

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI  
VIỆN VI SINH VẬT VÀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TRẦN LAN ĐÀI

NGHIÊN CỨU TĂNG CƯỜNG  
TÍNH KHÁNG BỆNH BẠC LÁ TRÊN GIỐNG LÚA TBR225  
BẰNG CÔNG NGHỆ CRISPR/Cas9

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

**Hà Nội – 2023**

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI  
VIỆN VI SINH VẬT VÀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TRẦN LAN ĐÀI

NGHIÊN CỨU TĂNG CƯỜNG  
TÍNH KHÁNG BỆNH BẠC LÁ TRÊN GIỐNG LÚA TBR225  
BẰNG CÔNG NGHỆ CRISPR/Cas9

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số : 9420201.01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. GS. TS. Phạm Xuân Hội
2. TS. Nguyễn Duy Phương

Hà Nội – 2023

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của các Thầy hướng dẫn, kế thừa Dự án: “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ chỉ thị phân tử và chỉnh sửa hệ gen trong chọn tạo giống lúa năng suất, chất lượng, chống chịu sâu bệnh và bất lợi ngoại cảnh”. Các kết quả nghiên cứu được trình bày trong luận án là trung thực, khách quan và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình khoa học nào khác.

Tôi xin cam đoan rằng mọi sự giúp đỡ cho việc hoàn thành luận án đã được cảm ơn, các thông tin trích dẫn trong luận án này đều được chỉ rõ nguồn gốc. Nếu có gì sai sót tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm.

Hà Nội, ngày 28 tháng 8 năm 2023

Nghiên cứu sinh

**Trần Lan Đài**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc tới **GS.TS. Phạm Xuân Hội** và **TS. Nguyễn Duy Phương** là những người thầy đã tận tình chỉ bảo, hướng dẫn, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt thời gian học tập, nghiên cứu để hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới các cán bộ, anh, chị, em trong Bộ môn Bệnh học Phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp đã nhiệt tình hỗ trợ và giúp đỡ tôi trong thời gian nghiên cứu tại Bộ môn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn **TS. Hoàng Văn Vinh** và **TS. Nguyễn Huỳnh Minh Quyên** cùng các thầy, cô giáo tại Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội đã truyền đạt những kiến thức quý báu trong thời gian tôi học tập tại Viện cũng như hỗ trợ tôi rất nhiều về các thủ tục hành chính trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Lãnh đạo trường Đại học Quy Nhơn, Khoa Khoa học Tự nhiên, Bộ môn Sinh học ứng dụng và Nông nghiệp đã tạo điều kiện cho tôi được đi học và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình làm việc và học tập.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn đến gia đình, bạn bè đã nhiệt tình động viên và tạo điều kiện tốt nhất để tôi có thể hoàn thành luận án này.

Hà Nội, ngày 28 tháng 8 năm 2023

Nghiên cứu sinh

**Trần Lan Đài**

## MỤC LỤC

<b>DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT .....</b>	<b>4</b>
<b>DANH MỤC BẢNG.....</b>	<b>6</b>
<b>DANH MỤC HÌNH.....</b>	<b>7</b>
<b>MỞ ĐẦU .....</b>	<b>9</b>
<b>Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. BỆNH BẠC LÁ LÚA VÀ VI KHUẨN <i>XOO</i> .....</b>	<b>13</b>
1.1.1. Bệnh bạc lá lúa.....	13
1.1.2. Vi khuẩn <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> .....	17
1.1.3. Các gen/QTL liên quan đến tính kháng bệnh bạc lá lúa.....	23
1.1.4. Nghiên cứu chọn tạo giống lúa kháng bạc lá dựa vào gen kháng.....	24
<b>1.2. VAI TRÒ CỦA HỌ GEN <i>SWEET</i> VÀ <i>TALE</i> TRONG MÔI TRƯỜNG TÁC GIỮA THỰC VẬT VÀ MÀM BỆNH .....</b>	<b>27</b>
1.2.1. Họ gen <i>SWEET</i> ở thực vật.....	27
1.2.2. Vai trò của gen <i>SWEET</i> trong môi trường tác giữa thực vật và mầm bệnh.....	28
1.2.3. Tương tác đặc hiệu giữa <i>TALE</i> và <i>SWEET</i> .....	31
1.2.4. Các gen nhiễm <i>OsSWEET</i> và <i>TALE</i> liên quan đến bệnh bạc lá lúa.....	33
<b>1.3. HỆ THỐNG CHỈNH SỬA GEN CRISPR/Cas9 VÀ ỨNG DỤNG TRONG CHỌN TẠO GIỐNG CÂY TRỒNG .....</b>	<b>36</b>
1.3.1. Giới thiệu về công nghệ chỉnh sửa gen .....	36
1.3.2. Hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9.....	37
1.3.3. Chỉnh sửa gen thực vật bằng hệ thống CRISPR/Cas9 .....	40
1.3.4. Ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas9 trong chỉnh sửa gen thực vật .....	45
<b>Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>51</b>
<b>2.1. VẬT LIỆU.....</b>	<b>51</b>
2.1.1. Mẫu thực vật.....	51
2.1.2. Chủng vi sinh vật .....	51
2.1.3. Vector và oligonucleotide .....	52
2.1.4. Hóa chất .....	52

2.1.5. Thiết bị .....	53
<b>2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>53</b>
2.2.1. Tách chiết, định lượng DNA/RNA .....	53
2.2.2. Nhân dòng và giải trình tự đoạn DNA đích.....	58
2.2.3. Gieo trồng lúa, nuôi cấy vi khuẩn và lây nhiễm bệnh nhân tạo.....	59
2.2.4. Phân lập và định danh vi khuẩn <i>Xoo</i> .....	61
2.2.5. Phân tích TALome của vi khuẩn <i>Xoo</i> .....	62
2.2.6. Thiết kế trình tự sgRNA.....	63
2.2.7. Thiết kế cấu trúc vector biểu hiện .....	63
2.2.8. Nuôi cấy <i>in vitro</i> và chuyển gen vào lúa TBR225.....	69
2.2.9. Phân tích các dòng lúa chuyển gen/chỉnh sửa gen.....	72
2.2.10. Xử lý số liệu thống kê .....	73
<b>Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>74</b>
<b>3.1. PHÂN LẬP VÀ NGHIÊN CỨU CƠ CHẾ GÂY BỆNH CỦA QUẦN THỂ</b> <b><i>XOO</i> Ở PHÍA BẮC VIỆT NAM TRÊN GIỐNG LÚA TBR225.....</b>	<b>74</b>
3.1.1. Phân lập <i>Xoo</i> từ một số tỉnh phía Bắc Việt Nam .....	74
3.1.2. Nghiên cứu tương tác phân tử giữa VXO và giống lúa TBR225 .....	78
<b>3.2. THIẾT KẾ CẤU TRÚC T-DNA CHỈNH SỬA PROMOTER <i>OsSWEET</i>...</b>	<b>87</b>
3.2.1. Thiết kế hệ thống CRISPR/Cas9 chỉnh sửa đa gen.....	87
3.2.2. Thiết kế vector mang cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa <i>SW13-TBR</i> và <i>SW14-TBR</i> .....	92
<b>3.3. TẠO DÒNG LÚA TBR225 CHỈNH SỬA <i>SW14-TBR</i>.....</b>	<b>105</b>
3.3.1. Tối ưu quy trình chuyển gen vào lúa TBR225 thông qua <i>A. tumefaciens</i> .....	106
3.3.2. Chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa <i>SW14-TBR</i> vào giống lúa TBR225 ...	110
3.3.3. Nghiên cứu kiểu gen của cây lúa TBR225 tái sinh được chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa <i>SW14-TBR</i> .....	112
3.3.4. Nghiên cứu đặc điểm kiểu gen và kiểu hình của các dòng lúa TBR225 chuyển vector chỉnh sửa <i>SW14-TBR</i> T <sub>1</sub> .....	117

3.3.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của đột biến <i>SW14-TBR</i> đến kiểu hình của dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen $T_2$ .....	120
<b>3.4. TẠO DÒNG LÚA TBR225 CHỈNH SỬA <i>SW13-TBR</i> VÀ <i>SW14-TBR</i>....</b>	<b>126</b>
3.4.1. Tạo chủng <i>A. tumefaciens</i> mang vector chỉnh sửa <i>SW13-TBR</i> và <i>SW14-TBR</i> .....	127
3.4.2. Chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa <i>SW13-TBR</i> và <i>SW14-TBR</i> vào giống lúa TBR225 .....	127
3.4.3. Nghiên cứu kiểu gen của cây lúa TBR225 tái sinh được chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa <i>SW13-TBR</i> và <i>SW14-TBR</i> .....	129
3.4.4. Nghiên cứu đặc điểm kiểu gen và kiểu hình của các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa <i>SW13-TBR</i> và <i>SW14-TBR</i> $T_1$ .....	132
<b>KẾT LUẬN .....</b>	<b>140</b>
<b>KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>141</b>
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....</b>	<b>143</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>144</b>
<b>PHỤ LỤC</b>	



## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
BAP	: 6-benzyl amino purine	Tên một loại chất điều hòa sinh trưởng thực vật
Cas	: CRISPR associated protein	Protein liên kết CRISPR
CRISPR	: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats	Nhóm trình tự lặp ngắn, đối xứng, cách đều nhau
crRNA	: CRISPR RNA	ARN nhóm trình tự lặp ngắn, đối xứng, cách đều nhau
DSB	: Double strand break	Đứt gãy sợi đôi
EBE	: Effector binding element	Yếu tố <i>cis</i> liên kết effector
GE	: Genome editing	Chỉnh sửa gen
Gen <i>R</i>	: Resistance gene	Gen kháng
Gen <i>S</i>	: Susceptibility gene	Gen nhiễm/gen mẫn cảm
HDR	: Homology-directed recombination	Tái tổ hợp tương đồng
HPT	: Hygromycin phosphotransferase	Tên một loại enzyme xúc tác
NIL	: Near isogenic line	Dòng cận đẳng gen
NHEJ	: Non-homologous end joining	Ghép nối tận cùng không tương đồng
PAM	: Protospacer adjacent motif	Trình tự gần protospacer
PCR	: Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi trùng hợp
QTL	: Quantitative trait locus	Locus tính trạng số lượng
RT-qPCR	: Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction	Phiên mã ngược và phản ứng chuỗi trùng hợp định lượng
RVD	: Repeat variable diresidue	Vị trí gốc axit amin siêu biến đổi và lặp lại
sgRNA	: Single guide RNA	RNA dẫn đường đơn phân tử
<i>SW13-TBR</i>	: Promoter region of <i>OsSWEET13</i> in rice cultivar TBR225	Promoter <i>OsSWEET13</i> của giống lúa TBR225

<i>SW14-TBR</i>	: Promoter region of <i>OsSWEET13</i> in rice cultivar TBR225	Promoter <i>OsSWEET14</i> của giống lúa TBR225
SWEET	: Sugar will eventually be exported transporter	Protein vận chuyển đường
T3SS	: Type III secretion system	Hệ thống tiết loại III
TALE	: Transcription activator-like effector	Effector tương tự yếu tố hoạt hóa phiên mã
TALEN	: Transcription activator-like effector nuclease	Effector tương tự yếu tố hoạt hóa phiên mã có hoạt tính nuclease
tracrRNA	: <i>Trans</i> -activating CRISPR RNA	RNA hoạt hóa CRISPR
VXO	: Vietnamese <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Vi khuẩn gây bệnh bạc lá được thu thập ở Việt Nam
<i>Xoo</i>	: <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Vi khuẩn gây bệnh bạc lá
ZFN	: Zinc finger nuclease	Nuclease ngón tay kẽm

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Mẫu lúa nhiễm bệnh bạc lá (2016-2018) sử dụng trong nghiên cứu.....	51
Bảng 2.2. Các chủng vi khuẩn <i>Xoo</i> sử dụng trong nghiên cứu.....	52
Bảng 2.3. Thang điểm đánh giá tính kháng/nhiễm bệnh bạc lá.....	62
Bảng 3.1. Danh sách isolate <i>Xoo</i> phân lập được ở phía Bắc Việt Nam.....	76
Bảng 3.2. Trình tự crRNA chỉnh sửa <i>SW13-TBR</i> và <i>SW14-TBR</i> .....	93
Bảng 3.3. Các trình tự DNA tương đồng với crRNA trong hệ gen lúa. ....	95
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của chất ĐHST tới khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo.....	107
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến hiệu quả biến nạp gen vào mô sẹo. ....	110
Bảng 3.6. Kết quả biến nạp cấu trúc pCas9/sgRNA-SW14 vào lúa TBR225. ....	112
Bảng 3.7. Kiểu gen <i>SW14-TBR</i> của các dòng lúa TBR225 chuyển gen T <sub>0</sub> . ....	116
Bảng 3.8. Phân ly di truyền của dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen T <sub>1</sub> .....	118
Bảng 3.9. Đánh giá kiểu hình của dòng lúa TBR225 chỉnh sửa <i>SW14-TBR</i> T <sub>1</sub> . ....	119
Bảng 3.10. Đánh giá chỉ tiêu nông học của dòng lúa đột biến <i>SW14-TBR</i> T <sub>2</sub> .....	120
Bảng 3.11. Kết quả biến nạp cấu trúc pCas9/SW13-SW14 vào lúa TBR225. ....	129
Bảng 3.12. Kết quả sàng lọc cây lúa TBR225 chuyển gen bằng PCR. ....	130
Bảng 3.13. Giải trình tự <i>SW13-TBR</i> và <i>SW14-TBR</i> của cây lúa chuyển gen T <sub>0</sub> . ....	131
Bảng 3.14. Sàng lọc các dòng lúa chỉnh sửa <i>SW13-TBR</i> và <i>SW14-TBR</i> T <sub>1</sub> .....	133
Bảng 3.15. Giải trình tự <i>SW13-TBR</i> và <i>SW14-TBR</i> dòng lúa chỉnh sửa gen T <sub>1</sub> ....	134
Bảng 3.16. Đánh giá tính kháng dòng lúa chỉnh sửa <i>SW13-TBR</i> và <i>SW14-TBR</i> ....	136
Bảng 3.17. Đánh giá kiểu hình dòng lúa chỉnh sửa <i>SW13-TBR</i> và <i>SW14-TBR</i> T <sub>1</sub> . ....	137

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Bản đồ phân bố bệnh bạc lá lúa trên thế giới.....	14
Hình 1.2. Triệu chứng điển hình của bệnh bạc lá lúa .....	15
Hình 1.3. Hình thái vi khuẩn <i>Xoo</i> .....	17
Hình 1.4. Vi khuẩn <i>Xoo</i> xâm nhập vào bên trong lá lúa .....	18
Hình 1.5. Vai trò của protein SWEET cung cấp chất dinh dưỡng cho mầm bệnh ...	29
Hình 1.6. Tạo cây trồng kháng bệnh thông qua chỉnh sửa gen SWEET .....	30
Hình 1.7. Tương tác đặc hiệu giữa TALE và EBE trên promoter của gen đích.....	32
Hình 1.8. Hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9.....	38
Hình 1.9. Cơ chế hoạt động của hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9.....	39
Hình 1.10. Các bước cơ bản trong chỉnh sửa gen thực vật bằng CRISPR/Cas9 .....	45
Hình 2.1. Lây nhiễm nhân tạo <i>Xoo</i> trên lúa bằng phương pháp cắt lá.....	60
Hình 2.2. Lây nhiễm nhân tạo <i>Xoo</i> trên lúa bằng phương pháp tiêm lá .....	61
Hình 2.3. Sơ đồ thiết kế vector pEN-V2.....	64
Hình 2.4. Sơ đồ thiết kế vector pEN-V1/sgRNA-SW13 .....	65
Hình 2.5. Sơ đồ thiết kế vector pEN-V2/sgRNA-SW14 .....	67
Hình 2.6. Sơ đồ thiết kế vector pEN/SW13-SW14.....	68
Hình 2.7. Sơ đồ thiết kế vector pCas9/SW13-SW14.....	69
Hình 3.1. Vi khuẩn <i>Xoo</i> được phân lập từ mẫu lúa bệnh.....	74
Hình 3.2. Định danh vi khuẩn phân lập bằng PCR đa môi .....	75
Hình 3.3. Độc tính của các isolate <i>Xoo</i> trên giống lúa TBR225 .....	77
Hình 3.4. Phân tích trình tự TALE AvrXa7 của isolate VXO .....	80
Hình 3.5. Phân tích trình tự TALE PthXo2 của isolate VXO.....	80
Hình 3.6. Biểu hiện của <i>OsSWEET</i> trong cây lúa TBR225 nhiễm <i>Xoo</i> .....	82
Hình 3.7. Phân lập <i>SW13-TBR</i> từ DNA tổng số .....	84
Hình 3.8. So sánh trình tự nucleotide của promoter <i>OsSWEET13</i> .....	85
Hình 3.9. So sánh trình tự EBE trên promoter <i>OsSWEET13</i> của các giống lúa.....	87
Hình 3.10. Thiết kế vector pEN-V0 .....	89
Hình 3.11. Thiết kế vector pEN-V2 .....	90

Hình 3.12. Giải trình tự vector pEN-V2 .....	90
Hình 3.13. Sơ đồ thiết kế hệ vector biểu hiện sgRNA chỉnh sửa đa gen.....	91
Hình 3.14. Cấu trúc bậc II của sgRNA .....	94
Hình 3.15. Vị trí trình tự crRNA chỉnh sửa <i>SW13-TBR</i> và <i>SW14-TBR</i> .....	96
Hình 3.16. Ghép nối <i>crRNA1-SW13</i> vào vector pEN-V1 .....	97
Hình 3.17. Ghép nối <i>crRNA2-SW13</i> vào vector pEN-V1/sgRNA1 .....	98
Hình 3.18. Ghép nối <i>crRNA1-SW14</i> vào vector pEN-V2 .....	99
Hình 3.19. Ghép nối <i>crRNA2-SW14</i> vào vector pEN-V2/sgRNA1 .....	100
Hình 3.20. Ghép nối cấu trúc [ <i>U6:sgRNA-SW14</i> ] vào pEN-V1/sgRNA-SW13 ....	101
Hình 3.21. Kiểm tra vector pCas9/SW13-SW14 .....	103
Hình 3.22. Giải trình tự vector pCas9/SW13-SW14 .....	104
Hình 3.23. Tái sinh chồi từ mô sẹo của lúa TBR225 .....	108
Hình 3.24. Đồng nuôi cấy mô sẹo lúa TBR225 với <i>A. tumefaciens</i> .....	109
Hình 3.25. Chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa <i>SW14-TBR</i> vào lúa TBR225 .....	111
Hình 3.26. Sàng lọc cây lúa chuyển gen bằng PCR.....	113
Hình 3.27. Trình tự <i>SW14-TBR</i> của các dòng lúa TBR225 chuyển gen T <sub>0</sub> .....	115
Hình 3.28. Hình thái cây lúa TBR225 chỉnh sửa <i>SW14-TBR</i> T <sub>2</sub> . .....	122
Hình 3.29. Biểu hiện của <i>OsSWEET14</i> trong dòng lúa chỉnh sửa <i>SW14-TBR</i> T <sub>2</sub> ..	123
Hình 3.30. Tính kháng bệnh bạc lá của dòng lúa chỉnh sửa <i>SW14-TBR</i> T <sub>2</sub> .....	124
Hình 3.31. Lây nhiễm VXO trên dòng lúa TBR225 chỉnh sửa <i>SW14-TBR</i> T <sub>2</sub> .....	126
Hình 3.32. PCR khuếch đại <i>A. tumefaciens</i> được biến nạp pCas9/SW13-SW14.....	127
Hình 3.33. Chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa <i>SW13-TBR</i> và <i>SW14-TBR</i> .....	128
Hình 3.34. Trình tự <i>SW13-TBR</i> và <i>SW14-TBR</i> của các dòng lúa chuyển gen T <sub>0</sub> ...	132
Hình 3.35. Lây nhiễm VXO dòng lúa chỉnh sửa <i>SW13-TBR</i> và <i>SW14-TBR</i> T <sub>1</sub> .....	136
Hình 3.36. Hình thái cây lúa TBR225 chỉnh sửa <i>SW13-TBR</i> và <i>SW14-TBR</i> T <sub>1</sub> .....	138

# MỞ ĐẦU

## 1. Đặt vấn đề

Bệnh bạc lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây ra, là một trong những bệnh hại nguy hiểm nhất trên lúa hiện nay, xuất hiện phổ biến ở nhiều quốc gia trồng lúa trên thế giới trong đó có Việt Nam. Bệnh gây hại chủ yếu ở vụ lúa Mùa khi điều kiện thời tiết ẩm ướt, nhiều sương mù và độ ẩm không khí cao. Thiệt hại do bệnh bạc lá lúa gây ra đã làm ảnh hưởng nặng nề đến sản lượng lúa gạo vào những năm xảy ra dịch bệnh. Ở một số tỉnh phía Bắc nước ta, TBR225 là giống lúa chủ lực có diện tích canh tác chiếm tỉ trọng khá lớn trong sản xuất lúa với nhiều ưu điểm như: chất lượng gạo thơm, ngon và cho năng suất khá cao. Tuy nhiên, nhược điểm lớn nhất của giống lúa này là mẫn cảm với bệnh bạc lá, dẫn đến năng suất bị ảnh hưởng nghiêm trọng khi xảy ra dịch bệnh. Vì vậy, bên cạnh những biện pháp phòng trừ bệnh như thay đổi phương thức canh tác, sử dụng thuốc hóa học hay biện pháp khống chế sinh học, nghiên cứu nâng cao khả năng kháng bệnh bạc lá trên giống lúa này là yêu cầu cấp thiết, giúp đảm bảo tính bền vững và hiệu quả của sản xuất lúa gạo ở các tỉnh phía Bắc Việt Nam.

Cho đến nay, cùng với những phương pháp lai tạo truyền thống, các phương pháp chọn giống chính xác mới dựa trên công nghệ sinh học hiện đại, bao gồm công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein 9), đang dần chứng minh được tính hiệu quả vượt trội trong các chương trình chọn/tao giống cây trồng kháng bệnh, có năng suất và chất lượng cao. Công nghệ CRISPR/Cas9 là một phát minh có ý nghĩa đặc biệt quan trọng đối với công nghệ sinh-y học nói chung và sinh học nông nghiệp nói riêng. Công nghệ này cho phép tạo đột biến có lợi ở bất cứ vị trí nào trong hệ gen một cách đơn giản và nhanh chóng; vì vậy được xem là một bước phát triển mang tính đột phá trong thao tác di truyền trên hệ gen sinh vật, đặc biệt đối với các ứng dụng cải tiến tính trạng nông sinh học cây trồng thông qua kiểm soát biểu hiện của (các) gen liên quan. Hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 mới ra đời gần 10 năm nhưng đã có những bước phát triển vượt bậc, được áp dụng rộng khắp trong

các nghiên cứu về cải tiến tính trạng nông sinh học của nhiều loại cây trồng nông nghiệp có giá trị quan trọng như lúa, ngô, đậu tương, cam, cà chua, thuốc lá...

Cơ chế gây bệnh bạc lá của vi khuẩn *Xoo* đã được chứng minh là có liên quan chặt chẽ với các TALE (Transcription activator-like effector) thuộc nhóm protein tiết loại III đặc trưng của vi khuẩn *Xoo*. TALE sau khi đi vào tế bào cây chủ sẽ hoạt động như một nhân tố phiên mã, liên kết với vùng promoter của gen nhiễm/gen mẫn cảm (susceptibility gene – gen *S*) và hoạt hóa sự biểu hiện của chúng, tạo điều kiện cho sự sinh trưởng của vi khuẩn hay phát triển triệu chứng bệnh. Một số gen thuộc họ *SWEET* (Sugar will eventually be exported transporter) - mã hóa protein vận chuyển đường ở lúa đã được chứng minh là gen *S* đối với vi khuẩn *Xoo*, bao gồm *OsSWEET11*, *OsSWEET13* và *OsSWEET14*. Nhiều đột biến (tự nhiên hay nhân tạo) xuất hiện tại vị trí TALE liên kết với promoter (gọi là EBE - effector binding element) của các gen *S* như vậy đã tạo nên tính kháng vi khuẩn *Xoo* cho cây lúa. Thực tế này đã cho thấy tiềm năng to lớn của việc ứng dụng công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 để can thiệp vào các gen *S* thuộc họ *OsSWEET* nhằm cải tiến tính kháng bệnh bạc lá cho các giống lúa phổ biến trong sản xuất như giống TBR225.

Với mục tiêu cải tiến tính kháng bệnh bạc lá cho giống lúa TBR225 bằng công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 dựa trên các nghiên cứu về tương tác phân tử giữa vi khuẩn *Xoo* và cây lúa, chúng tôi đã thực hiện đề tài “**Nghiên cứu tăng cường tính kháng bệnh bạc lá trên giống lúa TBR225 bằng công nghệ CRISPR/Cas9**”.

## **2. Mục tiêu nghiên cứu**

### **2.1. Mục tiêu chung**

Tăng cường tính kháng bệnh bạc lá của giống lúa TBR225 thông qua sử dụng công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 để gây đột biến chính xác các gen *S* có liên quan đến sự xâm nhiễm của vi khuẩn *Xoo*.

### **2.2. Mục tiêu cụ thể**

– Phân lập, nghiên cứu TALome và xác định được cơ chế gây bệnh trên giống lúa TBR225 của vi khuẩn *Xoo* thu thập từ các tỉnh phía Bắc Việt Nam.

– Thiết kế được cấu trúc biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa promoter *OsSWEET* trên giống lúa TBR225.

– Tạo được các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen mang đột biến có khả năng kháng vi khuẩn *Xoo* Việt Nam.

### **3. Đối tượng và nội dung nghiên cứu**

Đối tượng nghiên cứu của luận án là cây lúa TBR225 và vi khuẩn gây bệnh bạc lá *Xoo* ở Việt Nam (VXO)

Các nội dung nghiên cứu chính:

– Phân lập và nghiên cứu cơ chế gây bệnh của quần thể *Xoo* ở phía Bắc Việt Nam trên giống lúa TBR225.

– Thiết kế cấu trúc T-DNA chỉnh sửa promoter *OsSWEET*.

– Tạo dòng lúa TBR225 chỉnh sửa promoter *OsSWEET14* (*SW14-TBR*).

– Tạo dòng lúa TBR225 chỉnh sửa đồng thời hai promoter *OsSWEET13* (*SW13-TBR*) và *SW14-TBR*.

### **4. Những đóng góp mới của luận án**

Luận án là công trình đầu tiên ở Việt Nam thực hiện một cách có hệ thống về nghiên cứu cơ bản (cơ chế gây bệnh ở mức độ phân tử của vi khuẩn *Xoo* trên cây lúa TBR225) theo định hướng ứng dụng (cải tiến tính kháng bệnh bạc lá của giống lúa TBR225). Kết quả luận án đã cho thấy sự đa dạng của quần thể *Xoo* Việt Nam, ít nhất là về hệ protein tiết loại III TALE liên quan đến độc tính của vi khuẩn trên cây lúa. Kết quả nghiên cứu là nguồn tài liệu tham khảo tốt cho các nghiên cứu về đa dạng sinh học quần thể *Xoo* Việt Nam.

Trên cơ sở xác định *OsSWEET13* và *OsSWEET14* của giống lúa TBR225 là hai gen *S* chính của các isolate VXO, nghiên cứu đã gây đột biến các trình tự EBE *PthXo2(A)* và *AvrXa7* nằm trên hai gen này bằng công nghệ CRISPR/Cas9, kết quả thu được một số dòng lúa mang đột biến đơn gen và đa gen bất hoạt khi lây nhiễm với các isolate VXO đại diện. Như vậy, luận án đã thành công trong việc sử dụng hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 để tạo đột biến chính xác trên giống lúa TBR225 của Việt Nam. Đây là nguồn tài liệu tham khảo tốt cho công tác nghiên cứu liên quan đến chỉnh sửa gen bằng công nghệ CRISPR/Cas9.



## **5. Ý nghĩa thực tiễn của luận án**

Kết quả nghiên cứu của luận án lần đầu tiên tạo ra được các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen kháng phổ rộng với các isolate vi khuẩn gây bệnh bạc lá đại diện. Dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen kháng bạc lá phổ rộng này nếu phát triển có thể góp phần nâng cao năng suất cho giống lúa chủ lực ở phía Bắc Việt Nam nói riêng và cải thiện đời sống người dân nói chung.

Đây là một trong số ít những nghiên cứu ứng dụng công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 vào cải tạo tính kháng bệnh trên giống lúa thuần ở Việt Nam. Thành công của luận án đã mở ra triển vọng rất lớn về hướng nghiên cứu chỉnh sửa gen nhằm nâng cao năng suất, tính chống chịu và chất lượng của các giống cây trồng khác ở Việt Nam.

## Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

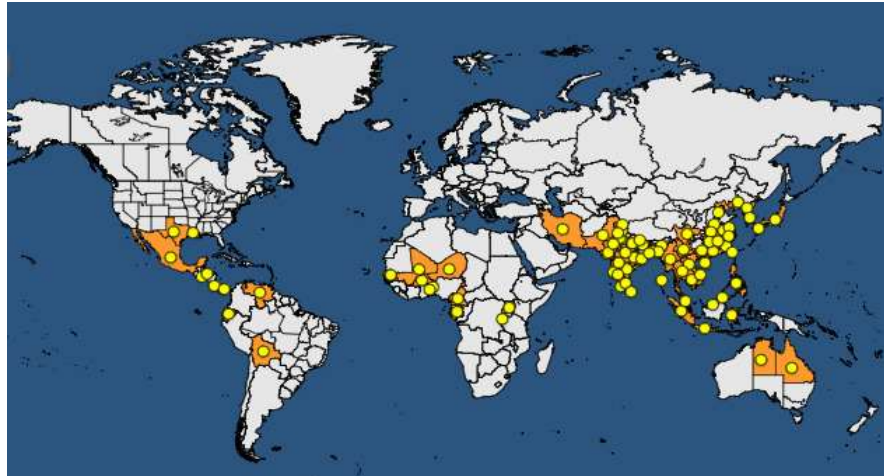
### 1.1. BỆNH BẠC LÁ LÚA VÀ VI KHUẨN *XOO*

#### 1.1.1. Bệnh bạc lá lúa

##### 1.1.1.1. Giới thiệu chung về bệnh bạc lá lúa

Bệnh bạc lá là một trong những bệnh hại lúa được phát hiện từ rất sớm, các nghiên cứu cho thấy nó xuất hiện đầu tiên ở Fukuoka, Nhật Bản vào năm 1884, sau đó dần lan rộng ra các vùng trồng lúa của nước này. Tại Trung Quốc, bệnh được ghi nhận sớm nhất vào những năm 1930 và phát triển rộng khắp mười tỉnh khác vào cuối những năm 1950. Tuy nhiên, bệnh bạc lá chưa thực sự được lưu tâm cho đến những năm 1970, khi có sự mở rộng gieo trồng các giống lúa lai và lúa cao sản, cũng như sử dụng một lượng lớn phân đạm vào canh tác. Bệnh bắt đầu phổ biến ở các nước châu Á khác trong thời kỳ này, bao gồm Ấn Độ, Philippines, Nepal, Indonesia, Sri Lanka và bắt đầu trở thành đại dịch ảnh hưởng đến nông nghiệp toàn cầu. Sau đó, bệnh cũng xuất hiện và gây hại cho các vùng trồng lúa ở Úc, Hoa Kỳ và các nước Tây Phi. Đến nay, bệnh bạc lá đã có mặt ở hầu hết các quốc gia trồng lúa trên thế giới [30, 91].

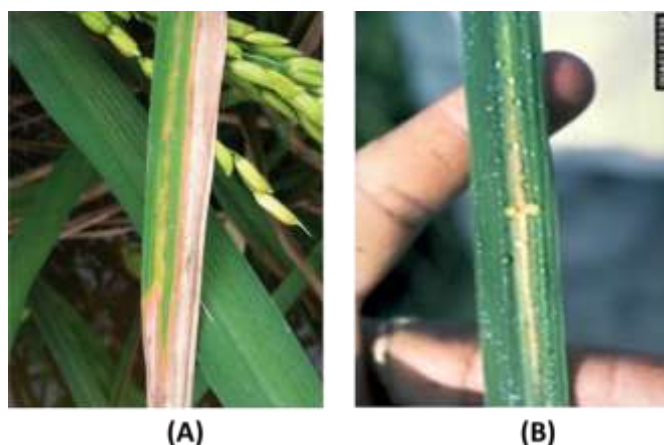
Thiệt hại sản lượng lúa do bệnh bạc lá gây ra lên đến 26% đối với các giống lúa mẫn cảm với bệnh. Vào những năm xảy ra dịch bệnh, Ấn Độ sụt giảm đến 60% sản lượng lúa; con số này ở Philippines là 22,5% [30]. Bệnh không chỉ ảnh hưởng đến năng suất mà còn làm giảm chất lượng gạo do tác động đến các quá trình chuyển hóa trong cây (hô hấp, quang hợp...) ở giai đoạn trổ bông, làm tăng tỉ lệ hạt lép, hạt dễ dập nát khi xay [63]. Riêng ở Việt Nam, theo số liệu Cục Bảo vệ thực vật, diện tích lúa nhiễm bệnh bạc lá năm 2013 là 72.343 ha; năm 2016 con số này lên đến 149.551 ha trong đó có 19.045 ha bị nhiễm nặng. Năm 2018, diện tích nhiễm bệnh bạc lá là 24.542 ha trong đó nhiễm nặng trên 1.592 ha [<http://ppd.gov.vn>]. Các số liệu thống kê này cho thấy mặc dù đã được phát hiện từ lâu nhưng cho đến nay, bệnh bạc lá vẫn được xếp là bệnh hại nghiêm trọng trong sản xuất lúa gạo không chỉ ở Việt Nam mà còn ở nhiều nước trên thế giới.



**Hình 1.1. Bản đồ phân bố bệnh bạc lá lúa trên thế giới**

**Ghi chú:** Bản đồ phân bố bệnh bạc lá lúa trên thế giới năm 2018. Vị trí phân bố bệnh bạc lá lúa được thể hiện bằng chấm màu vàng [62].

Nhiều nghiên cứu về bệnh bạc lá lúa đã bắt đầu được thực hiện từ những năm 1901 nhưng đến năm 1922 các nhà khoa học mới phát hiện được nguyên nhân gây bệnh là do vi khuẩn. Năm 1990, tác nhân gây bệnh bạc lá lúa được xác định là vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*). Bệnh bạc lá còn có một số tên gọi khác như bệnh BLB (bacterial leaf blight), bệnh kresek [114]. *Xoo* xâm nhiễm vào cây lúa thông qua các thủy khổng (hydathode) nằm ở ngọn và rìa lá. Vi khuẩn nhân lên trong khoảng gian bào của tế bào biểu mô có thành mỏng, sau đó đi vào mạch xylem, di chuyển dọc theo gân lá và lan rộng trong toàn bộ cây [73]. *Xoo* cũng có thể xâm nhập trực tiếp vào xylem tại các vết thương ở lá và rễ. Triệu chứng đầu tiên của bệnh bạc lá có thể quan sát thấy là những vết thâm nước ở ngọn lá và rìa lá; bệnh sẽ trở nên nghiêm trọng hơn khi các vết nước này lan rộng dọc theo gân lá. Các lá bị nhiễm bệnh trở nên úa vàng và hoại tử từ chóp lá đi theo gân lá và rìa lá (Hình 1.2A). Tại các vết tổn thương mới thường xuất hiện các giọt dịch chứa vi khuẩn rỉ ra trông giống như giọt sương có màu vàng đục (Hình 1.2B) [24]. Các triệu chứng của bệnh thường xuất hiện rõ ràng ở giai đoạn đẻ nhánh và trở nên trầm trọng nhất khi cây lúa bước vào giai đoạn trổ bông. Cây lúa mắc cảm với bệnh bạc lá ở giai đoạn cây con được gọi là kresek, là một biểu hiện bệnh bạc lá nặng hơn so với giai đoạn đẻ nhánh và trổ bông, trong đó toàn bộ lá trở nên vàng nhạt và héo, kết quả làm cho cây chết hoàn toàn và mất mùa nghiêm trọng [73].



**Hình 1.2. Triệu chứng điển hình của bệnh bạc lá lúa**

**Ghi chú:** (A) Lá lúa bị nhiễm bệnh với phần mô lá bị khô vàng dọc theo gân lá và mép lá. (B) Giọt dịch vi khuẩn rỉ ra trên vết tổn thương mới ở lá lúa bị nhiễm bệnh [24].

Bệnh bạc lá lúa có thể được kiểm soát bằng một số biện pháp canh tác như: sử dụng hạt giống sạch bệnh, dọn dẹp cỏ dại, rom rạ, lá bị nhiễm bệnh trước khi gieo cấy; khoảng cách cây phù hợp; bón phân hợp lý, tránh dư thừa nitrogen, bón cân đối N-P-K; xây dựng hệ thống cấp thoát nước tốt trong ruộng... Các biện pháp vật lý như ngâm hạt giống trong dung dịch agrimycin 0,07% trong 12 giờ và hấp cách thủy ở 54°C trong 30 phút có thể loại trừ được 95-100% vi khuẩn *Xoo*. Ngoài ra, phương pháp xử lý hạt giống 30 phút ở 52°C trước khi ngâm hạt 8-10 giờ cũng có hiệu quả phòng bệnh đáng kể [106].

Đã có nhiều nghiên cứu được thực hiện trong đó xác định hiệu quả của sự kết hợp các hóa chất khác nhau để quản lý bệnh hại và giảm thất thoát năng suất cây trồng. Sự kết hợp các loại kháng sinh với các nồng độ khác nhau nhằm ức chế bệnh bạc lá đã được khuyến cáo bởi các nhà nghiên cứu, cụ thể sự kết hợp của streptomycine (streptomycin sulphat + tetracycline hydrochloride, 9:1) 0,5% và copper oxychloride 2,5% cho hiệu quả cao nhất khi thử nghiệm trên đồng ruộng [95]. Ngoài ra, một số loại hóa chất mới như Amistar 0,1%, Nativo 75 WG 0,65% cũng cho thấy hiệu quả đối với bệnh bạc lá lúa trong những năm gần đây [106]. Tuy nhiên, việc sử dụng các loại thuốc hóa học thường gây hại cho sức khỏe con người và có thể ảnh hưởng đến sự cân bằng trong hệ sinh thái. Cùng với đó, khi sử dụng hóa chất trong thời gian dài có thể dẫn đến sự xuất hiện của các chủng vi khuẩn kháng thuốc. Do đó, kiểm soát dịch bệnh bằng hóa chất không phải là giải pháp mang lại hiệu quả cao và lâu dài.

Kiểm soát sinh học mầm bệnh thực vật bằng các vi sinh vật đối kháng được biết đến là một phương pháp kinh tế, hiệu quả và thân thiện với môi trường để quản lý dịch hại cây trồng. *Pseudomonas* sp., *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp. là những vi sinh vật đối kháng được biết đến với khả năng làm giảm bệnh cây do nấm và vi khuẩn trong đó có bệnh bạc lá [63].

Giải pháp nhằm xây dựng chiến lược kiểm soát bệnh bạc lá lâu dài chủ đạo và hiệu quả nhất vẫn cần phải kể đến là chọn/ tạo được các giống lúa mang các gen kháng bệnh. Chiến lược này không những mang lại hiệu quả kinh tế mà còn góp phần làm giảm thiểu ảnh hưởng tiêu cực đến môi trường. Chính vì vậy, giải pháp này đã thu hút được sự chú trọng đầu tư nghiên cứu từ nhiều quốc gia khác nhau trên thế giới [88, 93]. Tuy nhiên, các nhóm quần thể vi khuẩn *Xoo* kháng lại gen kháng bệnh cũng phát triển rất nhanh, điều này tiếp tục đặt ra thách thức cho công tác phòng chống dịch bệnh bạc lá lúa [18, 50].

#### *1.1.1.2. Giống lúa TBR225 miễn cảm với bệnh bạc lá lúa*

TBR225 là giống lúa thuần chất lượng do tác giả Trần Mạnh Báo và cộng sự lai tạo, chọn lọc và được công nhận giống Quốc gia vào năm 2015. Đây là giống lúa cảm ôn, ngắn ngày, thích ứng rộng, đẻ nhánh khỏe và chịu thâm canh. Năng suất trung bình đạt 70-75 tạ/ha, nếu thâm canh tốt con số này có thể đạt 85-90 tạ/ha. Thời gian sinh trưởng của TBR225 ở vụ Xuân từ 120-125 ngày và vụ Mùa từ 105-110 ngày. Giống lúa này có chiều cao cây 110-115 cm, cứng cây, trổ bông tập trung; bông to, dài, nhiều hạt; hạt thon dài, khối lượng 1.000 hạt trung bình 24-25 gam. TBR225 có tỉ lệ gạo xay xát cao (72-74%), hàm lượng amylose thấp (13,7%), chất lượng gạo ngon, gạo trắng, cơm mềm, vị đậm, có mùi thơm đặc trưng. Với những ưu điểm về năng suất, chất lượng đã đề cập trên nên giống lúa này trở thành một trong những giống lúa được canh tác phổ biến và ưa chuộng ở các tỉnh phía Bắc Việt Nam [1, 11].

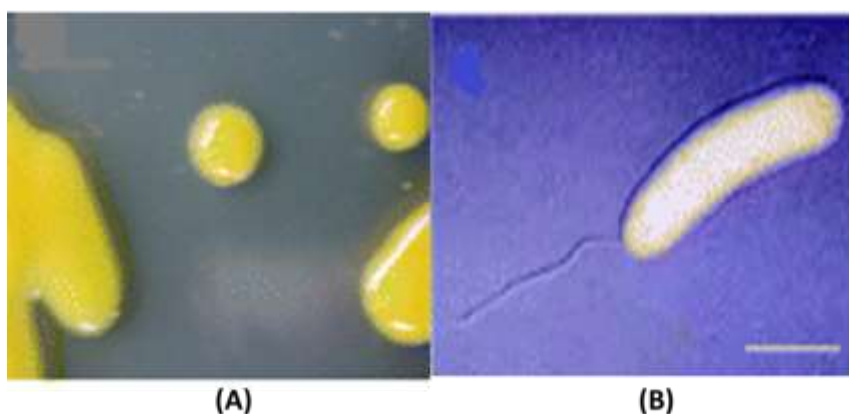
Bên cạnh những ưu điểm trên, giống lúa TBR225 vẫn có nhược điểm là miễn cảm với một số loại sâu bệnh hại, trong đó có bệnh bạc lá, dẫn đến năng suất bị ảnh hưởng nghiêm trọng. Chính vì vậy, nghiên cứu cải tạo khả năng kháng bệnh bạc lá của một trong những giống lúa chủ lực này có ý nghĩa thực tiễn rất lớn đối với sản xuất lúa gạo của miền Bắc nói riêng và Việt Nam nói chung.

## 1.1.2. Vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

### 1.1.2.1. Giới thiệu chung về *Xoo*

Tác nhân gây ra bệnh bạc lá lúa là vi khuẩn *Xoo*. Vi khuẩn này trước đây còn có một số tên gọi khác như *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, *Xanthomonas itoana*, *Xanthomonas kresek*, *Xanthomonas translucens* f. sp. *oryzae*. Năm 1990, Swings đã thống nhất cách đặt tên cho loài vi khuẩn gây bệnh bạc lá lúa là *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [106, 114]. Trong hệ thống phân loại, vi khuẩn bệnh bạc lá lúa thuộc giới vi khuẩn Bacteria, ngành Proteobacteria, lớp Gammaproteobacteria, bộ Xanthomonadales, họ Xanthomonadaceae, chi *Xanthomonas* [106]. *Xanthomonas* là một chi lớn trong họ Xanthomonadaceae, các thành viên thuộc chi này gây bệnh trên nhiều loài thực vật, bao gồm cả thực vật hai lá mầm và một lá mầm. Đặc biệt, các loài thuộc chi *Xanthomonas* có tính đặc hiệu vật chủ và mô rất cao. Ví dụ, *Xanthomonas campestris* lây nhiễm và gây bệnh trên các loài thực vật thuộc họ Cải (Brassicaceae), họ Cà (Solanaceae); *Xanthomonas oryzae* là loài gây bệnh đặc trưng ở lúa (*Oryza* spp.) và một số loài khác thuộc họ Hòa thảo (Poaceae) [85].

*Xoo* là vi khuẩn Gram âm, tế bào có hình que, có khả năng di chuyển bằng roi. Khi nuôi cấy trên môi trường thạch chứa glucose, khuẩn lạc *Xoo* có màu vàng do sản xuất sắc tố xanthomonadin (Hình 1.3A). Tế bào *Xoo* sản xuất ra các polysaccharide ngoại bào, điều này rất quan trọng để hình thành các giọt dịch tiết vi khuẩn trên lá bị nhiễm bệnh, bảo vệ vi khuẩn không bị khô và hỗ trợ sự phát tán của chúng. Vi khuẩn này phát triển tối ưu ở môi trường có nhiệt độ từ 25 - 30°C [91].

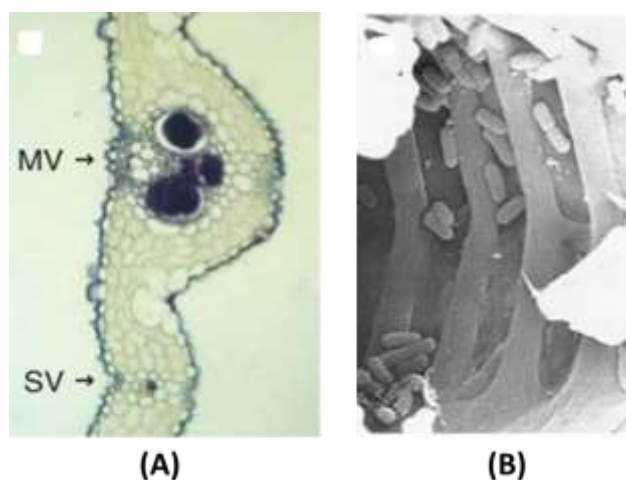


**Hình 1.3. Hình thái vi khuẩn *Xoo***

**Ghi chú:** (A) Khuẩn lạc vi khuẩn *Xoo* (B) Tế bào vi khuẩn *Xoo* được chụp bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (transmission electron microscope). Thanh đo (bar) = 1  $\mu$ m [91].

#### 1.1.2.2. Cơ chế gây bệnh bạc lá của vi khuẩn *Xoo*

Vi khuẩn *Xoo* xâm nhập vào cây lúa qua các vết thương ở lá, rễ và qua lỗ bài tiết nước ở mép lá để đi vào hệ mạch, sau đó di chuyển trong cây và gây ra tổn thương trên lá (Hình 1.4). Sau khi phát bệnh, vi khuẩn có thể phát tán theo nước mưa, nước lụt, nước tưới tiêu, gió... và gây ra sự lây lan rộng rãi trên đồng ruộng. Do đó, điều kiện thời tiết ẩm ướt, nhiều mưa, bão rất thuận lợi cho bệnh bạc lá phát sinh và lây lan. Đối với những vùng gieo cấy giống lúa mẫn cảm với vi khuẩn *Xoo*, bệnh rất dễ phát sinh thành dịch và rất khó kiểm soát trên diện rộng. Bệnh nặng khiến lá lúa cháy, đặc biệt lá đòng cháy sẽ làm tỉ lệ hạt lúa lép lửng cao, giảm năng suất nghiêm trọng. Mầm bệnh *Xoo* có thể tồn tại trong đất từ một đến hai tháng. Ngoài ra, *Xoo* có thể còn tồn dư trong rơm rạ, lúa chết và cỏ dại ký chủ thuộc họ Hòa thảo (Ponaceae). Khi gặp độ ẩm thích hợp, vi khuẩn sẽ được kích hoạt và sinh trưởng. Hạt giống của các cây lúa bị nhiễm bệnh cũng là một nguồn chứa mầm bệnh [73].



**Hình 1.4. Vi khuẩn *Xoo* xâm nhập vào bên trong lá lúa**

**Ghi chú:** (A) Mặt cắt ngang lá lúa bị nhiễm *Xoo*; tế bào *Xoo* nhuộm màu tím trong các mạch xylem của gân lá chính (MV) và gân lá phụ (SV). (B) Ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử tế bào *Xoo* trong mạch xylem của lá lúa bị nhiễm bệnh. Thanh đo (bar) = 1  $\mu\text{m}$  [91].

Cơ chế gây bệnh của vi khuẩn *Xoo* trên lúa khá phức tạp, với sự tham gia của ít nhất 245 gen trong hệ gen của vi khuẩn này. Sự biểu hiện phân tử tín hiệu DSF (diffusible signal factor – yếu tố tín hiệu khuếch tán), được xem là một bước khởi đầu đặc biệt quan trọng của quá trình gây bệnh trên cây chủ của vi khuẩn. Phân tử

này hoạt động như một yếu tố điều hòa then chốt, kiểm soát sự biểu hiện của hàng loạt các yếu tố tham gia vào quá trình xâm nhiễm và gây bệnh của *Xoo*, bao gồm khả năng bám dính, thu nhận dinh dưỡng từ cây chủ, chống chịu các stress từ môi trường bên trong cây chủ, truyền tín hiệu, phiên mã và biểu hiện các yếu tố gây độc; tất cả các yếu tố này tạo nên sự thích nghi của vi khuẩn với môi trường bên trong cây chủ và tạo thuận lợi cho quá trình lây nhiễm [74].

Tương tự các loài *Xanthomonas* khác, *Xoo* có ba nhóm gen trong hệ gen liên quan đến khả năng gây bệnh. Nhóm thứ nhất bao gồm các gen *rfp* (regulation of pathogenicity – điều hòa khả năng gây bệnh) tham gia điều hòa quá trình tổng hợp các yếu tố gây bệnh. Nhóm thứ hai là các gen *xps*, mã hóa hệ thống tiết loại II (T2SS - type II secretion system). Nhóm thứ ba bao gồm các gen *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity - đáp ứng quá mẫn và gây bệnh) mã hóa hệ thống tiết loại III (T3SS - type III secretion system). Bên cạnh các protein cấu trúc của T3SS, nhóm gen *hrp* còn mã hóa cho các protein điều hòa T3SS, được gọi là effector loại III (type three effector – T3E), và một số protein ngoại bào. Do T3E có thể được truyền từ tế bào vi khuẩn sang tế bào cây chủ nên chúng có vai trò rất quan trọng đối với khả năng gây bệnh trên cây chủ của vi khuẩn. T3E của *Xoo* có thể gây ra nhiều loại bệnh ở thực vật, động vật và con người. Chính vì vậy, T3E được đặc biệt quan tâm nghiên cứu để hiểu rõ quá trình tương tác giữa cây chủ và mầm bệnh trong chiến lược chọn/tạo cây trồng kháng bệnh [73].

Mỗi chủng *Xanthomonas* cụ thể có số lượng T3E khác nhau, từ vài effector đến vài chục effector [108]. T3E do *Xanthomonas* spp. tiết ra được chia thành 2 loại: TALE (transcription activator-like effector) và non-TALE (không phải protein TALE). So với các non-TALE, TALE được quan tâm nghiên cứu nhiều hơn. Các TALE thường có cấu trúc bảo thủ đặc trưng. Một số TALE đã được chứng minh có vai trò quan trọng đối với độc tính của *Xoo* trên cây chủ. Các TALE này hoạt động như những nhân tố phiên mã hoạt hóa gen cây chủ để cung cấp chất dinh dưỡng cho vi khuẩn *Xoo* sinh trưởng, phát triển trong tế bào [67] hay ức chế hệ thống phòng vệ đáp ứng mầm bệnh của tế bào chủ [75]. Ngược lại, non-TALE là các protein có cấu



trúc và chức năng rất đa dạng. Riêng chủng *Xoo* Philippines PXO99<sup>A</sup> có tới 18 non-TALE đã được xác định; trong đó 16 non-TALE có khả năng hoạt hóa các promoter thực vật, một non-TALE *XopZ* đã được chứng minh là có liên quan đến độc lực của PXO99<sup>A</sup> [108]. Bên cạnh đó, các đáp ứng miễn dịch và phòng vệ cơ bản ở lúa nhằm phản ứng lại sự tấn công của *Xoo* có thể bị ngăn chặn bởi T3E như *XopQ*, *XopR*, *XopN*, *XopX* và *XopZ*. Gần đây, nghiên cứu của Deb và cộng sự (2020) cũng cho thấy một số effector như *XopU*, *XopV*, *XopP*, *XopG*, và *AvrBs2* có thể phá vỡ sự hoạt hóa đáp ứng miễn dịch ở lúa của *XopQ*-*XopX* [67].

Các enzyme ngoại bào như cellulase, xylanase, xylosidase, protease, pectin-esterase, pectate lyase, polygalacturonase và 1,4-b-cellobiosidase được tiết ra thông qua T2SS chịu trách nhiệm phân hủy tế bào cây chủ và được mầm bệnh sử dụng như một nguồn dinh dưỡng quan trọng [67]. Ngoài ra, một số phân tử như RTX (repeat in toxin), axit 3-methylthio-propionic, axit phenylacetic (PAA), và axit trans-3-methyl-thio-acrylic (MTAA) do *Xoo* tạo ra gây ra hiện tượng héo xanh và úa vàng ở cây lúa sau khi vi khuẩn xâm nhập vào trong cây [67]. Lee và cộng sự (2017) đã phát hiện thấy các gen mã hóa TALE, gen liên quan đến tổng hợp protein và transposase được tăng cường biểu hiện trong quá trình tương tác giữa *Xoo* và cây lúa [75]. Ngoài ra, có một số gen quan trọng khác cũng được tăng cường biểu hiện như gen mã hóa protease (phân hủy các protein trong hệ thống phòng vệ của cây chủ) và gen *TonB* (liên quan đến sự hấp thu chất dinh dưỡng của vi khuẩn), điều này cho thấy tầm quan trọng của các sản phẩm protein của chúng trong quá trình lây nhiễm và gây bệnh của vi khuẩn *Xoo* trên lúa [67].

#### 1.1.2.3. Đa dạng sinh học các chủng *Xoo* ở Việt Nam

Vi khuẩn *Xoo* rất phong phú và đa dạng về thành phần nòi (race) và chủng (strain). Việc phân chia *Xoo* thành các nòi sinh lý thường phải dựa trên độc tính gây bệnh của chúng trên các giống lúa khác nhau. Tuy nhiên, do đặc thù của mỗi quốc gia gieo trồng các giống lúa khác nhau nên khó phân nhóm và so sánh các nòi sinh lý giữa các quốc gia; vì vậy các nhà khoa học của Viện Nghiên cứu lúa Quốc tế (IRRI) và Nhật Bản đã xây dựng một hệ thống các dòng lúa “chuẩn” phục vụ cho

mục đích này. Hệ thống này bao gồm một bộ các dòng lúa cận đẳng gen (near isogenic line - NIL) được tạo ra thông qua phương pháp lai chuyển các gen kháng bạc lá vào nền di truyền của ba giống lúa IR24, Toyonishiki và Milyang 23. Trên cơ sở hệ thống phân loại này, Nhật Bản, Philippines và Indonesia đã xác định được lần lượt có 5, 6 và 9 nhóm vi khuẩn *Xoo* [2].

Tại Việt Nam, Tạ Minh Sơn và cộng sự đã có những nghiên cứu bước đầu về thành phần nòi vi khuẩn gây bệnh bạc lá vào năm 1987 và đã xác định được có bốn nhóm phổ biến. Trong đó, nhóm I tập trung ở các tỉnh đồng bằng Bắc Bộ; nhóm II tập trung ở các tỉnh đồng bằng Nam Bộ; nhóm III và nhóm IV phân bố rải rác trong cả nước. So với thành phần nòi vi khuẩn *Xoo* ở Nhật Bản, nòi vi khuẩn *Xoo* ở Việt Nam rất khác biệt. Một số nhóm nòi ở Philippines và Indonesia cũng được tìm thấy ở Việt Nam. Nhóm II ở Việt Nam tương tự như nhóm IV của Philippines; nhóm IV ở Việt Nam tương tự nhóm I ở Philippines hay nhóm B ở Indonesia. Như vậy, thành phần nhóm nòi vi khuẩn gây bệnh bạc lá ở Việt Nam thể hiện tính đa dạng và phức tạp hơn ở các nước khác [2].

Khi nghiên cứu về thành phần nòi của quần thể vi khuẩn *Xoo* gây bệnh bạc lá ở vùng đồng Bằng Sông Hồng, tác giả Lưu Văn Quyết (1999) đã sử dụng bộ giống chuẩn quốc tế khác thay cho các dòng NIL và xác định được 7 nhóm từ I - VII. Trong đó, nhóm I gây nhiễm với các giống DV85, Zenith, BJ1, Nigeria và IR20. Nhóm II gây nhiễm với các giống Kuntlan, IR1545, Chugoku, IR346, IR8, Tẻ Tép, Cas209, IR24, Milyang46 và Kinmaze. Nhóm III gây nhiễm trên các giống IR1545, Chugoku, Kogyoku, IR346, IR8, Tẻ Tép, Cas209, IR24, Milyang46 và Kinmaze. Nhóm IV gây nhiễm trên các giống Kogyoku, IR346, IR8, Tẻ Tép, Cas209, IR24, Milyang46 và Kinmaze. Nhóm V gây nhiễm trên các giống IR346, IR8, Tẻ Tép, Cas209, IR24, Milyang46 và Kinmaze. Nhóm VI gây nhiễm trên giống Chugoku, IR24, Milyang46 và Kinmaze. Sử dụng các dòng NIL, Phan Hữu Tôn và Bùi Trọng Thủy (2003) đã phân loại 64 chủng (isolate) *Xoo* thu thập từ các vùng sinh thái khác nhau thành 12 nhóm, bao gồm: 1, 2A, 2B, 3A, 3B, 4, 5A, 5B, 6, 7, 8, 10. Các tác giả đã xác định nhóm 2 (A và B) phân bố phổ biến ở hầu hết các vùng trồng lúa (73,8%), trong khi các nhóm còn lại phân bố tùy từng vùng sinh thái. Năm 2005, tác

giả Bùi Trọng Thủy đã xác định được 12 nhóm vi khuẩn bạc lá có mặt ở miền Bắc Việt Nam. Đến năm 2008, Nguyễn Văn Việt và cộng sự đã xác định được 13 nòi vi khuẩn gây bạc lá hiện diện ở các vùng trồng lúa miền Bắc Việt Nam [2].

Hoang và cộng sự (2008) đã phân lập được 41 chủng (isolate) vi khuẩn *Xoo* từ 10 giống lúa nhiễm bệnh bạc lá tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long và phân thành 6 nhóm khác nhau từ A đến F. Nhóm A, E và F chiếm ưu thế ở 6 - 8 tỉnh; trong khi nhóm B, C và D chỉ có mặt ở 3 - 5 tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long [53].

Tại miền Bắc Việt Nam, nhóm nghiên cứu của Furuya và cộng sự (2012) đã tiến hành khảo sát sự phân bố của vi khuẩn *Xoo*. Kết quả đánh giá độc tính của 84 chủng trên 11 dòng NIL đã xác định được 4 nhóm G1, G2, G3 và G4; trong đó nhóm G2 và G3 phân bố rộng rãi hơn so với hai nhóm còn lại [50].

Năm 2016, tác giả Lưu Văn Quyết và cộng sự, đã phân lập vi khuẩn *Xoo* ở các tỉnh phía Bắc và phân thành 3 nhóm. Nhóm I phân bố ở Yên Đông - Ý Yên - Nam Định, nhóm II phân bố ở Bắc Giang, Hà Nội, Hòa Bình, Hải Dương, Nghệ An và nhóm III phân bố ở Hải Dương, Thanh Hóa. Trong đó, nhóm II có độc tính mạnh và phổ xuất hiện rộng hơn nhóm I và III [15].

Đa dạng sinh học các chủng vi khuẩn *Xoo* tại Cần Thơ cũng được báo cáo bởi nhóm nghiên cứu của Tran và cộng sự (2017). Trên cơ sở phân tích 126 chủng vi khuẩn gây bệnh bạc lá phân lập được tại các vùng trồng lúa tỉnh này, tác giả đã chia quần thể *Xoo* thành 4 nòi 5, 7, 5\* và 5\*\*, trong đó nòi 5 và 7 là những nòi đã xuất hiện từ trước, 5\* và 5\*\* là nòi mới và chiếm ưu thế hơn cả [116].

Mới đây, nhóm nghiên cứu của Nguyễn Thị Tho và cộng sự (2022) tại Viện Bảo vệ thực vật đã phân lập được 47 isolate *Xoo* từ các tỉnh đồng bằng sông Hồng và nhận thấy khả năng gây bệnh của các mẫu vi khuẩn thu thập được có sự biến động rất lớn. Dựa vào kết quả đánh giá độc tính của các isolate *Xoo* trên 28 giống lúa chỉ thị mang gen kháng bạc lá từ IRRI, các tác giả đã phân chia các isolate này thành 4 nhóm khác nhau. Đáng chú ý là, trong số các isolate này có đến 56,2% có khả năng vượt qua các dòng đơn gen kháng; 26,8% các isolate vượt qua các dòng mang 2 gen kháng và 17% các isolate có khả năng vượt qua các dòng mang tổ hợp

3-5 gen kháng [18]. Điều này đặt ra những thách thức lớn cho công tác chọn/tao giống lúa kháng bệnh bạc lá hiện nay.

Tóm lại, những kết quả nghiên cứu trên cho thấy thành phần các chủng vi khuẩn *Xoo* ở Việt Nam rất đa dạng và phong phú, đồng thời có sự biến động theo thời gian. Do đó việc chọn/tao các giống lúa có khả năng kháng phổ rộng và bền vững với các chủng vi khuẩn này trở thành hướng đi mang tính chiến lược.

### 1.1.3. Các gen/QTL liên quan đến tính kháng bệnh bạc lá lúa

Sau khi Sagaguchi và cộng sự (1967) lần đầu tiên công bố về gen kháng (*Resistance gene* – gen *R*) *Xoo* ở lúa, cho đến nay đã có hơn 46 gen mã hóa các thụ thể liên quan tới miễn dịch đã được xác định trong đó một số gen kháng đã được định vị nhờ các chỉ thị phân tử liên kết chặt với chúng (Phụ lục 1). Các gen này được đặt tên với tiền tố “*Xa*” kèm theo số thứ tự. Hai mươi chín gen trong số các gen *Xa* này, điển hình là các gen *Xa1*, *Xa3/Xa26* và *Xa27*, là các gen kháng trội, được biểu thị bằng chữ “*X*” viết hoa. Mười bảy gen trong số đó, bao gồm: *xa5*, *xa8*, *xa13*, *xa15*, *xa19*, *xa20*, *xa24*, *xa25(t)*, *xa26(t)*, *xa28(t)*, *xa31(t)*, *xa32(t)*, *xa34(t)*, *xa41(t)*, *xa42*, *xa44(t)* và *xa45(t)*, là các gen kháng lặn và được biểu thị bằng chữ “*x*” thường. Mười một trong số các locus *Xa*, bao gồm *Xa1*, *Xa3/Xa26*, *Xa4*, *xa5*, *Xa10*, *xa13*, *Xa21*, *Xa23*, *xa25(t)*, *Xa27(t)* và *xa41(t)* đã được phân lập và nghiên cứu chức năng, giúp các nhà nghiên cứu có được hiểu biết sâu sắc về cơ chế phân tử của tương tác giữa cây chủ và mầm bệnh. Một số ít, ví dụ như *Xa21*, đã được nghiên cứu khá chi tiết, từ đó cung cấp thông tin phong phú, mặc dù vẫn chưa đầy đủ, liên quan đến việc truyền tín hiệu qua trung gian protein *Xa*, qua đó gợi ý về các hướng tiếp cận mới để phát triển các giống lúa kháng bệnh [49, 73].

Cấu trúc của các protein *Xa/xa* rất đa dạng. Các gen *R* này được xác định mã hóa cho các loại protein khác nhau, cho thấy các gen này có cơ chế khác nhau trong việc tạo ra tính kháng đối với vi khuẩn *Xoo*. *Xa21* và *Xa3/Xa26* mã hóa thụ thể kinase mang các vùng lặp lại giàu leucine (leucine-rich repeat – LRR) [109, 113]. *Xa1* và *xa5* lần lượt mã hóa protein mang vùng liên kết nucleotide, vùng LRR và tiểu đơn vị  $\gamma$  của yếu tố phiên mã IIA [60, 129]. Các biến thể của trình tự tạo ra alen kháng *Xa27*, *xa13*, *xa25* và *xa41(t)* được xác định nằm ở vùng promoter của gen

chức năng. Mô hình biểu hiện của các gen *Xa/xa* cũng rất khác nhau. Trong khi *xa5* và *xa13* được biểu hiện liên tục; *Xa1*, *Xa3/Xa26*, *Xa21* và *Xa27* chỉ được biểu hiện khi cây bị lây nhiễm mầm bệnh [39, 60, 73]. Sự biểu hiện quá mức của các gen *Xa* dẫn đến kết quả tăng cường tính kháng bệnh. Sự đa dạng trong cấu trúc và mô hình biểu hiện chứng tỏ cơ chế kháng bệnh ở lúa rất phức tạp và có tính đặc hiệu nòi/chủng *Xoo*.

#### **1.1.4. Nghiên cứu chọn tạo giống lúa kháng bạc lá dựa vào gen kháng**

##### *1.1.4.1. Nghiên cứu chọn tạo giống lúa kháng bạc lá trên thế giới*

Sử dụng giống lúa kháng bệnh bạc lá là chiến lược phổ biến nhất hiện nay để kiểm soát bệnh dịch bởi tính kinh tế và an toàn môi trường. Chọn giống bằng chỉ thị phân tử (marker-assisted selection - MAS) và chuyển gen là hai hướng tiếp cận chính trong các chương trình chọn giống lúa kháng bệnh bạc lá sử dụng gen *R* [66]. Tuy nhiên, những tranh cãi về vấn đề an toàn thực phẩm và những hạn chế về quy định ở một số quốc gia đã cản trở nghiêm trọng việc áp dụng các giống cây trồng biến đổi gen, dẫn tới phương pháp chuyển gen được sử dụng khá hạn chế trong các chương trình chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá, thay vào đó, chủ yếu để phục vụ các nghiên cứu chức năng gen. Ví dụ, Hummel và cộng sự (2012) đã chuyển gen *Xa27* mang vùng promoter được cải biến vào giống lúa Kitakee và tạo ra tính kháng phổ rộng với cả *Xoo* and *Xoc* [57]. Gần đây nhất, Lu và cộng sự (2022), đã xác định một gen kháng mới (đặt tên là *Xa47*) thông qua chuyển gen này vào giống lúa JG30; cây chuyển gen có tính kháng phổ rộng với 9 chủng *Xoo* được nghiên cứu [57]. Do những hạn chế của phương pháp chuyển gen, cho đến nay, MAS vẫn được các nhà chọn giống phân tử ưu tiên sử dụng hơn cả.

Nhờ ứng dụng MAS, các nhà nghiên cứu đã chuyển được gen *R* vào các giống lúa phổ biến trong sản xuất để nâng cao tính kháng. Ví dụ, nghiên cứu đưa gen *Xa21* vào dòng phục chế ưu tú Minghui 63 của Chen và cộng sự (2000) là báo cáo đầu tiên về việc sử dụng chỉ thị phân tử để cải thiện khả năng kháng bạc lá của các giống lúa lai [36]. Reinke và cộng sự (2018) cũng đã đưa gen *Xa40* (sử dụng chỉ thị ID55.WA3 và RM1233) vào giống lúa mẫn cảm với bệnh bạc lá Junam của Hàn Quốc bằng phương pháp lai trở lại [102].

Trong khi việc sử dụng đơn gen *R* hay giống lúa thích nghi với mầm bệnh thường dẫn tới kết quả tính kháng bị phá vỡ trong một thời gian ngắn do sự biến đổi thành phần chủng của quần thể *Xoo* bản địa; việc tích hợp đa gen *R* kháng các chủng/nòi *Xoo* vào giống lúa mục tiêu bằng MAS là phương pháp rất hiệu quả để thu được tính kháng phổ rộng ổn định. Dựa trên các nghiên cứu trước đây, *xa5*, *Xa7*, *xa13*, *Xa21* và *Xa23* được các nhà chọn giống lúa sử dụng thường xuyên hơn cả do phổ kháng tương đối rộng hơn so với các gen *R* khác. Xu và cộng sự (2012) đã chuyển gen *Xa7* và *Xa21* vào dòng phục hồi lúa lai ưu tú Yihui 1577 [121]; hay Zhang và cộng sự (2016) trong chương trình lúa lai tại Trung Quốc cũng quy tụ 2 gen này vào giống lúa Minghui 63 để tăng khả năng kháng các chủng *Xoo* địa phương [138]. Hai giống lúa Basmati PB1121 và PB6 đã được cải thiện khả năng kháng bạc lá nhờ tích hợp gen kháng *xa13* và *Xa21* thông qua MAS [46]. Trong một nghiên cứu khác, ba gen *xa5*, *xa13* và *Xa21* đã được chuyển vào một giống lúa Lalat phổ biến ở miền Đông Ấn Độ nhưng vẫn cảm với bệnh bạc lá [44]. Tại Ấn Độ, việc quy tụ nhiều gen *R* vào cùng một tổ hợp gen đã được thực hiện và tạo ra được các dòng mang nhiều gen *R* làm nguồn vật liệu tốt để chuyển các tổ hợp gen này vào những giống lúa thương mại tăng tính kháng bạc lá của các giống ban đầu, ví dụ như dòng NH56 mang 4 gen *Xa4*, *xa5*, *Xa7* và *Xa21* [123]. Yap và cộng sự (2016) cũng đã đưa 4 gen *R* từ dòng IRBB66 vào tám giống lúa trồng phổ biến tại Trung Quốc [128]. Chukwu và cộng sự (2020) đã tích hợp đa gen *Xa4*, *Xa21*, *xa5* và *xa13* vào giống lúa Putra 1 từ giống bố mẹ IRBB60 nhằm tăng cường tính kháng với bệnh bạc lá [40]. Tương tự, Hsu và cộng sự (2020) đã tích hợp năm gen kháng *Xa4*, *xa5*, *Xa7*, *xa13* và *Xa21* từ dòng bố mẹ IRBB66 vào Tainung 82, một giống lúa *japonica* trồng phổ biến ở Đài Loan, Trung Quốc [54].

Các phương pháp chọn tạo giống bằng MAS mang lại những hiệu quả kháng bệnh bạc lá bước đầu khả quan, tuy nhiên phương pháp này có nhược điểm là tốn nhiều thời gian và nhân lực. Bên cạnh đó, phương pháp này cũng gặp trở ngại khi hai dòng lúa bố mẹ có nền di truyền khác biệt lớn, có thể không lai được với nhau hoặc con lai sẽ không duy trì được nền di truyền/đặc tính ban đầu của giống gốc.

Ngoài ra, một số tổ hợp gen kháng có thể không mang lại kết quả kháng phổ rộng như mong đợi, như trường hợp của *xa5* + *Xa23* [51] hay *xa5* + *Xa27* [131]. Do đó, việc nghiên cứu đầy đủ cơ chế phân tử của tính kháng qua trung gian gen *R* ở cây lúa có ý nghĩa rất quan trọng đối với hiệu quả ứng dụng các gen này trong chọn/tạo giống lúa. Chính vì vậy, ứng dụng các công nghệ chọn giống chính xác, bao gồm cả chỉnh sửa gen, là một giải pháp tiềm năng, bổ sung thêm công cụ hữu hiệu cho các nghiên cứu chọn/tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá hiện nay.

#### *1.1.4.2. Tình hình nghiên cứu chọn tạo giống kháng bạc lá ở Việt Nam*

Tại Việt Nam, hướng nghiên cứu chọn tạo giống lúa kháng bạc lá mang các gen/QTL kháng sử dụng chỉ thị phân tử đã được triển khai khá rộng rãi, bao gồm cả việc tìm ra các gen/QTL kháng hiệu quả với quần thể vi khuẩn *Xoo* Việt Nam, xác định sự có mặt của gen/QTL kháng trong các giống lúa Việt Nam. Phan Hữu Tôn và cộng sự (2005) chứng minh các gen *Xa4*, *xa5*, *Xa7* và *Xa21* kháng được hầu hết các chủng trong nhóm 10 chủng vi khuẩn gây bệnh bạc lá thu thập tại miền Bắc Việt Nam. Đây là những gen kháng làm tiền đề cho chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá ở miền Bắc Việt Nam [19, 20]. Bằng chỉ thị phân tử, Lã Vinh Hoa và cộng sự (2010) cũng đã phát hiện sự có mặt của gen kháng *Xa7* trên nhiều giống lúa địa phương [5]. Nhóm nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Nguyệt (2013) tại Viện Di truyền Nông nghiệp đã sử dụng chỉ thị P3 và pTA248 liên kết với gen *Xa7* và *Xa21* chọn lọc cá thể lai mang các gen này từ quần thể lai trở lại thế hệ BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> của phép lai giữa giống cho gen kháng IRBB62 (mang 3 gen kháng *Xa4*, *Xa7* và *Xa21*) và hai giống nhận gen BC15 và Hoa sữa, tạo vật liệu ban đầu cho nghiên cứu chọn/tạo giống lúa thuần [10]. Dương Đức Huy và cộng sự (2016) đã chuyển gen kháng bạc lá *Xa7* từ dòng lúa IRBB7 vào dòng phục hồi R212 bằng phương pháp lai trở lại, sau đó sử dụng phương pháp lây nhiễm nhân tạo và chọn lọc nền di truyền bằng chỉ thị phân tử (MAS) để tạo ra dòng lúa F3 có kiểu hình tương tự dòng R212, đồng hợp tử gen *Xa7* và kháng cao với 3 chủng vi khuẩn gây bệnh bạc lá phân lập từ Lào Cai, Nam Định và Thanh Hóa [8]. Mới đây, trong nghiên cứu của Phạm Thiên Thành và cộng sự (2020) đã sử dụng chỉ thị *xa5FM* liên kết với gen kháng bạc lá

xa5 trong quá trình lai trở lại và chọn lọc cá thể phân ly của giống lúa Bắc Thơm 7, tạo con lai BT7KBL ở thế hệ BC5F5 có triển vọng cao về năng suất, chất lượng và hiệu quả kháng bạc lá [17]. Những nghiên cứu trên đã cho thấy nỗ lực trong chọn/tạo giống lúa kháng bạc lá phổ rộng, tuy nhiên, đa phần những nghiên cứu này đều phải tiến hành trong thời gian khá dài do quá trình lai tạo kết hợp với chọn lọc, đòi hỏi đầu tư nhiều thời gian và kinh phí.

## 1.2. VAI TRÒ CỦA HỌ GEN *SWEET* VÀ TALE TRONG MỐI TƯƠNG TÁC GIỮA THỰC VẬT VÀ MÀM BỆNH

### 1.2.1. Họ gen *SWEET* ở thực vật

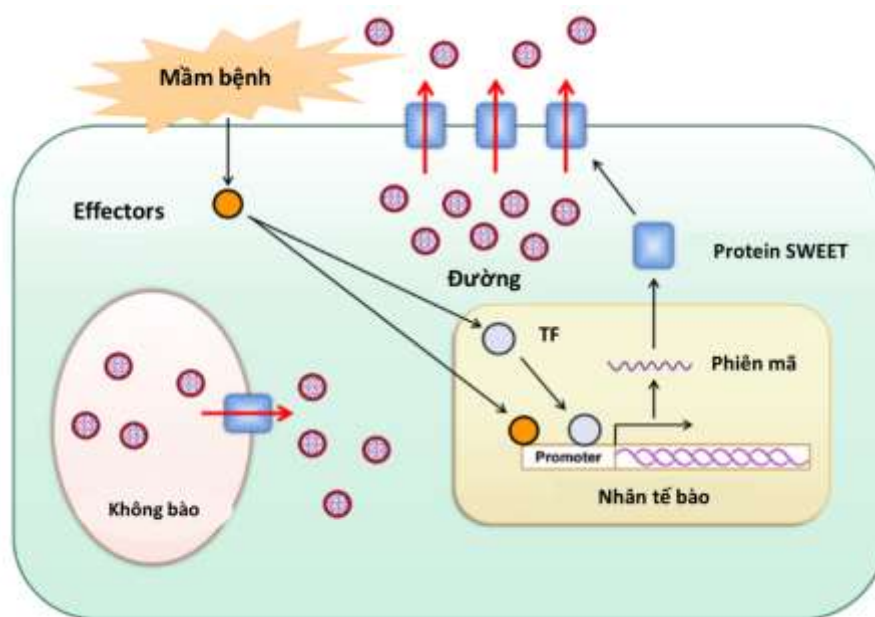
Nhóm nghiên cứu của Chen và cộng sự (2010) lần đầu tiên ứng dụng cảm biến truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (fluorescent resonance energy transfer-FRET) glucose đã xác định được một loại chất vận chuyển đường mới từ *Arabidopsis thaliana*, và đặt tên là *SWEET* [34]. Các protein *SWEET* dựa vào gradient nồng độ của đường nội bào và ngoại bào để vận chuyển chúng qua màng theo hai hướng từ trong ra ngoài tế bào hoặc ngược lại [35, 64]. Cho đến nay, các gen mã hóa protein *SWEET* có mặt phổ biến ở cả sinh vật nhân sơ, động vật và thực vật. Tuy nhiên, so với thực vật, họ gen *SWEET* ở sinh vật nhân sơ và động vật có số lượng ít hơn. Ví dụ: *Mycoplasma arthritidis*, *Prochlorococcus marinus*, chuột (*Mus musculus*), khỉ đầu chó olive (*Papio anubis*) và người đều chỉ chứa một gen mã hóa protein *SWEET* [64]. Con số này ở thực vật cao hơn nhiều và thay đổi tùy thuộc vào các loài khác nhau, cụ thể: số lượng gen *SWEET* lần lượt là 17, 21, 29, 105, 52, 18 và 17 ở các loài *A. thaliana*, lúa (*Oryza sativa*), cà tím (*Solanum melongena*), lúa mì (*Triticum aestivum*), đậu tương (*Glycine max*), lê (*Pyrus spp.*) và nho (*Vitis vinifera*) [38, 48, 96, 100, 132]. Dựa trên sự phát sinh loài, họ gen *SWEET* ở thực vật được phân thành 4 nhóm. Nhóm I và II bao gồm các gen mã hóa protein vận chuyển hexose (glucose và fructose); trong khi các gen mã hóa protein ở nhóm III (phổ biến nhất) lại có ý nghĩa đặc biệt trong vận chuyển sucrose. Các gen mã hóa protein thuộc nhóm IV phần lớn bao gồm các kênh vận chuyển không bào, có liên quan đến vận chuyển fructose qua màng không bào [34, 35].



Các protein SWEET ở thực vật là các thành viên thuộc họ MtN3/saliva (PF03083). Các protein này có đầu N nằm bên ngoài và đầu C nằm bên trong màng tế bào. Protein SWEET ở thực vật được đặc trưng bởi 7 vùng xoắn xuyên màng ( $\alpha$ -helical transmembrane-TM) trong đó vùng xoắn thứ 4 ít bảo thủ hơn và chỉ đóng vai trò liên kết, chia protein này thành hai domain (vùng cấu trúc/chức năng) MtN3/saliva, mỗi domain chứa 3 vùng xoắn tạo thành cấu trúc “3-1-3”. Ba vùng xoắn của mỗi domain MtN3/saliva sắp xếp theo dạng TM1-TM2-TM3 để tạo thành cấu trúc bó xoắn ba. Sự có mặt của các cấu trúc xuyên màng này cho phép protein SWEET bám vào màng tế bào để vận chuyển đường [64]. Các protein SWEET đóng vai trò quan trọng trong các quá trình sinh hóa của cây như: vận chuyển đường, cung cấp chất dinh dưỡng cho sự phát triển phần hoa, làm đầy hạt, phát triển quả, tương tác giữa cây chủ - mầm bệnh và đáp ứng với các stress phi sinh học [34, 111].

### **1.2.2. Vai trò của gen *SWEET* trong mối tương tác giữa mầm bệnh và cây chủ**

Các gen thuộc họ *SWEET* đóng vai trò quan trọng trong tương tác giữa cây chủ và mầm bệnh. Khi tác nhân gây bệnh xâm nhập vào cây, chúng sẽ tiết ra các TALE liên kết với trình tự EBE (effector binding element) của các gen *SWEET* và hoạt hóa sự biểu hiện của các gen này, tạo điều kiện thuận lợi cho sự sinh trưởng, phát triển và gây ra triệu chứng bệnh trên cây (Hình 1.5) [27, 111]. Những gen *SWEET* được hoạt hóa theo cơ chế này được gọi là gen nhiễm/gen mẫn cảm (susceptibility gene - gen *S*). Các gen *OsSWEET11-15* ở lúa được chứng minh là gen *S* của vi khuẩn *Xoo* với các TALE tương ứng đã biết. Trong số các TALE này, có 4 TALE được xác định hoạt hóa sự biểu hiện của *OsSWEET14* [22, 25, 94, 122, 130].



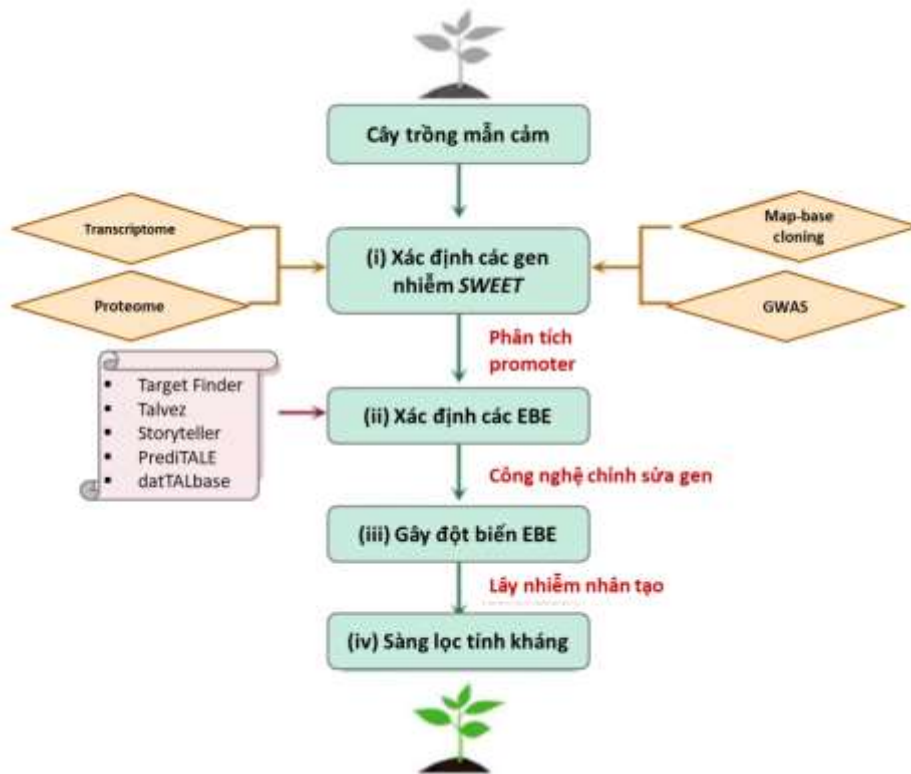
**Hình 1.5. Vai trò của protein SWEET trong việc cung cấp chất dinh dưỡng cho mầm bệnh**

**Ghi chú:** Mầm bệnh (vi khuẩn hoặc nấm) tiết các TALE vào bên trong tế bào cây chủ. Các TALE này sẽ hoạt hóa một cách trực tiếp hoặc gián tiếp sự biểu hiện của các gen SWEET, dẫn tới quá trình vận chuyển đường từ trong tế bào chất vào apoplast để cung cấp chất dinh dưỡng cho mầm bệnh [64].

Cơ chế hoạt hóa gen SWEET của tác nhân gây bệnh cũng được nghiên cứu và công bố ở nhiều loài thực vật khác. Cụ thể, *MeSWEET10* ở sắn (*Manihot esculenta*) được hoạt hóa bởi TAL20 của *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (gây ra bệnh bạc lá) [41]. Tương tự, *CsSWEET1* ở cam có thể được hoạt hóa bởi PthA4 và PthAw của vi khuẩn gây bệnh thối nhũn ở cây có múi (*Xanthomonas. citri* ssp. *citri*) [55]. Các gen *VvSWEET4* và *VvSWEET7* ở nho đã được chứng minh có thể tương tác với tác nhân gây ra bệnh thối xám (*Botrytis cinerea*). Cụ thể, mức độ biểu hiện của 2 gen này tăng lên sau khi cây bị nhiễm *B. cinerea* [38]. Hiện tượng tương tự cũng được phát hiện khi nghiên cứu trên cây mô hình *A. thaliana* bị xâm nhiễm bởi *Pythium irregulare* ở rễ cây; kết quả đánh giá biểu hiện gen cho thấy *AtSWEET2* biểu hiện mạnh so với cây đối chứng. Ngoài ra, những cây mang đột biến trên promoter của gen này có khả năng kháng lại sự tấn công của *P. irregulare* [32]. Điều này gợi ý rằng *AtSWEET2* trên màng không bào đã vận chuyển glucose để *Pythium* sinh trưởng và sinh sản. Các gen *AtSWEET* ở *A. thaliana* cũng là đích tấn

công bởi tác nhân gây ra bệnh đốm vi khuẩn (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000), bệnh phấn trắng (*Golovinomyces cichoracearum*) và thối rễ (*Plasmodiophora brassicae*) [34, 64].

Các kết quả nghiên cứu trên đã cho thấy vai trò quan trọng của các gen thuộc họ *SWEET* trong mối tương tác giữa cây chủ và mầm bệnh, nhưng chỉ có một số ít các gen *SWEET* và cơ chế tương tác của chúng với mầm bệnh được nghiên cứu đầy đủ. Hiểu biết về các cơ chế này sẽ tạo tiền đề cho những nghiên cứu chỉnh sửa vị trí liên kết của mầm bệnh bằng các công cụ sinh học phân tử để tạo được cây trồng mang đột biến kháng bệnh. Chiến lược chỉnh sửa các gen *SWEET* tạo cây trồng kháng bệnh được mô tả như hình 1.6.



**Hình 1.6. Tạo cây trồng kháng bệnh thông qua chỉnh sửa gen *SWEET***

**Ghi chú:** Chiến lược tạo cây trồng kháng bệnh thông qua chỉnh sửa gen *SWEET* bao gồm các bước: (i) Xác định gen *SWEET* liên quan đến tính kháng bệnh thông qua một số phương pháp như: map-based cloning, phân tích tương tác trên toàn bộ hệ gen (genome-wide association analysis - GWAS), transcriptome và proteome; (ii) Xác định và dự đoán EBE bằng các công cụ khác nhau như PrediTALe, Storyteller, Talvez, datTALbase và Target Finder; (iii) Chỉnh sửa các EBE bằng các công nghệ chỉnh sửa gen như hệ thống CRISPR/Cas9; (iv) Sàng lọc tính kháng bệnh trên cây chỉnh sửa gen [64].

### **1.2.3. Tương tác đặc hiệu giữa TALE và SWEET**

#### *1.2.3.1. Giới thiệu chung về TALE*

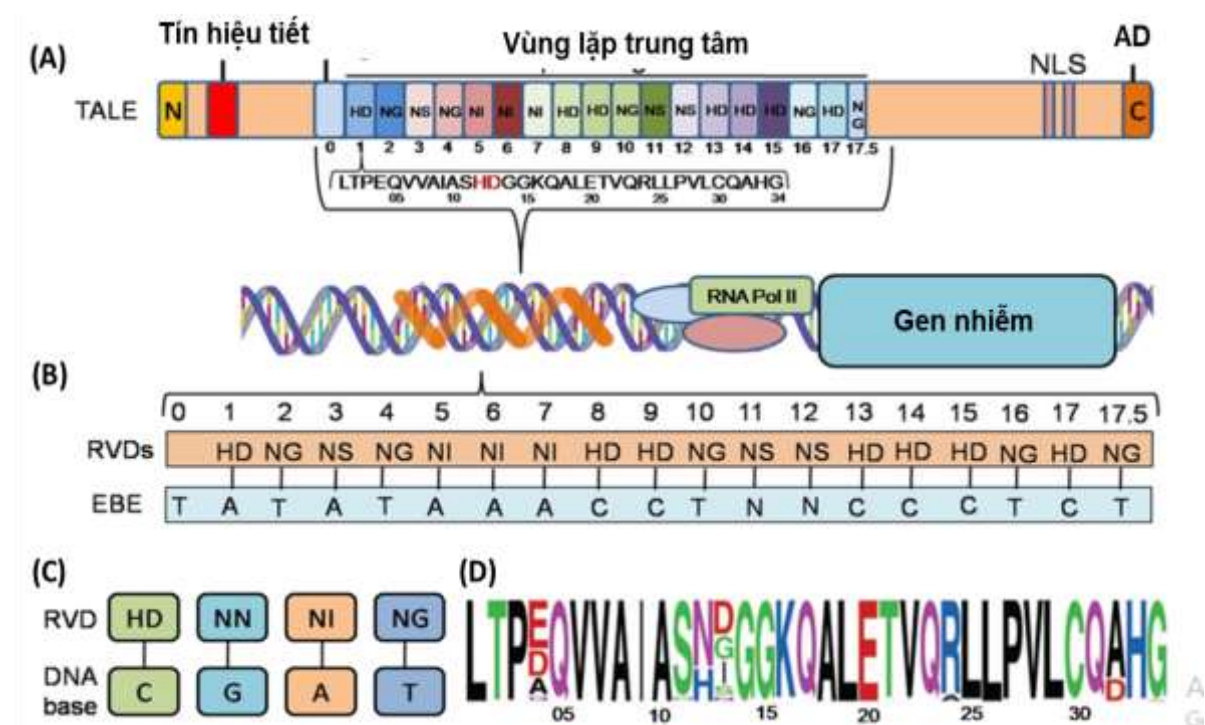
TALE là các protein thuộc nhóm T3SS, do mầm bệnh tiết ra khi xâm nhiễm vào cây chủ. TALE được đặc trưng bởi các motif cấu trúc bảo thủ, bao gồm: đầu C chứa tín hiệu định vị nhân (nuclear localization signal - NLS) và domain hoạt hóa có tính axit (acidic activator domain - AD); vùng trung tâm chứa một loạt các chuỗi trình tự 33-35 axit amin (thường là 34 axit amin) lặp lại không hoàn chỉnh; đầu N chứa tín hiệu tiết loại III và tín hiệu chuyển vị [27]. TALE hoạt hóa các triệu chứng bệnh hoặc kích hoạt hệ thống phòng bệnh ở cây chủ bằng cách liên kết với DNA cây chủ và hoạt hóa các gen đích tương ứng. Liên kết đặc hiệu này được quy định phần lớn bởi vùng lặp trung tâm. Các TALE chỉ khác nhau ở vị trí axit amin thứ 12 và 13 trong vùng lặp trung tâm. Hai axit amin này có tính đa hình, được gọi là vị trí lặp lại siêu biến đổi (repeat varibale diresidue-RVD), có vai trò liên kết trực tiếp và đặc hiệu với các nucleotide trên trình tự EBE thuộc promoter của gen đích. Điều này cho phép dự đoán trình tự DNA đích từ trình tự của axit amin trên chuỗi RVD. Chính vì vậy, việc phân tích trình tự axit amin của các TALE có thể giúp tìm ra các gen ở cây chủ có liên quan đến sự miễn cảm với bệnh hoặc kháng bệnh [90, 122].

#### *1.2.3.2. Mã liên kết giữa TALE và EBE*

Tương tác đặc hiệu giữa protein TALE và EBE trên gen đích được nghiên cứu và công bố vào năm 2009 bởi hai nhóm nghiên cứu độc lập. Nhóm nghiên cứu của Bogdanove (2009) lần đầu tiên đưa ra mô hình liên kết giữa trình tự axit amin của TALE với trình tự nucleotide trên promoter của các gen *SWEET* sử dụng cơ sở dữ liệu của các gen được hoạt hóa bởi TALE [27]. Sau đó, nhóm nghiên cứu của Boch cũng đồng thời công bố mã liên kết giữa TALE và EBE thông qua phân tích phân tử TALE AvrBs3 (Hình 1.7A) và trình tự DNA đích nằm trên promoter của gen *Bs3* (được hoạt hóa bởi AvrBs3) ở cây tiêu [26]. Mã liên kết bằng thực nghiệm giữa một cặp axit amin RVD và một nucleotide của DNA trên EBE được biểu thị như sau: HD liên kết với Cytosine (C); NN liên kết với Guanin (G); NI liên kết với Adenin (A); NG liên kết với Thiamin (T) (Hình 1.7C). Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng axit

amin ở vị trí 13 quyết định nucleotide mà RVD sẽ liên kết; do vậy các RVD NS hay N\* (không có gốc axit amin ở vị trí 13) không có tính đặc hiệu nucleotide và có thể liên kết với bất kỳ nucleotide nào [26, 27].

Việc phát hiện ra tương tác đặc hiệu TALE-EBE đã mở ra tiềm năng để nghiên cứu *in silico* các gen *tal* của mầm bệnh và EBE trên promoter của các gen cây chủ (thường là *SWEET*). Các mã tương tác này cũng đã được sử dụng để phát triển các TALE nhân tạo (designer TALE-dTALE) có khả năng hoạt hóa hoặc ức chế biểu hiện của gen *SWEET* và xác định chức năng của chúng [27, 52]. Nhiều công trình nghiên cứu đã tập trung vào dự đoán *in silico* các EBE trong hệ gen thực vật của một số TALE đã được xác định cấu trúc [27, 98].



**Hình 1.7. Tương tác đặc hiệu giữa TALE và EBE trên promoter của gen đích**

**Ghi chú:** (A) TALE *AvrBs3* bao gồm: (i) đầu cuối N chứa tín hiệu tiết loại III; (ii) vùng lặp trung tâm; (iii) đầu cuối C chứa NLS (tín hiệu định vị nhân) và AD (miền hoạt hóa có tính axit). Vùng lặp trung tâm có 34 axit amin, vị trí axit amin siêu biến đổi 12 và 13 (được đánh dấu đỏ) trong mỗi đoạn lặp liên quan đến việc đọc mã trình tự EBE tương ứng đã được công bố; (B) Sơ đồ tương tác giữa RVD của TALE với các nucleotide trên EBE; (C) Một bộ mã tối thiểu gồm bốn RVD và các nucleotide của DNA tương ứng; (D) Sequene logo hiển thị tần số xuất hiện các gốc axit amin trong một đoạn lặp dài 34 axit amin [52].

Hiện nay, một số công cụ tin sinh được phát triển để dự đoán tương tác giữa các TALE của mầm bệnh và EBE trong hệ gen cây chủ bao gồm: Target Finder, Talvez, Storyteller, TALgetter và PrediTAL. Mỗi công cụ trong số năm công cụ này thường cho phép xác định và dự đoán EBE mục tiêu cho hầu hết các TALE đã biết, trong đó PrediTAL đã được chứng minh là vượt trội hơn so với các công cụ khác về tính chính xác [47]. Hai công cụ DisTAL và FuncTAL, nằm trong bộ QueTAL cho phép phân loại TALE theo nguồn gốc phát sinh loài và sự giống nhau của về các đặc tính liên kết DNA. Một công cụ quan trọng khác là AnnoTAL cho phép định danh TALE dựa trên các loại TALE khác nhau và nguồn gốc của các chủng mang TALE trong một loại. Bên cạnh đó, chương trình TargeTAL cho phép xác định các trình tự DNA mục tiêu của từng TALE với hiệu quả dự đoán cao. Các thuật toán từ các công cụ này đôi khi cũng cho kết quả dương tính giả hay âm tính giả. Do đó, việc sửa đổi và cải tiến liên tục các thuật toán được sử dụng trong phương pháp tiếp cận tin sinh học là cần thiết [52]. Ngoài các công cụ trên, một bộ cơ sở dữ liệu (daTALbase) đã được phát triển riêng cho phép nghiên cứu tương tác đa dạng giữa TALE và EBE đối với bệnh bạc lá hại lúa do *Xoo* gây ra [97].

#### **1.2.4. Các gen nhiễm *OsSWEET* và TALE liên quan đến bệnh bạc lá lúa**

Họ gen *OsSWEET* đã được nghiên cứu khá nhiều ở lúa, trong đó 5 gen *OsSWEET* được xác định là gen *S* đối với vi khuẩn *Xoo*. Cụ thể, *OsSWEET11* (*Os8N3/Xa13*) và *OsSWEET13* (*Os12N3/Xa25*) lần lượt là đích tác động của TALE PthXo1 (chủng *Xoo* PXO99<sup>A</sup>) và PthXo2/PthXo2.1/PthXo2.2 (chủng JXO1 và MAFF311018) [34, 52]. *OsSWEET14* (*Os11N3/Xa41*) được hoạt hóa bởi 4 TALE khác nhau bao gồm AvrXa7, PthXo3, TalC và TalF (chủng PXO86, JXO1A, BAI3, MAI1). Ngoại trừ EBE liên kết với TalC, trình tự EBE liên kết với các TALE còn lại trên *OsSWEET14* chồng lên nhau một phần [25, 122]. Bằng cách sử dụng hai TALE nhân tạo ArtTAL12 và ArtTAL15, các nhà nghiên cứu đã nhận thấy *OsSWEET12* và *OsWEET15* cũng được hoạt hóa bởi các TALE này và có tiềm năng gây ra sự miễn cảm ở cây lúa với vi khuẩn *Xoo* [52, 111]. Điều đáng chú ý là các gen kháng bạc lá trong trong tự nhiên *xa13*, *xa25* và *xa41(t)* lần lượt là những dạng

đột biến trên vùng trình tự EBE của các gen *OsSWEET11*, *OsSWEET13* và *OsSWEET14* xuất hiện ở một số giống lúa, được xác định có thể kháng lại sự tấn công của một số chủng *Xoo* nhất định [58, 122].

Gen kháng *xa25*, lần đầu tiên được phân lập và nhân dòng từ giống lúa *indica* Minghui63, đã được sử dụng thành công trong các chương trình nhân giống và là gen kháng bệnh chính được sử dụng trong sản xuất lúa [37, 82]. Cho đến nay, hai loại alen lặn *xa25* đã được xác định, đó là *xa25* từ giống Minghui63 và *OsSWEET13<sub>Nip</sub>/OsSWEET13<sub>Kit</sub>* (mang đột biến mất 1 nucleotide ở vị trí thứ 4 trên EBE PthXo2) từ giống lúa Nipponbare, Kitaake và một số giống lúa *japonica* khác. Ngược lại, hai alen trội *Xa25* là *OsSWEET13<sub>ZS97</sub>* ở giống *indica* Zhenshan97 và *SWEET13<sub>IR24</sub>* ở giống *indica* IR24 đã được chứng minh là gen *S* đối với vi khuẩn *Xoo* trong nhiều nghiên cứu [37, 82, 140]. Các TALE PthXo2 và PthXo2.1/PthXo2.2 hoạt hóa các alen trội *OsSWEET13*, đã được phân lập từ các chủng *Xoo* khác nhau không thể liên kết với trình tự EBE trong vùng promoter của các gen *OsSWEET13<sub>Nip</sub>/OsSWEET13<sub>Kit</sub>* [140]. Điều thú vị là, một số nghiên cứu gần đây đã thu thập các chủng *Xoo* mang một số TALE mới có thể hoạt hóa sự biểu hiện của các alen kháng lặn của *OsSWEET13* từ hai giống lúa *japonica* đã đề cập trên. Cụ thể, trong nghiên cứu của Oliva và cộng sự (2019) đã nhận thấy *OsSWEET13<sub>Nip</sub>/OsSWEET13<sub>Kit</sub>* có thể được hoạt hóa bởi 2 TALE là PthXo2B và PthXo2C làm cho các giống lúa này trở nên miễn cảm với vi khuẩn *Xoo* [94]. Tương tự, Xu và cộng sự (2019) khi gây đột biến đồng thời EBE của *OsSWEET11* và *OsSWEET14* trên cây lúa Kitaake mang alen kháng lặn *OsSWEET13<sub>Kit</sub>*, kết quả thu được dòng lúa chỉnh sửa gen MS14K kháng hầu hết các chủng *Xoo* trừ 9 chủng được phân lập từ Trung Quốc và Philippines mang các các biến thể mới tương tự TALE PthXo2 là Tal5<sub>LN18</sub>, Tal7<sub>PXO61</sub> và Tal7<sub>K74</sub> [122]. Những phát hiện này đã cho thấy sự tiến hóa phức tạp đã diễn ra đồng thời ở cả cây chủ và tác nhân gây bệnh, dẫn đến những khó khăn trong công tác chọn/tao giống lúa kháng bệnh mang tính bền vững.

Khác với *OsSWEET13*, *OsSWEET14* là một ví dụ điển hình về tiến hóa hội tụ bởi đây là đích tác động của *Xoo* mang các TALE khác nhau về mặt phát sinh loài.

Cụ thể, *OsSWEET14* có thể được hoạt hóa bởi các chủng *Xoo* của Philippines PXO86 và PXO61 mang TALE *AvrXa7* và *PthXo3*; chủng MAI1 mang *TalF* và chủng BAI3 mang *TalC* từ hai quốc gia Châu Phi (Mali và Burkina Faso). *TalC* hoạt hóa trực tiếp *OsSWEET14* thông qua liên kết với EBE nằm ngược chiều với 3 EBE còn lại có trình tự chồng lên nhau *AvrXa7*, *PthXo3* và *TalF* [25, 37, 111]. Nghiên cứu của Li và cộng sự (2012) cho thấy khi gây đột biến trên EBE *AvrXa7* đã tạo ra dòng lúa kháng chủng *Xoo* Châu Á mang TALE tương ứng [77]. Ngoài ra, một số đột biến tự nhiên xuất hiện trên EBE *TalF* và *AvrXa7* của giống lúa đại *Oryza barthii* cũng có thể tạo tính kháng phổ rộng bệnh bạc lá [59]. Những dẫn liệu này đã cho thấy *OsSWEET14* là gen *S* và là đích tấn công của các TALE độc chính ở vi khuẩn *Xoo*. Do vậy, gen *S* này được quan tâm hơn cả so với các gen *S* khác thuộc họ gen *OsSWEET* nhóm III trong các nghiên cứu chọn/tạo giống lúa kháng bạc lá, đặc biệt là nghiên cứu chọn/tạo dòng lúa kháng bạc lá phổ rộng bằng công nghệ chỉnh sửa gen.

Kết quả nghiên cứu của Blanvillain và cộng sự (2017) đã chứng minh việc gây đột biến EBE *AvrXa7* hoặc *TalF* tạo ra dòng lúa Kitaake kháng vi khuẩn *Xoo* mang TALE tương ứng. Riêng *TalC*, mặc dù các indel tạo ra trên EBE *TalC* đã ngăn chặn sự hoạt hóa gen *OsSWEET14* bởi chủng BAI3 mang TALE *TalC*, nhưng dòng lúa chỉnh sửa gen vẫn không kháng được chủng vi khuẩn gây bệnh bạc lá này [25]. Điều này gợi ý rằng, có thể chủng BAI3 còn có đích tấn công khác ngoài *OsSWEET14* khi xâm nhiễm vào cây lúa Kitaake, do vậy việc chỉnh sửa một gen *S* không mang lại hiệu quả trong việc tạo ra tính kháng với *Xoo*. Những công bố chỉnh sửa đa gen gần đây trên một số giống lúa đã thu được các dòng lúa đột biến có thể kháng phổ rộng *Xoo* đã góp phần củng cố cho nhận định này [94, 122]. Trên cơ sở phân tích các TALE độc của 63 chủng *Xoo* thu thập từ Châu Á và Châu Phi, nhóm nghiên cứu của Oliva (2019) đã nhận thấy các chủng *Xoo* Châu Á hầu hết mang đồng thời TALE *PthXo2* và *AvrXa7/PthXo3*, một số rất ít mang *PthXo2* và *PthXo1* trong khi các chủng *Xoo* Châu Phi chỉ mang TALE *TalC* và *TalF*. Kết quả này đồng nghĩa rằng gen *OsSWEET13* và *OsSWEET14* là các gen *S* chính của hầu hết các



chủng *Xoo* thu thập được ở Châu Á. Từ kết quả đó, để cải tiến tính kháng bạc lá của giống lúa Kitaake, Siherang sub-1 và IR64, tác giả đã gây đột biến trên đồng thời cả 3 gen *S OsSWEET11*, *OsSWEET13* và *OsSWEET14* và đã thu được dòng lúa kháng phổ rộng với tất cả các chủng *Xoo* đã thu thập [94]. Tương tự, một nghiên cứu khác cũng gây đột biến cả 3 gen *S* nói trên của cây lúa Kitaake và cũng thu được dòng lúa đột biến kháng đồng thời các chủng *Xoo* mang TALE *PthXo1*, *Tal5<sub>LN18</sub>*, *Tal7<sub>PXO61</sub>*, *Tal7<sub>K74</sub>*, *AvrXa7* [122].

Tóm lại, các kết quả nghiên cứu trên đã cho thấy các gen *OsSWEET* thuộc nhóm III của lúa đóng vai trò quan trọng đối với quá trình xâm nhiễm của vi khuẩn *Xoo*, trong đó *OsSWEET13* và *OsSWEET14* là những gen *S* chính của các chủng vi khuẩn *Xoo* thu thập từ các quốc gia khu vực Châu Á mang các TALE *PthXo2* và *AvrXa7/PthXo3*. Việc gây đột biến các gen này bằng công nghệ chỉnh sửa gen có thể mang lại tiềm năng cải tiến tính kháng bệnh bạc lá phổ rộng và bền vững.

### 1.3. HỆ THỐNG CHỈNH SỬA GEN CRISPR/Cas9 VÀ ỨNG DỤNG TRONG CHỌN TẠO GIỐNG CÂY TRỒNG

#### 1.3.1. Giới thiệu về công nghệ chỉnh sửa gen

Chỉnh sửa gen (gene editing - GE) là một tập hợp những công nghệ giúp các nhà khoa học sửa đổi gen của sinh vật như: gây đột biến có mục tiêu hoặc chèn/xóa/thay thế tại một số vị trí cụ thể trong hệ gen. Các công nghệ chỉnh sửa gen hiện nay phần lớn sử dụng nuclease để cắt chính xác gen đích, tạo ra đứt gãy sợi đôi (double strand break - DSB); những DSB này sau đó được sửa chữa theo cơ chế tái tổ hợp tương đồng (homology-directed recombination - HDR) hoặc ghép nối tận cùng không tương đồng (non-homologous end joining - NHEJ). NHEJ được xác định là cơ chế sửa chữa DSB phổ biến nhất ở tế bào thực vật; trong đó DSB được sửa chữa với sự tham gia của các enzyme có chức năng nối trực tiếp những điểm đứt gãy mà không cần trình tự DNA tương đồng. Do tính chất dễ bị lỗi, cơ chế sửa chữa thông qua NHEJ thường xảy ra hiện tượng bổ sung hoặc loại bỏ nucleotide; do đó, DNA bị thay đổi trình tự tại vị trí DSB, thậm chí có thể dẫn đến mất hoàn toàn chức năng gen nếu đột biến xảy ra ở vùng exon của gen. Ngược lại, cơ chế sửa chữa

HDR yêu cầu phải có một trình tự DNA tương đồng làm khuôn để sửa chữa DSB nên có tính chính xác hơn so với cơ chế NHEJ, và thường được sử dụng để gây đột biến chính xác tại vị trí mong muốn của gen đích [99].

Các hệ thống GE thế hệ đầu sử dụng meganuclease, nuclease ngón tay kẽm (Zinc Finger Nuclease-ZFN), nuclease tương tự yếu tố hoạt hóa phiên mã (transcription activator-like effector nuclease-TALEN). Gần đây, hệ thống GE sử dụng nhóm các đoạn lặp ngắn đối xứng, cách đều nhau (clustered regularly interspaced short palindromic repeat- CRISPR) ra đời đã hoàn toàn thay thế các công cụ GE thế hệ thứ nhất. CRISPR được phân thành các nhóm khác nhau dựa vào sự tham gia của nuclease Cas và cấu trúc đoạn lặp trong CRISPR trong đó phổ biến là CRISPR loại II với sự tham gia của protein Cas9 [70].

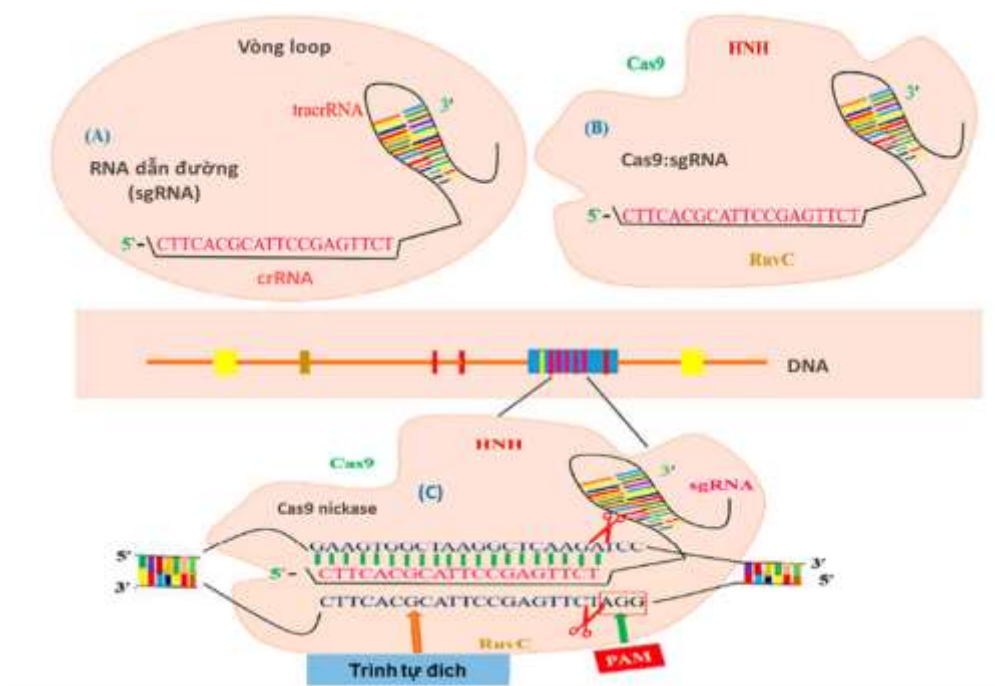
So với các hệ thống GE thế hệ đầu, hệ thống CRISPR/Cas9 dễ sử dụng hơn, chi phí thấp hơn và được ứng dụng rộng rãi hơn. Trái ngược với ZFN và TALEN, hệ thống CRISPR/Cas9 dễ thiết kế hơn rất nhiều, vì thành phần cấu tạo của hệ thống chỉnh sửa này chỉ bao gồm phân tử sgRNA và protein Cas9. Bên cạnh đó, hệ thống ZFN và TALEN phức tạp bởi vì chúng đòi hỏi phải cải biến protein khi thiết kế hệ thống. Chính vì nhược điểm này nên những ứng dụng của ZFN và TALEN trên đối tượng thực vật khá hạn chế. Do được nghiên cứu cải tiến không ngừng về hiệu quả hoạt động, hệ thống CRISPR/Cas9 ngày càng được sử dụng phổ biến hơn trong nhiều lĩnh vực đặc biệt là khoa học thực vật và trở thành công cụ chỉnh sửa gen vô cùng triển vọng [101].

### **1.3.2. Hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9**

#### *1.3.2.1. Thành phần của hệ thống CRISPR/Cas9*

Dựa vào cấu trúc và chức năng của các protein Cas, hệ thống CRISPR/Cas có thể được chia thành 2 lớp và 6 loại: lớp 1 (loại I, loại III, và loại IV) và lớp 2 (loại II, loại V và loại VI). Vì cấu trúc của CRISPR/Cas9 thuộc loại II tương đối đơn giản nên loại này được quan tâm nghiên cứu nhiều hơn và được ứng dụng rộng rãi trong kỹ thuật di truyền [84]. Một hệ thống CRISPR/Cas9 bao gồm hai thành phần thiết yếu là phân tử sgRNA (single guide RNA – RNA dẫn đường sợi đơn) và protein Cas9 (Hình 1.8).

Cas9 là protein Cas đầu tiên được sử dụng trong chỉnh sửa gen được tách chiết từ *Streptococcus pyogenes*. Đây là DNA endonuclease chứa nhiều domain, có kích thước lớn (1368 axit amin), chịu trách nhiệm phân cắt trình tự DNA đích để tạo ra các DSB [92]. Protein này có hai thùy, thùy REC (recognition) đóng vai trò nhận biết và thùy NUC (nuclease) đóng vai trò phân cắt trình tự đích. Thùy REC bao gồm 2 tiểu phần REC1 và REC2; trong đó REC 1 chịu trách nhiệm liên kết với sgRNA. Thùy NUC bao gồm: (i) domain RuvC có chức năng cắt sợi DNA liên kết không bổ sung với sgRNA; (ii) domain HNH (Histidine-Asparagine-Histidine) có chức năng cắt sợi DNA liên kết bổ sung với sgRNA; (iii) và domain PI (PAM Interacting-tương tác với trình tự PAM) có chức năng nhận biết trình tự PAM (protospacer adjacent motif- trình tự gần protospacer) và khởi đầu quá trình liên kết với DNA đích [86].



**Hình 1.8. Hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9**

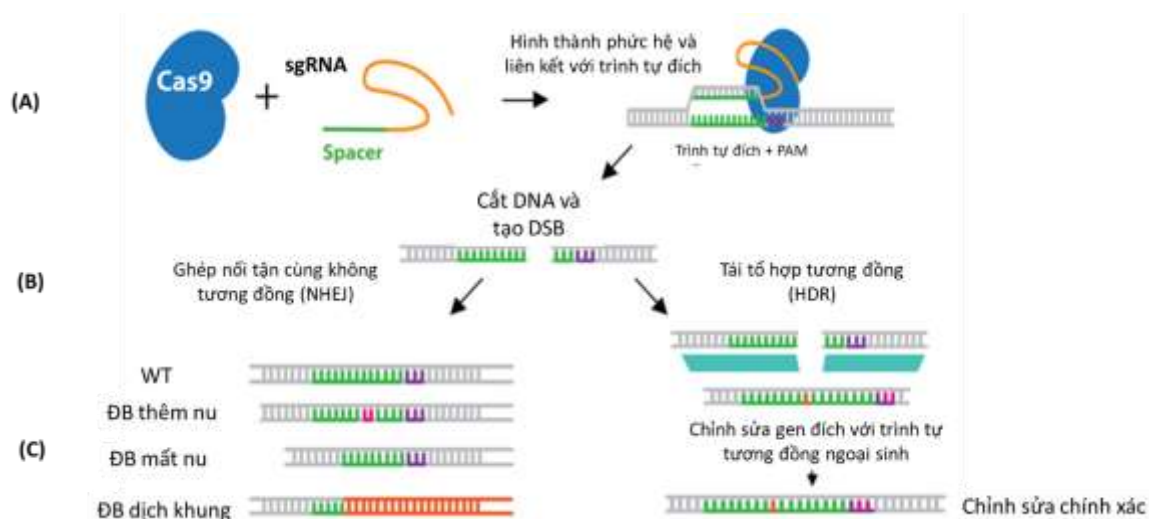
**Ghi chú:** Hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 bao gồm sgRNA(A) và Cas9 (B). (C) Protein Cas9 phát hiện vị trí đích trong hệ gen (màu xanh). Trình tự PAM đặc hiệu (màu đỏ) được phức hệ Cas9:sgRNA phát hiện [101].

Phân tử sgRNA được tạo thành từ hai thành phần: crRNA (CRISPR RNA) và tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA). crRNA chứa một trình tự spacer ở đầu 5' dài khoảng 18–22 nucleotide, có chức năng liên kết với trình tự DNA đích; trong khi

tracrRNA dài 75 – 170 nucleotide, chứa các cấu trúc vòng loop đóng vai trò liên kết với protein Cas9. Ở sinh vật nhân sơ, sgRNA được sử dụng như một hệ thống phòng vệ chống lại sự xâm nhiễm của DNA virus. Trong các hệ thống chỉnh sửa gen, sgRNA có thể được thiết kế tổng hợp bằng cách kết hợp crRNA và tracrRNA để tạo thành một phân tử duy nhất để tác động tới bất kỳ trình tự gen đích cần chỉnh sửa nào [92].

### 1.3.2.2. Cơ chế hoạt động của hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9

Cơ chế chỉnh sửa gen của CRISPR/Cas9 có thể chia thành ba bước: nhận dạng, phân cắt và sửa chữa. Phân tử sgRNA được thiết kế dẫn đường protein Cas9 nhận ra trình tự đích nằm trên gen quan tâm thông qua thành phần bắt cặp bổ sung ở đầu 5' của crRNA. Protein Cas9 sẽ không hoạt động khi không có sgRNA. Nuclease Cas9 cắt DNA tại vị trí cách trình tự PAM 3 nucleotide và tạo ra DSB (Hình 1.9) [101].



**Hình 1.9. Cơ chế hoạt động của hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9**

**Ghi chú:** cơ chế hoạt động của hệ thống chỉnh sửa gen gồm 3 bước: (A) nhận diện và liên kết với trình tự đích; (B) cắt trình tự đích bằng enzyme Cas9 tạo DSB; (C) sửa chữa các DSB bằng cơ chế NHEJ và HDR [101].

PAM là một đoạn trình tự DNA ngắn bảo thủ (2–5 cặp base) nằm trên trình tự đích của phức hệ CRISPR/Cas9, có vai trò giúp CRISPR/Cas9 phân biệt và cắt đúng phân tử DNA đích (thay vì cắt trình tự DNA mã hóa cho sgRNA). Kích thước của PAM thay đổi tùy loài vi khuẩn/hệ thống CRISPR/Cas. Trình tự PAM đặc trưng cho protein Cas9 phổ biến nhất là 5'-NGG-3' [65]. Khi Cas9 tìm thấy một vị trí DNA đích với trình tự PAM thích hợp, protein này sẽ làm biến tính cục

bộ phân tử DNA sau đó hình thành liên kết giữa RNA-DNA. Tuy nhiên, cơ chế làm thế nào enzyme Cas9 biến tính trình tự DNA đích cho đến nay vẫn chưa được hiểu một cách rõ ràng. Sau đó, protein Cas9 được hoạt hóa và phân cắt DNA. Domain HNH phân cắt sợi bổ sung, trong khi domain RuvC phân cắt sợi không bổ sung với sgRNA của DNA đích, tạo ra DSB. Cuối cùng, DSB được sửa chữa bởi hệ thống của tế bào chủ [65, 87].

Tế bào cây chủ sẽ sửa chữa các DSB được tạo ra bởi protein Cas9 trong hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 theo hai cơ chế NHEJ và HDR như đã trình bày ở mục 1.3.1. Cơ chế NHEJ hoạt động trong tất cả các giai đoạn của chu kỳ tế bào. Đây là cơ chế sửa chữa ưu thế và hoạt động hiệu quả nhất trong các tế bào; nhưng cơ chế này dễ xảy ra lỗi có thể dẫn đến chèn hoặc xóa ngẫu nhiên các nucleotide/đoạn DNA kích thước bé (indel) tại vị trí DSB; kết quả là tạo ra đột biến dịch khung hoặc tạo ra codon kết thúc sớm phiên mã [125]. Sửa chữa DSB theo cơ chế HDR xảy ra ở cuối pha S và G2 của chu kỳ tế bào. Cơ chế này yêu cầu sự có mặt của một trình tự DNA khuôn (ngoại sinh, được thiết kế nhân tạo) tương đồng với trình tự đích tại vị trí DSB được dự đoán, tạo ra sự chèn hoặc thay thế nucleotide/đoạn DNA một cách chính xác theo như thiết kế. Ở thực vật, chỉnh sửa gen bằng HDR vẫn còn là thách thức do hiệu suất thấp và những hạn chế trong phương thức đưa trình tự DNA khuôn ngoại sinh vào trong tế bào [81, 99].

### **1.3.3. Chỉnh sửa gen thực vật bằng hệ thống CRISPR/Cas9**

Trước đây, rất nhiều nhóm nghiên cứu đã cố gắng thực hiện chỉnh sửa gen trên đối tượng thực vật nhưng hiệu suất của hệ thống CRISPR/Cas9 vẫn rất thấp. Theo thời gian, nhiều hệ thống vector mang cấu trúc biểu hiện CRISPR/Cas9 đã được phát triển và chứng minh khả năng hoạt động rất hiệu quả trong các nghiên cứu chỉnh sửa gen trên thực vật như: ức chế sự xâm nhiễm của virus, bất hoạt yếu tố *cis* trên promoter của gen, xóa bỏ một đoạn nhiễm sắc thể, bất hoạt gen và chỉnh sửa đa gen. Các công cụ chỉnh sửa gen liên tục được cải tiến nhằm đưa chính xác cấu trúc biểu hiện CRISPR/Cas9 vào trong tế bào thực vật. Các tiến bộ có thể kể đến như: phát hiện được nhiều biến thể của protein Cas9, phát triển các

phương pháp cho phép sàng lọc hiệu quả các thể đột biến được tạo ra, chọn lọc vector, thiết kế và sử dụng chính xác hệ thống chuyển cấu trúc biểu hiện Cas9 vào tế bào đích. Một thí nghiệm chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 thông thường bao gồm một số bước như thiết kế vector, đưa cấu trúc biểu hiện CRISPR/Cas9 vào tế bào thực vật và sàng lọc đột biến [101].

#### 1.3.3.1. Hệ thống vector biểu hiện CRISPR/Cas9

Hệ thống vector sử dụng trong nghiên cứu chỉnh sửa gen bằng CRISPR/Cas9 được chia thành 2 loại: (i) hệ thống vector đơn (single vector) và (ii) hệ thống vector kép (binary vector). Bất kì vector đặc trưng nào được thiết kế mang cấu trúc biểu hiện protein Cas9 và (một vài) sgRNA cũng đều có thể sử dụng để chuyển gen thực vật. Do các cấu trúc sgRNA khác nhau có thể sử dụng kết hợp với nhiều loại protein Cas9 khác nhau nên việc thiết kế cấu trúc biểu hiện phức hệ sgRNA-Cas9 cũng dễ dàng và chính xác hơn. Hệ thống vector đơn mang đồng thời cả cấu trúc biểu hiện sgRNA và cấu trúc biểu hiện protein Cas9 có nhiều triển vọng ứng dụng hơn so với hệ thống vector kép. Nhìn chung, trong hệ thống vector đơn, promoter hoạt động phụ thuộc RNA polymerase III (*U3/U6*) được sử dụng để biểu hiện sgRNA; trong khi promoter *Ubiquitin* hay *CaMV35S* tương ứng với RNA polymerase II được sử dụng cho cấu trúc biểu hiện Cas9. Các tiến bộ liên tục trong nghiên cứu hệ thống CRISPR/Cas9 cho phép các nhà khoa học phát triển các hệ thống vector biểu hiện thông minh hơn để điều hòa biểu hiện sgRNA và Cas9. Gần đây, hệ thống vector đơn đã có thêm một vài cải tiến mới, như sử dụng một hoặc hai promoter phụ thuộc RNA polymerase II. Hệ vector mang một promoter phụ thuộc polymerase II chỉ sử dụng một promoter duy nhất để kiểm soát đồng thời sự biểu hiện của cả sgRNA và Cas9; trong khi hệ vector mang hai promoter phụ thuộc polymerase II sử dụng hai promoter khác nhau để điều khiển sự biểu hiện của sgRNA và Cas9. Bên cạnh đó, các nhà khoa học cũng cố gắng cải tiến hệ thống vector biểu hiện CRISPR/Cas9 theo hướng giảm chiều dài vector nhằm tăng hiệu quả biến nạp vào tế bào [101].

### 1.3.3.2. Các công cụ tin sinh học phục vụ thiết kế trình tự sgRNA

Thiết kế cấu trúc sgRNA là một trong những bước quan trọng nhất trong nghiên cứu chỉnh sửa gen bằng CRISPR/Cas9. Cho đến nay, rất nhiều công cụ tin sinh học đã được phát triển và có thể sử dụng trực tuyến để phục vụ việc thiết kế sgRNA. Đặc biệt, nhiều công cụ thiết kế sgRNA trực tuyến có cơ sở dữ liệu về thực vật, cho phép thiết kế sgRNA nhận biết những trình tự đích mới trong hệ gen nhiều loại cây trồng phổ biến. Công cụ CRISPR Design (<http://www.genome-engineering.org>) của Zhang và các cộng sự hỗ trợ thiết kế sgRNA và đánh giá các đột biến không mong muốn (off-target) [101]. Năm 2014, Xie và các cộng sự đã phát triển công cụ CRISPR-PLANT (<http://www.genome.arizona.edu/CRISPR>) cho phép thiết kế hiệu quả cấu trúc sgRNA cho hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9. Công cụ trực tuyến của Michano và các cộng sự cho phép dự đoán nhanh các locus đích phục vụ chỉnh sửa gen đậu tương bằng hệ thống CRISPR/Cas9. Tương tự, CRISPR-P (<http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/>) là một công cụ thiết kế sgRNA cho nhiều đối tượng thực vật khác nhau, đồng thời đánh giá được khả năng xuất hiện của các đột biến không mong muốn [101].

### 1.3.3.3. Thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA

Thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA là một bước quan trọng trong chỉnh sửa gen bằng CRISPR/Cas9. Mục đích của bước này nhằm tạo ra một hệ thống dẫn đường cho phức hệ sgRNA-Cas9, bao gồm một chuỗi dài 98 nucleotide chứa 20 nucleotide ở đầu 5' tương đồng với trình tự DNA đích. Ở thực vật, RNA polymerase III thường được sử dụng để phiên mã sgRNA và sự biểu hiện của nó chủ yếu được điều khiển bởi promoter *U3* và *U6*. Do cấu trúc biểu hiện *U3/U6:sgRNA* có kích thước khá nhỏ, chỉ khoảng 300 – 600 bp, nên kỹ thuật “overlapping PCR” thường được sử dụng để thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA. Năm 2016, Ma và cộng sự đã phát triển một phương pháp dựa trên kỹ thuật PCR để thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA không cần qua bước nhân dòng [101]. Phương pháp nhân dòng Gibson assembly hay Golden Gate là hai phương pháp phổ biến được sử dụng để ghép nối trực tiếp cấu trúc biểu hiện sgRNA vào vector

nhị phân cho hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9. Gao và Zhao thông qua cơ chế hoạt động của ribozyme để tạo ra sgRNA bằng cách phiên mã pre-RNA nhờ RNA polymerase II; trong đó, các tác giả đã sử dụng promoter hoạt động liên tục hoặc promoter hoạt động cảm ứng để kiểm soát quá trình biểu hiện sgRNA [101].

#### 1.3.3.4. Thiết kế cấu trúc biểu hiện Cas9

Trình tự mã hóa protein Cas9 dài 4.107 bp. Để đưa Cas9 vào trong nhân tế bào sinh vật nhân chuẩn, trình tự mã hóa Cas9 phải được dung hợp với một trình tự tín hiệu định vị nhân. Các công cụ tối ưu mã bộ ba cho thực vật thường được sử dụng để tối ưu hiệu quả hoạt động của cấu trúc biểu hiện Cas9 phục vụ chỉnh sửa gen thực vật. Ví dụ, mã bộ ba cho Cas9 dùng trên đối tượng lúa phải được tối ưu tăng hàm lượng G-C. Các promoter hoạt động liên tục như *35S Cauliflower mosaic virus (35SCaMV)* và *Ubiquitin* từ *Arapidopsis thaliana*, lúa và ngô thường được sử dụng để điều khiển sự biểu hiện của *Cas9* khi sử dụng phương pháp chuyển gen qua mô sẹo trên đối tượng thực vật một lá mầm và hai lá mầm [101].

#### 1.3.3.5. Chuyển nạp vector biểu hiện hệ thống CRISPR/Cas9 vào thực vật

Để chỉnh sửa gen bằng hệ thống CRISPR/Cas9, vector chuyển gen mang cả hai cấu trúc biểu hiện sgRNA và Cas9 phải được đưa vào tế bào thực vật. Các cấu trúc này sau đó có thể bị phân giải hoặc được chèn ngẫu nhiên vào hệ gen cây chủ, tùy thuộc vào phương pháp biến nạp và hệ thống vector đặc trưng được sử dụng trong từng thí nghiệm [33, 101].

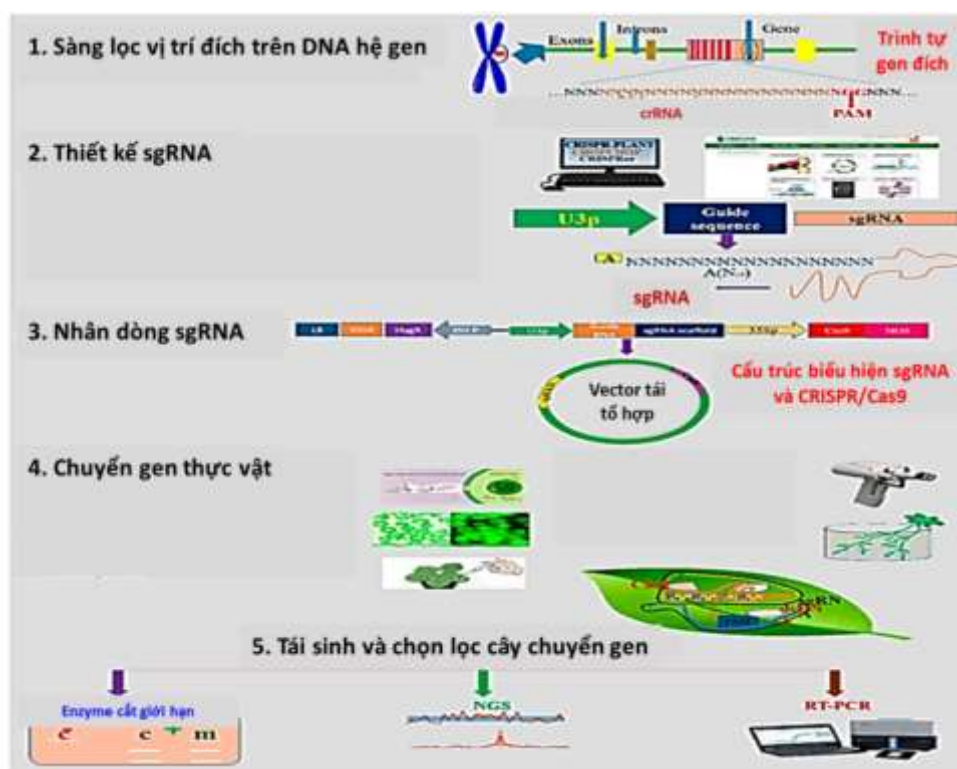
Phương pháp truyền thống để chuyển nạp cấu trúc DNA biểu hiện hệ thống CRISPR/Cas9 vào tế bào nhận là sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium* hoặc súng bắn gen; sau đó thông qua bước chọn lọc nhờ gen chỉ thị, cấu trúc DNA sẽ được chèn vào hệ gen tế bào thực vật và biểu hiện phức hệ sgRNA-Cas9 để chỉnh sửa gen đích. Phương pháp này thường được sử dụng cho hầu hết các nghiên cứu chỉnh sửa gen thực vật. Tuy nhiên, sản phẩm tạo ra sẽ mang cấu trúc CRISPR và gen chỉ thị trong hệ gen [94, 133]. Gần đây, các nhà khoa học đã phát triển nhiều phương thức khác nhau để thu được dòng cây chỉnh sửa gen không mang gen chuyển, ví dụ như sử dụng phức hệ ribonucleo-protein, hệ thống chuyển gen bằng plasmid



hay virus. Đối với các phương pháp này, bước chọn lọc thông thường bằng kháng sinh hay thuốc diệt cỏ sẽ được lược bỏ. Hệ thống biểu hiện gen tạm thời được sử dụng khá phổ biến để chuyển vector vào tế bào trần với mục đích phân tích hiệu suất và khả năng thành công của công cụ CRISPR/Cas9. Kỹ thuật chuyển gen qua trung gian tế bào trần hay súng bắn gen cũng có thể sử dụng để trực tiếp đưa cấu trúc biểu hiện Cas9 vào tế bào. Tuy nhiên, đối với nhiều loài thực vật, việc tái sinh từ tế bào trần rất khó khăn, điều này làm hạn chế đáng kể khả năng ứng dụng của phương pháp này [33, 101].

#### *1.3.3.6. Phương pháp sàng lọc đột biến*

Hệ thống CRISPR/Cas9 cho phép các nhà chọn giống tạo ra các đột biến mong muốn trong hệ gen cây trồng. Bằng công cụ này, rất nhiều thư viện cây trồng đột biến gen đã được tạo ra, ví dụ như thư viện lúa và cà chua đột biến trên toàn hệ gen. Công việc sàng lọc một số lượng lớn các thể đột biến, đặc biệt là các đột biến không biểu hiện kiểu hình, cần phải được thực hiện bằng nhiều kỹ thuật khác nhau như phương pháp ACT-PCR (annealing at critical temperature polymerase chain reaction), phân tích nhiệt độ nóng chảy (high-resolution melting analysis - HRMA), điện di trên gel polyacrylamide (Polyacrylamide gel electrophoresis PAGE-mediated genotyping), T7 endonuclease I (T7EI) và kỹ thuật phát hiện sự thay đổi vị trí nhận biết của enzyme cắt giới hạn. Bên cạnh đó, một đột biến về kiểu gen có thể dễ dàng được phát hiện nếu nó thể hiện ra kiểu hình một cách rõ ràng [101]. Ví dụ, sự xuất hiện của đột biến trên gen mã hóa phytoen desaturase (tạo ra bằng công cụ CRISPR/Cas9) có thể được phát hiện ngay thông qua kiểu hình bạch tạng của cá thể mang đột biến. Tuy nhiên, việc xác định mối liên kết giữa gen đích và kiểu hình (có thể dễ dàng quan sát) là một thách thức rất lớn của phương pháp sàng lọc dựa vào kiểu hình. Phương pháp giải trình tự độ phân giải cao là một phương pháp rất hiệu quả và chính xác để sàng lọc các thể đột biến tạo ra bằng hệ thống CRISPR/Cas9. Đồng thời, phương pháp giải trình tự toàn hệ gen cũng là một công cụ hữu ích để phát hiện các thể đột biến không mang DNA ngoại lai [101].



**Hình 1.10. Các bước cơ bản trong chỉnh sửa gen thực vật bằng hệ thống CRISPR/Cas9**

**Ghi chú:** Chỉnh sửa gen thực vật bằng CRISPR/Cas9 gồm các bước: (1) sàng lọc vị trí đích trong hệ gen; (2) thiết kế sgRNA; (3) nhân dòng sgRNA vào vector tái tổ hợp; (4) chuyển vector tái tổ hợp vào cây; (5) tái sinh và chọn lọc cây chuyển gen [101].

### 1.3.4. Ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas9 trong chỉnh sửa gen thực vật

#### 1.3.4.1. Ứng dụng CRISPR/Cas9 trong nghiên cứu cơ bản

##### a. Bất hoạt đơn gen

Bất hoạt đơn gen là dạng chỉnh sửa gen đơn giản nhất. DSB tạo ra bởi CRISPR/Cas9 có thể dẫn tới tạo ra các indel tại vị trí bị đứt gãy thông qua cơ chế sửa chữa DNA NHEJ. Một số indel xuất hiện trên khung đọc mở của gen thường gây ra đột biến dịch khung làm thay đổi biểu hiện của gen, dẫn tới bất hoạt gen đích [101].

Trong một nghiên cứu đã công bố trước đây, các tác giả đã sử dụng công cụ CRISPR/Cas9 để chứng minh *abp1* mang một alen lặn và gen này không phải là một thành phần quan trọng trong con đường truyền tín hiệu auxin hay không ảnh hưởng tới sự phát triển của *Arabidopsis*. Sử dụng tế bào trần của lúa mỳ, hai gen liên quan tới yếu tố stress phi sinh học *TaDREB3* and *TaDREB2* đã được nghiên

cứ chức năng nhờ công cụ CRISPR/Cas. Tương tự, để chứng minh vai trò của *OsAnn3* và *SAPK2* trong đáp ứng chống chịu stress phi sinh học của lúa; hay vai trò của *SIMAPK3* trong cơ chế đáp ứng chống chịu hạn của cà chua đã được chứng minh thông qua đột biến bất hoạt gen bằng hệ thống CRISPR/Cas9 [101]. Chức năng của các gen tương đồng trong các loài khác nhau cũng có thể nhanh chóng được so sánh bằng công cụ CRISPR/Cas9. Ví dụ, thông qua các đột biến bằng CRISPR/Cas9, các nhà khoa học đã chứng minh hai gen *shr* và *scr* ở *Arabidopsis* và cà chua có chức năng trái ngược nhau [68].

#### *b. Chỉnh sửa đa gen*

Ở thực vật, các gen tương đồng trong cùng họ gen thường được sử dụng với mục đích tinh chỉnh các quá trình sinh học của tế bào. Nếu chỉ bất hoạt một gen đơn lẻ có thể không tạo ra thay đổi về mặt kiểu hình do hoạt động bù trừ của những gen khác trong cùng họ gen. Chính vì vậy, một công cụ phân tử chỉnh sửa đồng thời đa gen sẽ là một giải pháp rất hữu ích hỗ trợ cho các nghiên cứu chức năng hệ gen và nghiên cứu ứng dụng. Các nhà khoa học có thể dễ dàng kết hợp nhiều cấu trúc biểu hiện sgRNA trên một cùng một plasmid, từ đó chỉnh sửa đa gen bằng hệ thống CRISPR/Cas9 [68]. Ví dụ, ở thực vật có hai gen *magnesium-chelatase subunit I* (*CHLI*) tương đồng cùng tham gia vào quá trình quang hợp. Các nhà khoa học đã thiết kế 2 sgRNA, mỗi sgRNA tác động tới một gen *CHLI* và biến nạp đồng thời vào *Arabidopsis*. Dòng cây mang đột biến trên cả hai gen đã biểu hiện ra kiểu hình bạch tạng. Kết quả nghiên cứu này đã làm sáng tỏ chức năng của hai gen đối với quá trình sinh tổng hợp diệp lục. Một ví dụ khác về bốn locus gen mã hóa tiểu phần katanin p80 (*KTN80.1*, *KTN80.2*, *KTN80.3*, và *KTN80.4*) ở *Arabidopsis*. Các nhà nghiên cứu đã thiết kế 3 sgRNA để bất hoạt đồng thời cả bốn gen *KTN80* bằng CRISPR/Cas9. Thể đột biến bốn gen biểu hiện ra kiểu hình cây lùn, chứng tỏ rằng các gen này hoạt động dư thừa và cung cấp một cái nhìn toàn cảnh về chức năng của *KTN80* trong quá trình phát triển. Tương tự, các nhà khoa học cũng đã chứng minh việc giảm số lượng bản sao của gen *Sc-i* ở lúa có thể tạo ra alen trung tính nhân tạo. Trong nghiên cứu này, hai gen *Sc-ib1* và *Sc-ib2* trong số ba gen *Sc-ib1*,

*Sc-ib2* và *Sc-ia* đã bị bất hoạt bằng hệ thống CRISPR/Cas9 sử dụng một sgRNA duy nhất. Việc giảm số lượng gen *Sc-i* đã chuyển đổi các alen không tương thích với quá trình lai thành alen tương thích hoàn toàn. Như vậy, đột biến đa gen bằng CRISPR/Cas9 là một công cụ rất hữu hiệu để tạo ra đột biến nhằm giải đáp các câu hỏi về chức năng sinh học của gen [68].

#### 1.3.4.2. Nghiên cứu cải tiến tính trạng cây trồng bằng CRISPR/Cas9

Đặc điểm di truyền của cây trồng có thể được cải tiến thông qua việc bất hoạt các gen kiểm soát các tính trạng không mong muốn và CRISPR/Cas9 đã trở thành công cụ hữu hiệu để giải quyết vấn đề này. Nhờ ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9, các nhà chọn tạo giống đã nâng cao được năng suất, chất lượng, khả năng chống chịu yếu tố stress sinh học và phi sinh học ở nhiều đối tượng cây trồng khác nhau [33].

Nghiên cứu bất hoạt đồng thời các gen liên quan tới kích thước và trọng lượng hạt (*GS3*, *GW2*, and *GW5*) ở lúa đã dẫn tới sự tích lũy tính trạng, làm tăng rõ rệt kích thước và trọng lượng hạt. Tương tự, Li và các cộng sự đã sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 để bất hoạt 3 gen *Hd2*, *Hd 4* và *Hd5* nhằm tạo ra dòng lúa có kiểu hình trở bông sớm [68]. Công nghệ CRISPR/Cas9 cũng có nhiều ứng dụng khác để tăng cường chất lượng cho cây trồng, bao gồm tăng chất lượng bảo quản, tăng giá trị dinh dưỡng, tạo mùi thơm và thay đổi hàm lượng tinh bột. Dòng lúa có hàm lượng amylose cao và ít tinh bột được tạo ra bằng phương pháp bất hoạt gen *SBEIIb* mã hóa enzyme tạo nhánh tinh bột thông qua công cụ CRISPR/Cas9. Một số ví dụ khác về việc ứng dụng CRISPR/Cas9 để tạo ra giống cây trồng mới có chất lượng cao như cây lanh (*Camelina sativa*) và cây cải dầu (*Brassica napus*) có hạt chứa hàm lượng dầu axit oleic cao; cà chua có thời gian bảo quản lâu hay hàm lượng lycopene và axit  $\gamma$ -aminobutyric cao; khoai tây có hàm lượng độc tố steroid glycoalkaloid thấp do giảm sự hình thành rễ tơ [33, 68, 101].

Hệ thống CRISPR/Cas9 có thể được sử dụng để trực tiếp bất hoạt các gen *S* của cây trồng tạo ra tính kháng bệnh ổn định. Các nhà nghiên cứu đã tăng cường tính kháng các stress sinh học, bao gồm tính kháng bệnh do nấm, vi khuẩn và virus

của nhiều loài thực vật thông qua công cụ CRISPR/Cas9. Ví dụ, bằng công cụ TALEN và CRISPR/Cas9, các nhà khoa học đã bất hoạt 6 alen *TaMLO* và thu được các dòng lúa mì đột biến kháng bệnh phấn trắng. Tương tự, Nekrasov và các cộng sự cũng công bố kết quả tạo ra dòng cà chua đột biến gen *MLO* kháng bệnh phấn trắng bằng hệ thống bất hoạt gen CRISPR/Cas9 [33, 68]. Trong một nghiên cứu khác, promoter *CsLOB1* mang trình tự EBE *PthA4* liên kết với effector PthA4 của *Xanthomonas citri* ssp. *citri* (*Xcc*) gây ra bệnh thối quả ở các cây có múi, bằng cách gây đột biến tại vị trí EBE *PthA4* đã tạo ra các dòng cây biểu hiện tính kháng một cách hiệu quả với *Xcc*. Đối với các bệnh có tác nhân là virus, các nhà khoa học đã sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 để tạo ra dòng lúa đột biến gen *eif4g* kháng bệnh tungro; cà chua đột biến gen *eif4g* kháng potyvirus phổ rộng hay bông đột biến gen *clnud* kháng bệnh xoắn lá. Các kết quả nghiên cứu này chứng tỏ công nghệ CRISPR/Cas9 có thể giúp tăng cường tính kháng bệnh cho cây trồng [33, 68].

Công nghệ CRISPR/Cas9 cũng đã được ứng dụng nhằm tăng cường tính chống chịu các yếu tố stress phi sinh học cho nhiều đối tượng cây trồng như lúa, lúa mì, ngô, bông, đậu tương, cà chua và khoai tây, giúp hiện đại hóa các chương trình chọn giống cây trồng [68, 101]. Bằng cách bất hoạt gen *OsARM1*, *OsNramp5* và *OsHAK1*, các nhà chọn giống phân tử đã tạo ra được dòng lúa có khả năng chịu được cadmium (Cd), caesium (Cs) phóng xạ và arsenic (As) ở nồng độ thấp. Nghiên cứu bất hoạt hai gen mã hóa protein liên kết RNA sợi đôi (*Drb2a* và *Drb2b*) cũng đã tạo ra dòng đậu tương kháng hạn và mặn. Gần đây, Zhang và nhóm nghiên cứu đã phát hiện ra rằng khả năng chống chịu mặn của các dòng lúa bất hoạt gen *OsRR22* tăng đáng kể so với dòng đối chứng ở giai đoạn cây non [68, 101, 136].

Như vậy, các kết quả nghiên cứu ở trên đã chứng tỏ chất lượng của cây trồng có thể được cải tiến bằng cách ứng dụng hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9.

#### 1.3.4.3. Nghiên cứu chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá bằng CRISPR/Cas9

Bệnh bạc lá gây ra bởi vi khuẩn *Xoo* là bệnh rất phổ biến trên lúa, đe dọa đến an ninh lương thực toàn cầu. Cho đến nay, rất nhiều phương thức khác nhau đã được các nhà chọn giống sử dụng để tạo ra giống lúa kháng bệnh bạc lá, bao

gồm cả các phương thức chọn giống truyền thống và chọn giống phân tử. Tuy nhiên, vi khuẩn *Xoo* tiến hóa rất nhanh để chống lại cơ chế phòng vệ của cây chủ, chính vì vậy, hướng tiếp cận mới, bao gồm cả chọn giống bằng công cụ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 là chiến lược cần thiết để tăng tính kháng bạc lá cho các giống lúa trong sản xuất [135].

Trên cơ sở bất hoạt các gen *S* của lúa thuộc họ gen *OsSWEET* bằng công cụ CRISPR/Cas9, các nhà nghiên cứu đã tạo ra được các giống lúa kháng bệnh bạc lá. Ví dụ, thông qua việc gây đột biến promoter *OsSWEET13* trên giống lúa *indica* bằng công nghệ CRISPR/Cas9, Zhou và cộng sự đã tạo được dòng lúa kháng vi khuẩn *Xoo* [140]. Bằng sử dụng công nghệ CRISPR/Cas9, Xu và cộng sự (2019) đã tạo ra các đột biến đồng thời trên promoter *OsSWEET11*, *OsSWEET14* của giống lúa Kitaake mang alen kháng lặn của *OsSWEET13<sub>Kit</sub>* tương tự gen kháng *xa25*. Dòng lúa chỉnh sửa gen MS14K tạo được có khả năng kháng 122/131 chủng và miễn cảm với 9/131 chủng *Xoo* (mang các TALE tương tự PthXo2 hoạt hóa gen *OsSWEET13*). Do vậy, dòng lúa MS14K tiếp tục được sử dụng làm vật liệu để chỉnh sửa *OsSWEET13*. Cuối cùng, các tác giả đã thu được dòng lúa chỉnh sửa cả 3 gen *OsSWEET11*, *OsSWEET13* và *OsSWEET14* có khả năng kháng với phổ rộng tất cả các chủng vi khuẩn *Xoo* nghiên cứu [122]. Tương tự, bằng cách sử dụng 6 sgRNA tác động đồng thời vào 3 promoter *OsSWEET11*, *OsSWEET13* và *OsSWEET14*, Oliva và cộng sự (2019) đã tạo ra giống lúa Kitaake kháng phổ rộng với tất cả các chủng vi khuẩn *Xoo* được nghiên cứu [94]. Mặc dù một số nghiên cứu trước đây đã chứng tỏ việc bất hoạt hoàn toàn gen *SWEET* có thể gây ra những ảnh hưởng tiêu cực tới sinh trưởng và năng suất cây lúa chỉnh sửa gen tuy nhiên, Kim và cộng sự (2019) đã tạo ra dòng lúa Kitaake bất hoạt gen *OsSWEET11* thông qua công cụ CRISPR/Cas9 kháng bệnh bạc lá và không bị ảnh hưởng tới năng suất hạt [71].

Trong khi rất nhiều nghiên cứu chỉnh sửa gen tạo tính kháng bạc lá đã được áp dụng trên giống lúa mô hình, số lượng giống lúa sản xuất được ứng dụng công nghệ này còn khá hạn chế. Gần đây, để cải tiến khả năng kháng bệnh bạc lá của

giống lúa Zhonghua 11 (CR-S14), Zeng và cộng sự (2020) đã bất hoạt gen *OsSWEET14* bằng công cụ CRISPR/Cas9, giống lúa chỉnh sửa gen kháng được cả chủng *Xoo* châu Á và châu Phi [135]. Giống lúa Super Basmati rất phổ biến ở Ấn Độ cũng được tăng cường tính kháng bạc lá thông qua chỉnh sửa đồng thời 3 vị trí trên promoter *OsSWEET14* bằng hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 [133]. Đặc biệt, nhóm nghiên cứu của Oliva (2019) đã tạo ra tính kháng phổ rộng với tất cả các chủng vi khuẩn *Xoo* châu Á được nghiên cứu cho 2 giống lúa chủ lực trong sản xuất IR64 và Ciherang-Sub1 bằng cách tạo ra 5 đột biến trên vùng promoter của 3 gen *OsSWEET11*, *OsSWEET13* và *OsSWEET14* [94]. Mới đây nhất, một nhóm nghiên cứu ở Ấn Độ cũng đã ứng dụng thành công công nghệ CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa *OsSWEET14* trên giống lúa chủ lực CO51, dòng lúa mang đột biến thêm 1 nucleotide ở vị trí số 17 trên EBE *AvrXa7* thể hiện tính kháng với chủng vi khuẩn *Xoo* thử nghiệm [23]. Riêng ở Việt Nam, CRISPR/Cas9 đã và đang được triển khai bước đầu mang lại hiệu quả khả quan, điển hình là nghiên cứu chỉnh sửa gen tạo dòng lúa Bắc Thơm 7 kháng bệnh bạc lá [14].

Tóm lại, các thành tựu nghiên cứu trên đã chứng tỏ triển vọng rất lớn của hướng tiếp cận tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá bằng công cụ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9. Vì vậy, việc áp dụng hệ thống CRISPR/Cas9 vào tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá là một hướng nghiên cứu rất hiện đại và nhiều tiềm năng, bắt kịp xu hướng nghiên cứu chọn giống trên thế giới, góp phần nâng cao năng suất chất lượng các giống lúa trồng vốn miễn cảm với bệnh bạc lá lúa.

## Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. VẬT LIỆU

#### 2.1.1. Mẫu thực vật

Giống lúa TBR225 được cung cấp bởi Công ty cổ phần Tập đoàn Giống cây trồng Thái Bình [1]. Giống lúa IR24 (chuẩn nhiễm vi khuẩn *Xoo*) [134] do Trung tâm Tài nguyên Thực vật cung cấp.

Mẫu bệnh phẩm bạc lá thu thập từ các vùng trồng lúa ở phía Bắc Việt Nam trong giai đoạn 2016 - 2018 được lưu giữ tại Bộ môn Bệnh học phân tử (Viện Di truyền Nông nghiệp) (Bảng 2.1).

**Bảng 2.1. Mẫu lúa nhiễm bệnh bạc lá (2016-2018) sử dụng trong nghiên cứu**

STT	Địa điểm thu thập	Giống lúa	Số mẫu
1	Hà Nội	TBR225, T10, Thiên Ưu, Bắc Thơm 7	10
2	Hải Phòng	Bắc Thơm 7	2
3	Bắc Giang	TBR225	2
4	Thái Bình	Bắc Thơm 7, TBR225	2
5	Hà Nam	TBR225	2
6	Nam Định	TBR225, Đông A1, Bắc Thơm 7	5
7	Bắc Ninh	TBR225	3
8	Vĩnh Phúc	Thiên Ưu	2
9	Nghệ An	Bắc Thơm 7	5
10	Ninh Bình	TBR225	2
Tổng			35

#### 2.1.2. Chủng vi sinh vật

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  được mua từ hãng Thermo Fisher Scientific (Hoa Kỳ). Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 khả biến được mua từ Công ty Clontech Laboratories (Hoa Kỳ). Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 mang vector chuyển gen biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa *SW14-TBR* (gọi tắt là pCas9/sgRNA-SW14) [11]; chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA 105 mang vector pCAMBIA1302 chứa gen chỉ thị *GFP* (*Green fluorescent protein*); bộ chủng vi



khuẩn *Xoo* (Bảng 2.2) [16] và chủng vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* được cung cấp bởi Bộ môn Bệnh học phân tử (Viện di truyền Nông nghiệp).

**Bảng 2.2. Các chủng vi khuẩn *Xoo* sử dụng trong nghiên cứu**

STT	Tên chủng	Địa điểm thu thập	Năm thu thập
1	VXO_11	Gia Lâm, Hà Nội	2013
2	VXO_16	An Lão, Hải Phòng	2013
3	VXO_25	Hải Hậu, Nam Định	2014
4	VXO_27	Thanh Oai, Hà Nội	2014
5	VXO_30	Cẩm Xuyên, Hà Tĩnh	2015

### 2.1.3. Vector và oligonucleotide

Vector pEN-V1 (mang cấu trúc biểu hiện sgRNA) được tạo ra từ khung vector pENTR4 (Invitrogen) (Phụ lục 2) và pCas9 (mang cấu trúc biểu hiện *Cas9*) do nhóm nghiên cứu của Tiến sĩ Sébastien Cunnac (Viện Nghiên cứu và phát triển, Montpellier, Pháp) cung cấp [118]. Vector pCas9/sgRNA-SW14 (Phụ lục 3) [100] và pCAMBIA1302 mang gen chỉ thị *GFP* (Phụ lục 4) do Bộ môn Bệnh học phân tử (Viện Di truyền Nông nghiệp) cung cấp.

Các oligonucleotide (Phụ lục 5) sử dụng trong nghiên cứu được thiết kế bằng phần mềm Primer3 và đặt sinh tổng hợp từ Công ty Cổ Phần Phù Sa Genomics. (Việt Nam).

### 2.1.4. Hóa chất

Các loại enzyme cắt giới hạn; T4 DNA ligase; *Taq* DNA polymerase; thang chuẩn DNA 1,0 kb; bộ kit tinh sạch DNA plasmid GeneJET Plasmid Miniprep Kit; bộ kit tinh sạch DNA từ gel agarose GenJET Gel Extraction; bộ kit tách chiết DNA tổng số từ vi khuẩn Wizard® Genomic DNA Purification; bộ kit nhân dòng gen Gateway cloning; bộ kit sinh tổng hợp cDNA và qPCR được đặt mua của hãng Thermo Scientific, Promega và Cleaver Scientific (Hoa Kỳ). Các hóa chất sử dụng để tinh sạch RNA (trizol) và các loại kháng sinh được đặt mua từ hãng Invitrogen (Hoa Kỳ). Các hóa chất cơ bản sử dụng cho sinh học phân tử được mua của công ty Sigma và Merk (Hoa Kỳ) đều đạt độ tinh khiết cần thiết dùng cho sinh học phân tử.

### 2.1.5. Thiết bị

Máy PCR 9700 của hãng Perkin Elmer; hệ thống điện di DNA và RNA của hãng Biorad; máy ly tâm Universal 320R của hãng Hettich, Biofuge 28RS của hãng Heraeus; máy chụp ảnh huỳnh quang FireReader của hãng UVITEC; máy Real-Time PCR System 7500 của hãng Life Technologies.

## 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.2.1. Tách chiết, định lượng DNA/RNA

#### 2.2.1.1. Tách chiết DNA/RNA từ lúa

##### a. Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của lúa được tách chiết theo phương pháp của Doyle và Doyle, sử dụng dung dịch CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) 2% [45]. Mẫu lá lúa có khối lượng khoảng 100 mg được nghiền với N<sub>2</sub> lỏng cho tới khi thành dạng bột mịn, sau đó được chuyển vào ống eppendorf 2,0 ml. Đệm CTAB được bổ sung vào ống với thể tích 0,5 ml, hỗn hợp được ủ ở 65°C trong 60 phút. Ống được ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C, sau đó phần dịch nổi được chuyển sang ống mới. Dung dịch chloroform:isoamylalcohol (24:1) được bổ sung vào ống với thể tích 0,4 ml, hỗn hợp được lắc đều và ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Phần dịch nổi được chuyển sang ống mới, 0,6 thể tích isopropanol được bổ sung vào ống. Ống hỗn hợp này được đảo đều trong 5-7 phút và ủ ở -20°C trong 1 giờ. Ống được ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 15 phút để thu tủa. Kết tủa được rửa trong 500 µl ethanol 70%, sau đó ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Kết tủa DNA được làm khô trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Năm mươi µl H<sub>2</sub>O khử ion khử trùng được bổ sung cùng với 2,0 µl RNase A (10 mg/ml) để hòa tan tủa DNA và loại bỏ RNA còn lẫn trong mẫu. Mẫu DNA tổng số được bảo quản ở -20°C và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

##### b. Tách chiết RNA tổng số

RNA tổng số được tách chiết từ lá lúa non bằng trizol theo quy trình hướng dẫn của hãng Invitrogen (Hoa Kỳ). Mẫu lá lúa tươi được thu và bảo quản trong N<sub>2</sub> lỏng cho tới khi tách chiết. Mẫu lá có khối lượng 100 mg được nghiền thành bột

mịn trong N<sub>2</sub> lỏng và chuyển vào ống eppendorf 1,5 ml. Sau đó, 1,0 ml trizol được bổ sung vào ống; ống được đảo đều và ủ trên đá trong 5 phút. Tiếp theo, 200 µl chloroform được bổ sung vào hỗn hợp; ống được tiếp tục được ủ trên đá trong 15 phút. Hỗn hợp được ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút, ở 4°C. Dịch nổi được chuyển sang ống eppendorf 1,5 ml mới. Isopropanol được bổ sung vào ống dung dịch với thể tích 500 µl, ống được ủ trên đá trong 15 phút. Kết tủa RNA được thu lại bằng cách ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút, trong 15 phút, ở 4°C và được rửa lại bằng 1,0 ml ethanol 70%. Ống được lắc mạnh trong 15 giây, sau đó được ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút, ở 4°C. Kết tủa được thu lại và làm khô trong 1 giờ. Kết tủa RNA cuối cùng được hòa tan lại trong 50 µl dung dịch DEPC (diethyl pyrocarbonate) 0,2% và bảo quản ở nhiệt độ -80°C.

#### 2.2.1.2. Tách chiết DNA từ vi khuẩn

##### a. Tách chiết DNA plasmid từ vi khuẩn *E. coli*

DNA tái tổ hợp được tinh sạch từ tế bào vi khuẩn *E. coli* bằng bộ kit GenJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ). Một khuẩn lạc được nuôi lắc trong 10 ml môi trường LB lỏng có bổ sung chất kháng sinh thích hợp với tốc độ 220 vòng/phút ở 37°C qua đêm. Tế bào được thu bằng cách ly tâm ở vận tốc 6.000 vòng/phút trong 10 phút, ở 4°C, sau đó được hòa trở lại trong 250 µl Resuspension Solution đã bổ sung RNase A. Hai trăm năm mươi µl Lysis Solution được bổ sung vào dung dịch tế bào. Hỗn hợp trong ống được đảo nhẹ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, sau đó được trung hòa bởi 350 µl Neutralization Solution. Ống được ly tâm với vận tốc 13.000 vòng/phút trong 10 phút, ở 4°C. Dịch nổi sau khi ly tâm được đưa lên cột tinh sạch plasmid và ly tâm 10.000 vòng/phút trong 1 phút. Wash Solution được bổ sung vào cột với thể tích 500 µl; cột được ly tâm 30 – 60 giây với tốc độ 10.000 vòng/phút, sau đó loại bỏ dịch qua cột. Bước này được lặp lại một lần nữa. Cột được làm khô ở nhiệt độ phòng trong khoảng 30 phút. Năm mươi µl Elution Buffer được bổ sung vào chính giữa màng silica, plasmid được thu bằng cách ly tâm cột với vận tốc 10.000 vòng/phút trong 1 phút. Mẫu DNA plasmid tinh sạch được bảo quản ở -20°C.

### *b. Tách chiết DNA tổng số từ vi khuẩn Xoo*

DNA tổng số được tách chiết từ vi khuẩn *Xoo* bằng bộ kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Hoa Kỳ). Một khuẩn lạc *Xoo* được cấy ria trên môi trường PSA và nuôi ở 28°C trong 48 giờ. Tế bào vi khuẩn được hoà trở lại trong 600 µl Nucleic Lysis Solution. Hỗn hợp được ủ 80°C trong 5 phút, sau đó làm mát về nhiệt độ phòng. Ba µl RNase Solution được bổ sung vào ống và trộn đều; hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 15-60 phút. Hai trăm µl Protein Precipitation Solution được bổ sung vào ống, ống được trộn đều và ủ trên đá trong 5 phút sau đó ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Lốp dịch nổi được chuyển sang ống eppendorf 1,5ml mới; một thể tích isopropanol tương đương được bổ sung vào ống. Ống được ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút để thu tủa. Kết tủa được rửa trong 600 µl ethanol 70%; ống sau đó được ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để thu lại kết tủa DNA (bước này được lặp lại 2 lần). Kết tủa DNA được làm khô ở nhiệt độ phòng và hòa tan bằng 100 – 200 µl Rehydration Solution để qua đêm ở 4°C và sau đó bảo quản ở -20°C để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

#### *2.2.1.3. Điện di DNA/RNA trên gel agarose*

DNA/RNA trong mẫu thí nghiệm được phát hiện và định lượng tương đối bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose và nhuộm Ethidium Bromide (EtBr) theo phương pháp của Sambrook và Russel (2001) [105].

##### *a. Điện di DNA*

Một khối lượng agarose 1,0 gam được đun nóng trong 100 ml đệm TAE (Tri-Acetate-EDTA) và đúc vào khuôn. Hỗn hợp mẫu gồm 5 µl mẫu DNA được trộn với 1 µl đệm mẫu có chứa bromophenol xanh, xylene cyanol và EtBr (50 µg/µl) được tra vào các giếng trên bản gel. Mẫu được điện di với hiệu điện thế 10 V/cm gel. Sau đó, gel được lấy ra và soi dưới ánh sáng tử ngoại, các băng DNA gắn với EtBr xuất hiện dưới dạng các băng màu sáng trên nền gel đen.

##### *b. Điện di RNA*

Agarose với khối lượng 1,8 gam được đun nóng trong 170 ml H<sub>2</sub>O, sau đó làm mát về 65°C. Mười ml formaldehyde (37%) và 20 ml đệm MOPS 10X được bổ

sung vào dung dịch; hỗn hợp được lắc đều và đổ vào khuôn đúc gel. Mười µl mẫu RNA được trộn với 20 µl đệm mẫu RNA (có chứa formamide, formaldehyde và EtBr); hỗn hợp mẫu được ủ ở 65°C trong 5 phút và làm mát trên đá. Trước khi tra mẫu điện di, gel được điện di khởi động ở hiệu điện thế 5 V/cm trong 5 phút. Mẫu được trộn với 2 µl đệm có chứa chất màu chỉ thị bromophenol xanh, sau đó được tra vào giếng và điện di với hiệu điện thế 100 V trong 10 phút và 65 V trong 90 phút. Sau đó, gel được lấy ra và soi dưới ánh sáng tử ngoại của máy soi gel, các băng gắn với EtBr xuất hiện dưới dạng các băng màu sáng trên nền gel màu đen.

#### 2.2.1.4. Tinh sạch DNA từ gel agarose

DNA được tinh sạch từ gel agarose bằng bộ kit GenJET Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) theo quy trình hướng dẫn. Băng DNA quan tâm được cắt chính xác từ gel agarose và đưa vào ống eppendorf 1,5 ml. Binding buffer được bổ sung vào ống (1 µl đệm ~ 1 mg gel); ống được ủ ở 60°C trong khoảng 10 phút đến khi gel tan hoàn toàn. Dung dịch chứa gel agarose đã hòa tan được chuyển lên cột tinh sạch và ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 1 phút. Năm trăm µl Wash buffer được bổ sung vào cột và được ly tâm trong 1 phút ở vận tốc 10.000 vòng/phút. Bước rửa cột được lặp lại một lần nữa. Một trăm µl Elution buffer được bổ sung vào chính giữa lớp màng silica của cột. DNA được thu bằng cách ly tâm cột với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 1 phút. Mẫu DNA tinh sạch được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose mục 2.2.1.3a và được bảo quản ở -20°C.

#### 2.2.1.5. Định lượng DNA bằng phương pháp đo quang phổ

Hàm lượng DNA được xác định bằng đo quang phổ hấp thụ ở bước sóng 260 nm ( $OD_{260nm}$  – Optical Density<sub>260nm</sub>) theo công thức:

$$\text{Hàm lượng DNA sợi đôi } (\mu\text{g/ml}) = 50 \times OD_{260nm} \times n$$

(Trong đó:  $OD_{260nm}$ : độ hấp thụ của dung dịch DNA ở 260 nm

$n$  : hệ số pha loãng).

#### 2.2.1.6. Nhân bản DNA bằng PCR

Phản ứng chuỗi trùng hợp (polymerase chain reaction – PCR) là kỹ thuật phổ biến trong sinh học phân tử nhằm nhân bản một đoạn DNA dựa vào các chu kỳ nhiệt [105]. Thành phần PCR bao gồm: 0,5 µl DNA khuôn; 1,5 µl dNTP (2 mM);

mỗi 0,6  $\mu\text{l}$  mỗi loại mỗi xuôi và mỗi ngược (10 pmol/ml); 0,5  $\mu\text{l}$  *Taq* DNA polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ ); 1,5  $\mu\text{l}$  đệm *Taq* DNA polymerase 10 X và 9,8  $\mu\text{l}$  nước cất khử ion khử trùng. Phản ứng được thực hiện bằng máy gia nhiệt tự động trong 30 – 40 chu kì, mỗi chu kì theo ba giai đoạn cơ bản: biến tính ở 94°C trong vòng 30 – 60 giây; gắn mỗi ở 40 – 70°C trong 30 – 60 giây; kéo dài chuỗi ở 72°C trong 30 – 120 giây. Sản phẩm PCR được giữ ở 4°C cho đến khi phân tích bằng kỹ thuật điện di (mục 2.2.1.3a).

#### 2.2.1.7. Đánh giá mức độ biểu hiện gen bằng RT-qPCR

Mẫu RNA tinh sạch được dùng cho phản ứng tổng hợp cDNA bằng bộ kit Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) theo quy trình hướng dẫn của hãng, sử dụng mỗi oligo dT. Một  $\mu\text{g}$  mẫu RNA tinh sạch được trộn với 1,0  $\mu\text{l}$  dNTP (100 mM); 1,0  $\mu\text{l}$  oligo dT (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ); 2,0  $\mu\text{l}$  đệm 10 X trong ống PCR thể tích 200  $\mu\text{l}$ . H<sub>2</sub>O được bổ sung vào hỗn hợp để đạt tổng thể tích là 15  $\mu\text{l}$ . Hỗn hợp được ủ ở 65°C trong 5 phút, sau đó được làm mát và để ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Bốn  $\mu\text{l}$  đệm 5X và một  $\mu\text{l}$  Reverse Transcriptase (5 U/ $\mu\text{l}$ ) được thêm vào ống phản ứng. Ống được ủ ở 42°C trong 60 phút để phản ứng tổng hợp cDNA xảy ra. Sản phẩm phản ứng được bảo quản ở nhiệt độ -80°C để sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

Mẫu cDNA được sử dụng làm khuôn cho thí nghiệm qPCR với các cặp mỗi đặc hiệu cho từng gen đích. Gen *OsEF1 $\alpha$*  được sử dụng làm gen nội chuẩn [61]. Thành phần của phản ứng bao gồm: 5,0  $\mu\text{l}$  hỗn hợp PCR SYBR Green Master Mix 2 X; 0,25  $\mu\text{l}$  mỗi loại mỗi (10 pmol); 1,0  $\mu\text{l}$  cDNA khuôn; 0,15  $\mu\text{l}$  chất nội chuẩn tín hiệu huỳnh quang ROX; 3,35  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O. Phản ứng này được thực hiện với chu trình nhiệt: (94°C – 30 giây, 60°C – 20 giây, 72°C - 30 giây) x 35 chu kỳ bằng hệ thống máy Real-Time PCR System 7500 của hãng Life Technologies.

Mức độ biểu hiện tương quan giữa gen đích trong các mẫu cây được tính toán dựa trên giá trị C<sub>t</sub> thu được theo công thức của Jain và cộng sự [61].

$$\text{Mức độ biểu hiện gen của mẫu} / \text{mức độ biểu hiện của đối chứng} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$(\text{Trong đó: } \Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ mẫu}} - \Delta C_{t \text{ đối chứng}}$$

$$\Delta C_{t \text{ mẫu}} = C_{t \text{ mẫu}} - C_{t \text{ gen nội chuẩn}}$$

$$\Delta C_{t \text{ đối chứng}} = C_{t \text{ đối chứng}} - C_{t \text{ gen nội chuẩn}})$$

## **2.2.2. Nhân dòng và giải trình tự đoạn DNA đích**

### *2.2.2.1. Xử lý DNA bằng enzyme cắt giới hạn*

Phản ứng cắt DNA (plasmid/sản phẩm PCR) được thực hiện bằng enzyme cắt giới hạn [105]. Thành phần phản ứng bao gồm: 17,0  $\mu$ l DNA; 2,0  $\mu$ l đệm phản ứng 10 X; 1,0  $\mu$ l enzyme (5 U/ $\mu$ l). Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C trong 30 phút – 4 giờ. Sản phẩm phản ứng được điện di trên gel agarose 1,0% (mục 2.2.1.3a).

### *2.2.2.2. Ghép nối DNA*

Phản ứng ghép nối hai đoạn DNA được thực hiện bằng T4 DNA ligase [105]. Thành phần phản ứng bao gồm: 4,0  $\mu$ l mỗi đoạn DNA; 1,0  $\mu$ l đệm T4 DNA Ligase 10 X; 1,0  $\mu$ l T4 DNA ligase (5 U/ $\mu$ l). Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 16°C trong 4 giờ hoặc 4°C qua đêm. Sản phẩm phản ứng được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  khả biến.

### *2.2.2.3. Biến nạp DNA plasmid vào tế bào vi khuẩn E. coli*

DNA plasmid được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  bằng phương pháp sốc nhiệt [105]. Tế bào *E. coli* khả biến (bảo quản trong tủ lạnh sâu -80°C) được rã đông trên đá trong 10 phút. Tiếp đó, mẫu DNA (hỗn hợp phản ứng ghép nối) được bổ sung vào dung dịch tế bào và được ủ trên đá trong 20 phút. Tế bào được sốc nhiệt bằng cách chuyển sang bể ổn nhiệt 42°C trong 45 giây, sau đó được chuyển lại ủ trên đá trong 2 phút. Tiếp theo, 450  $\mu$ l LB lỏng được bổ sung vào hỗn hợp biến nạp; sau đó tế bào được ủ ở 37°C trong 20 phút trước khi được nuôi lắc với tốc độ 220 vòng/phút trong 30 phút. Hỗn hợp tế bào được cấy trải trên đĩa môi trường LB đặc có bổ sung kháng sinh thích hợp và được ủ ở 37°C qua đêm.

### *2.2.2.4. Sàng lọc thể biến nạp bằng PCR trực tiếp khuẩn lạc*

Thể biến nạp xuất hiện trên môi trường chọn lọc được kiểm tra bằng phương pháp PCR trực tiếp khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu, phương pháp này tương tự như phương pháp PCR đã trình bày (mục 2.2.1.6 trong đó DNA khuôn được lấy trực tiếp từ khuẩn lạc). Một khuẩn lạc dương tính được chọn ngẫu nhiên để tách chiết DNA plasmid theo quy trình đã trình bày (mục 2.2.1.2a).

#### 2.2.2.5. Kiểm tra vector tái tổ hợp

Plasmid sau khi tinh sạch được kiểm tra lần thứ nhất bằng phương pháp PCR (mục 2.2.1.6) lần lượt với các cặp mồi đặc hiệu cho khung vector và đoạn DNA đích. Plasmid tinh sạch được kiểm tra lần thứ hai bằng cách xử lý với enzyme cắt giới hạn (mục 2.2.2.1).

Vector tái tổ hợp được giải trình tự bằng hệ thống máy ABI3100 theo phương pháp của Smith và cộng sự [107] bởi công ty Macrogen (Hàn Quốc) sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho từng vector hay trình tự DNA. Kết quả giải trình tự sau đó được xử lý bằng phần mềm BioEdit 4.0.

### 2.2.3. Gieo trồng lúa, nuôi cấy vi khuẩn và lây nhiễm bệnh nhân tạo

#### 2.2.3.1. Gieo trồng lúa trong điều kiện nhà lưới

Hạt lúa được ngâm nước và ủ ở nhiệt độ phòng trong vòng 48 giờ để phá ngủ, hạt nảy mầm được chuyển sang gieo trong các khay nhựa. Sau khoảng 15 ngày, cây lúa non được chuyển sang cấy trong các chậu đất (30x25x25 cm) với mật độ 3-4 cây/chậu. Các chậu được chăm sóc trong nhà lưới với điều kiện nhiệt độ khoảng 28°C, chiếu sáng 12h/ngày và độ ẩm 85% [140].

Cây lúa được bón phân theo phương thức sau:

- Bón lần 1: 3 g phân bón N-P-K 16-16-8/chậu vào ngày thứ 10 sau cấy
- Bón lần 2: 3 g phân bón N-P-K 16-16-8/chậu vào ngày thứ 20 sau cấy
- Bón lần 3: 3 g phân bón N-P-K 16-16-8/chậu vào ngày thứ 5 sau khi trổ bông

#### 2.2.3.2. Nuôi cấy vi khuẩn

Vi khuẩn *E. coli* được nuôi cấy trên môi trường LB (tryptone 10,0 g/l; NaCl 10 g/l; cao nấm men 5,0 g/l và agar 15,0 g/l) được bổ sung kháng sinh chọn lọc phù hợp với từng cấu trúc vector được biến nạp và nuôi ở 37°C trong 12-24 giờ. Đối với thí nghiệm nuôi vi khuẩn *E.coli* để tách plasmid, vi khuẩn được nuôi lắc (220 vòng/phút) trong môi trường LB không bổ sung agar, bổ sung các loại kháng sinh thích hợp và nuôi ở 37°C trong 12 giờ [140].

Vi khuẩn *Xoo* được nuôi cấy trên môi trường PSA (peptone 10,0 g/l; sucrose 10,0 g/l; axit glutamic 1,0 g/l và agar 15,0 g/l) ở 28°C trong 2-3 ngày. Đối với thí

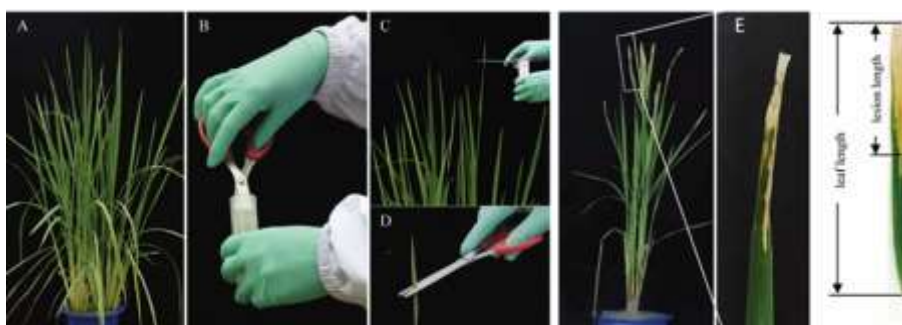


thí nghiệm phân lập vi khuẩn *Xoo*, thành phần môi trường được bổ sung thêm actidione 50,0 mg/l; cephalexin 40,0 mg/l và kasugamycin 20,0 mg/l [25].

Vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 được nuôi cấy trên môi trường LB ở 28°C bổ sung rifampicin 20 mg/l và loại kháng sinh phù hợp với từng cấu trúc vector được biến nạp và nuôi cấy ở 28°C trong 2 - 3 ngày. Đối với thí nghiệm chuyển gen vào lúa TBR225 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*, vi khuẩn này được nuôi trên môi trường AB (*Agrobacterium tumefaciens* minimal medium) (Phụ lục 6) có bổ sung rifampicin 20 mg/l và spectinomycin 50 mg/l ở 28°C trong 2 ngày [25].

### 2.2.3.3. Lây nhiễm nhân tạo vi khuẩn *Xoo* trên cây lúa

Vi khuẩn *Xoo* được nuôi cấy trên môi trường PSA (mục 2.2.3.2) và kiểm tra lại bằng PCR (mục 2.2.1.6). Sinh khối vi khuẩn được thu lại và pha loãng trong dung dịch MgCl<sub>2</sub> 10,0 mM khử trùng cho đến khi đạt giá trị OD<sub>600nm</sub> 0,5 (cho thí nghiệm đánh giá độc tính vi khuẩn) hoặc 1,0 (cho thí nghiệm đánh giá biểu hiện gen).



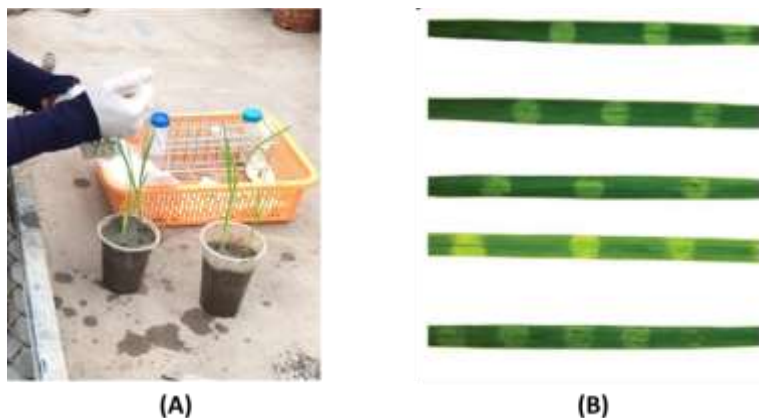
**Hình 2.1. Lây nhiễm nhân tạo *Xoo* trên lúa bằng phương pháp cắt lá**

**Ghi chú:** (A) Cây lúa ở giai đoạn đẻ nhánh; (B) Nhúng kéo vào ống chứa dung dịch vi khuẩn; (C–D) Sử dụng kéo cắt bỏ phần đầu phiến lá lúa; (E) Xác định chiều dài vết bệnh [69].

Đối với thí nghiệm đánh giá độc tính, vi khuẩn *Xoo* được lây nhiễm theo phương pháp cắt lá cải tiến của Ke và cộng sự (2017) [69]. Cây lúa trong giai đoạn đẻ nhánh (khoảng 45-60 ngày sau khi cấy) được sử dụng cho thí nghiệm lây nhiễm *Xoo*. Đầu phiến lá (3 – 4cm) của cây lúa TBR225 được cắt bằng kéo đã được nhúng trong dung dịch vi khuẩn *Xoo*.

Đối với thí nghiệm đánh giá biểu hiện gen, vi khuẩn *Xoo* được lây nhiễm nhân tạo theo phương pháp tiêm lá [76, 134]. Cây lúa non 2 tuần tuổi được sử dụng cho thí nghiệm đánh giá biểu hiện gen. Một bơm tiêm không kim được sử

dụng để thấm trực tiếp dịch khuẩn *Xoo* vào 3-5 điểm trên mặt sau của lá, cách đầu phiến lá 4,0 cm. Các mẫu lá được thu lại sau 48 giờ và bảo quản trong N<sub>2</sub> lỏng cho đến khi tách chiết RNA và sử dụng cho thí nghiệm đánh giá biểu hiện gen bằng RT-qPCR (mục 2.2.1.7).



**Hình 2.2. Lây nhiễm nhân tạo *Xoo* trên lúa bằng phương pháp tiêm lá**

**Ghi chú:** (A) Cây lúa 2 tuần tuổi được lây nhiễm vi khuẩn; (B) Vết bệnh thu được sau 48 giờ lây nhiễm với vi khuẩn *Xoo* [76].

#### **2.2.4. Phân lập và định danh vi khuẩn *Xoo***

##### **2.2.4.1. Phân lập vi khuẩn *Xoo***

Phương pháp phân lập vi khuẩn *Xoo* được thực hiện theo mô tả của Sudir và Dini (2016) [112]. Mẫu lá bệnh được cắt thành miếng nhỏ (0,8 x 2,0 cm) tại mép của vết bệnh và ngâm trong ethanol 70% trong 3 phút, sau đó được rửa bằng nước cất khử trùng. Mẫu được nghiền cùng với 1,0 ml nước cất khử trùng trong 5 phút. Dung dịch mẫu được pha loãng các tỉ lệ từ 1:1 đến 1:10, sau đó được cấy trải trên môi trường PSA đã bổ sung các loại kháng sinh (mục 2.2.3.2); đĩa nuôi cấy được ủ ở 28°C đến khi xuất hiện khuẩn lạc trên bề mặt. Các khuẩn lạc đơn hình tròn, màu vàng óng, bề mặt khuẩn lạc cong hình cầu vồng đặc trưng của vi khuẩn *Xoo* được cấy chuyển sang môi trường PSA mới và ủ ở 28°C trong 2 – 4 ngày. Vi khuẩn *Xoo* được bảo quản trong môi trường PSA lỏng chứa glycerol 25% ở -80°C.

##### **2.2.4.2. Định danh vi khuẩn *Xoo* bằng PCR**

Các isolate vi khuẩn được định danh bằng kỹ thuật PCR đa môi trực tiếp từ các khuẩn lạc (mục 2.2.2.4) [72]. Các cặp môi được sử dụng cho thí nghiệm định danh

vi khuẩn *Xoo* lần lượt là Xo3756F/Xo3756R; Xoo80F/Xoo80R và Xoc3866F/Xoc3866R (Phụ lục 5) nhân bản các đoạn DNA có kích thước lần lượt 331 bp, 163 bp và 691 bp (Phụ lục 5).

#### 2.2.4.3. Đánh giá độc tính vi khuẩn *Xoo*

Cây lúa TBR225 được lây nhiễm với các chủng vi khuẩn *Xoo* bằng kỹ thuật cắt lá như đã mô tả ở mục 2.2.3.3. Thí nghiệm đối chứng âm sử dụng dung dịch  $MgCl_2$  10,0 mM không chứa vi khuẩn *Xoo*. Giống IR24 được sử dụng làm mẫu chuẩn nhiễm vi khuẩn *Xoo* (đối chứng dương). Sau 14 ngày, chiều dài vết bệnh phát triển trên lá lúa được ghi lại. Chiều dài vết bệnh được tính là chiều dài từ vị trí cắt đến rìa của các vết tổn thương (cháy lá) hoàn toàn trên lá lúa. Thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần, mỗi lần trên ít nhất 3 cây, mỗi cây ít nhất 3 lá. Kết quả được xử lý thống kê và xây dựng đồ thị trên phần mềm Excel. Mức độ kháng/nhiễm bệnh bạc lá của cây lúa được xếp loại theo thang điểm Oliva và cộng sự (2019) như bảng 2.3 [94].

**Bảng 2.3. Thang điểm đánh giá tính kháng/nhiễm bệnh bạc lá**

Chiều dài vết bệnh (cm)	Mô tả
0 - 8	R - kháng
> 8 - 12	MR - kháng nhẹ
> 12	S - miễn cảm

#### 2.2.5. Phân tích TALome của vi khuẩn *Xoo*

##### 2.2.5.1. Giải trình tự TALome của vi khuẩn lây nhiễm

Vi khuẩn *Xoo* được nuôi cấy theo phương pháp đã trình bày ở mục 2.2.3.2 để tách chiết DNA tổng số (mục 2.2.1.1a). Mẫu DNA được gửi giải trình tự và phân tích tại Viện Nghiên cứu và Phát triển (Montpellier, Pháp). Trình tự đích của protein TALE được dự đoán bằng công cụ Talvez v.3.1.

##### 2.2.5.2. Đánh giá biểu hiện gen đích trên cây lúa lây nhiễm vi khuẩn *Xoo*

Các chủng vi khuẩn *Xoo* được lây nhiễm nhân tạo trên cây lúa TBR225 (mục 2.2.3.2). Mẫu lá được sử dụng để tách chiết RNA tổng số (mục 2.2.1.1b) và tổng hợp cDNA (mục 2.2.1.7). Mức độ biểu hiện của gen *OsSWEET11*, *OsSWEET13*, và *OsSWEET14* được phân tích bằng RT-qPCR (mục 2.2.1.7). Thí nghiệm được tiến hành

lặp lại 3 lần, mỗi lần thực hiện trên 3 cây, mỗi cây 2 lá. Thí nghiệm đối chứng âm sử dụng mẫu lá được tiêm dung dịch  $MgCl_2$  10,0 mM không chứa vi khuẩn *Xoo*.

#### 2.2.5.3. Phân lập và giải trình tự promoter *OsSWEET13* của lúa TBR225

DNA tổng số của cây lúa TBR225 được tách chiết theo phương pháp đã trình bày (mục 2.2.1.1a). Promoter *SW13-TBR* được phân lập bằng PCR (mục 2.2.1.6) sử dụng cặp mồi SW13-F/SW13-R (Phụ lục 5). Sản phẩm PCR được điện di và tinh sạch từ gel agarose như đã trình bày (mục 2.2.1.3a). Sản phẩm PCR được giải trình tự nucleotide (mục 2.2.2.5), sử dụng hai mồi SW13-F và SW13-R. Trình tự DNA sau khi xử lý được so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank.

#### 2.2.6. Thiết kế trình tự sgRNA

Trình tự CRISPR RNA (crRNA) có kích thước 18-21 nucleotide đặc hiệu trên phân tử sgRNA chỉnh sửa promoter *SW14-TBR* và *SW13-TBR* được thiết kế bằng phần mềm CRISPR-P v2.0 [80]. Cấu trúc bậc II của các sgRNA được phân tích bằng phần mềm Mfold 2.3 [141]. Đoạn DNA tương đồng với các crRNA trong hệ gen lúa được xác định bằng phần mềm CCTop [110]. Trình tự hệ gen lúa được tham chiếu từ cơ sở dữ liệu trên ngân hàng gen Ensembl Plants [29]. Trình tự crRNA đặc hiệu được lựa chọn dựa vào vị trí cắt trên gen đích, điểm đặc hiệu (On-score), hàm lượng GC, khả năng hình thành và duy trì cấu trúc bậc II, số lượng và vị trí đoạn DNA tương đồng xuất hiện trong hệ gen lúa [31]. Các đoạn oligonucleotide chứa các trình tự crRNA đặc hiệu được thiết kế bổ sung thêm đầu dính ở đầu 5' (Phụ lục 5) và đặt tổng hợp bởi Công ty Cổ Phần Phù Sa Genomics (Việt Nam).

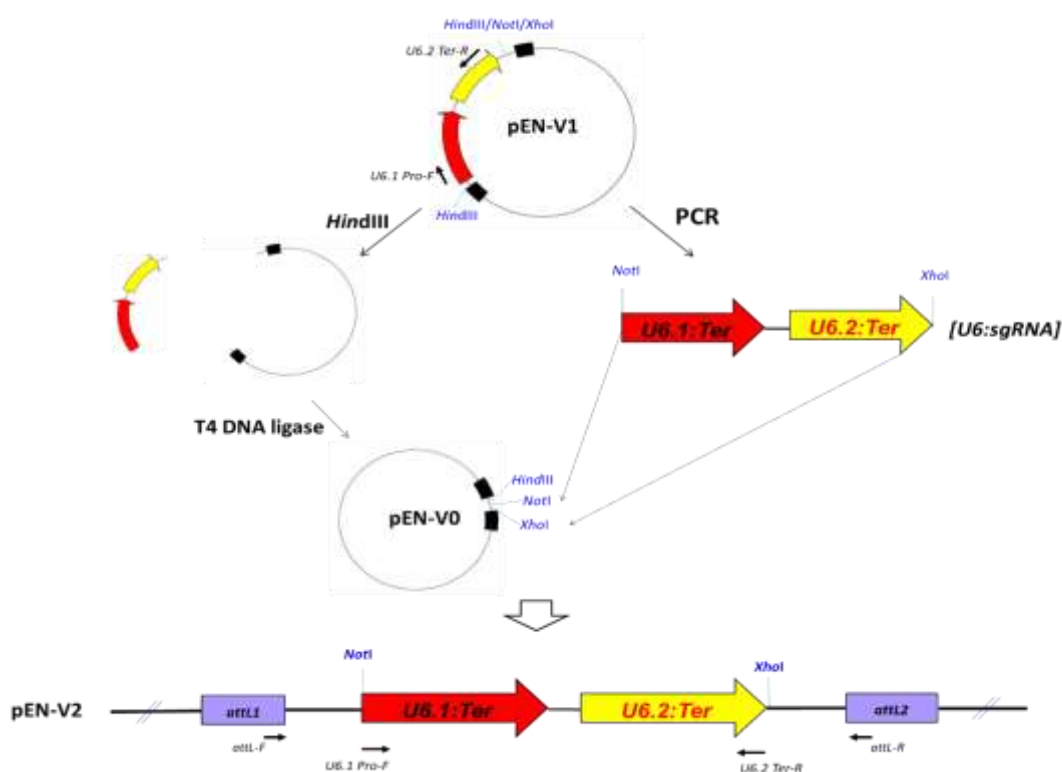
#### 2.2.7. Thiết kế cấu trúc vector biểu hiện

##### 2.2.7.1. Thiết kế vector pENTR4-V2

Vector “cho” (donor vector) pENTR4-V2 (pEN-V2) mang cấu trúc biểu hiện sgRNA được thiết kế từ nguyên liệu vector pEN-V1. Vector pEN-V1 được xử lý bằng enzyme *HindIII* (mục 2.2.2.1); băng DNA có kích thước tương ứng với khung vector pENTR4 mạch thẳng sau khi cắt cấu trúc [*U6:sgRNA*] được tinh sạch từ gel agarose (mục 2.2.1.4) và tự đóng vòng bằng enzyme T4 DNA ligase như đã trình bày ở mục 2.2.2.2 (Hình 2.3) tạo thành vector pEN-V0. Sản phẩm của phản ứng ghép nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* khả biến. Thẻ biến nạp được sàng lọc

bằng cặp mồi attL-F/attL-R. Một khuẩn lạc dương tính được chọn ngẫu nhiên để nuôi và tách chiết plasmid pEN-V0. Plasmid này sau đó được kiểm tra lần lượt bằng PCR (mục 2.2.1.6) với cặp mồi attL-F/attL-R và phản ứng cắt giới hạn sử dụng *Hind*III (mục 2.2.2.1).

Đoạn trình tự mang cấu trúc biểu hiện [*U6:sgRNA*] được khuếch đại từ khung vector pEN-V1 bằng PCR (mục 2.2.1.6) với cặp mồi đặc hiệu U6.1-Pro-F/U6.2-Ter-R. Sản phẩm PCR được kiểm tra và tinh sạch từ gel agarose (mục 2.2.1.4), sau đó được ghép nối vào vị trí *Not*I/*Xho*I (Hình 2.3) trên vector pEN-V0 (mục 2.2.2.2). Khuẩn lạc thu được sau thí nghiệm biến nạp được sàng lọc bằng PCR với cặp mồi attL-F/attL-R; plasmid tái tổ hợp pEN-V2 được kiểm tra bằng PCR lần lượt với các cặp mồi attL-F/attL-R và U6.1-Pro-F/U6.2-Ter-R và phản ứng cắt giới hạn sử dụng *Not*I/*Xho*I (Hình 2.3).



**Hình 2.3. Sơ đồ thiết kế vector pEN-V2**

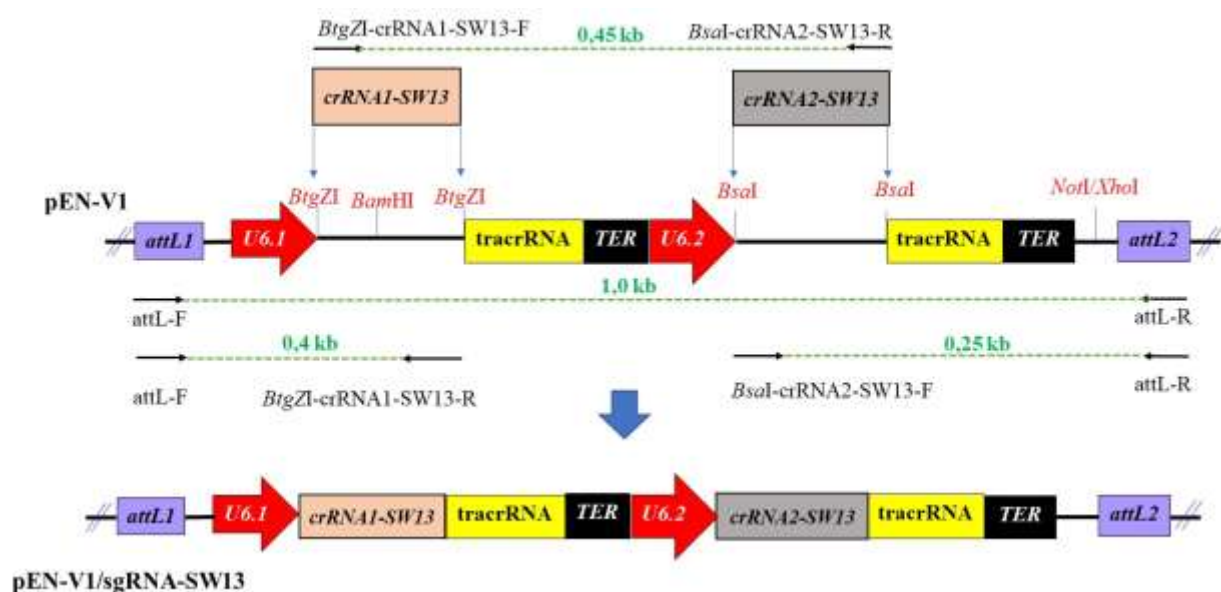
**Ghi chú:** Cấu trúc biểu hiện [*U6:sgRNA*] trên vector pEN-V1 được loại bỏ bằng enzyme *Hind*III để tạo thành vector pEN-V0. Đoạn DNA chứa cấu trúc [*U6:sgRNA*] trên vector pEN-V1 được nhân bản bằng PCR với cặp mồi bổ sung vị trí nhận biết của *Not*I và *Xho*I ở hai đầu và ghép nối vào vị trí *Not*I/*Xho*I trên vector pEN-V0 để tạo thành vector pEN-V2.

## 2.2.7.2. Thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa SW13-TBR và SW14-TBR

### a. Thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa SW13-TBR

Hai oligonucleotide BtgZI-crRNA1-SW13-F và BtgZI-crRNA1-SW13-R được gắn nhóm  $PO_4^{3-}$  và bắt cặp với nhau (đặt tên là *crRNA1-SW13*) bằng phản ứng phosphoryl hóa. Hỗn hợp phản ứng bao gồm: 4,0  $\mu$ l sợi xuôi 10 pmol/ $\mu$ l; 4,0  $\mu$ l sợi ngược 10 pmol/ $\mu$ l; 1,5  $\mu$ l đệm T4 PNK 10 X; 1,0  $\mu$ l ATP 10 mM; 3,5  $\mu$ l nước cất khử ion khử trùng và 1,0  $\mu$ l T4 PNK (5 U/ $\mu$ l). Ống phản ứng được ủ ở 37°C trong 30 phút, 95°C trong 5 phút, sau đó hạ nhiệt độ từ từ về nhiệt độ phòng.

Mảnh DNA *crRNA1-SW13* được ghép nối vào vị trí *BtgZI* (Hình 2.4) trên vector pEN-V1 (mục 2.2.2.2). Khuẩn lạc được sàng lọc bằng PCR với cặp mồi attL-F/*BtgZI-crRNA1-SW13-R*; plasmid tái tổ hợp pEN-V1/sgRNA1 được kiểm tra bằng PCR lần lượt với các cặp mồi attL-F/*BtgZI-crRNA1-SW13-R* và attL-F/attL-R; và phản ứng cắt giới hạn sử dụng *Bam*HI (Phụ lục 5, Hình 2.4).



**Hình 2.4. Sơ đồ thiết kế vector pEN-V1/sgRNA-SW13**

**Ghi chú:** *crRNA1-SW13* và *crRNA2-SW13* được ghép nối vào vị trí enzyme *BtgZI* và *Bsa*I trên vector pEN-V1. (*attL1*, *attL2*) vị trí nhận biết của LR clonase; (*U6.1*, *U6.2*) promoter *OsU6*; (*TER*) vùng kết thúc phiên mã; (*tracrRNA*) RNA hoạt hóa CRISPR; mũi tên (→) thể hiện vị trí mồi; dòng kẻ (---) thể hiện đoạn trình tự DNA được nhân bản và kích thước (kb).

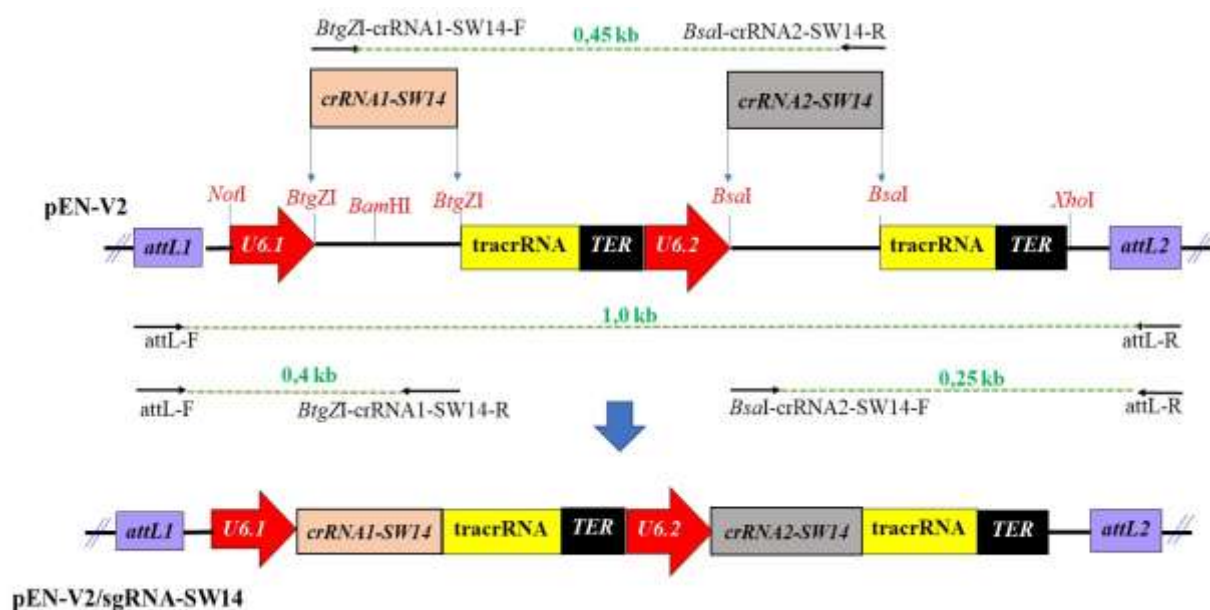
Hai oligonucleotide BsaI-crRNA2-SW13-F và BsaI-crRNA2-SW13-R được sử dụng để tạo thành mảnh DNA sợi đôi *crRNA2-SW13* mang nhóm  $\text{PO}_4^{3-}$  ở đầu 5' tương tự như đã trình bày ở trên. *crRNA2-SW13* được ghép nối vào vị trí *BsaI* (Hình 2.4) trên vector pEN-V1/sgRNA1 (mục 2.2.2.2). Khuẩn lạc được sàng lọc bằng PCR với cặp mồi BtgZI-crRNA1-SW13-F/BsaI-crRNA2-SW13-R; plasmid tái tổ hợp pEN/sgRNA-SW13 được kiểm tra bằng PCR lần lượt với các cặp mồi BtgZI-crRNA1-SW13-F/BsaI-crRNA2-SW13-R; BsaI-crRNA2-SW13-F/attL-R và attL-F/attL-R (Phụ lục 5, Hình 2.4).

*b. Thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa SW14-TBR*

Hai oligonucleotide BtgZI-crRNA1-SW14-F và BtgZI-crRNA1-SW14-R được gắn nhóm  $\text{PO}_4^{3-}$  và bắt cặp với nhau (đặt tên là *crRNA1-SW14*) bằng phản ứng phosphoryl hóa. Hỗn hợp phản ứng bao gồm: 4,0  $\mu\text{l}$  sợi xuôi 10 pmol/ $\mu\text{l}$ ; 4,0  $\mu\text{l}$  sợi ngược 10 pmol/ $\mu\text{l}$ ; 1,5  $\mu\text{l}$  đệm T4 PNK 10 X; 1,0  $\mu\text{l}$  ATP 10 mM; 3,5  $\mu\text{l}$  nước cất khử ion và 1,0  $\mu\text{l}$  T4 PNK (5 U/ $\mu\text{l}$ ). Ống phản ứng được ủ ở 37°C trong 30 phút, 95°C trong 5 phút, sau đó hạ nhiệt độ từ từ về nhiệt độ phòng.

Mảnh DNA *crRNA1-SW14* được ghép nối vào vị trí *BtgZI* (Hình 2.5) trên vector pEN-V2 (mục 2.2.2). Khuẩn lạc được sàng lọc bằng PCR với cặp mồi attL-F/BtgZI-crRNA1-SW14-R; plasmid tái tổ hợp pEN-V2/sgRNA1 được kiểm tra bằng PCR lần lượt với các cặp mồi attL-F/BtgZI-crRNA1-SW14-R và attL-F/attL-R; và phản ứng cắt giới hạn sử dụng *BamHI* (Hình 2.5).

Hai oligonucleotide BsaI-crRNA2-SW14-F và BsaI-crRNA4-SW14-R được sử dụng để tạo thành mảnh DNA sợi đôi *crRNA2-SW14* mang nhóm  $\text{PO}_4^{3-}$  ở đầu 5' tương tự như đã trình bày ở trên. *crRNA2-SW14* được ghép nối vào vị trí *BsaI* (Hình 2.5) trên vector pEN-V2/sgRNA1 (mục 2.2.2.2). Khuẩn lạc được sàng lọc bằng PCR với cặp mồi BtgZI-crRNA1-SW14-F/BsaI-crRNA2-SW14-R; plasmid tái tổ hợp pEN-V2/sgRNA-SW14 được kiểm tra bằng PCR lần lượt với các cặp mồi BtgZI-crRNA1-SW14-F/BsaI-crRNA2-SW14-R; BsaI-crRNA2-SW14-F/attL-R và attL-F/attL-R (Phụ lục 5, Hình 2.5).



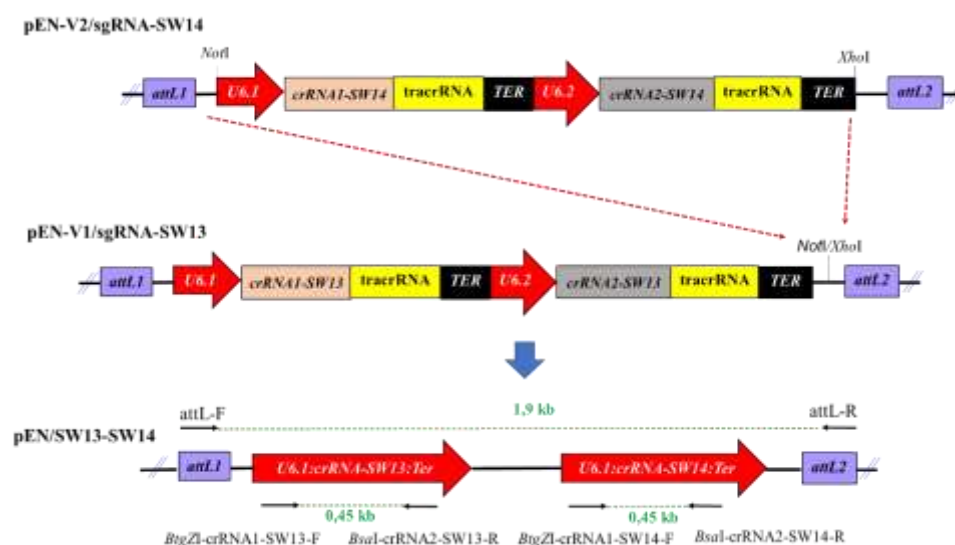
**Hình 2.5. Sơ đồ thiết kế vector pEN-V2/sgRNA-SW14**

**Ghi chú:** *crRNA1-SW14* và *crRNA2-SW14* được ghép nối vào vị trí enzyme *BtgZI* và *BsaI* trên vector *pEN-V2*. (*attL1*, *attL2*) vị trí nhận biết của *LR* clonase; (*U6.1*, *U6.2*) promoter *OsU6*; (*TER*) vùng kết thúc phiên mã; (*tracrRNA*) RNA hoạt hóa CRISPR; mũi tên (→) thể hiện vị trí mỗi; dòng kẻ (----) thể hiện đoạn trình tự DNA được nhân bản và kích thước (kb).

c. Thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa đồng thời *SW13-TBR* và *SW14-TBR*

Đoạn DNA mang 2 cấu trúc biểu hiện sgRNA trên vector *pEN/sgRNA-SW14* (đặt tên là [*U6:sgRNA-SW14*]) được ghép nối vào vị trí *NotI/XhoI* (Hình 2.6) trên *pEN/sgRNA-SW13* (mục 2.2.2) để tạo vector tái tổ hợp (gọi tắt là *pEN/SW13-SW14*). Khuẩn lạc được sàng lọc bằng PCR với cặp mồi *attL-F/attL-R*; plasmid tái tổ hợp *pEN/SW13-SW14* được kiểm tra bằng PCR lần lượt với các cặp mồi *BtgZI-crRNA1-SW13-F/BsaI-crRNA2-SW13-R* và *BtgZI-crRNA1-SW14/BsaI-crRNA2-SW14-R* (Phụ lục 5, Hình 2.6).





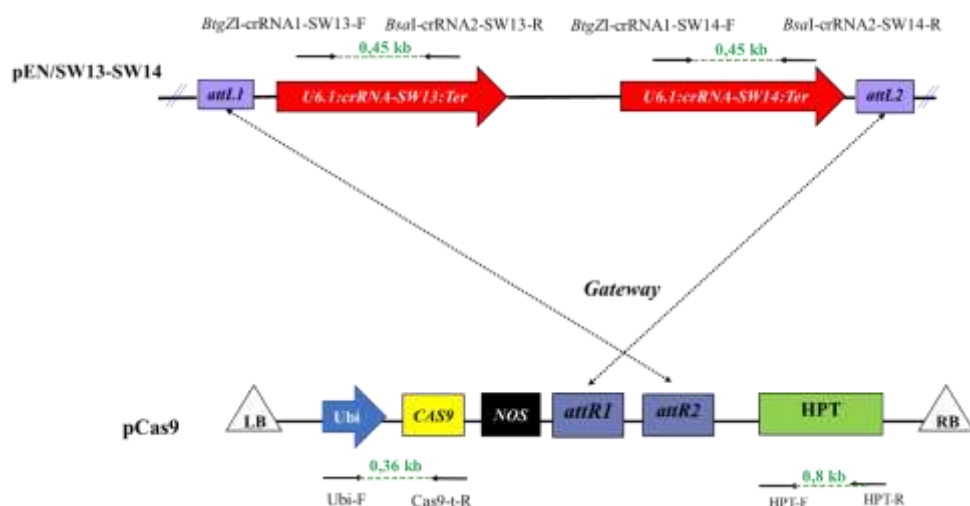
**Hình 2.6. Sơ đồ thiết kế vector pEN/SW13-SW14**

**Ghi chú:** cấu trúc [U6:sgRNA-SW14] được ghép nối vào vị trí NotI/XhoI trên pEN/sgRNA-SW13 để tạo thành vector pEN/SW13-SW14. (*attL1*, *attL2*) vị trí nhận biết của LR clonase; (*U6.1*, *U6.2*) promoter *OsU6*; (*TER*) vùng kết thúc phiên mã; (*tracrRNA*) RNA hoạt hóa CRISPR; mũi tên (→) thể hiện vị trí môi; dòng kẻ (----) thể hiện đoạn trình tự DNA được nhân bản và kích thước (kb).

### 2.2.7.3. Thiết kế cấu trúc T-DNA chỉnh sửa SW13-TBR và SW14-TBR

Cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR* (gọi tắt là *sgRNA-SW13/SW14*) trên vector pEN/SW13-SW14 được ghép nối vào vector pCas9 (Hình 2.7) bằng phản ứng Gateway theo quy trình hướng dẫn của hãng Thermo Fisher Scientific. Hỗn hợp phản ứng bao gồm : 50-100 ng vector pEN/SW13-SW14; 150 ng vector pCas9; đệm TE 1 X được bổ sung đến 8  $\mu$ l và 2,0  $\mu$ l LR clonase. Hỗn hợp được ủ ở 25°C trong 1 - 3 giờ. Tiếp theo, 1,0  $\mu$ l proteinase K được bổ sung vào hỗn hợp; hỗn hợp được ủ tiếp ở 37°C trong 10 phút. Sản phẩm của phản ứng tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E. coli* để sàng lọc và tách chiết plasmid tái tổ hợp tương tự như đã trình bày ở trên (mục 2.2.2). Khuẩn lạc được sàng lọc bằng PCR với cặp môi BtgZI-crRNA1-SW13-F/BsaI-crRNA2-SW13-R và BtgZI-crRNA1-SW14-F/BsaI-crRNA2-SW14-R; vector tái tổ hợp pCas9 mang cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR* (gọi tắt là pCas9/SW13-SW14) được kiểm tra bằng PCR lần lượt với các cặp môi BtgZI-crRNA1-SW13-F/BsaI-crRNA2-SW13-R; BtgZI-crRNA1-SW14-F/BsaI-crRNA2-SW14-R và Ubi-

F/Cas9-t-R (Phụ lục 5, Hình 2.7). Vector pCas9/SW13-SW14 được giải trình tự nucleotide (mục 2.2.2.5) tại các vị trí ghép nối crRNA. Trình tự DNA được phân tích bằng phần mềm BioEdit 4.0.



**Hình 2.7. Sơ đồ thiết kế vector pCas9/SW13-SW14**

**Ghi chú:** Cấu trúc sgRNA-SW13/SW14 được tái tổ hợp vào vector pCas9 nhờ LR clonase để tạo thành vector pCas9/SW13-SW14. (*attL1*, *attL2*, *attR1*, *attR2*) vị trí nhận biết của LR clonase; (*U6.1*) promoter *OsU6*; (*TER*) vùng kết thúc phiên mã; (*NOS*) vùng kết thúc phiên mã *Nopaline synthase*; (*LB*, *RB*) trình tự biên trái, biên phải của T-DNA; (*HPT*) cấu trúc biểu hiện gen *Hygromycin phosphotransferase*; mũi tên ( $\rightarrow$ ) thể hiện vị trí của các môi; đường kẻ (----) thể hiện đoạn DNA được nhân bản và kích thước (kb).

## 2.2.8. Nuôi cấy *in vitro* và chuyển gen vào lúa TBR225

### 2.2.8.1. Tối ưu quy trình chuyển gen vào lúa TBR225 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

T-DNA được chuyển vào giống lúa TBR225 bằng phương pháp chuyển gen sử dụng phôi trưởng thành thông qua *A. tumefaciens* dựa trên quy trình chuyển gen của Phạm Thu Hằng và cộng sự (2016) [3].

#### a. Tối ưu thành phần môi trường tái sinh chồi từ mô sẹo

Hạt lúa chắc, mẩy được bóc vỏ và khử trùng lần lượt bằng ethanol 70% trong 1 phút và dung dịch Javen 40% chứa 0,05% Tween 20 trong 25 phút. Hạt lúa sau đó được rửa bằng nước cất vô trùng 4 – 5 lần. Sau khi khử trùng, hạt được thấm khô bằng giấy thấm khử trùng và đặt lên các môi trường cảm ứng tạo mô sẹo (môi trường nền MS bổ sung 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid 2,5 mg/l) (Phụ lục 7). Đĩa nuôi cấy được ủ ở 28°C trong 7 ngày. Sau 5-7 ngày, mô sẹo hình thành từ phôi được

cắt khỏi nội nhũ và được chuyển sang các môi trường tái sinh chồi được bổ sung chất điều hòa sinh trưởng lần lượt theo 4 công thức TS1-TS4 (Phụ lục 8). Mô sẹo được nuôi cấy với điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 3.000 lux ở 28°C. Số mô sẹo tái sinh và số chồi/mô sẹo được ghi nhận sau 30 ngày nuôi cấy. Tỷ lệ tái sinh chồi được tính theo công thức:  $(\text{Số mô sẹo tái sinh chồi}/\text{tổng số mô sẹo}) \times 100\%$ . Số chồi/mô sẹo được tính theo công thức:  $\text{số chồi hình thành}/\text{tổng số mô sẹo tái sinh chồi}$ . Thí nghiệm được lặp lại 3 lần; 30 mô sẹo/công thức/lần lặp lại.

b. Tối ưu mật độ vi khuẩn *A. tumefaciens* đồng nuôi cấy với mô sẹo

*Chuẩn bị nguyên liệu thực vật:* Hạt lúa được bóc vỏ, khử trùng và nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo (mục 2.2.8.1a).

*Chuẩn bị nguyên liệu vi khuẩn:* một khuẩn lạc *A. tumefaciens* mang vector pCAMBIA1302 đã được trẻ hóa và được cấy trái trên môi trường AB đặc chứa kanamycin (50 mg/ml), rifampicin (20 mg/ml). Vi khuẩn được nuôi ở 28°C trong 2-3 ngày. Tế bào vi khuẩn được thu lại và hòa trong dung dịch đồng nuôi cấy lỏng (môi trường nền N6 bổ sung acetosyringone 100  $\mu$ M) (Phụ lục 7) đến giá trị OD<sub>600nm</sub> lần lượt 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 và 1,0.

Mô sẹo lúa sau khi cắt bỏ nội nhũ được ngâm trong dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* và lắc nhẹ trong 20 phút. Tiếp theo, mô sẹo được thấm khô và nuôi cấy trên môi trường đồng nuôi cấy đặc (môi trường nền N6 bổ sung acetosyringone 100  $\mu$ M, agar 10 g/l) trong điều kiện tối hoàn toàn 3 ngày, nhiệt độ 25°C. Mô sẹo sống sót được chuyển sang nuôi cấy trên môi trường chọn lọc (môi trường nền N6 bổ sung cefotaxim 200 mg/l, vancomycin 200 mg/l, hygromycin 30 mg/l, phytigel 5 g/l) ở 28°C trong tối. Sau 10 ngày mô sẹo sống sót được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang và ghi lại số mô sẹo có biểu hiện gen *GFP* (*Green Fluorescent Protein*). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần; 30 mô sẹo/công thức/lần lặp lại.

2.2.8.2. Chuyển T-DNA vào lúa TBR225

a. Biến nạp plasmid vào tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens*

DNA plasmid được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* theo phương pháp của Wang (2007) [120]. Tế bào *A. tumefaciens* chủng EHA105 khả biến (bảo quản

trong tủ lạnh sâu  $-80^{\circ}\text{C}$ ) được rã đông trên đá trong 10 phút. Tiếp đó,  $1,0\ \mu\text{g}$  vector pCas9/SW13-SW14 được bổ sung vào dung dịch tế bào đã rã đông; hỗn hợp được ủ trên đá 15 phút, sau đó được chuyển sang ủ trong  $\text{N}_2$  lỏng trong 5 phút. Tế bào được sốc nhiệt bằng cách chuyển sang bể ổn nhiệt  $37^{\circ}\text{C}$  trong 5 phút. Ống tế bào được ly tâm trong 30 giây; phần dịch nổi được loại bỏ hoàn toàn. Năm trăm  $\mu\text{l}$  LB được bổ sung vào ống để hòa tan toàn bộ tế bào, hỗn hợp này sau đó được ly tâm trong 30 giây; phần dịch nổi được loại bỏ. Tiếp theo,  $500\ \mu\text{l}$  LB lỏng được bổ sung vào hỗn hợp, tế bào được nuôi lắc với tốc độ 220 vòng/phút trong 2 - 4 giờ, ở  $28^{\circ}\text{C}$ . Hỗn hợp tế bào biến nạp được cấy trải trên môi trường LB đặc có bổ sung kháng sinh rifampicin  $20\ \text{mg/l}$  và spectinomycin  $50\ \text{mg/l}$  và nuôi cấy ở  $28^{\circ}\text{C}$  trong 2 - 3 ngày. Thể biến nạp được sàng lọc bằng PCR trực tiếp khuẩn lạc (mục 2.2.1.6), sử dụng cặp mồi Ubi-F/Cas9-t-R (Phụ lục 5).

*b. Chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa gen vào lúa TBR225*

Nguyên liệu thực vật và nguyên liệu vi khuẩn được chuẩn bị như đã mô tả ở mục 2.2.8.1 sử dụng chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 mang vector pCas9/sgRNA-SW14 (đối với thí nghiệm tạo dòng lúa chỉnh sửa *SW14-TBR*) hay vector pCas9/SW13-SW14 (đối với thí nghiệm tạo dòng lúa chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR*). Ngoài ra, mô sẹo tạo thành từ phôi được sử dụng trực tiếp, không qua bước loại bỏ nội nhũ. Mô sẹo lúa được đồng nuôi cấy với *A. tumefaciens*, sử dụng dung dịch vi khuẩn có  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  đã tối ưu (mục 2.2.8.1b). Mô sẹo sau 3 ngày đồng nuôi cấy được chuyển sang môi trường chọn lọc (mục 2.2.8.1b). Sau mỗi 10 ngày, mô sẹo sống sót sẽ được chuyển sang môi trường chọn lọc mới. Sau 3 lần chọn lọc, các mô sẹo sống sót và phát triển, sáng màu được chuyển sang môi trường tái sinh với thành phần đã tối ưu ở thí nghiệm đã trình bày trong mục 2.2.8.1a. Chồi tái sinh sau đó được chuyển sang môi trường tái sinh mới và tiếp tục nuôi cấy đến khi chồi đạt kích thước 3 – 5 cm; chồi được chuyển sang môi trường tạo rễ (môi trường MS cơ bản). Cây tái sinh được nuôi cấy với điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày ở  $28^{\circ}\text{C}$  tới khi hình thành bộ rễ đầy đủ. Cây lúa non sau đó được nhấc ra khỏi bình, rửa sạch môi trường bám ở rễ dưới vòi nước chảy, sau đó ngâm phần rễ trong ống thủy tinh chứa nước trong 5 ngày. Cuối cùng, cây non được chuyển sang

trồng trong chậu đất lớn và chăm sóc trong điều kiện nhà lưới (mục 2.2.3.1) để tiếp tục sử dụng cho thí nghiệm phân tích kiểu gen. Số mẫu sòng sót/phát triển sau mỗi giai đoạn chuyển gen được ghi lại.

## **2.2.9. Phân tích các dòng lúa chuyển gen/chỉnh sửa gen**

### *2.2.9.1. Phân tích kiểu gen các dòng lúa chuyển gen/chỉnh sửa gen*

Cây lúa TBR225 (thế hệ  $T_0$  và  $T_1$ ) ở giai đoạn 3 lá được sử dụng để tách chiết DNA tổng số (mục 2.2.1.1a); chất lượng mẫu DNA tách chiết được đánh giá bằng PCR với cặp mồi Actin-F/Actin-R [61] (Phụ lục 5) (mục 2.2.1.6).

Sự có mặt của cấu trúc T-DNA trong cây lúa được xác định bằng PCR (mục 2.2.1.6) với lần lượt các cặp mồi HPT-F/HPT-R [133]; Ubi-F/Cas9-t-R; sgRNA-SW14-F/sgRNA-SW14-R (cho cấu trúc chỉnh sửa *SW14-TBR*) và BtgZI-crRNA1-SW13-F/BsaI-crRNA2-SW13-R và BtgZI-crRNA1-SW14-F/BsaI-crRNA2-SW14-R (cho cấu trúc chỉnh sửa đồng thời *SW13-TBR* và *SW14-TBR*) (Phụ lục 5).

Đoạn trình tự *SW13-TBR* và *SW14-TBR* được phân lập từ các dòng lúa TBR225 bằng PCR (mục 2.2.1.6) với cặp mồi SW13-F/SW13-R và SW14-Pro-F/SW14-In1-R (Phụ lục 5). Sản phẩm PCR sau đó được giải trình tự nucleotide (mục 2.2.2.5), kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm BioEdit 4.0 và CRISPR ID [42] để xác định sự có mặt/loại đột biến tại vị trí đích.

### *2.2.9.2. Đánh giá kiểu hình các dòng lúa chỉnh sửa gen*

#### *a. Đánh giá đặc điểm nông học các dòng lúa chỉnh sửa gen*

Cây lúa thế hệ  $T_1$  được gieo trồng trên chậu đất trong điều kiện nhà lưới (mục 2.2.3.1) để đánh giá một số các chỉ tiêu nông học, bao gồm: thời gian sinh trưởng, chiều cao cây, số nhánh, số hạt chắc/bông. Thí nghiệm đối chứng sử dụng cây lúa TBR225 không chuyển gen.

Dòng lúa mang đột biến đồng hợp các gen đích và không mang cấu trúc chỉnh sửa gen (thế hệ  $T_2$ ) được gieo trồng trên chậu đất trong điều kiện nhà lưới (mục 2.2.3.1) để đánh giá các chỉ tiêu nông học, bao gồm: thời gian sinh trưởng, chiều cao, số nhánh, số hạt chắc/bông và năng suất cá thể (IRRI, 2013). Mỗi dòng trồng tối thiểu 3 chậu, mỗi chậu 3 – 4 cây. Thí nghiệm đối chứng sử dụng cây lúa TBR225 không chuyển gen.

#### *b. Đánh giá biểu hiện của OsSWEET14 trong các dòng lúa chỉnh sửa gen*

Cây lúa thế hệ T<sub>2</sub> được gieo trồng trên chậu đất trong điều kiện nhà lưới (mục 2.2.3.1) và lây nhiễm nhân tạo với vi khuẩn *Xoo* bằng phương pháp tiêm lá (mục 2.2.3.3) để đánh giá biểu hiện *OsSWEET14* (mục 2.2.5.2). Thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo sử dụng các chủng vi khuẩn *Xoo* đại diện từ bộ chủng đã phân lập và phân tích trình tự protein TALE (mục 2.2.5.1). Cây lúa TBR225 không chỉnh sửa gen được sử dụng cho thí nghiệm đối chứng.

#### *c. Đánh giá tính kháng vi khuẩn Xoo của các dòng lúa chỉnh sửa gen*

Đối với các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa *SW14-TBR*, các cây lúa thế hệ T<sub>2</sub> của mỗi dòng được gieo trồng trên chậu đất trong điều kiện nhà lưới (mục 2.2.3.1) và lây nhiễm nhân tạo với vi khuẩn *Xoo* bằng phương pháp cắt lá (mục 2.2.3.3). Thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo sử dụng các chủng vi khuẩn *Xoo* đại diện từ bộ chủng đã phân lập và phân tích trình tự protein TALE (mục 2.2.5.1). Dòng lúa TBR225 không chỉnh sửa gen được sử dụng cho thí nghiệm đối chứng.

Đối với các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR*, mỗi cây lúa thế hệ T<sub>1</sub> được trồng trên chậu đất trong điều kiện nhà lưới (mục 2.2.3.1) và lây nhiễm nhân tạo với vi khuẩn *Xoo* bằng phương pháp cắt lá (mục 2.2.3.3). Thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo sử dụng các chủng vi khuẩn *Xoo* đại diện từ bộ chủng đã phân lập và phân tích trình tự protein TALE (mục 2.2.5.1). Trên một cây lúa, mỗi nhánh lây nhiễm một chủng vi khuẩn khác nhau; mỗi chủng lây nhiễm trên 2-3 lá. Dòng lúa TBR225 không chỉnh sửa gen và dòng lúa chỉnh sửa *SW14-TBR* có tính kháng đã được xác định ở mục 2.2.9.2b được sử dụng cho thí nghiệm đối chứng.

#### **2.2.10. Xử lý số liệu thống kê**

Số liệu được thống kê bằng phần mềm Excel để tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn các lần lặp lại của mỗi công thức. Giá trị trung bình của các công thức trong cùng thí nghiệm được phân tích bằng so sánh phương sai một yếu tố (One-way ANOVA) với xử lý Duncan's multi range test trên phần mềm SPSS 25 với  $\alpha = 0,05$ . Bảng số liệu trình bày giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của mỗi công thức trong từng thí nghiệm. Phân tích sự phân ly kiểu gen được thực hiện bằng kiểm định  $\chi^2$ .

## Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

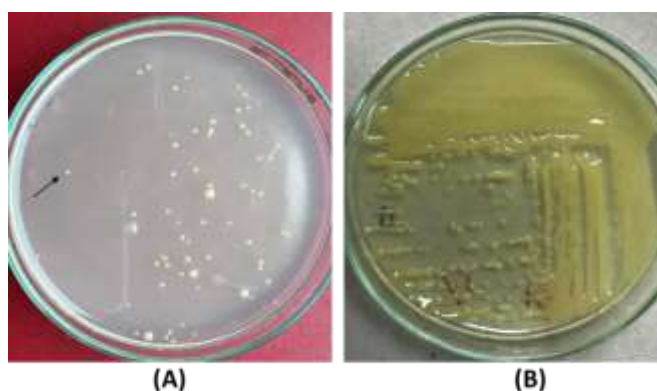
### 3.1. PHÂN LẬP VÀ NGHIÊN CỨU CƠ CHẾ GÂY BỆNH CỦA QUẦN THỂ *XOO* Ở PHÍA BẮC VIỆT NAM TRÊN GIỐNG LÚA TBR225

#### 3.1.1. Phân lập *Xoo* từ một số tỉnh phía Bắc Việt Nam

##### 3.1.1.1. Phân lập vi khuẩn từ mẫu lúa bị nhiễm bệnh bạc lá

Bệnh bạc lá xuất hiện khá phổ biến ở hầu hết các vùng trồng lúa trên khắp cả nước, đặc biệt là vào vụ mùa ở các tỉnh phía Bắc. Với đặc tính tiến hóa khá nhanh, độc tính của vi khuẩn *Xoo* rất dễ thay đổi theo thời gian [135], do vậy việc thu thập và phân lập đối tượng vi khuẩn này hàng năm là một nhiệm vụ quan trọng để có được những đánh giá chính xác về quần thể *Xoo* Việt Nam. Trong nghiên cứu này, các mẫu bệnh bạc lá được thu thập từ vụ lúa 2016-2018 (phòng Bệnh học phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp) được sử dụng để phân lập vi khuẩn *Xoo* với mục đích cập nhật nguồn mẫu vi khuẩn *Xoo* phục vụ cho các nghiên cứu chọn giống cũng như nghiên cứu nguồn gen, cơ chế tương tác giữa vi khuẩn *Xoo* và cây lúa TBR225.

Vi khuẩn *Xoo* được phân lập trực tiếp từ dịch chiết mẫu lá lúa có triệu chứng điển hình của bệnh bạc lá. Sau các bước sàng lọc và cấy chuyển, khuẩn lạc đã được làm thuần trên môi trường PSA. Khuẩn lạc *Xanthomonas oryzae* (*X. oryzae*) có hình tròn, bề mặt khuẩn lạc lồi, rìa nhẵn, dạng nhót dính, màu vàng sáp với độ đậm nhạt khác nhau (Hình 3.1).



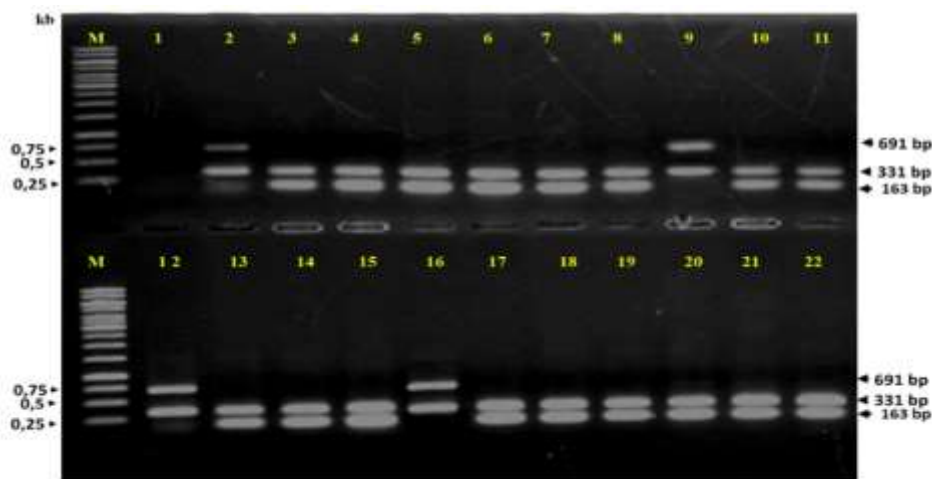
**Hình 3.1. Vi khuẩn *Xoo* được phân lập từ mẫu lúa bệnh**

**Ghi chú:** (A) Dịch lá của mẫu bệnh thu thập từ Hải Hậu, Nam Định năm 2018 được cấy trải trên môi trường PSA; mũi tên chỉ một khuẩn lạc đơn có hình thái giống *X. oryzae*. (B) Khuẩn lạc đã được làm thuần sinh trưởng trên môi trường PSA sau 3 ngày nuôi cấy.

Kết quả của thí nghiệm phân lập vi khuẩn đã thu được 17 isolate (tạm dịch là “chủng phân lập”) có hình dạng khuẩn lạc tương tự *X. oryzae* từ 35 mẫu lá bệnh. Các isolate vi khuẩn được bảo quản để sử dụng cho các thí nghiệm phân tích tiếp theo.

### 3.1.1.2. Định danh vi khuẩn phân lập

Vì triệu chứng của bệnh bạc lá giai đoạn muộn thường dễ bị nhầm lẫn với bệnh đốm sọc gây ra bởi vi khuẩn *Xoc* [66], do vậy các isolate phân lập được từ những mẫu lúa nhiễm bệnh bạc lá được định danh bằng phương pháp PCR đa môi (Multiplex-PCR) với các cặp môi đặc hiệu cho chi *Xanthomonas*, loài *Xoo* và *Xoc* (Phụ lục 5) [66]. Kết quả phân tích PCR thu được cho thấy hầu hết các isolate phân lập được là vi khuẩn *Xoo*. Cụ thể, 15 isolate đã được nhận định thuộc loài *Xoo* (Bảng 3.1); sản phẩm PCR cho 2 băng DNA có kích thước 163 bp và 331 bp (Hình 3.2, giếng 4-8, 10, 11, 14, 15, 17-22). Xét về giống lúa nhiễm *Xoo*, tần suất xuất hiện *Xoo* phần lớn tập trung ở giống lúa TBR225 (9/15 isolate), sau đó lần lượt đến các giống lúa Bắc Thơm 7 (4/15 isolate), và chỉ có 2 isolate được phân lập trên giống lúa Thiên Ưu. Điều này có thể lý giải do sự gieo trồng khá phổ biến của hai giống lúa này ở các tỉnh phía Bắc Việt Nam và đặc tính miễn cảm của chúng với bệnh bạc lá đã được công bố trong nghiên cứu trước đây [7, 16].



**Hình 3.2. Định danh vi khuẩn phân lập bằng PCR đa môi**

**Ghi chú:** Sản phẩm PCR đa môi (*Xo3756F/Xo3756R*, *Xoo80F/Xoo80R* và *Xoc3866F/Xoc3866R*) được điện di trên gel agarose 1,0%. Giếng M: Thang chuẩn DNA 1,0 kb (Promega); giếng 1: đối chứng âm (không có DNA khuôn); giếng 2 và 12: đối chứng dương *Xoc* (khuẩn lạc *Xoc*); giếng 3 và 13: đối chứng *Xoo* dương (khuẩn lạc *Xoo*); giếng 4-11 và 14-22: khuôn là khuẩn lạc từ các isolate vi khuẩn phân lập được.



Trong số 17 isolate đã phân lập được, chỉ có 2 isolate được xác định là *Xoc*, sản phẩm PCR cho 2 băng DNA có kích thước lần lượt là 331 bp và 691 bp (Hình 3.2, giếng 9 và 16). Kết quả này cũng phù hợp với những công bố trước đây đã xác định bệnh bạc lá trên lúa gây ra chủ yếu bởi *Xoo* [114]. Sự xuất hiện của *Xoc* có thể là kết quả của việc phân biệt nhầm triệu chứng bệnh khi thu thập mẫu, hoặc thậm chí cũng có thể là hiện tượng đồng nhiễm 2 loại vi khuẩn *Xoo* và *Xoc* trong cùng một mẫu thu thập. Các isolate *Xoo* đã phân lập được bảo quản ở -80°C để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Các isolate *Xoo* được phân lập từ các tỉnh phía Bắc Việt Nam được gọi tắt là VXO.

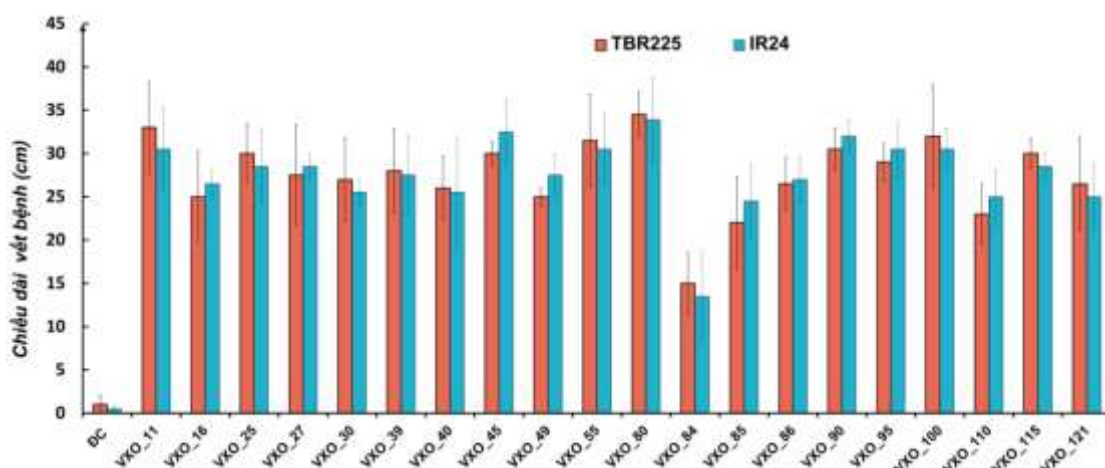
**Bảng 3.1. Danh sách isolate *Xoo* phân lập được ở phía Bắc Việt Nam**

STT	Tên chủng	Địa điểm thu mẫu	Giống lúa	Năm thu mẫu
1	VXO_39	Thanh Oai, Hà Nội	TBR225	2016
2	VXO_40	Chương Mỹ, Hà Nội	Bắc Thơm 7	2016
3	VXO_45	Chương Mỹ, Hà Nội	Thiên Ưu	2016
4	VXO_49	Yên Lạc, Vĩnh Phúc	Thiên Ưu	2016
5	VXO_55	Thạch Thất, Hà Nội	TBR225	2016
6	VXO_80	Diễn Châu, Nghệ An	Bắc Thơm 7	2017
7	VXO_84	Hiệp Hòa, Bắc Giang	TBR225	2017
8	VXO_85	Đông Hưng, Thái Bình	TBR225	2017
9	VXO_86	Nho Quan, Ninh Bình	TBR225	2017
10	VXO_90	Từ Sơn, Bắc Ninh	TBR225	2017
11	VXO_95	Thanh Liêm, Hà Nam	TBR225	2017
12	VXO_100	TP. Nam Định, Nam Định	TBR225	2018
13	VXO_110	Hải Hậu, Nam Định	Bắc Thơm 7	2018
14	VXO_115	Xuân Trường, Nam Định	TBR225	2018
15	VXO_121	Hải Hậu, Nam Định	Bắc Thơm 7	2018

### 3.1.1.3. Đánh giá độc tính trên giống lúa TBR225

Để đánh giá độc tính 15 isolate VXO phân lập được và 5 isolate VXO đã phân lập trước đó (bởi Bộ môn Bệnh học phân tử - Viện Di truyền nông nghiệp) [16], cây lúa TBR225 được lây nhiễm nhân tạo lần lượt với 20 isolate VXO này. Sau 14 ngày

lây nhiễm, kết quả cho thấy tất cả các isolate VXO đều gây triệu chứng bệnh bạc lá điển hình trên mẫu lúa lây nhiễm, tuy nhiên mức độ nhiễm bệnh khác nhau. Chiều dài vết bệnh đo được (> 13 cm) trên các cây lúa có triệu chứng bệnh (Hình 3.3) đã thể hiện hầu hết các isolate VXO (19/20 isolate) được nghiên cứu có độc tính mạnh đối với giống lúa TBR225 và giống lúa chuẩn nhiễm IR24, với chiều dài vết bệnh trung bình > 20 cm. Đặc biệt, isolate VXO\_80 (phân lập tại Diễn Châu, Nghệ An) thể hiện độc tính mạnh nhất; chiều dài vết bệnh trung bình đạt lần lượt 34,5 cm và 33,9 cm trên giống lúa IR24 và BTR225. Ngược lại, cả 2 giống lúa nghiên cứu đều thể hiện mức độ nhiễm bệnh nhẹ hơn trong thí nghiệm lây nhiễm với isolate VXO\_84; vết bệnh xuất hiện trên lá sau 14 ngày lây nhiễm có chiều dài trung bình đạt lần lượt là 15 cm và 13,5 cm. Các kết quả thí nghiệm này chứng tỏ giống lúa TBR225 rất mẫn cảm với vi khuẩn *Xoo* thu thập tại các tỉnh phía Bắc Việt Nam.



**Hình 3.3. Độc tính của các isolate *Xoo* trên giống lúa TBR225**

**Ghi chú:** Cây lúa TBR225 và IR24 được lây nhiễm với 20 isolate *Xoo* phân lập từ phía Bắc Việt Nam. (ĐC): đối chứng âm (cây lúa được lây nhiễm bằng dung dịch không chứa vi khuẩn *Xoo*). Đồ thị biểu hiện chiều dài vết bệnh trên lá lúa sau 14 ngày lây nhiễm. Số liệu trên đồ thị là kết quả trung bình của 3 lần thí nghiệm.

Lây nhiễm nhân tạo bằng kỹ thuật cắt lá là phương pháp được sử dụng rất phổ biến trong nghiên cứu đánh giá độc tính vi khuẩn *Xoo*. Nhóm nghiên cứu của Phan Hữu Tôn (2013) đã sử dụng phương pháp này để đánh giá khả năng kháng các chủng *Xoo* của tập đoàn giống lúa nếp Việt Nam [20]. Tương tự, Nguyễn Thị Liên và cộng sự (2012) cũng đã đánh giá độc tính của 5/70 chủng *Xoo* phân lập được từ

các tỉnh miền Nam trên giống lúa Jasmine 85 [9]. Để xác định độc tính vi khuẩn *Xoo* trên giống lúa Bắc Thơm 7, nhóm nghiên cứu của Vũ Hoài Sâm (2019) cũng đã sử dụng phương pháp cắt lá, kết quả cho thấy giống lúa này miễn cảm với hầu hết các isolate kiểm tra [16]. Sử dụng phương pháp cắt lá, Nguyễn Thị Tho và cộng sự (2022) cũng đã xác định được độc tính của 47 isolate phân lập được từ các tỉnh trồng lúa ở vùng đồng bằng sông Hồng trên 28 giống chỉ thị của IRRI, từ đó làm cơ sở cho việc phân chia chính xác cấu trúc quần thể vi khuẩn *Xoo* gây bệnh bạc lá ở miền Bắc Việt Nam [18]. Tại các tỉnh phía Bắc Việt Nam, TBR225 là một giống lúa rất miễn cảm với bệnh bạc lá nhưng hầu như chưa có một công bố khoa học chính thức nào về tính kháng/miễn cảm của giống lúa này với các chủng *Xoo* của Việt Nam. Kết quả thu được trong nghiên cứu này cho thấy TBR225 có biểu hiện bệnh rất rõ rệt khi được lây nhiễm với 20 isolate VXO phân lập từ các tỉnh trồng lúa phía Bắc Việt Nam. Kết quả này cũng hoàn toàn phù hợp với những quan sát thực tế tình hình bệnh dịch đối với giống lúa TBR225 trên đồng ruộng.

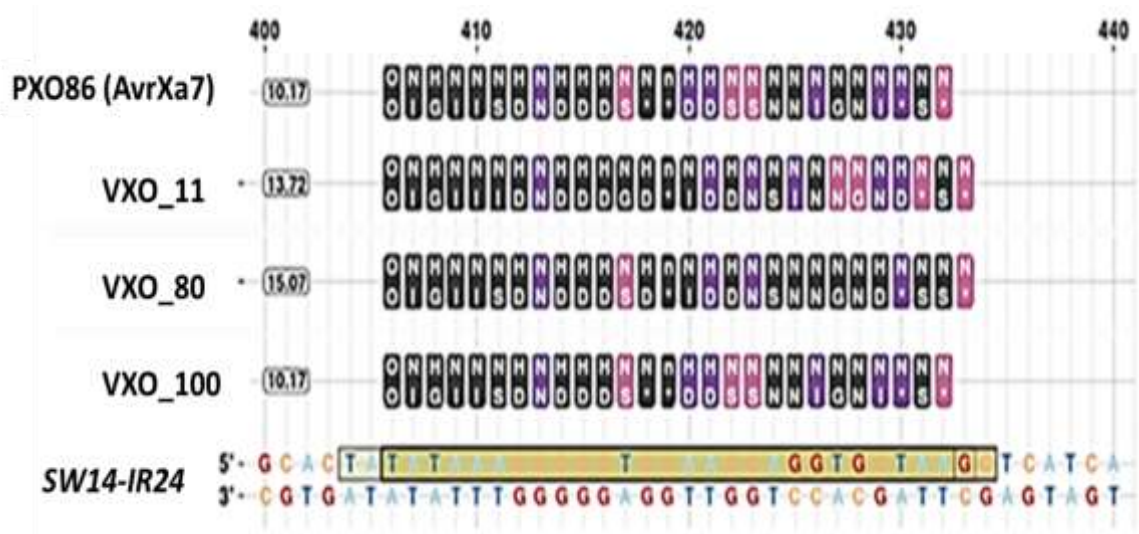
### **3.1.2. Nghiên cứu tương tác phân tử giữa VXO và giống lúa TBR225**

Với đặc tính tiến hóa khá nhanh, độc tính của vi khuẩn *Xoo* dễ thay đổi theo thời gian, do sự tác động của môi trường cũng như những biến đổi theo mùa vụ hay sự xuất hiện gen kháng mới trên lúa [30]. Riêng ở Việt Nam, mới đây nhất, kết quả đánh giá khả năng gây bệnh các chủng *Xoo* thu thập vùng đồng bằng sông Hồng của tác giả Nguyễn Thị Tho và cộng sự đã cho thấy có sự biến động rất lớn, rất khác so với bộ nòi tiêu chuẩn của IRRI. Trong đó có đến 17% các isolate có khả năng bề gãy tính kháng ở các dòng lúa mang tổ hợp 3-5 gen kháng [18]. Bên cạnh đó, các nòi địa lý cũng có độc tính khác nhau trên cây lúa. Cụ thể khi phân lập vi khuẩn *Xoo* từ các quốc gia Châu Á và Châu Phi, các nhà nghiên cứu cũng nhận thấy hai nhóm nòi này có các yếu tố độc lực khác nhau, tác động vào những gen đích khác nhau trên cây lúa [94]. Trong phạm vi luận án này, để nghiên cứu cơ chế gây bệnh của vi khuẩn *Xoo* trên giống lúa TBR225, ba isolate VXO\_11, VXO\_80 và VXO\_100 đại diện cho ba vùng trồng lúa ở phía Bắc Việt Nam (Hà Nội, Nghệ An, Nam Định) với các thời gian thu thập khác nhau (2013, 2017, 2018) đã được lựa

chọn cho thí nghiệm giải mã hệ gen (thực hiện bởi Viện Nghiên cứu và Phát triển, Montpellier, Pháp).

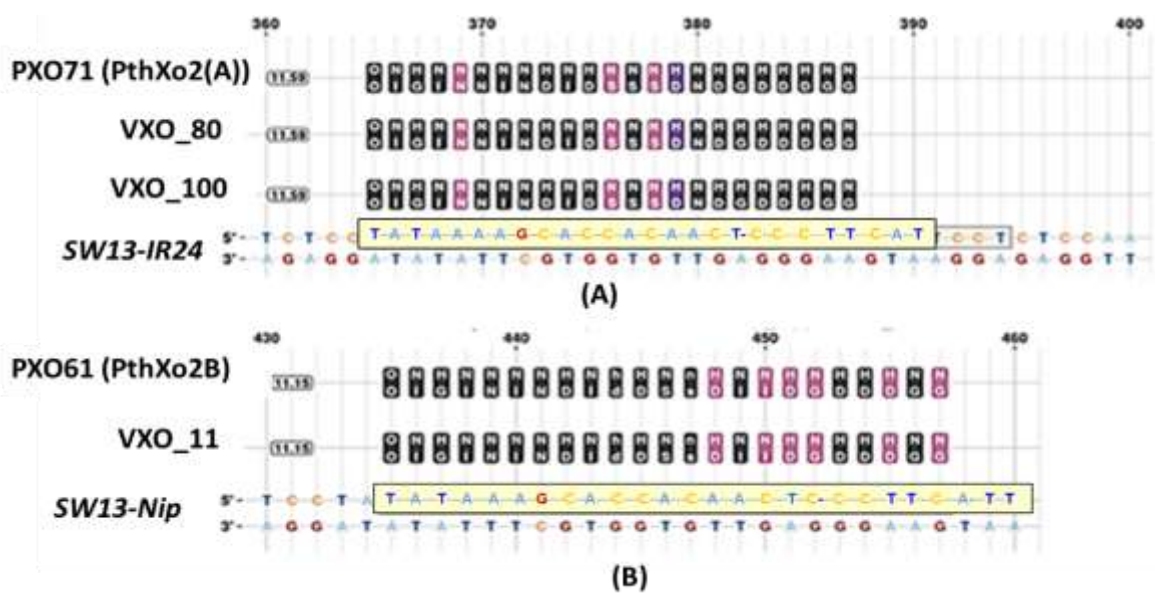
### 3.1.2.1. Phân tích trình tự vùng gen *tal* của VXO

Hệ gen của 3 isolate VXO đại diện đã được giải mã và phân tích trình tự vùng gen *tal*. Trên cơ sở trình tự nucleotide của vùng gen *tal* thu được, trình tự axit amin suy biến trên TALE của VXO đã được xác định (Hình 3.4 và Hình 3.5). Trình tự TALE (dự đoán) của các isolate VXO được phân tích bằng công cụ Talvez v.3.1 và so sánh với trình tự TALE của các chủng *Xoo* tham chiếu. Kết quả phân tích cho thấy mỗi isolate VXO đều mang 2 gen *tal* mã hóa TALE có vùng trình tự RVD tương đồng với vùng trình tự RVD trên TALE của các chủng *Xoo* tham chiếu đã công bố. Cụ thể, cả ba isolate VXO đều mang gen mã hóa TALE có vùng trình tự RVD tương đồng với TALE *AvrXa7* của chủng *Xoo* PXO86; TALE này có khả năng liên kết với EBE *AvrXa7* trên vùng promoter *OsSWEET14* của giống lúa tham chiếu IR24 (Hình 3.4). Hơn nữa, ba isolate VXO còn mang gen mã hóa TALE khác có vùng trình tự RVD giống 100% với vùng trình tự RVD của TALE có khả năng nhận biết EBE *PthXo2* trên promoter *OsSWEET13*, nhưng với các biến thể khác nhau. Đối với isolate VXO\_11, TALE này liên kết với biến thể EBE *PthXo2B* có trong hệ gen giống lúa Nipponbare (Hình 3.5B), tương tự như TALE *PthXo2* của chủng *Xoo* PXO61 [94]. Trong khi đó, isolate VXO\_80 và VXO\_100 cùng mang TALE nhận biết EBE *PthXo2(A)* có trong hệ gen giống lúa chuẩn nhiễm IR24 (Hình 3.5A), tương tự như chủng *Xoo* PXO71 đã công bố [134]. Ngoài ra, trình tự axit amin suy biến của các gen *tal* khác không mang trình tự RVD tương thích với bất kì trình tự DNA nào có trong hệ gen lúa tham chiếu (kết quả không trình bày). Những kết quả thu được cho phép dự đoán các isolate VXO khi xâm nhiễm vào cây lúa có thể hoạt hóa sự biểu hiện của các gen chứa trình tự EBE *AvrXa7* và/hoặc *PthXo2(A)* và/hoặc *PthXo2B* trên vùng promoter, từ đó gây ra độc tính cho cây lúa.



**Hình 3.4. Phân tích trình tự TALE AvrXa7 của isolate VXO**

*Ghi chú:* Vùng trình tự RVD trên protein TALE của 3 isolate VXO (VXO\_11, VXO\_80, VXO\_100) được so sánh với TALE AvrXa7 của chủng Xoo PXO86. (SW14-IR24) một phần trình tự promoter OsSWEET14 của giống lúa IR24 được nhận biết bởi TALE AvrXa7; vị trí EBE AvrXa7 được đóng khung.



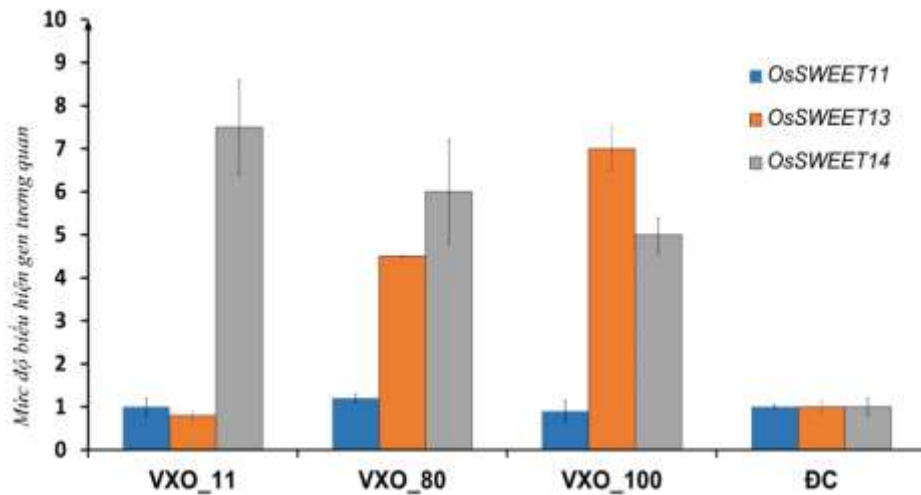
**Hình 3.5. Phân tích trình tự TALE PthXo2 của isolate VXO**

*Ghi chú:* Vùng trình tự RVD trên protein TALE của isolate VXO\_80, VXO\_100 (A) và isolate VXO\_11 (B) được so sánh với TALE PthXo2(A) và PthXo2B chủng PXO71 và PXO61. (SW13-IR24, SW13-Nip): một phần trình tự promoter OsSWEET13 của giống lúa IR24 và Nipponbare được nhận biết bởi TALE PthXo2; vị trí EBE PthXo2(A) và PthXo2B được đóng khung.

Một số thành viên thuộc nhóm gen vận chuyển đường *SWEET*, bao gồm *OsSWEET11*, *OsSWEET13* và *OsSWEET14* được xác định là gen *S* quan trọng của nhiều chủng *Xoo*. Các nghiên cứu trước đây cũng cho thấy *OsSWEET14* là đích tấn công của những chủng *Xoo* mang protein TALE PthXo3, AvrXa7, TalC và TalF; trong khi *OsSWEET11* và *OsSWEET13* được hoạt hóa lần lượt bởi các chủng *Xoo* biểu hiện protein TALE PthXo1 và PthXo2 [25, 122]. Gần đây, nghiên cứu của Oliva và cộng sự (2019) đã chứng minh hầu hết các chủng *Xoo* thu thập ở khu vực châu Á, bao gồm Trung Quốc, Nhật Bản, Philippines, Đài Loan, Thái Lan, Ấn Độ, Nepal, Hàn Quốc đều mang gen mã hóa TALE PthXo2 nhận biết các biến thể khác nhau của EBE PthXo2 trên *OsSWEET13*. Hơn nữa, đa số các chủng *Xoo* châu Á có mang một trong hai TALE PthXo3 hoặc AvrXa7 (hoạt hóa *OsSWEET14*). Trong khi đó, chỉ rất ít chủng *Xoo* châu Á có gen mã hóa TALE PthXo1 (tấn công *OsSWEET11*) [94]. Các công bố trên hoàn toàn tương đồng với kết quả thu được ở nghiên cứu này, trong đó ba isolate VXO đại diện đã được xác định có mang đồng thời 2 loại protein TALE có khả năng liên kết với trình tự EBE của hai gen *OsSWEET13* và *OsSWEET14* của các giống lúa tham chiếu. Đây rất có thể là các gen *S* quan trọng quyết định tính miễn cảm của giống lúa TBR225 với các isolate VXO.

### 3.1.2.2. Nghiên cứu biểu hiện gen *OsSWEET* trên cây lúa TBR225 nhiễm *Xoo*

Để chứng minh vai trò của các gen *OsSWEET* trong quá trình VXO xâm nhiễm vào cây lúa TBR225, thí nghiệm đánh giá biểu hiện gen *OsSWEET11*, *OsSWEET13* và *OsSWEET14* trên cây lúa lây nhiễm nhân tạo với 3 isolate *Xoo* VXO\_11, VXO\_80 và VXO\_100 đã được thực hiện. Kết quả phân tích bằng RT-qPCR cho thấy mức độ biểu hiện của các gen đích có sự khác biệt khá rõ rệt giữa mẫu lúa lây nhiễm và không lây nhiễm VXO, và giữa các mẫu lúa nhiễm các isolate VXO khác nhau (Hình 3.6). Tất cả các cây lúa lây nhiễm VXO đều có sự tăng đáng kể mức độ biểu hiện của ít nhất một trong ba gen đích so với cây lúa đối chứng không lây nhiễm *Xoo*.



**Hình 3.6. Biểu hiện của *OsSWEET* trong cây lúa TBR225 nhiễm *Xoo***

**Ghi chú:** Đồ thị so sánh mức độ biểu hiện gen tương quan giữa các gen *OsSWEET11*, *OsSWEET13* và *OsSWEET14* và giữa các mẫu lúa lây nhiễm VXO\_11, VXO\_80, VXO\_100 và không lây nhiễm *Xoo* (ĐC); *OsEF1a* được sử dụng làm gen nội chuẩn; mức độ biểu hiện gen của mẫu lúa ĐC có giá trị bằng 1,0; giá trị thể hiện trên đồ thị là kết quả RT-qPCR trung bình của 3 lần thí nghiệm.

Cụ thể, sự xâm nhiễm của isolate VXO\_80 hay VXO\_100 đã hoạt hóa đồng thời sự biểu hiện của 2 gen *OsSWEET13* và *OsSWEET14* trên cây lúa TBR225, với mức độ biểu hiện gen tăng trung bình từ 4,5 – 7 lần so với cây lúa đối chứng. Trong khi đó, isolate VXO\_11 chỉ làm tăng mức độ biểu hiện của *OsSWEET14* (trung bình khoảng 7,5 lần so với đối chứng). Đặc biệt, cả ba isolate VXO đều không hoạt hóa sự biểu hiện của *OsSWEET11*. Kết quả này chứng tỏ cả hai gen *OsSWEET13* và *OsSWEET14* có thể liên quan tới quá trình xâm nhiễm trên giống lúa TBR225 của các isolate VXO đại diện được nghiên cứu.

Trong các nghiên cứu trước đây, Huang và cộng sự (2016) đã phân tích 31 chủng *Xoo* châu Á và xác định được lần lượt 9, 14 và 22 chủng hoạt hoá sự biểu hiện của *OsSWEET11*, *OsSWEET13* và *OsSWEET14*. Trong khi tất cả các chủng hoạt hóa *OsSWEET11* đều thuộc các quốc đảo hoặc ở xa Việt Nam; tất cả các chủng *Xoo* có nguồn gốc từ Trung Quốc đều chỉ hoạt hóa *OsSWEET13* hoặc *OsSWEET14* hoặc cả hai gen này [56]. Trong nghiên cứu này, phân tích biểu hiện gen bằng RT-qPCR đã cho thấy sự xâm nhiễm của ba isolate VXO đại diện cũng làm tăng cường

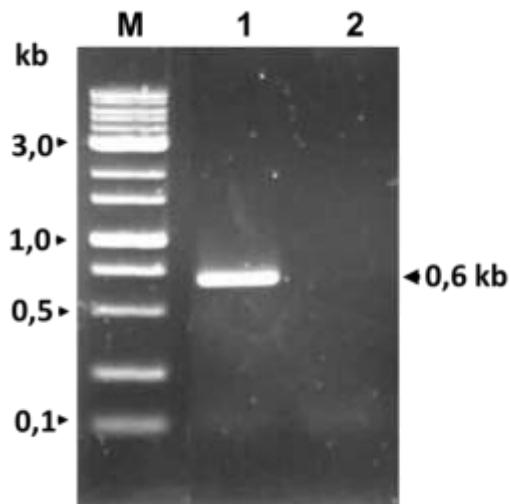
biểu hiện *OsSWEET13* và/hoặc *OsSWEET14* của giống lúa TBR225 và không làm thay đổi mức độ biểu hiện của *OsSWEET11*, tương tự như các công bố trước đây. Kết quả này đã củng cố thêm cho nhận định ở trên (mục 3.1.2.1) về gen *S* đối với bệnh bạc lá của giống lúa TBR225. Cụ thể, độc tính của isolate VXO\_80 và VXO\_100 trên giống lúa TBR225 có thể liên quan tới cả hai gen *OsSWEET13* và *OsSWEET14*; trong khi độc tính của VXO\_11 trên giống lúa TBR225 có thể liên quan tới *OsSWEET14*. Hơn nữa, kết quả thu được cho thấy tính đa dạng của quần thể VXO, với ít nhất hai nhóm; trong đó nhóm I đại diện bởi isolate VXO\_11 (mang gen *tal* mã hóa TALE AvrXa7 và PthXo2B) và nhóm II với 2 đại diện là isolate VXO\_80 và VXO\_100 (mang gen *tal* mã hóa TALE AvrXa7 và PthXo2(A)).

### 3.1.2.3. Phân lập, giải trình tự SW13-TBR

Để chứng minh rõ hơn giả thuyết *OsSWEET13* và *OsSWEET14* là hai gen *S* trong cây lúa TBR225 đối với các isolate VXO, sự có mặt của những EBE tương ứng với mỗi TALE của VXO cần phải được xác định thông qua phân tích trình tự nucleotide vùng promoter của hai gen này. Khi thực hiện nghiên cứu phân tích trình tự *SW14-TBR* trên giống lúa TBR225, Phùng Thị Thu Hương và cộng sự (2018) đã xác định được trên promoter này có mang 4 EBE, bao gồm: *TalC*, *TalF*, *PthXo3* và *AvrXa7*, trong đó ngoại trừ EBE *TalC*, trình tự các EBE còn lại chồng lên nhau một phần [7]. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, đoạn promoter *SW13-TBR* đã tiếp tục được phân lập để nghiên cứu đặc điểm trình tự nucleotide.

Vùng promoter của gen *OsSWEET13* được nhân bản bằng PCR với khuôn là DNA tổng số của mẫu lúa non TBR225, sử dụng cặp mồi SW13-F/SW13-R đã thiết kế dựa vào trình tự nucleotide của gen *OsSWEET13* được công bố trên GenBank. Kết quả điện di trên gel agarose 1,0% cho thấy sản phẩm PCR chỉ xuất hiện một băng DNA duy nhất có kích thước khoảng 615 bp, tương ứng với kích thước lí thuyết của đoạn promoter *OsSWEET13* cần nhân bản (Hình 3.7, giếng 1). Như vậy, đoạn DNA mong muốn đã bước đầu được phân lập thành công từ DNA tổng số của TBR225.





**Hình 3.7. Phân lập SW13-TBR từ DNA tổng số**

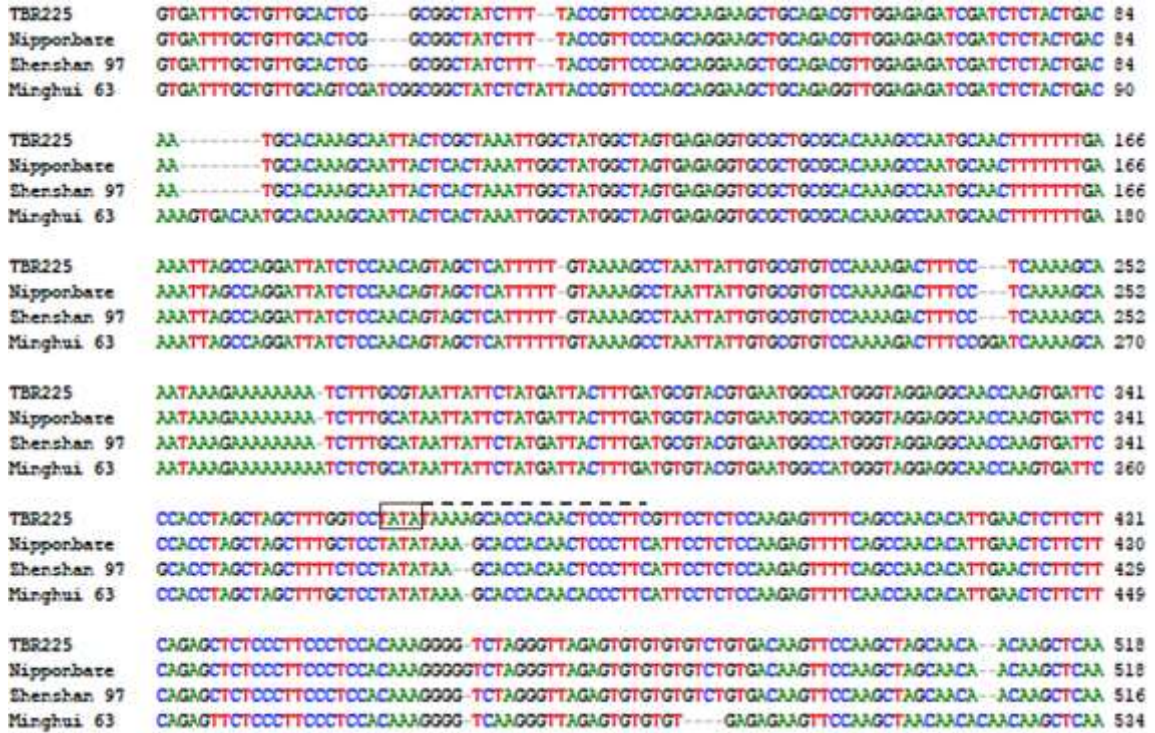
**Ghi chú:** Sản phẩm PCR với cặp mồi SW13-F/SW13-R được điện di trên gel agarose 1,0%. Giếng 1: khuôn là DNA tổng số của cây lúa TBR225; giếng 2: đối chứng âm (không có DNA khuôn); giếng M: thang chuẩn DNA 1,0 kb (Cleaver Scientific).

Để khẳng định chính xác đoạn DNA phân lập được là promoter *OsSWEET13*, sản phẩm PCR được giải trình tự nucleotide và phân tích bằng phần mềm BioEdit 4.0 (Hình 3.8). Kết quả so sánh trình tự nucleotide cho thấy đoạn promoter *OsSWEET13* phân lập được từ giống lúa TBR225 có chiều dài 615 bp, tương đồng 99% và 98% so với trình tự promoter *OsSWEET13* của giống lúa Nipponbare (*japonica*, mã số AP014968.1) và Zhenshan 97 (*indica*, mã số CP056063.1) đã được công bố trên GenBank. Kết quả này chứng tỏ SW13-TBR đã được phân lập thành công từ giống lúa TBR225.

Hơn nữa, phân tích trình tự nucleotide cũng cho thấy đoạn promoter phân lập được chứa trình tự TATA Box (hộp TATA) đặc trưng ở vị trí -259. Đặc biệt, trên SW13-TBR có chứa một trình tự EBE *PthXo2(A)* (Hình 3.8) liên kết đặc hiệu với TALE của một số chủng vi khuẩn *Xoo* đã được công bố [134]. Kết quả này chứng tỏ *OsSWEET13* của TBR225 có thể được hoạt hóa bởi quá trình xâm nhiễm của những chủng *Xoo* có biểu hiện TALE *PthXo2(A)* như VXO\_80 và VXO\_100.

Trong công bố trước đây về vai trò của *OsSWEET13* đối với cơ chế xâm nhiễm của *Xoo* trên giống lúa IRBB13, các tác giả đã phân lập đoạn DNA dài 341 bp nằm phía trước mã mở đầu (ATG) của *OsSWEET13* để nghiên cứu chức năng [58]. Tương

tự, ở nghiên cứu này, đoạn DNA dài khoảng 615 bp nằm phía trước khung đọc mở của *OsSWEET13* đã được phân lập từ DNA tổng số nhằm xác định mối liên hệ giữa sự biểu hiện của *OsSWEET13* với quá trình xâm nhiễm của các isolate VXO.



**Hình 3.8. So sánh trình tự nucleotide của promoter *OsSWEET13***

**Ghi chú:** Trình tự promoter *OsSWEET13* của giống lúa TBR225 được so sánh với giống lúa Nipponbare (AP014968.1), giống lúa miễn cảm bệnh bạc lá Zhenshan 97 (CP056063.1) và giống lúa kháng bạc lá Minghui 63 (CP054681.1). Vị trí của hộp TATA được đóng khung; vị trí EBE PthXo2(A) được thể hiện bằng đường nét đứt (- - -).

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh độc tính của các chủng vi khuẩn *Xoo* có liên quan tới sự hoạt hóa gen *S* thông qua tương tác của TALE với trình tự EBE đặc hiệu trên vùng promoter của gen này [94, 122]. Chính vì vậy, sự có mặt hay vắng mặt của các EBE trên vùng promoter của các gen đích trong hệ gen là một trong những nhân tố quan trọng giúp xác định tính kháng/mẫn cảm của một giống lúa với một chủng *Xoo* nhất định. Cho đến nay, ít nhất 3 TALE đã được xác định tấn công *OsSWEET13*, bao gồm PthXo2/PthXo2(A), PthXo2B và PthXo2C. Trong khi PthXo2B và PthXo2C nhận biết cùng một trình tự EBE; PthXo2(A) lại có khả năng nhận biết đồng thời 2 trình tự EBE tương đồng nhau (Hình 3.9) [94]. Trong nghiên

cứu này, một biến thể EBE *PthXo2(A)* cũng đã được phát hiện trên đoạn trình tự 615 bp của *SW13-TBR*. Trình tự này giống với trình tự EBE *PthXo2(A)* của giống lúa chuẩn nhiễm IR24 và giống lúa Zhenshan 97 không mang gen kháng *xa25*. Ngược lại, tất cả các giống lúa mang gen kháng *xa25* hay biến thể của gen kháng *xa25* đều có các SNP-single nucleotide polymorphism (đa hình đơn các nucleotide) trên trình tự EBE *PthXo2* (Hình 3.9).

Như vậy, phát hiện này cùng với kết quả nghiên cứu trình tự *SW14-TBR* đã công bố [7], kết hợp với kết quả đánh giá độc tính của VXO (mục 3.1.1.3) và kết quả phân tích biểu hiện gen *OsSWEET13* và *OsSWEET14* (mục 3.1.2.3) ở trên đã củng cố hơn cho giả thuyết *OsSWEET13* và *OsSWEET14* là hai gen *S* đóng vai trò quan trọng đối với quá trình xâm nhiễm của các isolate VXO trên giống lúa TBR225. Rất có thể các isolate VXO khi xâm nhiễm vào tế bào lúa TBR225 đã tiết ra các TALE (trong đó có *AvrXa7* và/hoặc *PthXo2(A)*) hoạt động như những nhân tố phiên mã, liên kết với EBE trên vùng promoter của các gen vận chuyển đường (bao gồm *OsSWEET14* và/hoặc *OsSWEET13*), và hoạt hóa gen để biểu hiện ra các protein phục vụ cho quá trình sinh trưởng của vi khuẩn. Trong đó, isolate VXO\_11 tác động vào vị trí EBE *AvrXa7* trên *OsSWEET14*; isolate VXO\_80 và VXO\_100 đồng thời tác động vào vị trí EBE *AvrXa7* trên *OsSWEET14* và *PthXo2(A)* trên *OsSWEET13*. Tuy nhiên, việc xác định đây có phải là những EBE/gen có vai trò quyết định tới độc tính của các isolate VXO trên giống lúa TBR225 hay không cần phải có thêm các bằng chứng cây lúa TBR225 mang đột biến chính xác tại các vị trí EBE này trên hệ gen (được tạo ra bằng công cụ CRISPR/Cas9). Chính vì vậy, trong những nội dung nghiên cứu tiếp theo, các công việc tạo ra dòng lúa TBR225 mang đột biến đơn gen *OsSWEET14* và đột biến đa gen *OsSWEET13-OsSWEET14* đã lần lượt được thực hiện để đánh giá những thay đổi về kiểu hình tính kháng bệnh.

Giống lúa	Gen kháng	Trình tự EBE	TALE
<b>TBR225</b>		ATAAAAGCACCACAACCTCCCTTC	
<b>IR24</b>		ATAAAAGCACCACAACCTCCCTTC	PthXo2(A)
<b>Nipponbare</b>		ATAAA~GCACCACAACCTCCCTTC	PthXo2B, PthXo2C
<b>Zhenshan 97</b>		ATATAAGCACCACAACCTCCCTTC	PthXo2(A)
<b>Minghui 63</b>	( <i>xa25</i> )	ATAAA~GCACCACAACACCCTTC	
	<i>xa25-1</i>	ATAAA~GCAC~~CAACTCCCTTC	
	<i>xa25-2</i>	ATAAA~GCA~~~CAACTCCCTTC	
	<i>xa25-3</i>	TATAA~GCACCACAACCTCCCTTC	
	<i>xa25-4</i>	ATATA~GCACCACAACCTCCCTTC	
	<i>xa25-5</i>	ATAAA~GCACCACAATTCCCTTC	
	<i>xa25-6</i>	ATAAA~GCACCACAATTTCCCTTC	

**Hình 3.9. So sánh trình tự EBE trên promoter *OsSWEET13* của các giống lúa**

**Ghi chú:** Kí tự màu xanh, đỏ và dấu ngã (~) thể hiện vị trí các nucleotide sai khác giữa các hộp TATA và EBE nằm trên promoter *OsSWEET13* của các giống lúa TBR225, IR24 (mã số CP101145.1), Nipponbare (mã số AP014968.1), Zhenshan 97 (mã số CP056063.1), Minghui 63 (mã số CP054681.1) chứa *xa25* và các biến thể của *xa25* (từ *xa25-1* đến *xa25-6*).

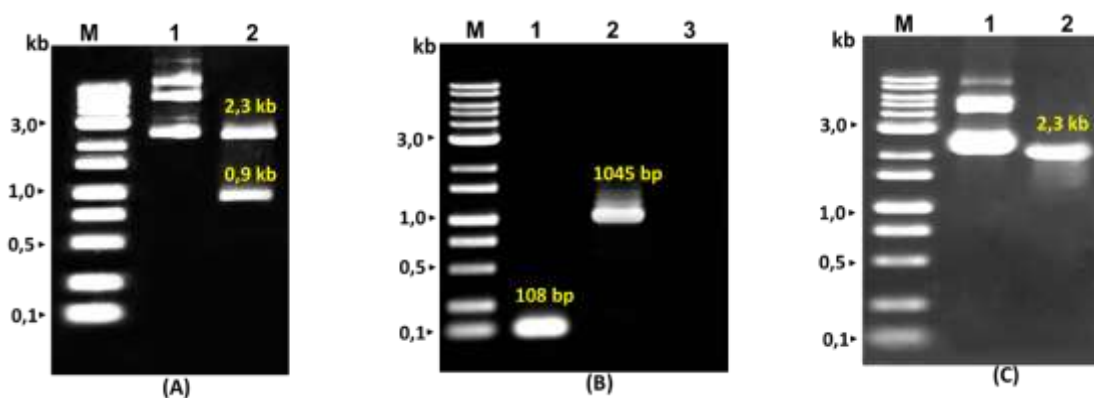
### 3.2. THIẾT KẾ CẤU TRÚC T-DNA CHỈNH SỬA PROMOTER *OsSWEET*

#### 3.2.1. Thiết kế hệ thống CRISPR/Cas9 chỉnh sửa đa gen

Gateway cloning (Invitrogen, Hoa Kỳ) là hệ thống cho phép nhân dòng các trình tự DNA kích thước lớn, ví dụ như một cấu trúc biểu hiện gen mang đầy đủ promoter – khung đọc mở - terminator, được sử dụng rất phổ biến trong các thí nghiệm thiết kế vector biểu hiện. Hệ thống vector dùng cho Gateway cloning bao gồm 2 thành phần: (i) vector “cho” (donor vector) dùng làm trung gian mang đoạn DNA cần chỉnh sửa, có kích thước nhỏ (vài kb), và (ii) vector “nhận” (destination vector) là khung vector dùng để chuyển vào tế bào chủ và biểu hiện gen đích. Trong nghiên cứu này, vector nhận pCas9 mang sẵn cấu trúc biểu hiện Cas9 và vector cho pEN-V1 mang cấu trúc biểu hiện sgRNA đã được sử dụng làm vật liệu chính. Thông thường, trong các thí nghiệm chỉnh sửa gen sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9, mỗi vị trí cần chỉnh sửa được thiết kế 2 sgRNA để đảm bảo khả năng thành công. Tuy nhiên, trên vector pEN-V1 chỉ mang 2 cấu trúc biểu hiện 2 sgRNA. Chính vì vậy, để phục vụ mục đích chỉnh sửa đồng thời hai EBE trên

promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR*, một phiên bản vector pEN-V2 trung gian đã được thiết kế. Điều này cho phép sau khi được chèn trình tự crRNA, toàn bộ 2 cấu trúc biểu hiện sgRNA trên pEN-V2 có thể được cắt và ghép nối tiếp với cụm cấu trúc biểu hiện sgRNA trên vector pEN-V1 để tạo ra cấu trúc vector “cho” mang 4 cấu trúc biểu hiện 4 sgRNA khác nhau.

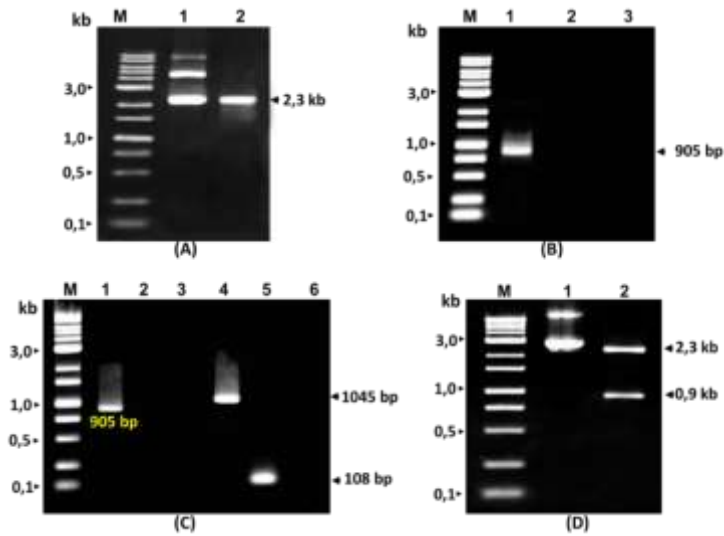
Để tạo ra phiên bản vector biểu hiện sgRNA mới pEN-V2, vector trung gian pEN-V0 đã được tạo ra từ khung vector pEN-V1 (Hình 2.3). Vector pEN-V1 đã được xử lý với enzyme *HindIII* để loại bỏ trình tự DNA chứa 2 cấu trúc biểu hiện sgRNA (Hình 3.10A). Băng DNA có kích thước khoảng 2,3 kb tương ứng với kích thước bộ khung vector pENTR4 mạch thẳng (Hình 3.10A, giếng 2) đã được tinh sạch từ gel agarose và cho thực hiện phản ứng tự đóng vòng để tạo thành vector trung gian pEN-V0. Plasmid pEN-V0 sau đó được kiểm tra bằng PCR (Hình 3.10B) và cắt enzyme giới hạn (Hình 3.10C). Hình ảnh điện di sản phẩm PCR với cặp mồi attL-F/attL-R thu được băng DNA có kích thước khoảng 108 bp (Hình 3.10B, giếng 1) đúng như kích thước đã tính toán theo lý thuyết. Tương tự, sản phẩm của phản ứng cắt giới hạn bằng *HindIII* sau khi điện di chỉ thu được một băng DNA kích thước khoảng 2,3 kb (Hình 3.10C, giếng 2), tương ứng với kích thước lý thuyết của vector pEN-V0 mạch thẳng. Kết quả này chứng tỏ cấu trúc biểu hiện sgRNA đã hoàn toàn được loại bỏ khỏi vector pEN-V0.



**Hình 3.10. Thiết kế vector pEN-V0**

**Ghi chú:** Sản phẩm cắt giới hạn và PCR được điện di trên gel agarose 1,0%. (A) Xử lý pEN-V1 bằng enzyme HindIII; giếng 1: vector nguyên bản; giếng 2: sản phẩm cắt giới hạn. (B) Kiểm tra vector pEN-V0 bằng PCR với cặp môi attL-F/attL-R; giếng 1: khuôn là pEN-V0; giếng 2: khuôn là pEN-V1; giếng 3: đối chứng âm (không có DNA khuôn). (C) Kiểm tra vector pEN-V0 bằng cắt enzyme giới hạn HindIII; giếng 1: vector nguyên bản; giếng 2: sản phẩm cắt giới hạn. Giếng M: thang chuẩn DNA 1,0 kb (Cleaver Scientific).

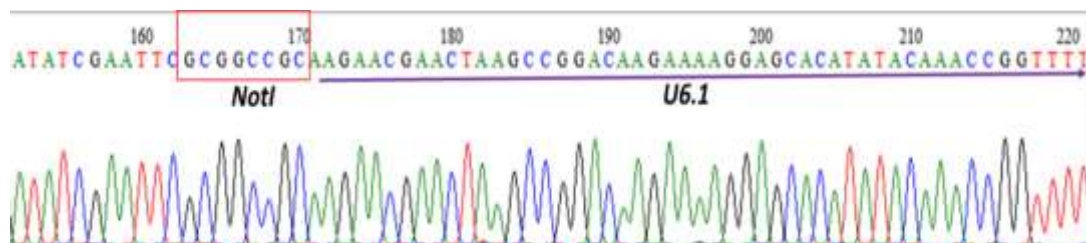
Cấu trúc biểu hiện sgRNA được khuếch đại bằng PCR từ vector pEN-V1 với cặp môi đặc hiệu U6.1\_Pro-F/U6.2\_Ter-R (Phụ lục 5). Để thuận tiện cho việc ghép nối các cấu trúc DNA sau này, hai môi nhân bản cấu trúc biểu hiện sgRNA đã được thiết kế bổ sung thêm lần lượt vị trí nhận biết của *NcoI-NotI* và *XhoI-HindIII* ở đầu 5'. Sản phẩm PCR có kích thước khoảng 905 bp (Hình 3.11B, giếng 1) và vector pEN-V0 được xử lý đồng thời bằng *NotI/XhoI* (Hình 3.11A, giếng 2) được tinh sạch từ gel agarose 1,0% và ghép nối với nhau bằng T4 DNA ligase để tạo thành vector pEN-V2. Vector tái tổ hợp được kiểm tra lần lượt bằng PCR và cắt giới hạn. Kết quả điện di sản phẩm PCR thu được bằng có kích thước khoảng 905 bp (cặp môi U6.1-Pro-F/U6.2-Ter-R) và 1045 bp (cặp môi attL-F/attL-R) phù hợp với kích thước lý thuyết của các đoạn DNA cần nhân bản (Hình 3.11C, giếng 1 và 4). Tương tự, kết quả điện di sản phẩm phản ứng cắt giới hạn vector pEN-V2 bằng enzyme *NotI/XhoI* thu được 2 băng DNA có kích thước 0,9 kb và 2,3 kb tương ứng với kích thước của cấu trúc biểu hiện sgRNA và khung vector pENTR4 mạch thẳng (Hình 3.11D, giếng 2). Như vậy, cấu trúc vector pEN-V2 đã được thiết kế thành công bước đầu để phục vụ cho việc thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa các promoter *OsSWEET* ở thí nghiệm tiếp theo.



**Hình 3.11. Thiết kế vector pEN-V2**

**Ghi chú:** Sản phẩm cắt giới hạn và PCR được điện di trên gel agarose 1,0%. (A) Xử lý pEN-V0 bằng NotI/XhoI; giếng 1: vector nguyên bản; giếng 2: sản phẩm cắt giới hạn. (B) PCR nhân bản cấu trúc [U6:sgRNA] trên pEN-V1 với môi U6.1-Pro-F/U6.2-Ter-R; giếng 1: khuôn là pEN-V1; giếng 2: khuôn là pEN-V0; giếng 3: đối chứng âm (không có DNA khuôn). (C) Kiểm tra vector tái tổ hợp pEN-V2 bằng PCR; giếng 1-3: môi U6.1-Pro-F/U6.2-Ter-R; giếng 4-6: môi attL-F/attL-R; giếng 1 và 4: khuôn là pEN-V2; giếng 2 và 5: khuôn là pEN-V0; giếng 3 và 6: đối chứng âm (không có DNA khuôn). (D) Kiểm tra vector tái tổ hợp pEN-V2 bằng enzyme cắt giới hạn NotI/XhoI; giếng 1: vector nguyên bản; giếng 2: sản phẩm cắt giới hạn. Giếng M: thang chuẩn DNA 1,0 kb (Cleaver Scientific).

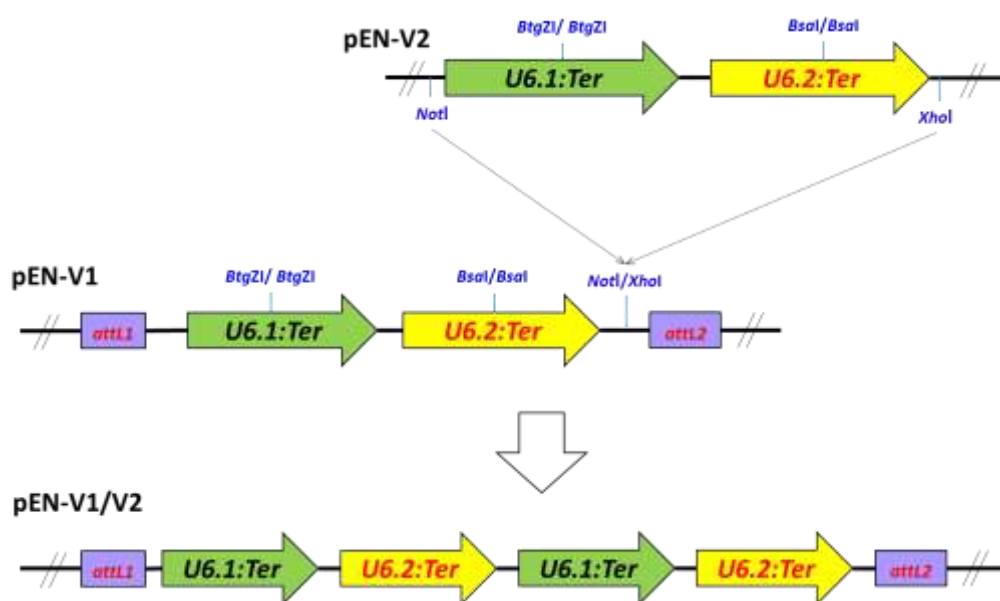
Để khẳng định chắc chắn đoạn trình tự cấu trúc biểu hiện của sgRNA mang vị trí cắt giới hạn của hai enzyme NotI và XhoI ở hai đầu đã được chèn chính xác vào vector pEN-V0 hay chưa, vector pEN-V2 được giải trình tự nucleotide (Phụ lục 9). Kết quả thu được ở (Hình 3.12) cho phép khẳng định chắc chắn cấu trúc biểu hiện sgRNA pEN-V2 đã được thiết kế thành công.



**Hình 3.12. Giải trình tự vector pEN-V2**

**Ghi chú:** Một phần kết quả giải trình tự vector pEN-V2 bằng môi attL-F. Mũi tên màu tím thể hiện trình tự promoter U6.1; trình tự nhận biết của enzyme NotI được đóng khung.

Như vậy, với hai hệ vector pEN-V1 (đã có) và pEN-V2 (đã tạo được) cho phép thiết kế một hệ vector biểu hiện mang đồng thời 4 cấu trúc biểu hiện sgRNA riêng biệt theo sơ đồ được trình bày ở hình 3.13. Do mỗi cấu trúc mang một trình tự crRNA riêng rẽ, cụm cấu trúc biểu hiện sgRNA này khi được ghép nối vào vector chuyển gen có mang sẵn cấu trúc biểu hiện protein Cas9 sẽ tạo thành hệ thống CRISPR/Cas9 hoàn chỉnh có thể chỉnh sửa được đồng thời 4 vị trí khác nhau trong hệ gen đích. Hệ thống vector này được sử dụng cho thí nghiệm thiết kế vector CRISPR/Cas9 chỉnh sửa đồng thời 2 promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR* tiếp theo.



**Hình 3.13. Sơ đồ thiết kế hệ vector biểu hiện sgRNA chỉnh sửa đa gen**

**Ghi chú:** Trình tự crRNA được ghép nối vào vị trí *BtgZI* trên cấu trúc [U6.1:Ter] và *BsaI* trên cấu trúc [U6.2:Ter]. Hai cấu trúc [U6.1:Ter] và [U6.2:Ter] trên pEN-V2 được ghép nối tiếp với hai cấu trúc [U6.1:Ter] và [U6.2:Ter] trên pEN-V1 để tạo thành chuỗi 4 cấu trúc biểu hiện sgRNA.

Trong các nghiên cứu tương tự, cấu trúc biểu hiện các sgRNA chỉnh sửa đa gen cũng được tích hợp vào cùng một vector theo các phương pháp khác nhau nhằm nâng cao hiệu quả gây đột biến của phức hệ CRISPR/Cas9. Cụ thể, Oliva và cộng sự (2019) đã thiết kế 4 cấu trúc biểu hiện sgRNA cho 4 EBE *PthXo1*, *PthXo2*, *TalC* và *AvrXa7* nằm trên *OsSWEET11*, *OsSWEET13* và *OsSWEET14* và ghép nối các cấu trúc này vào trong vector pENTR4-U6.1P-ccdB bằng hệ thống Golden Gate để tạo cấu trúc chỉnh sửa đa gen, nhằm tăng cường tính kháng bạc lá phổ rộng cho giống lúa IR64 và Ciherang-Sub1 [94]. Một nghiên cứu chỉnh sửa đa gen khác ở giống lúa



Kitaake được thực hiện bởi Xu và cộng sự (2019), nhóm tác giả cũng thực hiện ghép nối 2 cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa gen *OsSWEET11* và *OsSWEET14* vào cùng một vector, và tạo được dòng lúa chỉnh sửa gen có khả năng kháng hầu hết các chủng *Xoo* thử nghiệm [122]. Trong nghiên cứu này, vector biểu hiện sgRNA pEN-V2 đã được thiết kế làm vật liệu ban đầu cho việc thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa đa gen *SW13-TBR* và *SW14-TBR* ở giống lúa TBR225 .

### **3.2.2. Thiết kế vector mang cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR***

Các phân tích TALome (mục 3.1.2) đã xác định được hai vị trí EBE *PthXo2(A)* và *AvrXa7* trên hai gen *S OsSWEET13* và *OsSWEET14* của giống lúa TBR225 là đích tấn công của protein TALE do các isolate VXO tiết ra. Để phục vụ thí nghiệm gây đột biến EBE *PthXo2(A)* và *AvrXa7* bằng công cụ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 nhằm xác định đây có phải là những EBE/gen *S* có vai trò quyết định đến tính miễn cảm của cây lúa TBR225 với các isolate VXO hay không, hai hệ thống vector CRISPR/Cas9 chỉnh sửa đơn gen *OsSWEET14* và đa gen *OsSWEET13- OsSWEET14* đã được thiết kế. Trong nghiên cứu trước đây, cấu trúc vector chuyển gen biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 gây đột biến đồng thời vị trí EBE *AvrXa7/TalF/PthXo3* trên *SW14-TBR* đã được Nguyễn Duy Phương và cộng sự (2019) thiết kế [11]. Chính vì vậy, trong thí nghiệm này, cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa đồng thời EBE *PthXo2(A)* trên *SW13-TBR* và EBE *AvrXa7* trên *SW14-TBR* đã tiếp tục được thiết kế để sử dụng cho nghiên cứu tạo dòng lúa TBR225 chỉnh sửa đa gen.

#### **3.2.2.1. Thiết kế trình tự crRNA chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR***

Cơ chế hoạt động chính của hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 dựa trên khả năng cắt chính xác DNA sợi đôi tại vị trí mong muốn trên gen đích của phức hệ sgRNA-Cas9 và hệ thống sửa chữa DNA nội sinh của cây chủ để sửa chữa các DSB. Phức hệ sgRNA-Cas9 hoạt động với hai thành phần chính là protein Cas9 có hoạt tính endonuclease và phân tử sgRNA dẫn đường cho phức hệ tới vị trí cần cắt được đặc hiệu bởi đoạn trình tự dài khoảng 20 nucleotide (crRNA) nằm ở đầu 5' [101]. Do đó, các trình tự crRNA nhận biết lần lượt vị trí EBE *PthXo2(A)* và *AvrXa7* trên *SW13-TBR* và *SW14-TBR* đã được thiết kế để phục vụ thí nghiệm tạo cấu trúc vector biểu hiện sgRNA tiếp theo, mỗi vị trí EBE được

thiết kế 2 trình tự crRNA để tăng khả năng gây đột biến thành công cho hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9.

Bằng phần mềm CRISPR.P 2.0, 56 trình tự crRNA đã được xác định nằm phía trước vị trí nhận biết bảo thủ PAM, bao gồm 20 trình tự crRNA chỉnh sửa EBE *PthXo2(A)* và 36 trình tự crRNA chỉnh sửa EBE *AvrXa7* (dữ liệu không được trình bày). Để đảm bảo khả năng biểu hiện và hoạt động hiệu quả của sgRNA, 11 trình tự crRNA đã được lựa chọn (Bảng 3.2) theo các điều kiện: (i) có vị trí cắt DNA nằm trên trình tự đích, (ii) ưu tiên bắt đầu bằng Guanine (G) ở đầu 5', (iii) hàm lượng GC từ 30-80%, (iv) có khả năng hình thành sgRNA có cấu trúc bậc II ổn định (duy trì cấu trúc vòng loop RAR, SL2 và SL3), (v) tổng số cặp base (TBP-total base pairs) < 13, (vi) số cặp base liên tục (CBP-consecutive base pairs) < 8, (vii) số cặp base bên trong cấu trúc crRNA (IBP-internal base pairs) < 7 [78].

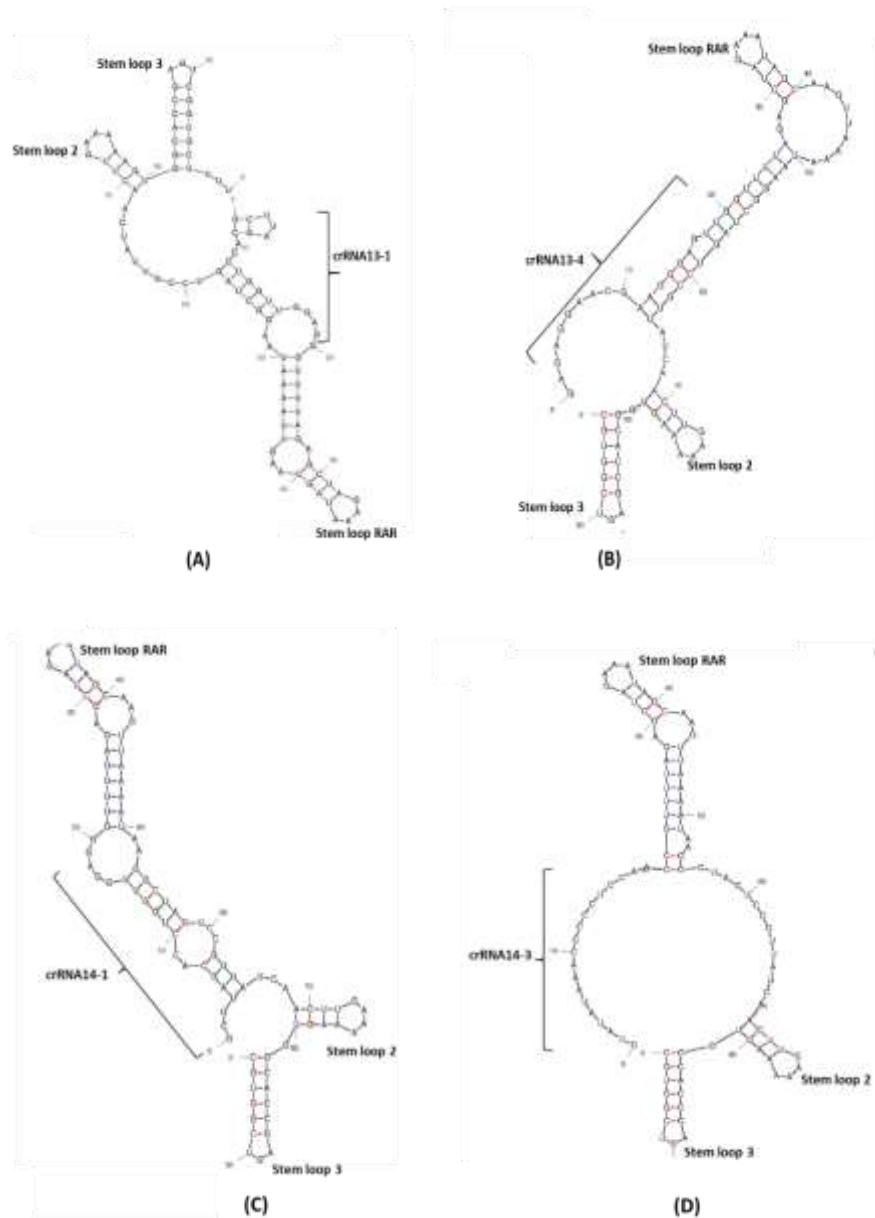
**Bảng 3.2. Trình tự crRNA chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR***

Tên	Trình tự crRNA (5'-3')	Kích thước	TBP	CBP	IBP	GSL	% GC	On score	Đích tác động
crRNA13-1	GAGTTGTGGTGCTTTTATAT	20	10	5	0	0	35	0,2932	<i>PthXo2(A)</i>
crRNA13-2	GGAGAGGAACGAAGGGAGTTG	21	10	4	0	0	55	0,1933	<i>PthXo2(A)</i>
crRNA13-3	GGAGTTGTGGTGCTTTTATAT	21	12	6	0	0	40	0,0448	<i>PthXo2(A)</i>
crRNA13-4	GAGAGGAACGAAGGGAGTTG	20	12	3	0	0	55	0,3028	<i>PthXo2(A)</i>
crRNA14-1	GCTTAGCACCTGGTTGGAGG	20	10	6	0	0	60	0,4770	<i>AvrXa7</i>
crRNA14-2	GAGCTTAGCACCTGGTTGGAGG	22	10	6	0	0	59	0,0631	<i>AvrXa7</i>
crRNA14-3	TATATAAACCCCTCCAACC	20	2	2	0	0	48	0,1307	<i>AvrXa7</i>
crRNA14-4	GAGCTTAGCACCTGGTTGGA	20	10	6	0	0	55	0,1117	<i>AvrXa7</i>
crRNA14-5	GAGCTTAGCACCTGGTTGG	19	10	6	0	0	58	0,0660	<i>AvrXa7</i>
crRNA14-6	GCTTAGCACCTGGTTGGAG	19	10	6	0	0	58	0,0631	<i>AvrXa7</i>
crRNA14-7	GAGCTTAGCACCTGGTTGGAG	21	10	6	0	0	57	0,0631	<i>AvrXa7</i>

**Ghi chú:** (% GC) tỉ lệ phần trăm GC; (TBP) tổng số cặp base; (CBP) số cặp base liên tục; (IBP) số cặp base trong cấu trúc của crRNA; (GSL) số vòng loop quan trọng (RAR, SL2 và SL3) bị phá vỡ cấu trúc; (On score) điểm dự đoán khả năng nhận biết đúng vị trí đích (từ 0,00 – 1,00); (*PthXo2(A)*) EBE trên *SW13-TBR*; (*AvrXa7*) EBE trên *SW14-TBR*.

Hai trình tự crRNA có điểm On-score (điểm dự đoán khả năng nhận biết đúng trình tự đích) cao nhất (Bảng 3.2) và vị trí cắt DNA khác nhau (Hình 3.15) đặc hiệu cho mỗi promoter đã được lựa chọn cho thí nghiệm thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa gen, bao gồm crRNA13-1 và crRNA13-4 đặc hiệu cho *SW13-TBR* và crRNA14-1 và crRNA14-3 đặc hiệu cho *SW14-TBR*. Hơn nữa, phân tích

bằng công cụ Mfold v2.3 cũng cho thấy phân tử sgRNA mang lần lượt 4 trình tự crRNA này đều duy trì được cả 3 vòng loop quan trọng RAR, SL2 và SL3 trong cấu trúc bậc II (Hình 3.14), vì vậy đảm bảo khả năng tạo phức hợp với protein Cas9 để hoạt động hiệu quả.



**Hình 3.14. Cấu trúc bậc II của sgRNA**

**Ghi chú:** Mô hình cấu trúc bậc II của sgRNA mang các trình tự crRNA13-1 (A), crRNA13-4 (B), crRNA14-1 (C), crRNA14-3 (D) được dự đoán bằng phần mềm Mfold v2.3. Các phân tử sgRNA mang cấu trúc vòng loop: stem loop RAR (repeat and anti-repeat region), stem loop 2 và stem loop 3.

Các trình tự crRNA tiếp tục được phân tích bằng công cụ CCTop để dự đoán tính đặc hiệu của các trình tự này, nhằm giảm thiểu khả năng tạo ra các đột biến sai vị trí (off-target) của phức hệ Cas9/sgRNA sau này [31]. Kết quả phân tích thu được (Bảng 3.3) cho thấy tất cả các trình tự tương đồng với các crRNA đã lựa chọn đều nằm trên vùng intron (đối với crRNA13-4) hoặc là nằm xa gen chức năng (đối với crRNA13-1, crRNA14-1 và crRNA14-3). Do đó, trong trường hợp phức hệ CRISPR/Cas9 hoạt động không đặc hiệu cũng sẽ ít có khả năng gây ảnh hưởng tới hoạt động bình thường của các gen khác trong hệ gen lúa [43, 78]. Tuy nhiên, đây cũng là những vị trí cần được kiểm tra bằng phân tích trình tự sau khi tạo ra dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen để đảm bảo không xuất hiện đột biến off-target có thể gây ảnh hưởng tới tính chính xác của quá trình đánh giá tác động của các đột biến on-target.

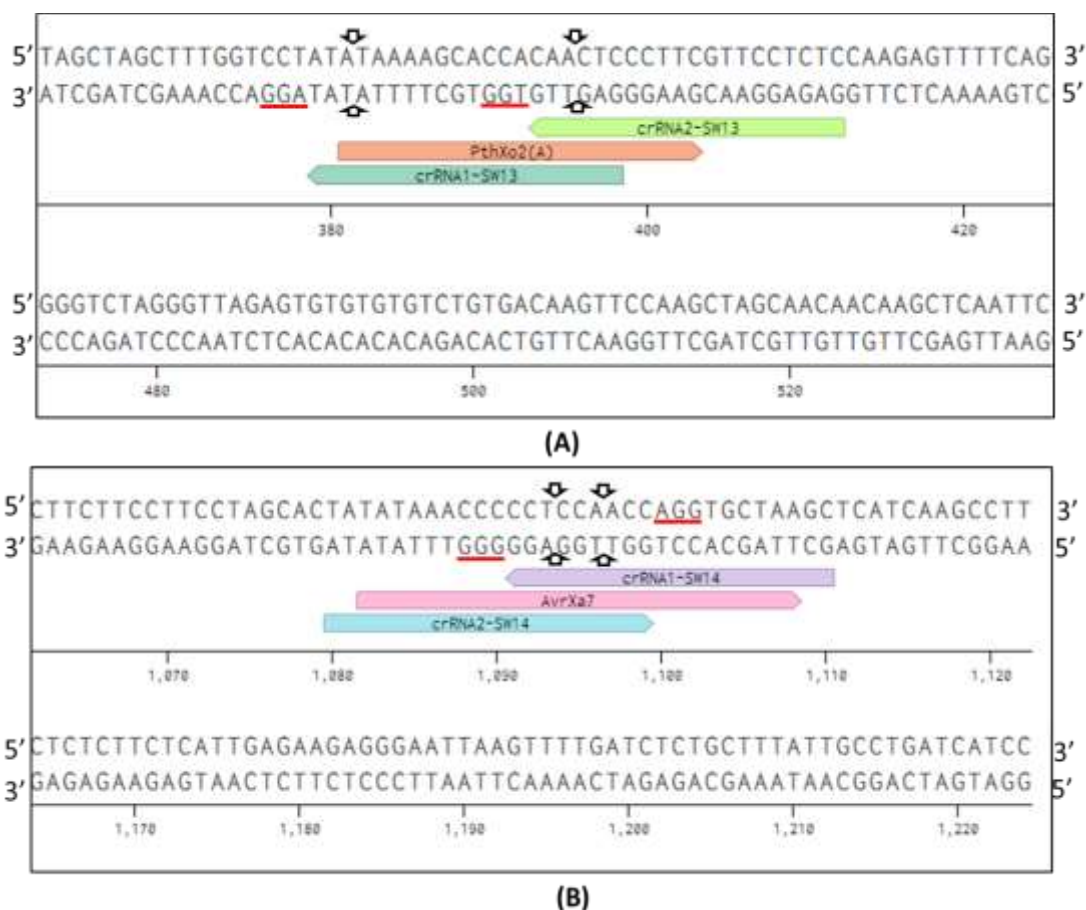
**Bảng 3.3. Các trình tự DNA tương đồng với crRNA trong hệ gen lúa**

Tên	Trình tự tương đồng	Vị trí	Khoảng cách đến exon gần nhất	Mã số
crRNA13-1	AATTTGTC[GTGTTTTTATAT]	-	1658	Os07g0229990
crRNA13-4	GCGAGGCA[GGGAGGGAGTTG]	I	1459	Os01g0337500
crRNA14-1	GCAGAGAA[GCTGGTTGGAGG]	-	8607	Os10g0409556
	ACATAGCA[CCTGGCTAGAGG]	-	8383	Os01g095607
crRNA14-3	CCTAAAAA[CTCCCTCCAACC]	-	6651	Os11g0562600
	AATATTTA[CTCCCTCCAACC]	-	23528	Os11g0146800
	CACATGAA[CCCCACCAACC]	-	15618	Os11g0530600

**Ghi chú:** Chữ trong ngoặc [] thể hiện trình tự tương đồng với vùng lõi (12 Nu) của crRNA; chữ in đậm thể hiện vị trí sai khác so với vị trí Nu tương ứng trên crRNA; (I) intron; (-) không nằm trên gen chức năng.

Như vậy, tổng hợp các kết quả phân tích, crRNA13-1 và crRNA13-4 được sử dụng cho nghiên cứu gây đột biến EBE *PthXo2(A)* trên *SW13-TBR* (đặt tên lần lượt là *crRNA1-SW13* và *crRNA2-SW13*), crRNA14-1 và crRNA14-3 được sử dụng cho nghiên cứu gây đột biến EBE *AvrXa7* trên *SW14-TBR* (đặt tên lần lượt là *crRNA1-SW14* và *crRNA2-SW14*) (Hình 3.15) theo cơ chế NHEJ bằng hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 [101]. Các oligonucleotide (xuôi và ngược) mang trình tự

crRNA đã thiết kế với đầu dính bổ sung (Phụ lục 5) được sinh tổng hợp bởi Công ty Cổ Phần Phù Sa Genomics (Việt Nam), bắt cặp với nhau để tạo thành các phân tử DNA sợi đôi hoàn chỉnh để sử dụng cho thí nghiệm thiết kế cấu trúc vector biểu hiện sgRNA tiếp theo.



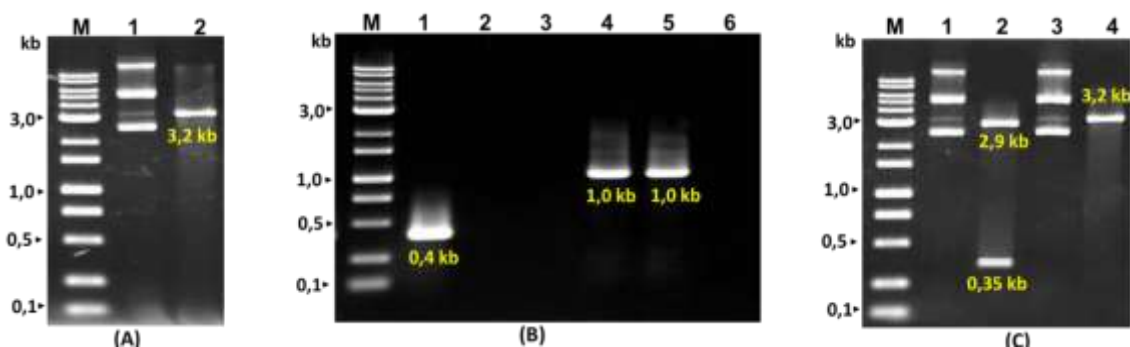
**Hình 3.15. Vị trí trình tự crRNA chỉnh sửa SW13-TBR và SW14-TBR**

**Ghi chú:** Vị trí của các crRNA chỉnh sửa EBE *PthXo2(A)* trên SW13-TBR (A) và chỉnh sửa EBE *AvrXa7* trên SW14-TBR (B). Trình tự các EBE và crRNA được đánh dấu bằng mũi tên. Trình tự PAM được gạch chân bằng đường kẻ màu đỏ. Mũi tên (↔) chỉ vị trí cắt của phức hệ CRISPR/Cas9.

### 3.2.2.2. Thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa SW13-TBR và SW14-TBR

#### a. Thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa SW13-TBR

Hai cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa SW13-TBR được thiết kế dựa trên khung vector pEN-V1 (Hình 2.4), sử dụng nguyên liệu là các trình tự DNA *crRNA1-SW13* và *crRNA2-SW13* mang các crRNA đã thiết kế (mục 3.2.2.1).



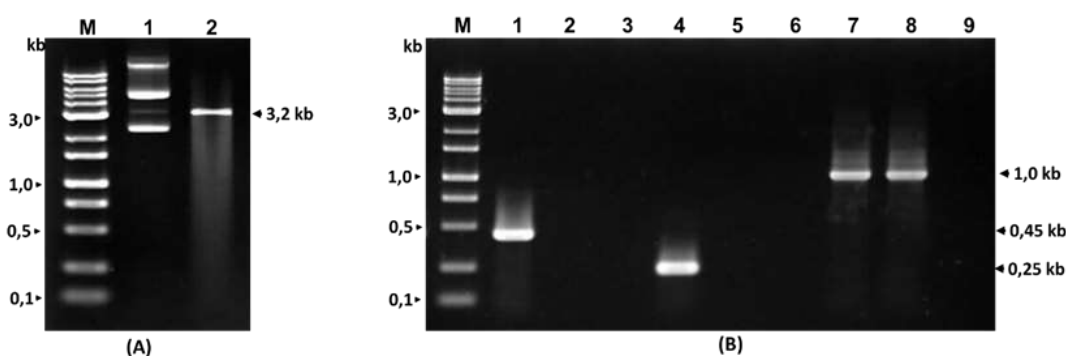
**Hình 3.16. Ghép nối *crRNA1-SW13* vào vector pEN-V1**

**Ghi chú:** Sản phẩm cắt giới hạn và PCR được điện di trên gel agarose 1,0%. (A) Xử lý pEN-V1 bằng *BtgZI*; giếng 1: vector nguyên bản, giếng 2: sản phẩm cắt giới hạn. (B) Kiểm tra vector tái tổ hợp pEN-V1/sgRNA1 bằng PCR; giếng 1-3: môi là attL-F/*BtgZI-crRNA1-SW13-R*; giếng 4-6: môi là attL-F/attL-R; giếng 1 và 4: khuôn là pEN-V1/sgRNA1; giếng 2 và 5: khuôn là vector pEN-V1; giếng 3 và 6: đối chứng âm (không có DNA khuôn). (C) Kiểm tra vector tái tổ hợp pEN-V1/sgRNA1 bằng enzyme cắt giới hạn *BamHI*; giếng 1: pEN-V1 nguyên bản; giếng 2: sản phẩm cắt giới hạn pEN-V1; giếng 3: pEN-V1/sgRNA1 nguyên bản; giếng 4: sản phẩm cắt giới hạn pEN-V1/sgRNA1. Giếng M: thang chuẩn DNA 1,0 kb (Clever scientific).

Để ghép nối trình tự *crRNA1-SW13* vào cấu trúc biểu hiện sgRNA thứ nhất ([U6.1::Ter]) trên pEN-V1 (Hình 2.4), vector pEN-V1 đã được xử lý bằng *BtgZI*. Băng DNA 3,2 kb tương ứng với kích thước lý thuyết của khung vector pEN-V1 mạch thẳng (Hình 3.16A, giếng 2) được tinh sạch và ghép nối với mảnh DNA *crRNA1-SW13* đã được gắn nhóm  $PO_4^{3-}$  vào đầu 5' bằng phản ứng phosphoryl hóa và biến nạp vào vi khuẩn *E. coli*. Kết quả kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng PCR với các cặp môi đặc hiệu attL-F/attL-R và attL-F/*BtgZI-crRNA1-SW13-R* thu được các băng DNA có kích thước lần lượt khoảng 1,0 kb và 0,4 kb (Hình 3.16B, giếng 1 và 4) phù hợp với kích thước lý thuyết các đoạn DNA cần nhân bản. Đối với thí nghiệm kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng enzyme cắt giới hạn *BamHI* (có 2 vị trí nhận biết trên pEN-V1, trong đó 1 vị trí nằm giữa 2 vị trí nhận biết của *BtgZI*), sản phẩm cắt giới hạn pEN-V1/sgRNA1 chỉ thu được một băng có kích thước khoảng 3,2 kb (Hình 3.16C, giếng 4) tương ứng với toàn bộ kích thước của vector mạch thẳng; trong khi sản phẩm cắt pEN-V1 nguyên bản thu được hai băng DNA kích thước lần lượt là 0,35 kb và 2,9 kb (Hình 3.16C, giếng 2). Điều này chứng tỏ 1 vị trí

nhận biết của *Bam*HI đã được loại bỏ khỏi khung vector pEN-V1 và được thay thế bởi đoạn *crRNA1-SW13*. Các kết quả thu được cho thấy trình tự *crRNA1-SW13* đã được ghép nối thành công vào vector pEN-V1.

Tiếp theo, trình tự *crRNA2-SW13* tiếp tục được ghép nối vào cấu trúc biểu hiện sgRNA thứ hai (*[U6.2::Ter]*) trên pEN-V1/sgRNA1 (Hình 2.4). Vector pEN-V1/sgRNA1 được xử lý bằng *Bsa*I; băng DNA 3,2 kb tương ứng với khung vector pEN-V1/sgRNA1 mạch thẳng (Hình 3.17A, giếng 2) được tinh sạch và ghép nối với đoạn *crRNA2-SW13* tương tự như trên. Vector tái tổ hợp đã được kiểm tra bằng PCR với lần lượt các cặp mồi đặc hiệu cho *crRNA1-SW13* và *crRNA2-SW13* và khung vector pEN-V1 (Hình 2.4). Kết quả điện di trên gel agarose 1,0% thu được các băng 0,45 kb (đối với cặp mồi BtgZI-*crRNA1-SW13*-F/*Bsa*I-*crRNA2-SW13*-R đặc hiệu cho trình tự *crRNA1-SW13* và *crRNA2-SW13*) (Hình 3.17B, giếng 1); 0,25 kb (đối với cặp mồi *Bsa*I-*crRNA1-SW13*-F/*att*L-R (đặc hiệu cho *crRNA2-SW13* và vector pEN-V1/sgRNA1) (Hình 3.17B, giếng 4) và 1,0 kb (cặp mồi *att*L-F/*att*L-R đặc hiệu cho khung vector pEN-V1) (Hình 3.17B, giếng 7). Tất cả các sản phẩm PCR thu được đều có kích thước phù hợp với kích thước lý thuyết các đoạn DNA cần nhân bản, chứng tỏ *crRNA2-SW13* đã được ghép nối thành công vào vector pEN-V1/sgRNA1.



**Hình 3.17. Ghép nối *crRNA2-SW13* vào vector pEN-V1/sgRNA1**

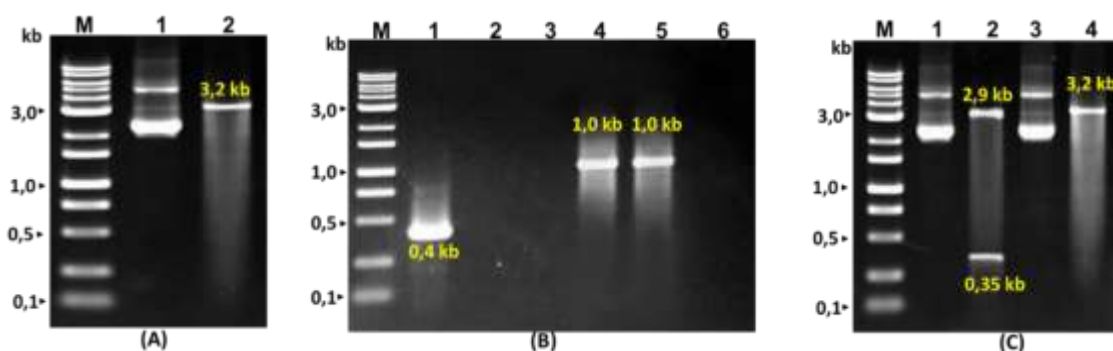
**Ghi chú:** Sản phẩm cắt giới hạn và PCR được điện di trên gel agarose 1,0%. (A) Xử lý pEN-V1/sgRNA1 bằng *Bsa*I; giếng 1: vector nguyên bản, giếng 2: sản phẩm cắt giới hạn. (B) Kiểm tra vector tái tổ hợp pEN-V1/sgRNA-SW13 bằng PCR; giếng 1-3: mồi là BtgZI-*crRNA1-SW13*-F/*Bsa*I-*crRNA2-SW13*-R; giếng 4-6: mồi là *Bsa*I-F/*att*L-R; giếng 7-9: mồi là *att*L-F/*att*L-R; giếng 1, 4, 7: khuôn là pEN-V1/sgRNA-SW13; giếng 2, 5, 8: khuôn là pEN-V1; giếng 3, 6, 9: đối chứng âm (không có DNA khuôn). Giếng M: thang chuẩn DNA 1,0 kb (Cleaver Scientific).

Như vậy, vector mang 2 cấu trúc biểu hiện 2 sgRNA chỉnh sửa *SW13-TBR* (đặt tên là pEN-V1/sgRNA-SW13) đã được thiết kế thành công.

*b. Thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa SW14-TBR*

Hai cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa *SW14-TBR* được thiết kế dựa trên khung vector pEN-V2 (Hình 2.5) (mục 3.2.1) và hai trình tự DNA *crRNA1-SW14* và *crRNA2-SW14* mang các crRNA đã thiết kế (mục 3.2.2.1).

Để ghép nối *crRNA1-SW14* vào cấu trúc [*U6.1:Ter*], vector pEN-V2 mạch thẳng đã được tạo ra bằng cách xử lý pEN-V2 với *BtgZI* (Hình 3.18A). Sản phẩm cắt giới hạn (Hình 3.18A, giếng 2) được tinh sạch trước khi ghép nối với đoạn trình tự *crRNA1-SW14* để tạo vector tái tổ hợp. Vector pEN-V2/sgRNA1 tái tổ hợp được kiểm tra lần lượt bằng PCR (Hình 3.18B) và cắt giới hạn (Hình 3.18C).



**Hình 3.18. Ghép nối *crRNA1-SW14* vào vector pEN-V2**

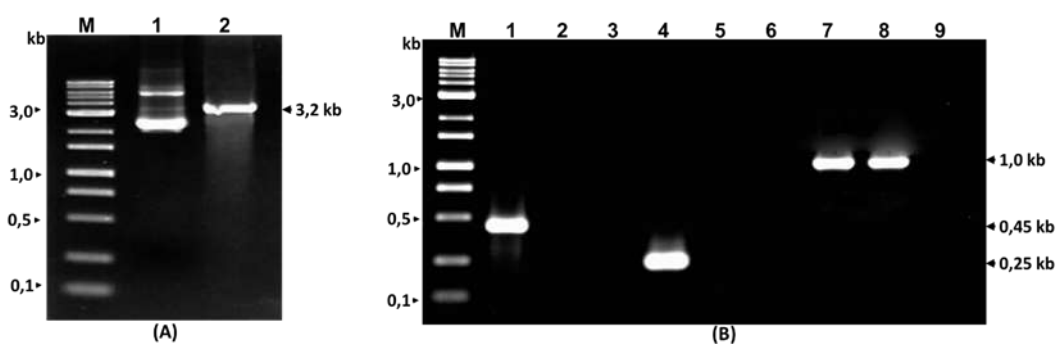
**Ghi chú:** Sản phẩm cắt giới hạn và PCR được điện di trên gel agarose 1,0%. (A) Xử lý pEN-V2 bằng *BtgZI*; giếng 1: vector nguyên bản, giếng 2: sản phẩm cắt giới hạn. (B) Kiểm tra vector tái tổ hợp pEN-V2/sgRNA1 bằng PCR. Giếng 1-3: môi là attL-F/*BtgZI*-*crRNA1-SW14-R*; giếng 4-6: môi là attL-F/attL-R; giếng 1 và 4: khuôn là pEN-V2/sgRNA1; giếng 2 và 5: khuôn là pEN-V2; giếng 3 và 6: đối chứng âm (không có DNA khuôn). (C) Kiểm tra vector tái tổ hợp pEN-V2/sgRNA1 bằng enzyme cắt giới hạn *Bam*HI; giếng 1: pEN-V2 nguyên bản; giếng 2: sản phẩm cắt giới hạn pEN-V2; giếng 3: pEN-V2/sgRNA1 nguyên bản; giếng 4: sản phẩm cắt giới hạn pEN-V2/sgRNA1. Giếng M: thang chuẩn DNA 1,0 kb (Cleaver scientific).

Kết quả điện di sản phẩm PCR đã thu được các băng mang kích thước phù hợp với kích thước đã dự đoán về lý thuyết; cụ thể, băng DNA 0,4 kb đối với thí nghiệm sử dụng cặp môi attL-F/*BtgZI*-*crRNA1-SW14-R* (Hình 3.18B, giếng 1) và băng DNA 1,0 kb đối với thí nghiệm sử dụng cặp môi attL-F/attL-R (Hình 3.18B, giếng



4). Tương tự, thí nghiệm xử lý vector pEN-V2/sgRNA1 bằng *Bam*HI cũng thu được băng DNA có kích thước 3,2 kb (Hình 3.18C, giếng 4) đúng với kích thước mong muốn; trong khi thí nghiệm đối chứng xử lý pEN-V2 bằng *Bam*HI thu được 2 băng DNA có kích thước 2,9 kb và 0,35 kb (Hình 3.18C, giếng 2). Các kết quả thu được chứng tỏ *crRNA1-SW14* đã được ghép nối thành công vào vector pEN-V2.

Vector pEN-V2/sgRNA1 tiếp tục được sử dụng làm nguyên liệu cho thí nghiệm ghép nối đoạn *crRNA2-SW14* vào cấu trúc biểu hiện sgRNA [*U6.2::Ter*]. Khung vector đã được xử lý với *Bsa*I (Hình 3.19A, giếng 2) và ghép nối với *crRNA2-SW14* bằng T4 DNA ligase. Kết quả PCR kiểm tra vector tái tổ hợp pEN-V2/sgRNA-SW14 với cặp mồi BtgZI-*crRNA1-SW14-F*/*BsaI-crRNA2-SW14-R* đặc hiệu cho 2 trình tự *crRNA*, cặp mồi *BsaI-crRNA2-SW14-F/attL-R* đặc hiệu cho trình tự *crRNA2-SW14* và pEN-V2/sgRNA1 và cặp mồi *attL-F/attL-R* đặc hiệu cho khung vector pEN-V2 đã thu được các băng DNA có kích thước lần lượt khoảng 0,45 kb (Hình 3.19B, giếng 1), 0,25 kb (Hình 3.19B, giếng 4) và 1,0 kb (Hình 3.19B, giếng 7). Kích thước của các băng DNA này đều tương ứng với kích thước lý thuyết của các đoạn DNA cần nhân bản; điều này cho thấy cấu trúc biểu hiện sgRNA mang trình tự *crRNA2-SW14* đã được thiết kế thành công.

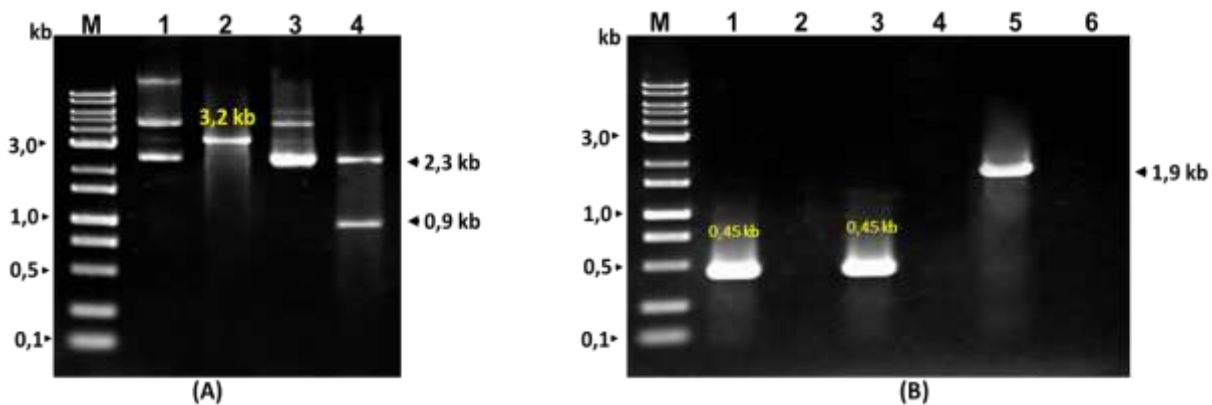


**Hình 3.19. Ghép nối *crRNA2-SW14* vào vector pEN-V2/sgRNA1**

**Ghi chú:** Sản phẩm cắt giới hạn và PCR được điện di trên gel agarose 1,0%. (A) Xử lý pEN-V2/sgRNA1 bằng *Bsa*I; giếng 1: vector nguyên bản, giếng 2: sản phẩm cắt giới hạn. (B) Kiểm tra vector tái tổ hợp pEN-V2/sgRNA-SW14 bằng PCR; giếng 1-3: mồi là BtgZI-*crRNA1-SW14-F*/*BsaI-crRNA2-SW14-R*; giếng 4-6: mồi là *BsaI-crRNA2-SW14-F/attL-R*; giếng 7-9: mồi là *attL-F/attL-R*; giếng 1, 4 & 7: khuôn là pEN-V2/sgRNA-SW14; giếng 2, 5 & 8: khuôn là pEN-V2; giếng 3, 6 & 9: đối chứng âm (không có DNA khuôn). Giếng M: thang chuẩn DNA 1,0 kb (Cleaver Scientific).

c. Thiết kế hệ vector mang đồng thời cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa SW13-TBR và SW14-TBR

Hệ vector mang đồng thời 4 cấu trúc biểu hiện sgRNA nhận biết EBE *PthXo2(A)* và *AvrXa7* trên *SW13-TBR* và *SW14-TBR* đã được tạo ra từ nguyên liệu là hai vector pEN-V1/sgRNA-SW13 và pEN-V2/sgRNA-SW14 (Hình 2.6). Do cả 2 vị trí nhận biết của *NotI* và *XhoI* nằm ở phía sau 2 cấu trúc biểu hiện sgRNA (đặt tên là [*U6:sgRNA-SW13*]) trên pEN-V1/sgRNA-SW13, trong khi pEN-V2/sgRNA-SW14 mang vị trí nhận biết của *NotI* và *XhoI* ở 2 phía của cấu trúc [*U6:sgRNA-SW14*] (Hình 2.6, Hình 3.13); hai vector này được xử lý đồng thời với *NotI/XhoI*. Băng DNA có kích thước khoảng 3,2 kb tương ứng với khung vector pEN-V1/sgRNA-SW13 mạch thẳng (Hình 3.20A, giếng 2) và 0,9 kb tương ứng với cấu trúc biểu hiện [*U6:sgRNA-SW14*] (Hình 3.20A, giếng 4) được tinh sạch từ gel agarose và ghép nối với nhau bằng T4 DNA ligase để tạo thành vector mang 4 cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa đồng thời hai promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR* (đặt tên là pEN/SW13-SW14).



**Hình 3.20. Ghép nối cấu trúc [*U6:sgRNA-SW14*] vào pEN-V1/sgRNA-SW13**

**Ghi chú:** Sản phẩm cắt giới hạn và PCR được điện di trên gel agarose 1,0%. (A) Xử lý vector bằng *NotI/XhoI*; giếng 1: pEN-V1/sgRNA-SW13 nguyên bản; giếng 2: sản phẩm cắt giới hạn pEN-V1/sgRNA-SW13; giếng 3: pEN-V2/sgRNA-SW14 nguyên bản; giếng 4: sản phẩm cắt giới hạn pEN-V2/sgRNA-SW14. (B) Kiểm tra vector tái tổ hợp pEN/SW13-SW14 bằng PCR; giếng 1 & 2: môi là *BtgZI-crRNA1-SW13-F/BsaI-crRNA2-SW13-R*; giếng 3 & 4: môi là *BtgZI-crRNA1-SW14-F/BsaI-crRNA2-SW14-R*; giếng 5 & 6: môi là *attL-F/attL-R*; giếng 1, 3 & 5: khuôn là pEN/SW13-SW14; giếng 2, 4 & 6: đối chứng âm (không có DNA khuôn). Giếng M: thang chuẩn DNA 1,0 kb (Cleaver Scientific).

Vector tái tổ hợp được kiểm tra bằng PCR với lần lượt 3 cặp mồi khác nhau. Kết quả điện di sản phẩm PCR với các cặp mồi BtgZI-crRNA1-SW13-F/BsaI-crRNA2-SW13-R (đặc hiệu cho *[U6:sgRNA-SW13]*) và BtgZI-crRNA1-SW14-F/BsaI-crRNA2-SW14-R (đặc hiệu cho *[U6:sgRNA-SW14]*) đều thu được băng kích thước khoảng 0,45 kb phù hợp với kích thước lý thuyết của các đoạn DNA cần nhân bản (Hình 3.20B, giếng 1 và 3). Hơn nữa, thí nghiệm PCR với cặp mồi attL-F/attL-R đặc hiệu cho khung vector pEN-V1 cũng thu được băng có kích thước khoảng 1,9 kb đúng như dự đoán lý thuyết (Hình 3.20B, giếng 5), bao gồm cả kích thước của đoạn DNA được chèn vào. Các kết quả này cho phép khẳng định hai cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa *SW14-TBR [U6:sgRNA-SW14]* đã được chèn thành công vào vector pEN-V1/sgRNA-SW13 mang hai cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa *SW13-TBR*.

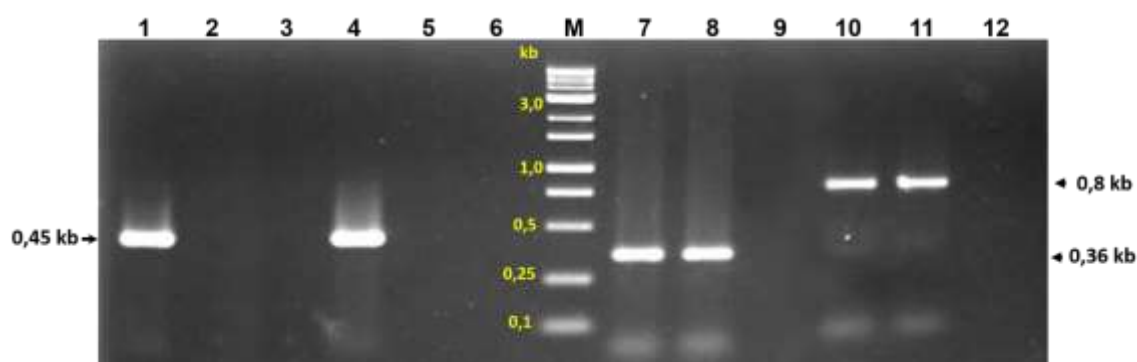
Trong các nghiên cứu chỉnh sửa gen đã công bố gần đây, để biểu hiện phức hệ Cas9-sgRNA trong tế bào lúa, các tác giả thường thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA điều khiển bởi promoter *U3* hoặc *U6*. Hệ thống vector này được chứng minh là có khả năng đồng nhất, hiệu quả và tạo ra nhiều đột biến có thể di truyền [94, 133]. Một số các phương pháp khác nhau đã được sử dụng để thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA, trong đó phổ biến nhất phải kể đến là Overlapping - PCR [83]. Trong nghiên cứu trước đây của Nguyễn Duy Phương và cộng sự (2019), cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa đồng thời các EBE *PthXo3/AvrXa7/TalF* trên *SW14-TBR* của giống lúa TBR225 cũng đã được thiết kế bằng kỹ thuật Overlapping-PCR cải tiến, sử dụng promoter *OsU6* [11]. Trong nghiên cứu này, cấu trúc biểu hiện sgRNA điều khiển bởi promoter *OsU6.1* và *OsU6.2* nhận biết vị trí của 2 EBE *PthXo2(A)* và *AvrXa7* trên *SW13-TBR* và *SW14-TBR* đã được tạo ra bằng kỹ thuật ghép nối DNA sử dụng kết hợp các enzyme cắt giới hạn thuộc nhóm IIS (*BtgZI* và *BsaI*) và T4 DNA ligase. Phương pháp này cũng được sử dụng trong nghiên cứu chỉnh sửa gen *OsSWEET14* trên giống lúa Bắc Thơm 7 bởi nhóm nghiên cứu của Vũ Hoài Sâm (2019) [118]. Tương tự, một nghiên cứu chỉnh sửa gen *OsSWEET14*

trên giống lúa Super Basmati bằng CRISPR/Cas9 được thực hiện năm 2020 bởi Zafar và cộng sự, tác giả đã thiết kế ba cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa các EBE *TalF*, *AvrXa7/PthXo3*, *TalC* bằng kỹ thuật ghép nối DNA sử dụng enzyme *BsaI* [133].

### 3.2.2.3. Thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR*

Với mục tiêu tạo dòng lúa TBR225 được chỉnh sửa đồng thời hai promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR*, vector chuyển gen biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 mang đồng thời cấu trúc biểu hiện Cas9 và cấu trúc biểu hiện phức hệ sgRNA đã được thiết kế từ hai vector pEN/SW13-SW14 và pCas9 thông qua hệ thống nhân dòng Gateway để sử dụng cho thí nghiệm chuyển gen (Hình 2.7).

Hỗn hợp phản ứng tái tổ hợp Gateway đã được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 $\alpha$  và sàng lọc bằng phương pháp PCR trực tiếp khuẩn lạc. Plasmid tái tổ hợp sau đó được tách chiết từ thể biến nạp dương tính và kiểm tra bằng PCR với các cặp mồi khác nhau (Hình 3.21).



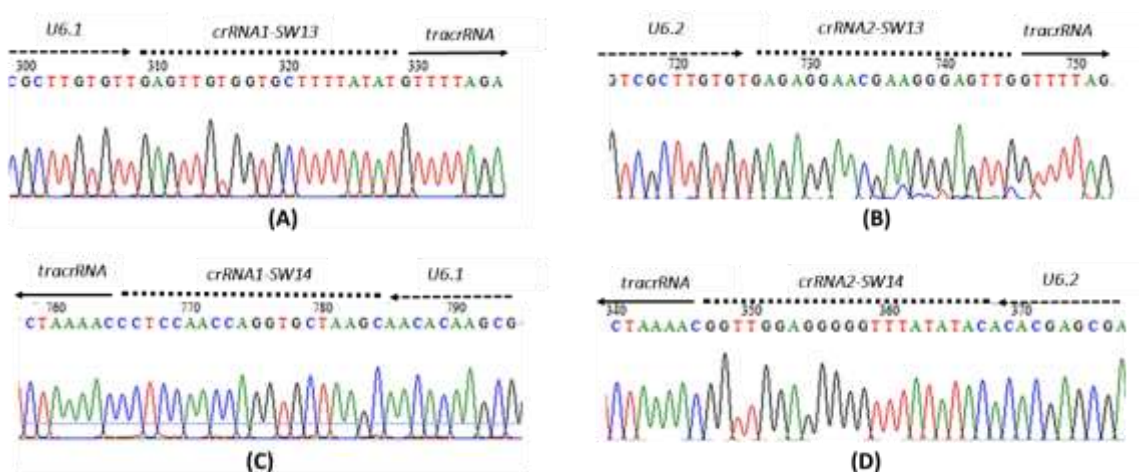
**Hình 3.21. Kiểm tra vector pCas9/SW13-SW14**

**Ghi chú:** Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,0%. Giếng M: thang chuẩn DNA 1,0 kb (Clever Scientific); giếng 1-3: mồi là *BtgZI-crRNA1-SW13-F/BsaI-crRNA2-SW13-R*; giếng 4-6: mồi là *BtgZI-crRNA1-SW13-F/BsaI-crRNA2-SW13-R*; giếng 7-9: mồi là *Ubi-F/Cas9-t-R*; giếng 10-12: mồi là *HPT-F/HPT-R*; giếng 1, 4, 7 & 10: khuôn là *pCas9/sgRNA-SW13-SW14*; giếng 3, 6, 9 & 12: đối chứng âm (không có DNA khuôn).

Kết quả điện di (Hình 3.21) cho thấy, với hai cặp mồi đặc hiệu cho cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR* (*BtgZI-crRNA1-SW13-F/BsaI-crRNA2-SW13-R* và *BtgZI-crRNA1-SW14-F/BsaI-crRNA2-SW14-R*) đều xuất hiện băng DNA có kích thước khoảng 0,45 kb (Hình 3.21, giếng 1 và 4). Đối

với thí nghiệm sử dụng các cặp mồi Ubi-F/Cas9-t-R đặc hiệu cho cấu trúc biểu hiện [*Ubi:Cas9*] trên vector pCas9, kết quả điện di thu được bằng DNA có kích thước khoảng 0,36 kb (Hình 3.21, giếng 7) tương tự như thí nghiệm đối chứng dương (Hình 3.21, giếng 8). Bên cạnh đó, kết quả PCR bằng cặp mồi HPT-F/HPT-R đặc hiệu cho gen chọn lọc *Hygromycin phosphotransferase (HPT)* cũng thu được bằng DNA có kích thước đúng với kích thước đoạn DNA cần nhân bản, khoảng 0,8 kb (Hình 3.22, giếng 10).

Để khẳng định chắc chắn hơn sự có mặt của các trình tự crRNA đích và cấu trúc biểu hiện sgRNA trong vector chuyển gen tái tổ hợp, vector pCas9/SW13-SW14 đã được giải trình tự nucleotide bằng các mồi khác nhau. Kết quả phân tích trình tự (Hình 3.22) cho thấy tất cả các cấu trúc biểu hiện sgRNA mang các trình tự crRNA đích (đã thiết kế) ở giữa promoter *U6* và *tracrRNA* đã được chèn chính xác vào vector pCas9. Các kết quả thu được đã chứng tỏ cấu trúc biểu hiện sgRNA nhận biết EBE *PthXo2(A)* trên *SW13-TBR* và *AvrXa7* trên *SW14-TBR* đã được ghép nối thành công vào vector chuyển gen pCas9.



**Hình 3.22. Giải trình tự vector pCas9/SW13-SW14**

**Ghi chú:** Một phần các kết quả giải trình tự vector pCas9/SW13-SW14 với 4 mồi khác nhau (A-D). Trình tự promoter *U6.1* và *U6.2* được đánh dấu bằng dòng mũi tên nét đứt (-----); trình tự crRNA được thể hiện bằng đường kẻ đứt (-----); trình tự *tracrRNA* được biểu diễn bằng đường mũi tên liền (→).

Các nghiên cứu trước đây cho thấy vector chuyển gen biểu hiện đồng thời protein Cas9 và các sgRNA chỉnh sửa gen đích trên cùng một vector có hiệu quả cao trong chỉnh sửa gen ở lúa [83, 118]. Chính vì vậy, đã có nhiều nghiên cứu chỉnh sửa gen đích trên lúa áp dụng phương pháp này. Cụ thể, Xu và cộng sự (2019) đã tích hợp cấu trúc biểu hiện 2 sgRNA (chỉnh sửa EBE *PthXo1* trên promoter *OsSWEET11* và EBE *PthXo3/AvrXa7 OsSWEET14*) vào vector nhị phân để chuyển vào cây lúa Kitaake [122]. Tương tự, Oliva và cộng sự (2019) sau khi tích hợp 4 sgRNA (chỉnh sửa EBE *PthXo1*, *PthXo2*, *TalC* và *AvrXa7* trên promoter *OsSWEET11*, *OsSWEET13* và *OsSWEET14* của giống lúa IR64 và Shiherang-Sub1) vào cùng một vector pENTR4-U6.1P-ccdB bằng hệ thống Golden Gate, cấu trúc biểu hiện các sgRNA này sau đó cũng được đưa vào vector chuyển gen có chứa Cas9 đặt dưới sự biểu hiện của promoter *Ubiquitin* [94]. Phương pháp tương tự cũng đã được sử dụng để thiết kế cấu trúc chuyển gen chỉnh sửa promoter *OsSWEET14* trên các giống lúa thương mại như Super Basmati hay Zhonghua-11 [134, 135]. Gần đây, trong nghiên cứu của Phùng Thị Thu Hương và cộng sự (2018), với mục đích chỉnh sửa promoter *OsSWEET14* của giống lúa TBR225, nhóm tác giả đã thiết kế 3 crRNA trong đó có 2 crRNA tác động lên đồng thời các EBE *TalC* và *AvrXa7/TalF/PthXo3* [7]. Tiếp sau đó, Nguyễn Duy Phương và cộng sự (2019) đã sử dụng 2 crRNA này để thiết kế hệ thống CRISPR/Cas9 chỉnh sửa *SW14-TBR*, sử dụng cùng hệ vector pCas9 như trong nghiên cứu này [11]. Tuy nhiên, trong hai nghiên cứu nói trên, phức hệ CRISPR/Cas9 có điểm cắt (về mặt lý thuyết) nằm trên EBE *TalF* và nằm ngoài vị trí của EBE *AvrXa7* [7]. Do vậy, trong nghiên cứu này, cấu trúc vector chuyển gen đã được thiết kế để biểu hiện ra các phức hệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa hai vị trí EBE trên hai promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR*, trong đó vị trí tạo DSB trên *SW14-TBR* nằm chính xác trong vùng trình tự của EBE *AvrXa7* thay vì nằm gần như trong nghiên cứu trước đây [7].

### 3.3. TẠO DÒNG LÚA TBR225 CHỈNH SỬA *SW14-TBR*

Cơ chế tương tác giữa vi khuẩn *Xoo* với giống lúa TBR225 có sự khác biệt giữa các isolate VXO. Cụ thể, isolate VXO\_11 được dự đoán chỉ tác động vào

*OsSWEET14* (vị trí EBE *AvrXa7*); trong khi isolate VXO\_80 và VXO\_100 được dự đoán tác động đồng thời vào cả 2 gen *OsSWEET13* (vị trí EBE *PthXo2(A)*) và *OsSWEET14* (vị trí EBE *AvrXa7*). Để xác định chính xác vai trò của *AvrXa7/OsSWEET14* đối với tính miễn cảm của giống lúa TBR225 với các isolate VXO đại diện, dòng lúa TBR225 chỉnh sửa *SW14-TBR* đã được tạo ra bằng công cụ CRISPR/Cas9 thông qua phương pháp chuyển gen nhờ *A. tumefaciens*.

### **3.3.1. Tối ưu quy trình chuyển gen vào lúa TBR225 thông qua *A. tumefaciens***

Hiệu quả của quy trình chỉnh sửa gen phụ thuộc rất nhiều vào kỹ thuật đưa hệ thống CRISPR/Cas9 vào tế bào đích. Đối với hệ thống chỉnh sửa gen lúa sử dụng phương pháp chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*, quy trình chuyển gen đạt hiệu suất cao sẽ giúp tăng khả năng chỉnh sửa gen thành công. Trước đây, Nguyễn Duy Phương và cộng sự (2019) đã chuyển gen thành công vào phôi non giống lúa TBR225 bằng phương pháp sử dụng *A. tumefaciens*, tuy nhiên, hiệu suất chuyển gen chỉ đạt 5% [11]. Hơn nữa, việc sử dụng vật liệu chuyển gen là phôi non cũng là một điểm hạn chế khiến cho thí nghiệm khó thực hiện đồng đều (do phụ thuộc vào tuổi phôi). Vì vậy, trong nghiên cứu này, quy trình chuyển gen vào lúa TBR225 sử dụng phôi trưởng thành đã được tối ưu để có thể đảm bảo khả năng thành công của việc chỉnh sửa gen. Hiệu suất của phương pháp chuyển gen vào lúa thông qua *A. tumefaciens* phụ thuộc vào rất nhiều bước với nhiều yếu tố tham gia, bao gồm cả bản chất di truyền của giống lúa sử dụng. Khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo và hiệu quả tiếp nhận DNA ngoại lai của mô sẹo là hai trong số những yếu tố quan trọng nhất quyết định đến hiệu suất của toàn bộ quy trình chuyển gen. Do đó, trong phạm vi nghiên cứu này, bước tái sinh chồi từ mô sẹo lúa TBR225 và đồng nuôi cấy mô sẹo với *A. tumefaciens* đã được tối ưu.

#### **3.3.1.1. Đánh giá ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo lúa TBR225**

Hiệu quả của một quy trình chuyển gen thực vật phụ thuộc vào nhiều yếu tố như khả năng tái sinh của tế bào, tỷ lệ mang gen chuyển của các tế bào có thể tái sinh và hiệu quả chọn lọc các tế bào mang gen chuyển tái đang tái sinh...[103].

Vì vậy, tối ưu môi trường tái sinh cho giống lúa TBR225 là bước rất quan trọng trong hoàn thiện quy trình chuyển gen của một giống lúa. Hormone 6-Benzyl aminopurine (BAP) được chứng minh là loại hormone ngoại sinh thuộc nhóm cytokinin thích hợp khi nuôi cấy tái sinh chồi từ mô sẹo phôi trưởng thành của giống lúa Bắc Thơm 7 trong nghiên cứu của Cao Lệ Quyên và cộng sự (2019) [12]. Vì vậy, trên cơ sở quy trình đã công bố [3], để tối ưu thành phần môi trường tái sinh cho giống lúa TBR225, 4 công thức thí nghiệm (TS1-TS4) khác nhau về nồng độ BAP (từ 0,5 mg/l-2,0 mg/l) đã được khảo sát (Bảng 3.4).

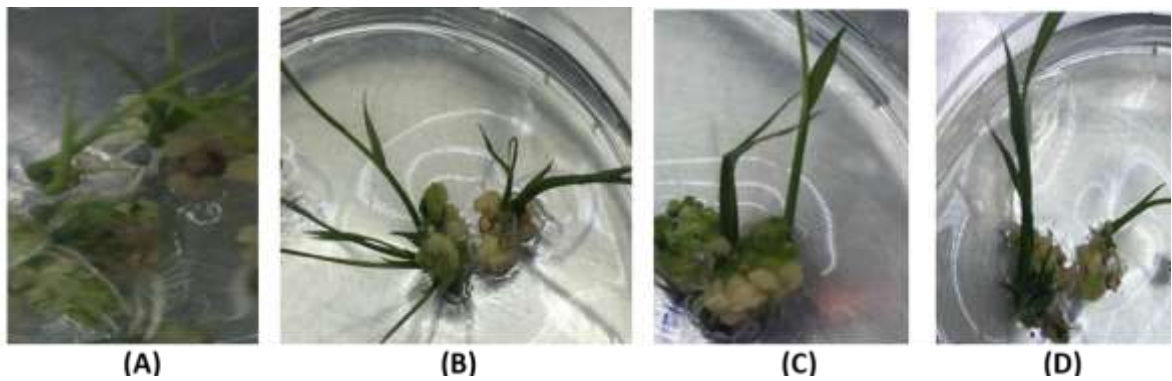
**Bảng 3.4. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng tới khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo giống lúa TBR225**

Công thức	BAP (mg/l)	Tỉ lệ mô sẹo tái sinh chồi (%)	Số chồi/cụm mô sẹo
TS1	0,5	92 ± 3,97 <sup>a</sup>	5,76 ± 0,37 <sup>a</sup>
TS2	1,0	78,6 ± 6,49 <sup>b</sup>	4,4 ± 0,40 <sup>b</sup>
TS3	1,5	68,6 ± 7,78 <sup>c</sup>	1,78 ± 0,44 <sup>c</sup>
TS4	2,0	59,8 ± 5,34 <sup>d</sup>	1,48 ± 0,41 <sup>d</sup>

**Ghi chú:** Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm; các chữ cái khác nhau trong cùng cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ( $\alpha = 0,05$ )

Kết quả quan sát ở Bảng 3.4 cho thấy, mô sẹo của giống lúa TBR225 có khả năng tái sinh trên cả 4 loại môi trường với tỷ lệ khác nhau. Cụ thể, môi trường TS1 có tỉ lệ mô sẹo tái sinh cao nhất (92%), tiếp đến lần lượt là môi trường TS2 (78,6%), TS3 (68,6%) và TS4 (59,8%). Tương tự như vậy, số chồi/cụm mô sẹo hình thành trên môi trường TS1 cũng đạt cao nhất, trung bình 5,76 chồi/cụm mô sẹo. Tỉ lệ này cao gấp 3 - 4 lần so với môi trường TS3 (1,78 chồi/cụm mô sẹo) và TS4 (1,48 chồi/cụm mô sẹo). Như vậy, môi trường tái sinh TS1 (môi trường nền MS bổ sung BAP 0,5 mg/l) có hiệu suất tái sinh cao nhất (92%), trung bình thu được 5,76 chồi/cụm mô sẹo, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với các môi trường còn lại (Bảng 3.4 và Hình 3.23).





**Hình 3.23. Tái sinh chồi từ mô sẹo của lúa TBR225**

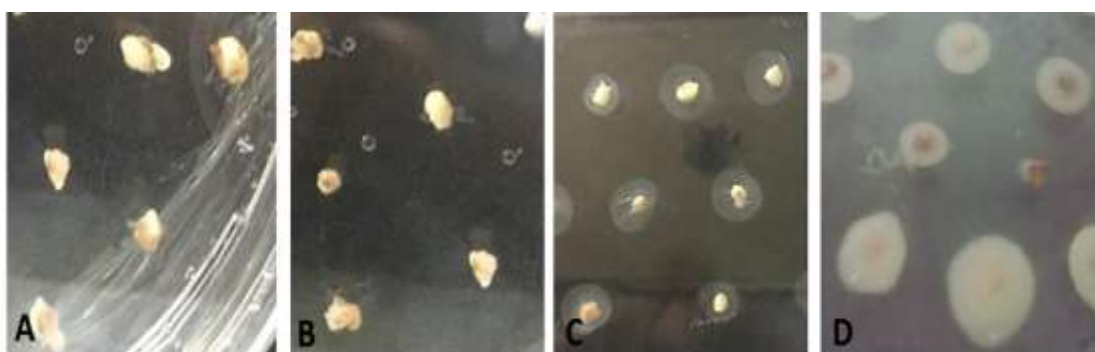
**Ghi chú:** Mô sẹo tạo được của giống lúa TBR225 được nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi với các thành phần môi trường TS1 (A), TS2 (B), TS3 (C), TS4 (D). Hình ảnh được ghi lại sau 30 ngày nuôi cấy mô sẹo trên môi trường tái sinh.

Trước đây, nhiều nghiên cứu khác nhau về xây dựng hệ thống tái sinh cho các giống lúa *indica* được thực hiện, trong đó đã cho thấy hiệu quả tái sinh phụ thuộc rất lớn vào việc bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin và auxin như BAP, kinetin, NAA (1- Naphthaleneacetic axit) với các tỉ lệ khác nhau. Thông thường, tỉ lệ auxin/cytokinin càng thấp thì hiệu quả tái sinh chồi lúa càng cao [103,104]. Sahoo và cộng sự (2011) khi xây dựng quy trình chuyển gen cho giống lúa IR64 đã nhận thấy môi trường tái sinh bổ sung 2mg/l kinetin và 0,2 mg NAA cho tỉ lệ tái sinh chồi từ mô sẹo không mang gen chuyển đạt 92% [103]. Tương tự, nhóm nghiên cứu của Liang (2021) đã thu được tỉ lệ cây lúa Shiherang-Sub1 tái sinh cao hơn trong môi trường chứa 3mg kinetin và 0,1 mg NAA [79]. Riêng trong nhóm cytokinin, hormone BAP theo nghiên cứu của Phan Thị Hương và cộng sự (2014) cho hiệu quả tái sinh chồi tốt hơn so với kinetin, đạt tỉ lệ 100% trong môi trường tái sinh có bổ sung 3,0 mg/l BAP [6]; con số này đạt 83% ở giống lúa Nếp 87 khi bổ sung 1,0 mg/l BAP trong nghiên cứu của Lã Văn Hiền (2020) [4]. Trong nghiên cứu này, nồng độ BAP 0,5 mg/l cho tỉ lệ mô sẹo tái sinh chồi đạt 92% với 5,76 chồi/cụm mô sẹo ở giống lúa TBR225. Nguyễn Duy Phương và cộng sự (2019) khi thực hiện chuyển gen vào phôi non giống lúa TBR225 đã sử dụng môi trường tái sinh có bổ sung 5 mg/l kinetin và 2 mg/l NAA, tác giả đã thu được 9 dòng lúa tái sinh từ 100 phôi ban đầu [11]. Những kết quả này góp phần củng cố nhận định về vai trò của BAP trong quá trình tái sinh chồi của giống lúa TBR225.

### 3.3.1.2. Đánh giá ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến hiệu quả chuyển gen vào lúa TBR225

Hiệu suất chuyển gen vào mô sẹo thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* phụ thuộc chủ yếu vào bước đồng nuôi cấy mô sẹo với vi khuẩn cũng như khả năng tiếp nhận DNA ngoại lai của giống lúa (bản chất di truyền) [104]. Để tối ưu bước lây nhiễm vi khuẩn *A. tumefaciens* vào mô sẹo lúa TBR225, ảnh hưởng của yếu tố mật độ vi khuẩn *A. tumefaciens* tới hiệu suất chuyển gen đã được đánh giá, sử dụng dung dịch vi khuẩn có OD<sub>600nm</sub> lần lượt từ 0,01-1,0.

Kết quả quan sát Bảng 3.5 cho thấy ở các thí nghiệm sử dụng dịch khuẩn *A. tumefaciens* với mật độ cao (OD<sub>600nm</sub> ≥ 0,5), vi khuẩn phát triển rất mạnh (sau 3 ngày đồng nuôi cấy), thậm chí ngay cả khi được xử lý bằng 2 loại kháng sinh là cefotaxime 200 mg/l và vancomycin 200 mg/l (giai đoạn chọn lọc) (Hình 3.24C và D). Tỷ lệ mô sẹo biểu hiện gen chỉ thị trong các thí nghiệm này cũng chỉ đạt lần lượt là 14,6% (OD<sub>600nm</sub> = 1,0) và 21,3% (OD<sub>600nm</sub> = 1,0). Ngược lại, đối với thí nghiệm sử dụng dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* mật độ thấp (OD<sub>600nm</sub> < 0,05), mặc dù hầu như không quan sát thấy sự có mặt của vi khuẩn trên đĩa nuôi cấy sau giai đoạn đồng nuôi cấy nhưng tỷ lệ mô sẹo có biểu hiện gen *GFP* sau chọn lọc cũng không cao. Tỷ lệ mô sẹo biểu hiện *GFP* đạt cao nhất ở thí nghiệm mô sẹo được lây nhiễm với dịch khuẩn *A. tumefaciens* có OD<sub>600nm</sub> = 0,05 (43,3%) và khác biệt với các công thức sử dụng mật độ vi khuẩn khác theo phép kiểm định Duncan's test.



**Hình 3.24.** Đồng nuôi cấy mô sẹo lúa TBR225 với *A. tumefaciens*

**Ghi chú:** Mô sẹo được lây nhiễm với dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* có OD<sub>600nm</sub> đạt 0,01 (A), 0,05 (B), 0,5 (C) và 1,0 (D) và đồng nuôi cấy trên môi trường N6. Hình ảnh được ghi lại sau 3 ngày đồng nuôi cấy.

**Bảng 3.5. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến hiệu quả biến nạp gen vào mô sẹo**

Mật độ vi khuẩn (OD <sub>600</sub> )	Tỉ lệ mẫu nhiễm vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i> (%)		Tỉ lệ mẫu biểu hiện GFP (%) <sup>*</sup>
	Sau đồng nuôi cấy	Sau chọn lọc	
1,0	100 ± 0	100 ± 0	14,6 ± 2,1 <sup>d</sup>
0,5	94,1 ± 7,3	94,1 ± 7,3	21,3 ± 2,5 <sup>c</sup>
0,1	45,8 ± 1,2	24,8 ± 2,3	23,3 ± 3,1 <sup>c</sup>
0,05	5,8 ± 2,2	1,2 ± 0,2	43,3 ± 3,1 <sup>a</sup>
0,03	0 ± 0	0 ± 0	32,3 ± 3,8 <sup>b</sup>
0,01	0 ± 0	0 ± 0	20,3 ± 2,1 <sup>c</sup>

**Ghi chú:** \* các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ( $\alpha = 0,05$ ). Tỉ lệ mẫu biểu hiện GFP được tính theo công thức: (Số mô sẹo có biểu hiện GFP/số mẫu sống sót sau chọn lọc) x 100%. Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm.

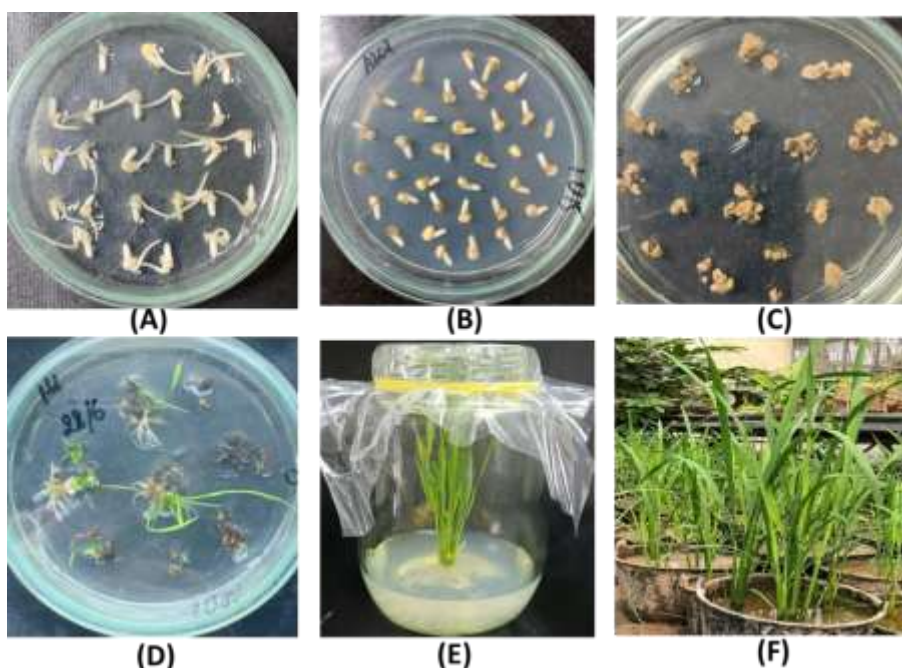
Mật độ vi khuẩn *A. tumefaciens* sử dụng để chuyển gen là một trong những yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả biến nạp gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Mật độ vi khuẩn quá thấp sẽ làm giảm hiệu quả tiếp xúc của vi khuẩn với mẫu thực vật, ngược lại, khi mật độ vi khuẩn quá cao làm ảnh hưởng tới sự phát triển của mẫu thực vật và gây nhiễm mẫu sau giai đoạn đồng nuôi cấy. Sahoo và cộng sự (2012) đã sử dụng dịch vi khuẩn có giá trị OD<sub>600nm</sub> 1,0 để lây nhiễm với mô sẹo của giống lúa IR64 [104]. Khi thực hiện chuyển gen trên giống lúa Bắc Thơm 7 từ vật liệu mô sẹo, nhóm nghiên cứu của Cao Lệ Quyên (2019) đã sử dụng dịch khuẩn có giá trị OD<sub>600nm</sub> 0,03 [12]. Trong nghiên cứu này, mật độ vi khuẩn 0,05 cho hiệu quả biến nạp gen cao nhất được lựa chọn để thực hiện thí nghiệm chuyển gen.

### 3.3.2. Chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa *SW14-TBR* vào giống lúa TBR225

Trong nghiên cứu trước đây, Nguyễn Duy Phương và cộng sự (2019) đã thiết kế cấu trúc T-DNA biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 mang 2 crRNA chỉnh sửa EBE *TalC* và *AvxXa7/PthXo3/TalF* (pCas9/sgRNA-SW14), và chuyển thành công vào giống lúa TBR225. Hai trong số năm dòng lúa chuyển gen tạo ra đã được chứng minh có mang đột biến trên *SW14-TBR* bằng T7 Endonuclease I [7, 11].

Tuy nhiên, kết quả giải trình tự nucleotide của *SW14-TBR* sau đó đã xác định cả 2 dòng lúa chuyển gen không mang đột biến trên vị trí EBE *AvrXa7* (số liệu không công bố). Nguyên nhân có thể do số lượng cây chuyển gen thu được quá ít, trong khi đột biến được tạo ra theo cơ chế NHEJ có tính ngẫu nhiên [31]. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, sau khi đã cải tiến quy trình chuyển gen vào lúa TBR225 (với hiệu suất đạt 21,7%) (mục 3.3.1), cấu trúc pCas9/sgRNA-SW14 được sử dụng lại để chuyển vào cây lúa TBR225 nhằm thu được các dòng lúa chỉnh sửa gen mang đột biến trên EBE *AvrXa7*.

Mô sẹo của lúa TBR225 (Hình 3.25A) được đồng nuôi cấy với chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 tái tổ hợp mang cấu trúc pCas9/sgRNA-SW14 [11] trên môi trường MS có bổ sung chất dẫn dụ acetosyrigone để tăng hiệu quả biến nạp gen (Hình 3.25B). Mô sẹo sau đó được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc (Hình 3.25C) và môi trường tái sinh (đã tối ưu) (Hình 3.25D). Chồi tái sinh được chuyển sang môi trường tạo rễ để tạo thành cây con hoàn chỉnh (Hình 3.25E) trước khi đưa ra trồng trên chậu đất (Hình 3.25F).



**Hình 3.25. Chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa *SW14-TBR* vào lúa TBR225**

**Ghi chú:** (A) Tạo mô sẹo từ phôi trưởng thành; (B) Đồng nuôi cấy mô sẹo với *A. tumefaciens*; (C) Chọn lọc mô sẹo trên môi trường có chất kháng sinh Hygromycin 30 mg/l; (D) Tái sinh chồi từ mô sẹo, (E) Tạo rễ từ chồi tái sinh; (F) Cây tái sinh trồng trong chậu đất ở điều kiện nhà lưới.

Kết quả chuyển cấu trúc pCas9/sgRNA-SW14 vào lúa TBR225 (Bảng 3.6) cho thấy tỉ lệ mẫu sống sót khá cao, đạt trên 50% ở hầu hết các giai đoạn của quy trình chuyển gen. Tỉ lệ mô sẹo tái sinh sau bước chọn lọc III khá cao, đạt 87,8% (36/41 dòng lúa TBR225 tái sinh hoàn chỉnh). Các cây lúa TBR225 tái sinh, được đặt tên từ S1 – S36 (S ~ single gene: chuyển cấu trúc chỉnh sửa đơn gen *SW14-TBR*), khi đưa ra bầu đất đạt tỉ lệ sống sót 83,3 % (30/36 cây).

Như vậy, từ 250 mẫu hạt (phôi trưởng thành) lúa TBR225 ban đầu, 30 cây lúa tái sinh được chuyển cấu trúc pCas9/sgRNA-SW14 có khả năng sinh trưởng tốt trên đất đã được tạo ra. Các cây lúa TBR225 tái sinh tiếp tục được trồng và chăm sóc trong điều kiện nhà lưới để phục vụ các thí nghiệm phân tích kiểu gen tiếp theo.

**Bảng 3.6. Kết quả biến nạp cấu trúc pCas9/sgRNA-SW14 vào lúa TBR225**

Giai đoạn	Số mẫu sống sót/phát triển	Tỉ lệ*
Vào mẫu	250	-
Tạo mô sẹo	189	75,6
Đồng nuôi cấy	178	94,2
Chọn lọc I	116	65,1
Chọn lọc II	78	67,2
Chọn lọc III	41	52,6
Tiền tái sinh	38	74,5
Tái sinh, tạo cây hoàn chỉnh	36	94,7
Nhà lưới	30	83,3

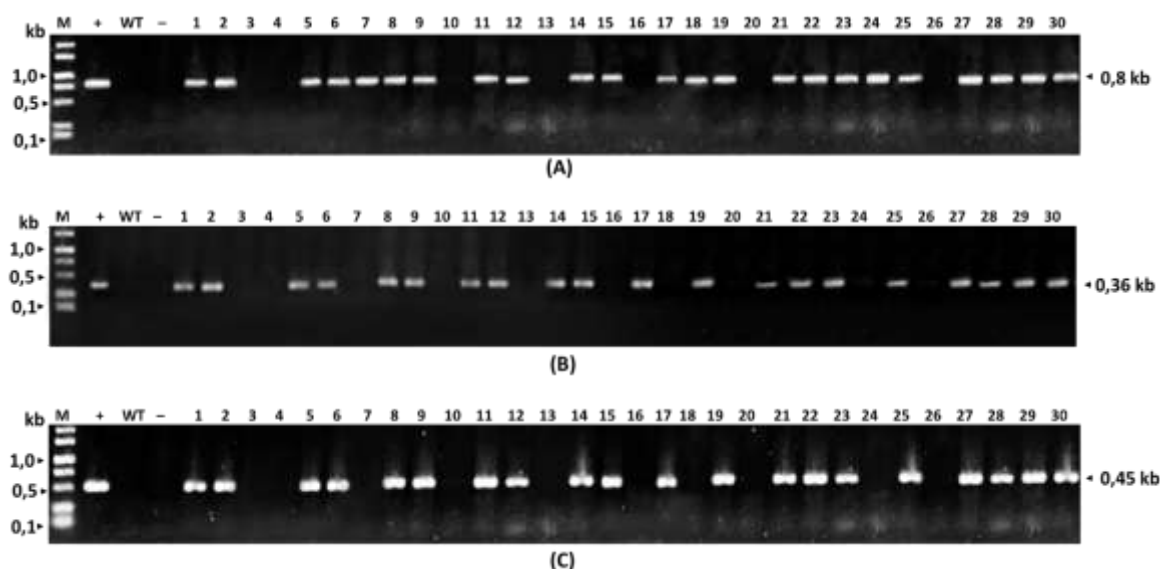
**Ghi chú:** \*Tỉ lệ mẫu sống sót/phát triển ở mỗi giai đoạn được tính theo công thức: (số mẫu sống sót ở cuối giai đoạn trước/số mẫu đưa vào ở đầu giai đoạn sau) x 100.

### 3.3.3. Nghiên cứu kiểu gen của cây lúa TBR225 tái sinh được chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa *SW14-TBR*

#### 3.3.3.1. Xác định sự có mặt của cấu trúc T-DNA trong các cây lúa TBR225 tái sinh

Để xác định sự có mặt của cấu trúc pCas9/sgRNA-SW14 trong hệ gen, 30 cây lúa TBR225 tái sinh sinh trưởng, phát triển tốt đã được tách chiết DNA tổng số từ mô lá. Mẫu DNA tách chiết được kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gen

nội chuẩn *Actin*. Đây là một trong những gen đã được chứng minh biểu hiện liên tục, ổn định trên cây lúa trong các điều kiện khác nhau và thường được sử dụng làm gen tham chiếu cho các thí nghiệm đánh giá biểu hiện gen bằng RT-PCR [61]. Kết quả cho thấy tỉ lệ PCR dương tính đạt 100%, tất cả các mẫu tách chiết đều cho băng DNA đúng với kích thước tính toán lý thuyết (Phụ lục 10). Điều này chứng tỏ các mẫu DNA đều đạt yêu cầu cho thí nghiệm phân tích cây chuyển gen bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu cho cấu trúc T-DNA. Kết quả PCR đã xác định được 23/30 cây cho kết quả dương tính với cặp mồi đặc hiệu của gen chọn lọc *HPT* (Hình 3.26A). Tuy nhiên, trong số này, chỉ có 20 cây cho kết quả dương tính với cặp mồi đặc hiệu của gen *Cas9* và cấu trúc *[U6:sgRNA-SW14]*, đạt tỉ lệ 66,67% (Hình 3.26B và C).



**Hình 3.26. Sàng lọc cây lúa chuyển gen bằng PCR**

**Ghi chú:** Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,0%. (A) Mồi là HPT-F/HPT-R. (B) Mồi là Ubi-F/Cas9-t-R. (C) Mồi là sgRNA-SW14-F/sgRNA-SW14-R. Giếng 1 – 30: khuôn là mẫu DNA của cây lúa TBR225 tái sinh; giếng WT: đối chứng âm (khuôn là mẫu DNA của cây lúa TBR225 không chuyển gen); giếng (+): đối chứng dương (khuôn là pCas9/sgRNA-SW14); giếng (-): mẫu trống (không có DNA khuôn); giếng M: thang chuẩn DNA 1,0 kb (Clever Scientific).

Sự khác biệt giữa các thí nghiệm PCR sử dụng các cặp mồi khác nhau (Hình 3.26, giếng 7, 18 và 24) có thể lí giải do sự sắp xếp lại vị trí các trình tự trong cấu trúc T-DNA trong quá trình chèn vào nhiễm sắc thể của cây chủ, tương tự như nghiên cứu

của Yang và cộng sự (2005) [127]. Điều này đã dẫn đến các môi được sử dụng có thể liên kết với vị trí của gen chọn lọc (cho kết quả PCR dương tính) nhưng không thể liên kết với vị trí gen đích (*Cas9*, cấu trúc biểu hiện sgRNA) trong nhiễm sắc thể (cho kết quả PCR âm tính). Ngoài ra, đây cũng có thể đơn giản chỉ là hệ quả của hiện tượng dương tính/âm tính giả trong xét nghiệm PCR. Mặc dù vậy, các kết quả thu được đã chứng tỏ các cây lúa TBR225 tái sinh có mang cấu trúc T-DNA đích trong hệ gen. Xét trên toàn bộ quy trình, hiệu suất chuyển gen đạt 8,0% (Bảng 3.6).

Trong các nghiên cứu gần đây, cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa gen *OsSWEET14* bằng hệ thống CRISPR/Cas9 đã được chuyển thành công vào một số giống lúa *indica* thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Cụ thể, nhóm nghiên cứu của Nguyễn Duy Phương (2019) đã chuyển cấu trúc chỉnh sửa gen *OsSWEET14* vào phôi non giống lúa TBR225, kết quả thu được 5 dòng lúa mang cấu trúc gen chuyển, hiệu suất trên toàn bộ quy trình đạt 5% [11]. Tương tự, khi sử dụng cùng bộ khung biểu hiện sgRNA chỉnh sửa gen *OsSWEET14* và protein Cas9 chuyển vào phôi non giống lúa Bắc Thơm 7, Vũ Hoài Sâm và cộng sự (2021) đã thu được 28 dòng lúa mang cấu trúc gen chuyển, hiệu suất toàn bộ quá trình đạt 9,33% [118]. Trong nghiên cứu này, khi thực hiện chuyển cấu trúc chỉnh sửa *SW14-TBR* vào giống lúa TBR225 bằng quy trình đã tối ưu, hiệu suất chuyển gen tương đương so hai nghiên cứu đã công bố, đạt 8,0% trên toàn bộ quy trình. Tuy nhiên, với việc sử dụng phôi trưởng thành làm vật liệu chuyển gen, thí nghiệm chuyển gen trong nghiên cứu này đã dễ dàng thực hiện với số lượng mẫu đầu vào lớn hơn, do đó đã thu được số lượng cây chuyển gen cao hơn đáng kể so với nghiên cứu trước [11]. Đây là tiền đề quan trọng để đảm bảo khả năng sàng lọc và thu được dòng lúa mang đột biến mong muốn từ các dòng lúa chuyển gen.

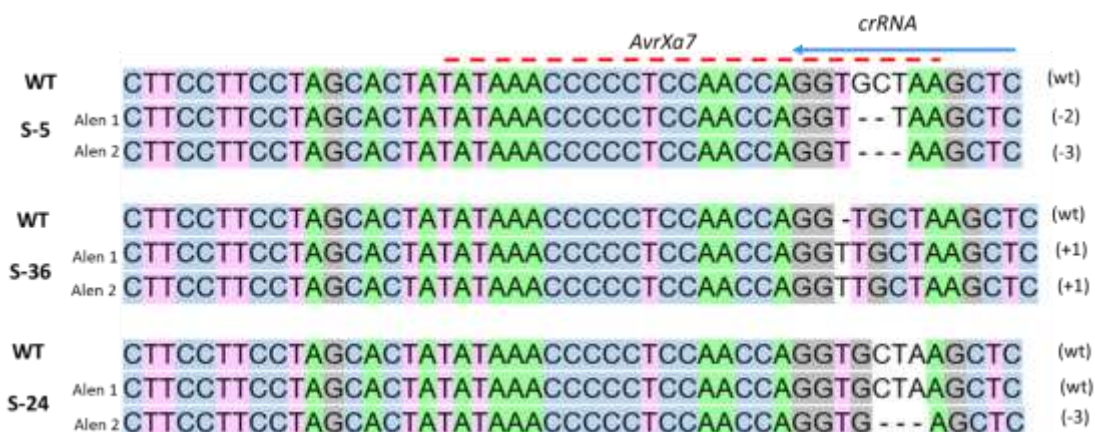
Như vậy, cấu trúc biểu hiện protein Cas9 và sgRNA chỉnh sửa *SW14-TBR* đã được chuyển thành công vào giống lúa TBR225. Hai mươi dòng lúa chuyển gen có kết quả PCR dương tính với cả ba cặp môi đặc hiệu cho cấu trúc T-DNA tiếp tục được sử dụng cho các phân tích đột biến tiếp theo.

### 3.3.3.2. Xác định đột biến trên *SW14-TBR* của các dòng lúa chuyển gen $T_0$

Để xác định hiệu quả chỉnh sửa gen của cấu trúc T-DNA, 20 dòng lúa  $T_0$  chuyển gen được giải trình tự vùng *SW14-TBR*. Đoạn trình tự 715 bp trên *SW14-*

*TBR* chứa vị trí nhận biết của sgRNA (Phụ lục 11) được nhân bản bằng PCR với cặp mồi SW14-Pro-F/SW14-In-R từ các dòng lúa chuyển gen để giải trình tự nucleotide.

Kết quả phân tích trình tự *SW14-TBR* bằng phần mềm BioEdit 4.0 cho thấy 13/20 dòng lúa chuyển gen có mang đột biến trên vùng trình tự đích (Hình 3.27, Bảng 3.7). Hiệu suất chỉnh sửa gen của cấu trúc CRISPR/Cas9 tính trên số cây mang cấu trúc gen chuyển đạt 65%. Tỷ lệ đột biến này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu đã công bố trước đây sử dụng cùng bộ khung vector biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 [139]. Các đột biến được phát hiện trên *SW14-TBR* đều là các đột biến nhỏ (1-8 nucleotide), bao gồm loại đột biến thêm nucleotide (31,8% số alen đột biến) và mất nucleotide (68,2% số alen đột biến), đặc biệt không xuất hiện đột biến thay thế nucleotide (Bảng 3.7). Tất cả các đột biến thu được đều xuất hiện xung quanh điểm xảy ra DSB (cách vị trí PAM 3 nucleotide theo tính toán lý thuyết) trên trình tự EBE *AvrXa7/PthXo3/TalF* của *SW14-TBR* (Hình 3.27).



**Hình 3.27. Trình tự *SW14-TBR* của các dòng lúa TBR225 chuyển gen  $T_0$**

**Ghi chú:** Trình tự *SW14-TBR* của các dòng lúa chuyển gen (S-5, S-36 và S-24) được so sánh với trình tự *SW14-TBR* của cây lúa TBR225 không chuyển gen (WT). Kí tự phía bên phải thể hiện kiểu gen *SW14-TBR* đột biến; (wt) kiểu gen không đột biến; (+/-) đột biến thêm/bớt nucleotide; kí tự số thể hiện số nucleotide thay đổi. Vị trí EBE *AvrXa7* được thể hiện bằng đường nét đứt màu đỏ. Trình tự *crRNA* được biểu thị bằng mũi tên màu xanh.

Bên cạnh đó, kiểu gen *SW14-TBR* đột biến của các dòng lúa chỉnh sửa gen đã xác định ở trên tiếp tục được phân tích dự đoán bằng công cụ CRISPR ID [42]. Kết quả thu được đã cho thấy các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen mang đột biến



*SW14-TBR* ở cả 3 dạng (Bảng 3.7), trong đó đột biến đồng hợp (đột biến giống nhau trên cả hai alen) chiếm 30,77%, đột biến dị hợp (đột biến chỉ xuất hiện trên một alen) chiếm tỉ lệ 30,77% và đột biến bi-alen (hai alen mang 2 dạng đột biến khác nhau) 38,46%. Tỉ lệ alen mang đột biến đạt 55% (tính trên tổng số cây mang cấu trúc T-DNA được kiểm tra), chứng tỏ hệ thống CRISPR/Cas9 đã sử dụng là một công cụ hiệu quả để chỉnh sửa gen trên lúa TBR225.

**Bảng 3.7. Kiểu gen *SW14-TBR* của các dòng lúa TBR225 chuyển gen  $T_0$**

Kiểu gen đột biến <i>SW14-TBR</i>	Tên dòng*	Số cây (Tỉ lệ)
Dị hợp <sup>a</sup>	S-4 (-4/wt), S-12 (+1/wt); S-24 (-3/wt); S-25 (-5/wt);	4 (20%)
Đồng hợp <sup>b</sup>	S-7(-6); S-17 (-3); S-23(-8); S-36 (+1);	4 (20%)
Bi-alen <sup>c</sup>	S-1(-2/-3); S-5(-3/-2); S-9(+3/+2); S-26 (+2/-3); S-34(+2/-3)	5 (25%)
Không đột biến	S-6; S-14; S-19; S-27; S-29; S-21; S-31	7 (35%)

**Ghi chú:** <sup>a</sup>Đột biến trên một alen. <sup>b</sup>Đột biến giống nhau trên cả 2 alen. <sup>c</sup>Đột biến khác nhau trên 2 alen. \*Kí tự trong ngoặc thể hiện số nucleotide đột biến thêm (+) hay mất (-) trên *SW14-TBR*; wt: không đột biến.

Trong nhiều năm trở lại đây, đã có một số nghiên cứu ứng dụng công nghệ chỉnh sửa gen được thực hiện trên gen *OsSWEET14* ở các giống lúa khác nhau, kết quả chỉ thu được hai dạng đột biến thêm và mất nucleotide trên trình tự đích mong muốn, tuy nhiên số nucleotide thêm/mất lại khác nhau ở các nghiên cứu này. Cụ thể, khi chỉnh sửa gen *OsSWEET14* của giống lúa Kitaake bằng công nghệ TALEN, nhóm nghiên cứu của Blanvilliant-Baufumé (2017) đã thu được các dòng lúa đột biến thêm/mất nucleotide dao động từ 1-51 [25]. Trong khi đó, số nucleotide đột biến ở vị trí gen đích được chỉnh sửa bằng công nghệ CRISPR/Cas9 ở giống lúa thương mại Zhonghua-11 dao động thấp hơn, từ 1-33 nucleotide [135]. Với nghiên cứu này, khi sử dụng công nghệ CRISPR/Cas9 đã thu được các dòng lúa TBR225 mang đột biến thêm/mất với số lượng thay đổi từ 1-8 nucleotide, kết quả này cũng tương tự với công bố của Cao Lê Uyên và cộng sự (2021) khi sử dụng cùng bộ khung vector chuyển gen trên giống lúa Bắc Thơm 7 [13]. Như vậy, sự khác nhau ngẫu nhiên về số nucleotide thêm vào hoặc mất đi ở các dòng lúa chỉnh sửa cùng một gen đích trong các thí nghiệm khác nhau (Kitaake, Zhonghua-11, Bắc Thơm 7) với các

công nghệ chỉnh sửa gen khác nhau (TALEN và CRISPR/Cas9) đã củng cố thêm cho hiểu biết trước đây về đột biến ngẫu nhiên xảy ra do cơ chế sửa chữa DNA theo con đường NHEJ.

Tóm lại, bằng phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*, cấu trúc biểu hiện phức hệ Cas9-sgRNA chỉnh sửa *SW14-TBR* đã được chuyển thành công vào lúa TBR225 và tạo ra 13 dòng lúa mang đột biến trên vùng trình tự đích gọi là các dòng lúa chỉnh sửa gen. Mười hai dòng lúa chỉnh sửa gen thu được hạt sau khi trồng trong điều kiện nhà lưới (Phụ lục 12) tiếp tục được phân tích kiểu gen và kiểu hình ở thế hệ  $T_1$  tiếp theo.

### **3.3.4. Nghiên cứu đặc điểm kiểu gen và kiểu hình của các dòng lúa TBR225 chuyển vector chỉnh sửa *SW14-TBR* $T_1$**

#### *3.3.4.1. Nghiên cứu kiểu gen của các dòng lúa TBR225 $T_1$*

Để đánh giá một cách chính xác nhất hiệu quả của các đột biến tạo ra bởi hệ thống CRISPR/Cas9, các nghiên cứu trước đây thường sử dụng các dòng/cá thể mang đột biến dạng đồng hợp, đồng thời không chứa cấu trúc T-DNA trong hệ gen [94, 135]. Do đó, trong nghiên cứu này, hạt của 12 dòng lúa chỉnh sửa gen *SW14-TBR*  $T_0$  (Phụ lục 12) được tiếp tục gieo trồng để sàng lọc các dòng lúa  $T_1$  không mang gen chuyển (cấu trúc T-DNA) và mang đột biến *SW14-TBR* ở dạng đồng hợp, phục vụ cho các thí nghiệm đánh giá kiểu hình.

Kết quả sàng lọc các dòng lúa  $T_1$  bằng PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho gen nội chuẩn *Actin* và cấu trúc T-DNA (Bảng 3.8) đã thu được 90/395 dòng lúa  $T_1$  không mang cấu trúc T-DNA từ 12 dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen  $T_0$ , đạt tỉ lệ 22,78% (Bảng 3.8). Phân tích sự phân ly di truyền của cấu trúc biểu hiện T-DNA, bao gồm cả cấu trúc biểu hiện *Cas9*, cấu trúc biểu hiện sgRNA và gen chọn lọc *HPT* cho thấy gen chuyển phân ly theo tỉ lệ 3:1 ở hầu hết các dòng lúa  $T_1$ , phù hợp với định luật của Mendel ( $\chi^2 < 3,841$ ;  $P < 0,05$ ).

Tương tự, khi phân tích sự di truyền các đột biến trên *SW14-TBR* từ thế hệ  $T_0$  sang thế hệ  $T_1$ , kết quả cũng cho thấy các đột biến được phân ly theo đúng như định luật Mendel. Cụ thể, các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen  $T_0$  mang kiểu gen *SW14-TBR* đột biến dị hợp và bi-alen phân ly ở thế hệ  $T_1$  theo tỉ lệ gần với tỉ lệ 1:2:1 ( $\chi^2 < 5,991$ ;  $P < 0,05$ ); các dòng mang kiểu gen *SW14-TBR* đột biến đồng hợp tạo ra 100%

cá thể T<sub>1</sub> có kiểu gen đột biến đồng hợp. Tất cả các dòng lúa T<sub>1</sub> thuộc cùng một cây T<sub>0</sub> đều mang các đột biến đã có ở thế hệ T<sub>0</sub>, không xảy ra hiện tượng xuất hiện thêm các đột biến mới (Bảng 3.8). Kết quả này cũng giống với nhiều nghiên cứu chỉnh sửa gen bằng hệ thống CRISPR/Cas9 đã công bố, trong đó đột biến được di truyền ổn định qua các thế hệ, đặc biệt là trong các dòng lúa chỉnh sửa gen không mang cấu trúc T-DNA. Hơn nữa, các đột biến tạo ra cũng được phân ly theo quy luật di truyền Mendel [119, 137]. Kết quả giải trình tự *SW14-TBR* của các dòng lúa T<sub>1</sub> đã cho thấy tính di truyền ổn định của các alen đột biến sang thế hệ sau là hiện tượng phổ biến trong các nghiên cứu chỉnh sửa gen lúa bằng công nghệ CRISPR/Cas9. Đặc biệt, ngoại trừ dòng S-1, 11 dòng lúa T<sub>0</sub> chỉnh sửa gen còn lại đều tạo ra cây lúa T<sub>1</sub> đồng thời mang đột biến *SW14-TBR* và không chứa T-DNA trong hệ gen.

**Bảng 3.8. Phân ly di truyền của dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen T<sub>1</sub>**

Tên dòng T <sub>0</sub>	Số cây T <sub>1</sub> kiểm tra	Di truyền cấu trúc T-DNA ở thế hệ T <sub>1</sub>					Di truyền đột biến <i>SW14-TBR</i> ở thế hệ T <sub>1</sub>	
		<i>Actin</i> <sup>a</sup>	<i>HPT</i> <sup>b</sup>	<i>sgRNA</i> <sup>b</sup>	<i>Cas9</i> <sup>b</sup>	$\chi^2$ (3:1) <sup>*</sup>	Phân ly đột biến <sup>c</sup>	$\chi^2$ (1:2:1) <sup>*</sup>
S-1 (-2/-3)	21	21	5	5	5	0,228	7(-2), 10(-2/-3), 4 (-3)	0,905
S-4 (-4/wt)	38	38	7	7	7	1,210	10(-4), 16(-4/wt), 12(wt)	1,158
S-5 (-3/-2)	30	30	6	6	6	1,480	8(-3), 16(-3/-2), 6(-2)	0,400
S-7 (-6)	25	25	7	7	7	1,400	25 (-6)	-
S-9 (+2/wt)	37	37	8	8	8	0,225	11(+2), 19(+2/wt), 7(wt)	0,892
S-12 (+1/wt)	35	35	6	6	6	1,152	9(+1), 19(+1/wt), 7(wt)	0,486
S-17 (-3)	36	36	8	8	8	2,476	36(-3)	2,833
S-23 (-8)	20	20	4	4	4	0,843	20(-8)	-
S-24 (-3/wt)	38	38	9	9	9	0,148	6(-3), 22(-3/wt), 10(wt)	1,789
S-25 (-5/wt)	45	45	13	13	13	1,033	9(-5), 24(-5/wt), 12(wt)	0,600
S-34 (+2/-3)	36	36	10	10	10	0,434	9(+2), 20(+2/-3), 7(-3)	0,667
S-36 (+1)	34	34	7	7	7	0,993	34(+1)	-

**Ghi chú:** <sup>a</sup>Số cây có kết quả PCR dương tính. <sup>b</sup>Số cây có kết quả PCR âm tính. <sup>c</sup>số cây có cùng kiểu gen; kí tự trong ngoặc thể hiện số nu đột biến thêm (+)/mất (-) trên *SW14-TBR*; (wt) không đột biến. \*P<0,05.

Trong một vài nghiên cứu trước đây về đa hình trên vùng EBE của gen nhiễm *OsSWEET*, vị trí của các indel trên EBE đã được chứng minh có ảnh hưởng khác nhau đến khả năng kháng bạc lá của các dòng lúa chỉnh sửa gen, như trường hợp của các biến thể *xa25* [94]. Đối với một số EBE, trong đó có *AvrXa7*, vị trí các indel càng gần đầu phía đầu 3' dường như càng ít có khả năng cản trở liên kết giữa

protein TALE của *Xoo* và EBE [14, 25]. Trong nghiên cứu này, kết quả giải trình tự nucleotide đã cho thấy các đột biến được tạo ra nằm rải rác từ vị trí 19 - 24 (tính từ đầu 5') của EBE *AvrXa7* (Bảng 3.9).

Bên cạnh đó, để đảm bảo sự hoạt động của cấu trúc CRISPR/Cas9 không gây ra ảnh hưởng tới các gen chức năng khác trong hệ gen (ngoài *SW14-TBR*), 3 gen chứa vị trí tương đồng với trình tự crRNA trên pCas9/sgRNA-SW14 (Phụ lục 13) đã được giải trình tự. Kết quả thu được cho thấy đột biến off-target hoàn toàn không xuất hiện ở các vị trí được kiểm tra (Phụ lục 14). Điều này đã chứng tỏ tính đặc hiệu cao hệ thống CRISPR/Cas9 đã sử dụng.

Mười một dòng lúa T<sub>1</sub> mang đột biến *SW14-TBR* ở dạng đồng hợp, không chứa cấu trúc T-DNA trong hệ gen, đại diện cho mỗi dạng và vị trí đột biến, bao gồm S-4.3, S-5.2, S-7.5, S-9.6, S-12.35, S-17.10, S-23.34, S-24.10, S-25.8, S-34.5, S-36.7 (Bảng 3.9) đã được lựa chọn để tiếp tục phân tích ở các thí nghiệm tiếp theo.

#### 3.3.4.2. Đánh giá kiểu hình của các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa *SW14-TBR* T<sub>1</sub>

Để đánh giá sơ bộ kiểu hình của dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen, 11 dòng lúa chỉnh sửa gen T<sub>1</sub> đã được lựa chọn ở trên (mục 3.3.4.1) (Bảng 3.9) được trồng và chăm sóc trong điều kiện nhà lưới và theo dõi một số chỉ tiêu nông học chính.

**Bảng 3.9. Kết quả đánh giá kiểu hình của dòng lúa TBR225 chỉnh sửa *SW14-TBR* T<sub>1</sub>**

Tên dòng T <sub>1</sub>	Kiểu gen <sup>1</sup>	Vị trí đột biến <sup>2</sup>	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Chiều cao cây (cm)	Số nhánh	Số hạt chắc/bông
ĐC	wt		105	104,1	8	86,24 ± 5,60
S-4.3	-4 (GCTA)	23	109	118,5	7	82,34 ± 5,50
S-5.2	-2 (GC)	23	110	112,7	6	95,05 ± 3,30
S-7.5	-6 (AGGTGC)	19	105	106,9	8	98,34 ± 7,25
S-9.6	+2 (AC)	23	107	98,5	9	98,5 ± 2,25
S-12.35	+1 (A)	23	109	115,6	6	87,50 ± 4,20
S-17.10	-3 (AGG)	19	110	110,6	7	90,34 ± 9,25
S-23.34	-8(AGGTGCTA)	19	110	115,5	7	87,08 ± 6,20
S-24.10	-3 (CTA)	24	115	100,5	6	79,31 ± 3,50
S-25.8	-5 (GCTAA)	23	112	120,5	6	77,32 ± 4,40
S-34.5	-3 (GCT)	23	114	116,5	7	88 ± 8,20
S-36.7	+1 (T)	23	106	121,5	7	79 ± 5,40

**Ghi chú:** <sup>1</sup>Kí tự số thể hiện số nu đột biến trên *SW14-TBR*; (+/-) thể hiện loại đột biến thêm/mất nu; kí tự chữ trong ngoặc thể hiện nu bị đột biến (thêm/mất) trên *SW14-TBR*. <sup>2</sup>Vị trí của đột biến tính từ đầu 5' của EBE *AvrXa7*. (ĐC) Cây lúa TBR225 đối chứng không chuyển gen. Thí nghiệm được thực hiện tại nhà lưới Bộ môn Bệnh học phân tử (Viện Di truyền nông nghiệp), vụ Xuân năm 2020.

Kết quả đánh giá hình thái (Bảng 3.9) cho thấy khả năng sinh trưởng và phát triển của các dòng lúa T<sub>1</sub> không có sự khác biệt nhiều so với dòng đối chứng không chuyển gen về tất cả các chỉ tiêu được theo dõi, bao gồm thời gian sinh trưởng, chiều cao cây và số nhánh. Đặc biệt, tất cả các dòng lúa chỉnh sửa gen đều có khả năng tạo hạt (chắc) tốt (> 77 hạt/bông). Điều này cho thấy các đột biến trên *SW14-TBR* tạo ra bởi công cụ CRISPR/Cas9 có thể không gây ảnh hưởng tiêu cực đối với năng suất cây lúa. Tuy nhiên, để có được kết luận chính xác, các phân tích cần được thực hiện ở thế hệ tiếp theo (với số lượng mẫu phân tích lớn hơn).

Hạt của 11 các dòng lúa T<sub>1</sub> chỉnh sửa gen (mang đột biến *SW14-TBR* đồng hợp và không chứa T-DNA) (Bảng 3.9) được thu thập và bảo quản để phục vụ nghiên cứu biểu hiện gen và đánh giá tính kháng bạc lá.

### 3.3.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của đột biến *SW14-TBR* đến kiểu hình của dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen T<sub>2</sub>

#### 3.3.5.1. Đánh giá đặc điểm nông học của dòng lúa TBR225 chỉnh sửa *SW14-TBR* T<sub>2</sub>

Để đánh giá mức độ ảnh hưởng của đột biến trên *SW14-TBR* đến một số đặc điểm nông học của các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen, các cây lúa TBR225 T<sub>2</sub> tạo ra từ 11 dòng lúa chỉnh sửa gen T<sub>1</sub> đại diện ở trên đã được phân tích, đánh giá các chỉ tiêu như: thời gian sinh trưởng, chiều cao cây, số nhánh, số hạt chắc/bông và năng suất cá thể khi trồng trong điều kiện nhà lưới (Bảng 3.10).

**Bảng 3.10. Kết quả đánh giá một số chỉ tiêu nông học của dòng lúa TBR225 đột biến *SW14-TBR* T<sub>2</sub>**

Tên dòng	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Chiều cao cây (cm)	Số nhánh	Số hạt chắc/bông	Năng suất cá thể (gam)
WT	107,10±5,34 <sup>ab</sup>	115,25±3,54 <sup>ab</sup>	6,90±1,02 <sup>ab</sup>	79,40±5,03 <sup>b</sup>	19,05±0,54 <sup>b</sup>
S-4.3	108,15±4,25 <sup>ab</sup>	115,20±5,25 <sup>ab</sup>	6,80±0,97 <sup>ab</sup>	82,65±6,72 <sup>b</sup>	22,45 ±0,88 <sup>a</sup>
S-5.2	110,30±3,05 <sup>ab</sup>	110,35±4,10 <sup>ab</sup>	6,52±1,40 <sup>ab</sup>	89,25±3,40 <sup>ab</sup>	21,07±0,33 <sup>ab</sup>
S-7.5	105,55±5,34 <sup>bc</sup>	114,32±4,14 <sup>ab</sup>	7,88±1,08 <sup>ab</sup>	98,25±4,39 <sup>a</sup>	23,20±0,16 <sup>a</sup>
S-9.6	107,42±3,18 <sup>ab</sup>	110,48±3,18 <sup>bc</sup>	8,90±1,15 <sup>a</sup>	81,25±4,05 <sup>b</sup>	22,63±0,42 <sup>a</sup>
S-12.35	109,85±4,18 <sup>ab</sup>	113,25±4,28 <sup>ab</sup>	6,14±1,20 <sup>b</sup>	85,35±2,06 <sup>b</sup>	21,35±1,53 <sup>ab</sup>
S-17.10	109,34±4,53 <sup>ab</sup>	114,36±4,93 <sup>ab</sup>	6,90±0,95 <sup>ab</sup>	85,75±5,97 <sup>b</sup>	22,25 ±0,96 <sup>ab</sup>
S-23.34	109,25±2,46 <sup>ab</sup>	112,15±3,56 <sup>ab</sup>	7,00±0,80 <sup>ab</sup>	80,95±8,18 <sup>b</sup>	21,24±1,17 <sup>ab</sup>
S-24.10	115,33±2,46 <sup>a</sup>	105,25±4,76 <sup>c</sup>	6,90±1,05 <sup>ab</sup>	79,85±6,78 <sup>b</sup>	21,18±1,19 <sup>ab</sup>
S-25.8	110,52±4,45 <sup>ab</sup>	120,30±4,25 <sup>a</sup>	6,89±0,88 <sup>ab</sup>	79,90±2,88 <sup>b</sup>	21,18±0,33 <sup>ab</sup>
S-34.5	112,15±4,18 <sup>ab</sup>	116,15±5,18 <sup>ab</sup>	6,95±0,85 <sup>ab</sup>	79,65±3,04 <sup>b</sup>	21,56±0,32 <sup>ab</sup>
S-36.7	107,14±4,42 <sup>ab</sup>	120,35±4,92 <sup>a</sup>	7,14±1,20 <sup>ab</sup>	78,95±4,98 <sup>b</sup>	21,90±0,50 <sup>ab</sup>

*Ghi chú:* Các giá trị trung bình có cùng ký tự sai khác nhau không có ý nghĩa thống kê (Duncan's test,  $\alpha=0,05$ ). (WT) Dòng lúa TBR225 đối chứng không chỉnh sửa gen. Thí nghiệm được thực hiện tại nhà lưới Bộ môn Bệnh học phân (Viện Di truyền nông nghiệp), vụ Mùa năm 2020

Phân tích kết quả thu được bằng kiểm định One-way ANOVA và Duncan's test cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hầu hết các dòng lúa đột biến so với dòng lúa đối chứng không đột biến gen về tất cả các tính trạng nông học được quan sát (Hình 3.28, Bảng 3.10). Một số dòng có thể hiện sự khác biệt về một số chỉ tiêu, ví dụ như dòng S-24.10 khác biệt về thời gian sinh trưởng, S-24.10 và S-25.8 khác biệt về chiều cao cây, S-9.6 và S-12.35 khác biệt về số nhánh. Mặc dù vậy, không có dòng lúa đột biến nào có chỉ tiêu liên quan tới năng suất (số hạt chắc/bông và năng suất cá thể) bị giảm so với dòng lúa TBR225 đối chứng không chuyển gen. Điều này chứng tỏ rằng các đột biến trên *SW14-TBR* được tạo ra bởi hệ thống CRISPR/Cas9 không gây ra ảnh hưởng tiêu cực đến các đặc điểm sinh trưởng phát triển và đặc biệt là năng suất của cây lúa.

Các gen thuộc họ *SWEET* không những liên quan đến con đường cung cấp chất dinh dưỡng cho vi sinh vật gây bệnh mà còn có vai trò quan trọng đối với quá trình phát triển phấn hoa và tạo hạt của cây chủ [34, 35]. Trong nghiên cứu của Yang và cộng sự (2006), việc tạo ra dòng lúa kháng bạc lá thông qua bất hoạt gen *Os8N3/OsSWEET11* bằng công nghệ SiRNA đã dẫn đến sự phát triển bất thường của phấn hoa và làm giảm năng suất hạt [124]. Bên cạnh đó, các đột biến đơn trên *OsSWEET11* hay đột biến kép đồng thời trên *OsSWEET11* và *OsSWEET15* đều gây ảnh hưởng đến quá trình phát triển nội nhũ và làm đầy hạt trên cây lúa Kitaake [126]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, các tính trạng nông học được đánh giá của dòng lúa TBR225 mang đột biến trên vùng promoter của *OsSWEET14* đều không có sự khác biệt đáng kể so với dòng lúa đối chứng khi trồng trong điều kiện nhà lưới, đặc biệt là về tính trạng năng suất (số hạt chắc/bông và năng suất cá thể). Phát hiện này tương tự như kết quả nghiên cứu của Kim và cộng sự (2019) khi gây đột biến *OsSWEET11(Os8N3)* bằng CRISPR/Cas9 trên giống lúa Kitaake hay Oliva và cộng sự (2019) khi tạo tổ hợp đột biến trên 3 promoter *OsSWEET11*, *OsSWEET13*, *OsSWEET14* đã thu được các dòng lúa kháng bệnh bạc lá mà không làm thay đổi tới đặc điểm sinh trưởng, phát triển vốn có của giống gốc ban đầu [71, 94]. Điều này có thể lý giải bởi một số giả thuyết khác nhau như hiện tượng bù đắp di truyền (genetic compensation) của các gen *SWEET* trong hệ gen lúa, hoặc cũng có thể là

do đột biến nhỏ trên vùng promoter không gây tác động tới hoạt động của RNA polymerase trong điều kiện bình thường. Kết quả nghiên cứu này đã góp phần củng cố thêm cho nhận định rằng việc tạo ra các đột biến nhỏ trên vùng promoter của gen *OsSWEET14* bằng công nghệ CRISPR/Cas9 không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng, phát triển và năng suất của giống lúa TBR225.



**Hình 3.28. Hình thái cây lúa TBR225 chỉnh sửa SW14-TBR T<sub>2</sub>.**

**Ghi chú:** Hình thái cây lúa TBR225 ở giai đoạn đẻ nhánh. (A) Cây lúa TBR225 chỉnh sửa SW14-TBR (dòng S-7.5). (B) Cây lúa TBR225 đối chứng (không chuyển gen).

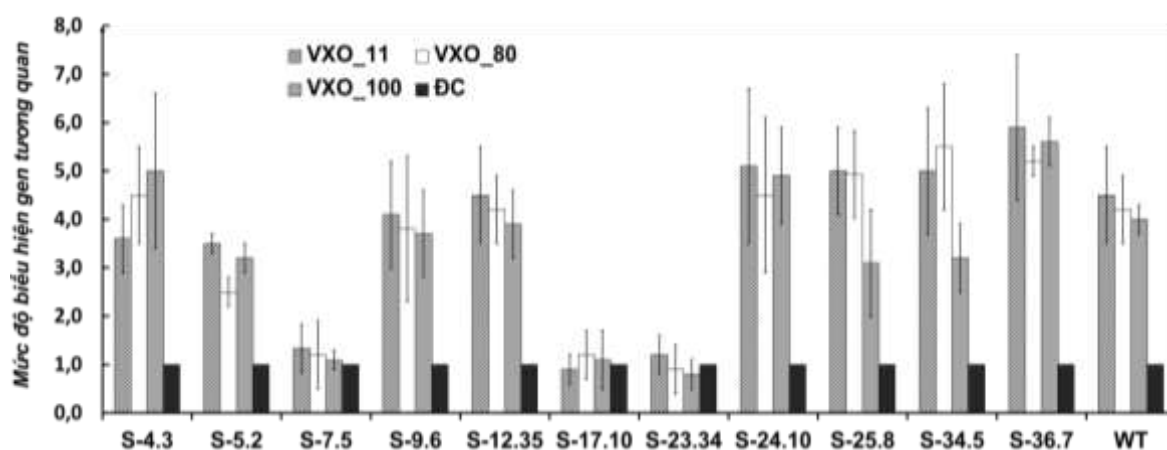
### 3.3.5.2. Nghiên cứu biểu hiện của *OsSWEET14* trên các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa SW14-TBR T<sub>2</sub>

Để chứng minh giả thuyết về tương tác phân tử giữa TALE AvrXa7 (của các isolate VXO) và EBE AvrXa7 (của giống lúa TBR225) cũng như xác định hiệu quả của các đột biến đã tạo ra đối với hoạt động của gen đích, các dòng lúa chỉnh sửa gen đã được lây nhiễm nhân tạo lần lượt với ba isolate VXO đại diện (VXO\_11, VXO\_80 và VXO\_100) và phân tích mức độ biểu hiện của *OsSWEET14*.

Kết quả RT-qPCR thu được (Hình 3.29) cho thấy mức độ biểu hiện gen của các dòng lúa đột biến *OsSWEET14* được chia thành 2 nhóm rõ rệt. Nhóm thứ nhất bao gồm 3 dòng lúa S-7.5, S-17.10 và S-23.34 hầu như không có sự thay đổi đáng kể nào về mức độ biểu hiện của gen đích khi được lây nhiễm với vi khuẩn *Xoo* tương tự như thí nghiệm đối chứng lây nhiễm bằng dung dịch không chứa vi khuẩn

*Xoo*. Nhóm thứ hai bao gồm 8 dòng lúa còn lại (S-4.3, S-5.2, S-9.6, S-12.35, S-24.10, S-25.8, S-34.5 và S-36.5) với mức độ biểu hiện *OsSWEET14* tăng đáng kể khi được lây nhiễm với cả 3 isolate *Xoo* đại diện, tương tự như dòng lúa TBR225 đối chứng không chỉnh sửa gen. Kết quả này chứng tỏ các đột biến trên *SW14-TBR* ở các dòng lúa thuộc nhóm thứ nhất đã làm phá vỡ tương tác giữa TALE *AvrXa7* với *SW14-TBR*, dẫn tới không hoạt hóa sự biểu hiện của *OsSWEET14* khi các isolate VXO xâm nhiễm vào cây lúa TBR225 chỉnh sửa gen. Ngược lại, ở các dòng lúa chỉnh sửa gen thuộc nhóm thứ hai, khi vi khuẩn *Xoo* xâm nhiễm, TALE vẫn tương tác với EBE *AvrXa7* và hoạt hóa *OsSWEET14*.

Hơn nữa, sự khác biệt về mức độ biểu hiện *OsSWEET14* giữa hai nhóm cũng gợi ý rằng các đột biến khác nhau trên EBE có thể ảnh hưởng khác nhau tới liên kết giữa EBE trên promoter *OsSWEET* với protein TALE của *Xoo*. Giả thuyết này cũng đã được Blanvillain–Baufumé và cộng sự (2017) đề cập đến trong công bố trước đây, khi nghiên cứu đột biến EBE *TalF/AvrXa7* trên *OsSWEET14* của lúa Kitaake [25]. Các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen không thay đổi biểu hiện *OsSWEET14* khi lây nhiễm các isolate VXO đại diện (S-7.5, S-17.10 và S-23.34) được lựa chọn để đánh giá khả năng kháng bệnh bạc lá trong thí nghiệm tiếp theo.



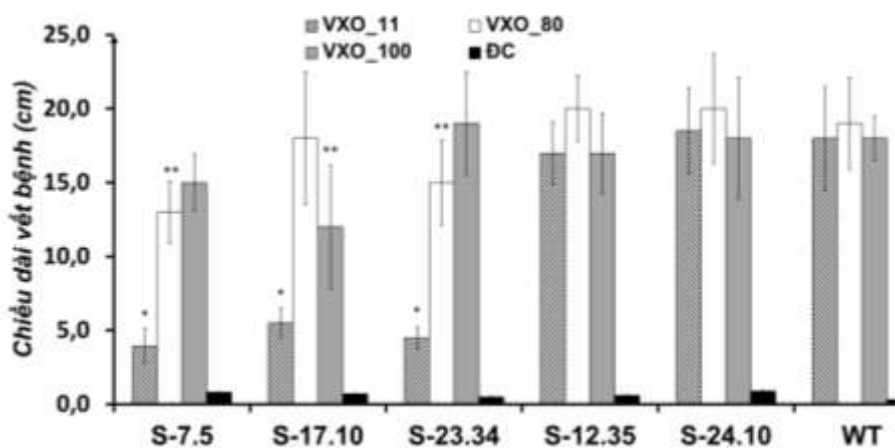
**Hình 3.29. Biểu hiện của *OsSWEET14* trong dòng lúa TBR225 chỉnh sửa *SW14-TBR T<sub>2</sub>***

**Ghi chú:** Đồ thị so sánh mức độ biểu hiện *OsSWEET14* tương quan giữa các mẫu lúa. Các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa *SW14-TBR* (S-4.3, S-5.2, S-7.5, S-9.6, S-12.35, S-17.10, S-23.34, S-24.10, S-25.8, S-34.5, S-36.7) được lây nhiễm nhân tạo với isolate VXO\_11, VXO\_80 và VXO\_100. *OsEF1a* được sử dụng làm gen nội chuẩn. Mức độ biểu hiện *OsSWEET14* của mẫu lúa không lây nhiễm *Xoo* (ĐC) có giá trị bằng 1,0. (WT) cây lúa TBR225 không chỉnh sửa gen. Giá trị thể hiện trên đồ thị là kết quả RT-qPCR trung bình của 3 lần lặp lại thí nghiệm.



### 3.3.5.3. Đánh giá tính kháng vi khuẩn Xoo của các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa SW14-TBR T<sub>2</sub>

Để xác định vai trò của gen nhiễm *OsSWEET14/EBE AvrXa7* đối với tính miễn cảm của lúa TBR225 với các isolate VXO, ba dòng lúa đột biến có mức độ biểu hiện *OsSWEET14* không thay đổi khi lây nhiễm VXO (S-7.5, S-17.10 và S-23.34) và hai dòng lúa đột biến có mức độ biểu hiện *OsSWEET14* thay đổi tương tự dòng lúa đối chứng khi lây nhiễm VXO (S-12.35 và S-24.10) đã được lựa chọn để đánh giá tính kháng bệnh với 3 isolate VXO đại diện (VXO\_11, VXO\_80 và VXO\_100) trong điều kiện nhà lưới (Hình 3.30).



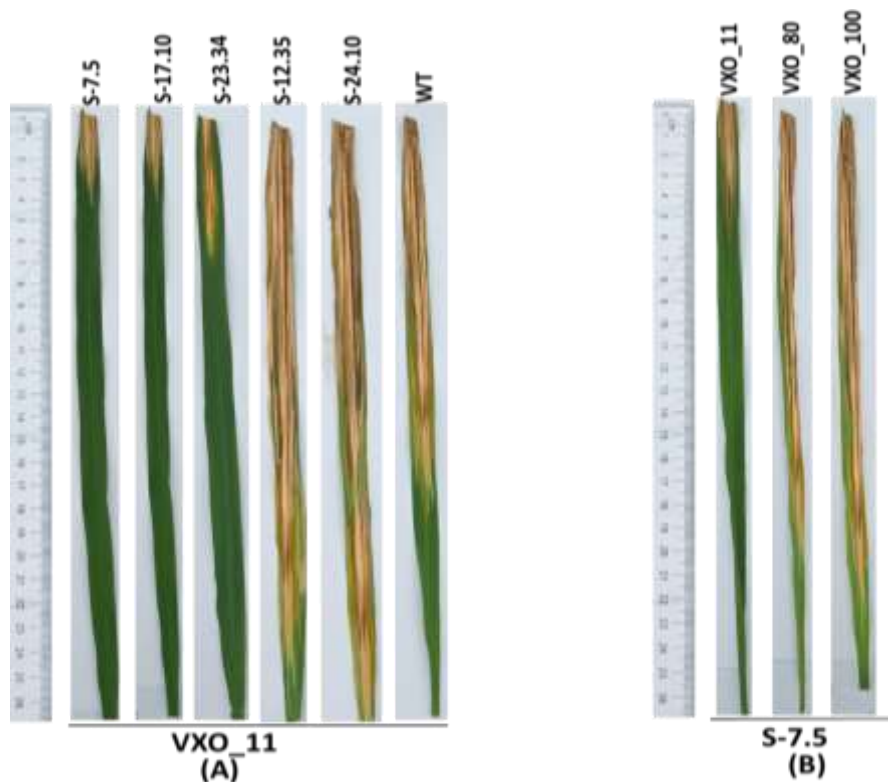
**Hình 3.30. Đánh giá tính kháng bệnh bạc lá của dòng lúa TBR225 chỉnh sửa SW14-TBR T<sub>2</sub>**

**Ghi chú:** Các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen (S-7.5, S-23.34, S-17.10, S-12.35 và S-24.10) và không chỉnh sửa gen (WT) được lây nhiễm nhân tạo các isolate VXO đại diện (VXO\_11, VXO\_80 và VXO\_100). (ĐC) Thí nghiệm đối chứng âm (lây nhiễm cây lúa với dung dịch MgCl<sub>2</sub> không chứa vi khuẩn Xoo). Dấu sao thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về chiều dài vết bệnh trung bình giữa các dòng lúa chỉnh sửa gen và dòng lúa đối chứng không chỉnh sửa gen (WT) (Duncan's test,  $\alpha = 0,05$ )

Quan sát biểu hiện bệnh trên lá thu được sau 14 ngày lây nhiễm cho thấy hai dòng lúa đột biến *OsSWEET14* S-12.35 và S-24.10 không thể hiện tính kháng với tất cả các isolate VXO được đánh giá (Hình 3.31). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả phân tích biểu hiện gen thu được ở trên, trong đó *OsSWEET14* tăng cường biểu hiện mạnh khi các dòng lúa này được lây nhiễm nhân tạo với 3 isolate VXO\_11, VXO\_80 và VXO\_100. Ngược lại, ba dòng lúa S-7.5, S-17.10 và S-23.34

thể hiện tính kháng rõ rệt với isolate VXO\_11, chiều dài vết bệnh trung bình quan sát được từ 3 – 5,5 cm (Hình 3.30, Hình 3.31). Kết quả này chứng tỏ *OsSWEET14* là gen *S* duy nhất đối với isolate VXO\_11 của giống lúa TBR225; việc gây đột biến vị trí EBE trên *SW14-TBR* đã làm mất độc tính của isolate này với cây lúa TBR225. Tuy nhiên, cả ba dòng lúa S-7.5, S-17.10 và S-23.34 lại không thể hiện tính kháng hay chỉ kháng nhẹ đối với hai isolate VXO\_80 và VXO\_100; chiều dài vết bệnh trung bình từ 12 – 18 cm (Hình 3.30, Hình 3.31). Thực tế ba dòng lúa này biểu hiện triệu chứng bệnh bạc lá điển hình, trong khi hầu như không thay đổi mức độ biểu hiện gen đích *OsSWEET14* khi được lây nhiễm với hai isolate VXO\_80 và VXO\_100 đã gợi ý rằng hai isolate này có thể có ít nhất 2 đích tấn công trong hệ gen của giống lúa TBR225.

Các gen thuộc họ *SWEET* được xác định là gen *S* đối với *Xoo*, do đó khi gây đột biến các gen này sẽ góp phần vô hiệu hóa các protein “độc” TALE của *Xoo*, kết quả là cây trồng có khả năng kháng được bệnh bạc lá [94]. Nghiên cứu trước đây đã tiến hành gây đột biến *OsSWEET14* trên cây lúa Kitaake bằng công nghệ TALEN hay *OsSWEET11* bằng CRISPR/Cas9 và thu được dòng lúa kháng chủng *Xoo* biểu hiện TALE *AvrXa7/PthXo3* hay *PthXo1* tương ứng. Tuy nhiên, tính kháng của cây lúa Kitaake mang đột biến *AvrXa7/PthXo3* (*OsSWEET14*) và *PthXo1* (*OsSWEET11*) lại bị vô hiệu hóa bởi chủng *Xoo* mang protein đồng thời gen *tal* mã hóa *AvrXa7/PthXo3* và *PthXo2* [94]. Như vậy, tính kháng phụ thuộc rất lớn vào sự có mặt của các EBE trên gen *S* được nhận biết bởi protein TALE tương ứng của vi khuẩn *Xoo*. Trong nghiên cứu này, tính kháng isolate VXO\_11 mang gen *tal AvrXa7* của ba dòng lúa S-7.5, S-17.10 và S-23.34 chỉnh sửa gen chứa đột biến đồng hợp trên EBE *AvrXa7* cũng được cải tiến rõ rệt so với dòng lúa TBR225 đối chứng không chỉnh sửa gen. Tính kháng không hoàn toàn hay không kháng với hai isolate VXO\_80 và VXO\_100 có thể giải thích do sự có mặt của một hay một vài EBE trên (các) gen *S* (khác) cũng được nhận biết bởi protein TALE của các isolate này. Giả thiết này cũng hoàn toàn phù hợp với kết quả thu được ở mục 3.1.2, trong đó đã xác định ngoài *OsSWEET14/AvrXa7*, VXO\_80 và VXO\_100 còn tấn công vào *OsSWEET13/PthXo2(A)*. Vì vậy, việc gây đột biến một vị trí EBE *AvrXa7* trên *SW14-TBR* có thể không đủ để tạo ra tính kháng hoàn toàn VXO\_80 và VXO\_100 cho cây lúa TBR225.



**Hình 3.31. Lây nhiễm VXO nhân tạo trên dòng lúa TBR225 chỉnh sửa *SW14-TBR T<sub>2</sub>***

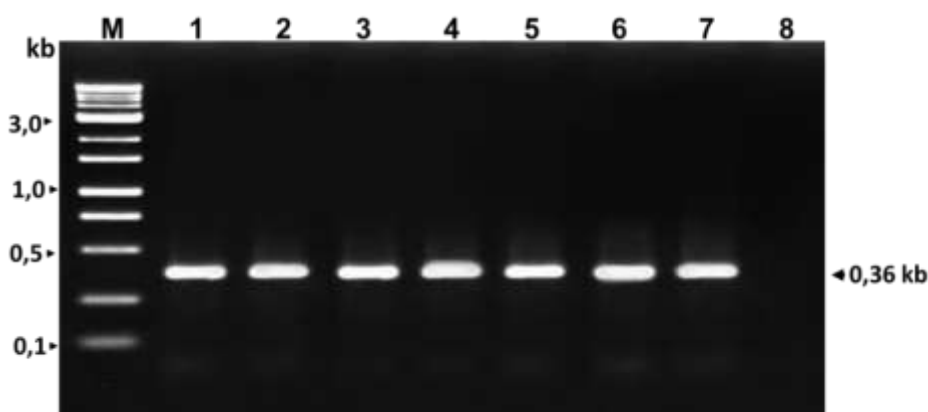
**Ghi chú:** Các dòng lúa chỉnh sửa gen (S-7.5, S-17.10, S-23.34 S-12.35, S-24.10) và không chỉnh sửa gen (WT) được lây nhiễm nhân tạo với các isolate VXO\_11 (A); dòng lúa S-7.5 được lây nhiễm nhân tạo với isolate VXO\_11, VXO\_80 và VXO\_100 (B). Hình ảnh được ghi lại sau 14 ngày lây nhiễm.

#### 3.4. TẠO DÒNG LÚA TBR225 CHỈNH SỬA *SW13-TBR* VÀ *SW14-TBR*

Các kết quả nghiên cứu trình tự gen *tal*, trình tự *SW13-TBR* và *SW14-TBR* (mục 3.1.2.1) và phân tích dòng lúa TBR225 đột biến *SW14-TBR/EBE AvrXa7* (mục 3.3.3.2) đã chứng minh được *OsSWEET14* là gen *S* có vai trò quyết định đến độc tính của isolate VXO\_11 trên giống lúa TBR225, đồng thời là gen *S* quan trọng đối với 2 isolate VXO\_80 và VXO\_100. Tuy nhiên, tính miễn cảm của TBR225 đối với VXO\_80 và VXO\_100 không phụ thuộc hoàn toàn vào gen *S* này mà có thể còn liên quan tới *OsSWEET13/EBE PthXo2(A)*. Để chứng minh cho giả thuyết này, thí nghiệm tạo dòng lúa TBR225 chỉnh sửa đồng thời 2 promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR* tiếp tục được thực hiện.

### 3.4.1. Tạo chủng *A. tumefaciens* mang vector chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR*

Để tạo vật liệu phục vụ thí nghiệm chuyển cấu trúc chỉnh sửa đồng thời hai promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR* vào lúa TBR225, vector pCas9/SW13-SW14 đã được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 bằng phương pháp sốc nhiệt. Thể biến nạp sau đó được kiểm tra bằng phương pháp PCR trực tiếp khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu Ubi-F/Cas9-t-R. Kết quả điện di sản phẩm PCR từ các khuẩn lạc đều cho một băng DNA duy nhất có kích thước khoảng 0,36 kb (Hình 3.32, giếng 1-6) tương tự kết quả thí nghiệm PCR từ khuôn là vector pCas9/SW13-SW14 (Hình 3.32, giếng 7). Điều này chứng tỏ cả 6 khuẩn lạc được kiểm tra đều mang cấu trúc pCas9/SW13-SW14. Một thể biến nạp có kết quả PCR dương tính được chọn ngẫu nhiên để sử dụng cho thí nghiệm chuyển gen vào giống lúa TBR225 tiếp theo.



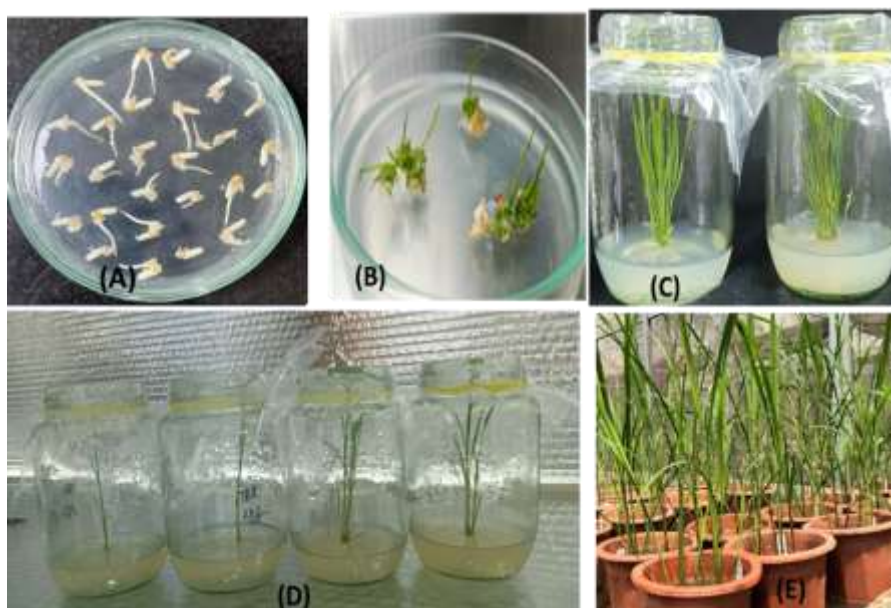
**Hình 3.32. PCR trực tiếp khuẩn lạc *A. tumefaciens* được biến nạp pCas9/SW13-SW14**

**Ghi chú:** Sản phẩm PCR với cặp mồi Ubi-F/Cas9-t-R được điện di trên gel agarose 1,0%. Giếng M: thang chuẩn DNA 1,0 kb (Cleaver Scientific); giếng 1 - 6: khuôn là các khuẩn lạc *A. tumefaciens* được biến nạp vector pCas9/SW13-SW14; giếng 7: đối chứng dương (khuôn là pCas9/SW13-SW14); giếng 8: đối chứng âm (khuôn lạc *A. tumefaciens* không được biến nạp DNA).

### 3.4.2. Chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR* vào giống lúa TBR225

Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang cấu trúc T-DNA biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa đồng thời hai promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR* được biến nạp vào lúa TBR225 tương tự như thí nghiệm đã thực hiện ở trên (mục 3.3.2) (Hình 3.33).

Kết quả thu được ở Bảng 3.11 cho thấy tỉ lệ tạo mô sẹo đạt 63,0%, tương tự với tỉ lệ thu được trong thí nghiệm chuyển gen đã được thực hiện ở trên (đạt 59%) (mục 3.3.2). Các mô sẹo sau khi đồng nuôi cấy với vi khuẩn *A. tumefaciens* có tỉ lệ sống sót đạt 89,8%. Để loại bỏ những mô sẹo không mang cấu trúc T-DNA, các mô sẹo sau khi lây nhiễm vi khuẩn sẽ được sàng lọc trên môi trường nuôi cấy có chứa kháng sinh hygromycin 30mg/l. Kết quả cho thấy tỉ lệ mô sẹo sống sót sau ba lần chọn lọc đạt lần lượt 64,0%, 60,2% và 68,8% (Bảng 3.11).



**Hình 3.33. Chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR* vào lúa TBR225**

**Ghi chú:** : (A) Tạo mô sẹo từ phôi trưởng thành; (B) Tái sinh chồi từ mô sẹo, (C) & (D) Tạo rễ từ chồi tái sinh; (E) Cây tái sinh trồng trong chậu đất ở điều kiện nhà lưới.

Những mô sẹo sống sót sau giai đoạn chọn lọc được chuyển qua môi trường tái sinh chồi có bổ sung các loại hormone sinh trưởng đã tối ưu. Kết quả sau 2-4 tuần đã thu được 67 dòng lúa tái sinh hoàn chỉnh, đạt tỉ lệ 89,3% (Hình 3.33, Bảng 3.11). Các cây tái sinh khi chuyển sang môi trường tái sinh rễ không bổ sung các loại hormone, 100% số cây đã tái sinh bộ rễ đầy đủ (Hình 3.33C & D). Các cây lúa TBR225 tái sinh, đặt tên từ D1 – D67 (D ~ double gene: chuyển cấu trúc chỉnh sửa đa gen *SW13-TBR* và *SW14-TBR*), khi đưa từ môi trường nuôi cấy *in vitro* ra bầu đất chăm sóc trong điều kiện nhà lưới, tỉ lệ cây sống sót chỉ còn 88,1% (Bảng 3.11, Hình 3.33E).

Như vậy, từ 500 mẫu hạt lúa TBR225 ban đầu được sử dụng để chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa đồng thời cả hai *SW13-TBR* và *SW14-TBR*, 59 dòng lúa tái sinh đã được tạo ra, sinh trưởng và phát triển tốt trong điều kiện nhà lưới. Hiệu suất của toàn bộ quy trình đạt 23,6%.

**Bảng 3.11. Kết quả biến nạp cấu trúc pCas9/SW13-SW14 vào lúa TBR225**

Giai đoạn	Số mẫu	Hiệu suất*
Vào mẫu	500	
Tạo mô sẹo	315	63,0
Đồng nuôi cấy	283	89,8
Chọn lọc I	181	64,0
Chọn lọc II	109	60,2
Chọn lọc III	75	68,8
Tiền tái sinh	70	93,3
Tái sinh, tạo cây hoàn chỉnh	67	95,7
Nhà lưới	59	88,1

**Ghi chú:** \**Tỉ lệ mẫu sống sót/phát triển ở mỗi giai đoạn được tính theo công thức: (số mẫu sống sót ở cuối giai đoạn trước/số mẫu đưa vào ở đầu giai đoạn sau) x 100.*

### 3.4.3. Nghiên cứu kiểu gen của cây lúa TBR225 tái sinh được chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR*

#### 3.4.3.1. Xác định sự có mặt của cấu trúc T-DNA trong các cây lúa TBR225 tái sinh

Sự có mặt của cấu trúc pCas9/SW13-SW14 trong hệ gen của 59 cây lúa tái sinh sinh trưởng trong nhà lưới được xác định bằng PCR với khuôn là DNA tổng số tách chiết từ mẫu lá của các cây này. Các thí nghiệm PCR được thiết kế nhằm kiểm tra lần lượt sự có mặt của gen *Cas9*, gen chọn lọc *HPT* và cấu trúc biểu hiện của các sgRNA nhận biết trình tự EBE *PthXo2(A)* và *AvrXa7* trên *SW13-TBR* và *SW14-TBR*.

Tổng hợp kết quả phân tích PCR (Bảng 3.12) đã cho thấy 55/59 cây lúa TBR225 tái sinh có kết quả PCR dương tính với cặp mồi đặc hiệu *HPT*. Tuy nhiên, trong số này chỉ có 51 cây (86,44%) cho kết quả PCR dương tính với cặp mồi đặc hiệu cho gen *Cas9* và cấu trúc biểu hiện của sgRNA. Hiện tượng này cũng tương tự

như đã quan sát được đối với cây lúa TBR225 tái sinh đã được chuyển cấu trúc chỉnh sửa *SW14-TBR* đã trình bày ở trên (mục 3.3.3.1).

**Bảng 3.12. Kết quả sàng lọc cây lúa TBR225 chuyển gen bằng PCR**

Thí nghiệm	Tổng số cây*
Cây lúa TBR225 tái sinh được kiểm tra	59
PCR với mỗi đặc hiệu cho <i>Actin</i>	59
PCR với mỗi đặc hiệu cho <i>HPT</i>	55
PCR với mỗi đặc hiệu cho <i>Cas9</i>	51
PCR với mỗi đặc hiệu cho <i>sgRNA</i>	51

**Ghi chú:** \*Số cây có kết quả PCR dương tính.

Như vậy, cấu trúc biểu hiện protein Cas9 và sgRNA chỉnh sửa đồng thời *SW13-TBR* và *SW14-TBR* đã được chuyển thành công vào lúa TBR225; hiệu suất chuyển gen của toàn bộ quy trình đạt 10,2%.

#### 3.4.3.2. Xác định đột biến trên *SW13-TBR* và *SW14-TBR* của các dòng lúa chuyển gen $T_0$

Để đánh giá hiệu quả chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR* của hệ thống CRISPR/Cas9 đã sử dụng, 51 dòng lúa chuyển gen  $T_0$  đã được giải trình tự vùng gen đích. Phân tích trình tự nucleotide bằng phần mềm BioEdit 4.0 cho thấy, có 44/51 dòng lúa tái sinh mang đột biến trên các gen đích. Kết quả này chứng tỏ cấu trúc vector CRISPR/Cas9 đã thiết kế hoạt động khá hiệu quả; hiệu suất chỉnh sửa gen của hệ thống CRISPR/Cas9 đạt 8,8% tính trên toàn bộ quá trình chỉnh sửa gen và đạt 86,3% tính trên số cây lúa mang gen chuyển. Trong đó, 18/51 dòng lúa (35,3%) mang đột biến đơn gen trên *SW13-TBR*, 15/51 dòng (29,4%) mang đột biến đơn gen trên *SW14-TBR* và 12/51 dòng (23,5%) mang đa đột biến đồng thời trên cả hai promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR* (Bảng 3.13). Điều này cũng chứng minh hệ thống vector CRISPR/Cas9 đã thiết kế (mục 2.2.7.3) hoàn toàn có thể sử dụng cho mục đích chỉnh sửa đa gen trên đối tượng cây lúa.

**Bảng 3.13. Kết quả giải trình tự *SW13-TBR* và *SW14-TBR* của cây lúa TBR225 chuyển gen  $T_0$**

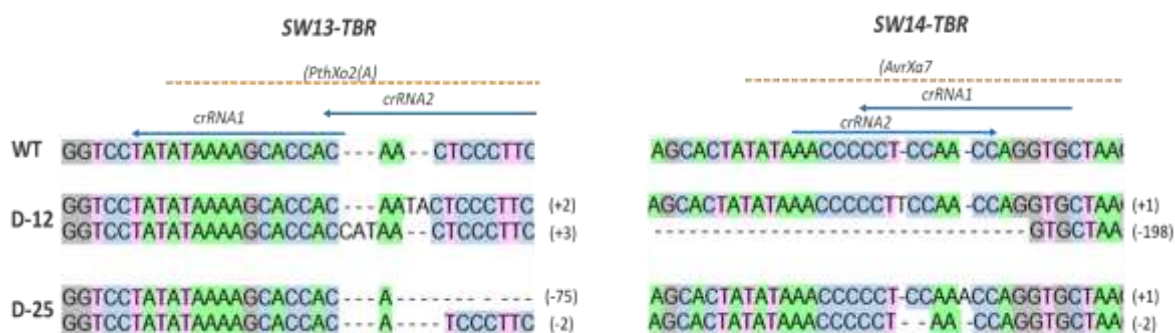
Promoter đột biến	Tên dòng lúa	Số cây (Tỉ lệ)*
<i>SW13-TBR</i> <sup>a</sup>	D-5, D-9, D-10, D-14, D-17, D-19, D-23, D-27, D-28, D-32, D-33, D-37, D-41, D-43, D-45, D-53, D-64, D-65	18 (35,3%)
<i>SW14-TBR</i> <sup>b</sup>	D-2, D-4, D-13, D-16, D-20, D-24, D-29, D-31, D-35, D-48, D-51, D-54, D-57, D-62	14(27,5%)
<i>SW13-TBR</i> và <i>SW14-TBR</i> <sup>c</sup>	D-6, D-7, D-11, D-12, D-18, D-21, D-22, D-25, D-26, D-30, D-40, D-67	12 (23,5%)

**Ghi chú:** <sup>a</sup>Đột biến trên *SW13-TBR*; <sup>b</sup>Đột biến trên *SW14-TBR*; <sup>c</sup>Đột biến trên *SW13-TBR* và *SW14-TBR*; \* Số cây mang đột biến/Tổng số cây mang gen chuyển.

Phân tích chi tiết các đột biến trên hai promoter đích trong các dòng lúa thu được bằng công cụ CRISPR ID [42] cho thấy các đột biến đều xuất hiện trên EBE *PthXo2(A)* và *AvrXa7* đúng như dự tính khi thiết kế sgRNA (Hình 3.34). Các loại đột biến thu được cũng bao gồm đột biến thêm và mất nucleotide, không có dòng lúa nào xuất hiện đột biến thay thế nucleotide. Đặc biệt, trong số các dòng lúa mang đột biến đồng thời trên cả hai promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR*, có 2 dòng mang đột biến mất đoạn lớn: dòng D-12 mất 198 nucleotide trên *SW14-TBR* và dòng D-25 mất 75 nucleotide trên *SW13-TBR* (Hình 3.34, Bảng 3.14).

Như vậy, thông qua phương pháp chuyển gen sử dụng *A. tumefaciens*, cấu trúc biểu hiện hệ thống CRISPR/Cas9 chỉnh sửa đồng thời hai promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR* đã được chuyển thành công vào lúa TBR225 và tạo ra một số dòng lúa mang đột biến mong muốn trên trình tự đích. Điều này bước đầu chứng minh được tính hiệu quả khi sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 chỉnh sửa đa gen để gây đột biến đồng thời nhiều vị trí trong hệ gen cây chủ, nhằm phá vỡ liên kết giữa các protein TALE của *Xoo* và trình tự EBE trên vùng promoter của các gen nhiễm. Với mục tiêu tạo ra các dòng lúa TBR225 được chỉnh sửa đồng thời cả 2 promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR*, 12 dòng lúa bao gồm D-6, D-7, D-11, D-12, D-18, D-21, D-22, D-25, D-26, D-30, D-40, D-67 (Bảng 3.13) tiếp tục được trồng và chăm sóc trong điều kiện nhà lưới để thực hiện các phân tích tiếp theo về tính hiệu quả của các dạng đột biến thu được.





**Hình 3.34. Trình tự SW13-TBR và SW14-TBR của các dòng lúa TBR225 chuyển gen  $T_0$**

**Ghi chú:** Trình tự SW13-TBR và SW14-TBR của các dòng lúa chuyển gen (D-12 và D-25) được so sánh với trình tự SW13-TBR và SW14-TBR của cây lúa TBR225 không chuyển gen (WT). Kí tự bên phải thể hiện kiểu gen đột biến; (+/-) đột biến thêm/bớt nucleotide; kí tự số thể hiện số nucleotide thay đổi. Trình tự các EBE được thể hiện bằng đường nét đứt màu cam. Vị trí các crRNA được biểu thị bằng mũi tên màu xanh.

### 3.4.4. Nghiên cứu đặc điểm kiểu gen và kiểu hình của các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa SW13-TBR và SW14-TBR $T_1$

#### 3.4.4.1. Nghiên cứu kiểu gen của các dòng lúa chỉnh sửa gen $T_1$

Với mục đích tạo ra dòng lúa TBR225 mang đột biến đồng thời trên SW13-TBR và SW14-TBR và không chứa cấu trúc T-DNA trong hệ gen, các dòng lúa chỉnh sửa gen cần được sàng lọc ở thế hệ  $T_1$ . Do cấu trúc T-DNA và các đột biến tạo ra bởi hệ thống CRISPR/Cas9 trong các dòng lúa chỉnh sửa gen đã xác định ở trên (mục 3.4.2) sẽ có sự phân ly ở thế hệ  $T_1$  nên để đảm bảo khả năng thành công của quá trình sàng lọc, hạt của 7 dòng lúa tạo được nhiều hạt chắc bao gồm: D-11, D-12, D-18, D-21, D-25, D-26, D-30 (Bảng 3.14, Phụ lục 15) được sử dụng để tiếp tục gieo trồng phục vụ cho các phân tích kiểu gen ở thế hệ  $T_1$ .

DNA tổng số được tách chiết từ các cây lúa  $T_1$  và kiểm tra lần lượt các cặp môi đặc hiệu cho gen *Actin*, *HPT*, *Cas9* và các cấu trúc biểu hiện sgRNA tương tự như đối với các dòng lúa chuyển cấu trúc pCas9/sgRNA-SW14 đã thực hiện ở trên (mục 3.3.4.1). Kết quả sàng lọc (Bảng 3.14) đã thu được 80/346 dòng lúa  $T_1$  (từ 7 dòng lúa  $T_0$ ) có kết quả PCR dương tính với cặp môi đặc hiệu cho gen nội chuẩn *Actin* nhưng âm tính với các cặp môi đặc hiệu cho cấu trúc T-DNA, điều này chứng tỏ các dòng lúa này không mang cấu trúc T-DNA trong hệ gen.

**Bảng 3.14. Kết quả sàng lọc các dòng lúa chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR* thế hệ T<sub>1</sub> bằng PCR**

Tên dòng T <sub>0</sub> <sup>1</sup>	Số cây T <sub>1</sub>	PCR				Giải trình tự <sup>2</sup>	
		<i>Actin</i> <sup>a</sup>	<i>HPT</i> <sup>b</sup>	<i>Cas9</i> <sup>b</sup>	<i>sgRNA</i> <sup>b</sup>	Đột biến đơn gen	Đột biến đa gen <sup>3</sup>
D-11 (-5/wt)   (-2/wt)	45	45	9	9	9	7	2 (1)
D-12 (+2/+3)   (-198/+1)	60	60	15	15	15	0	15 (5)
D-18 (+2/-4)   (-2/-3)	56	56	14	14	14	0	14 (4)
D-21 (-8/wt)   (-10/wt)	30	30	6	6	6	3	3 (0)
D-25 (-75/-2)   (+1/-2)	60	60	17	17	17	0	17 (5)
D-26 (-6/wt)   (-4/wt)	45	45	7	7	7	5	2 (0)
D-30 (-7/+3)   (+1/-3)	50	50	12	12	12	0	12 (7)

**Ghi chú:** <sup>1</sup>Kí tự trong ngoặc trước/sau dấu “|” chỉ kiểu gen *SW13-TBR*/*SW14-TBR*; kí tự số thể hiện số nucleotide thêm (+)/mất (-) hoặc không đột biến (wt).  
<sup>a</sup>Số cây có kết quả PCR dương tính; <sup>b</sup>Số cây có kết quả PCR âm tính.  
<sup>2</sup>Kết quả giải trình tự những cây lúa TBR225 chỉnh sửa gen không mang cấu trúc T-DNA. <sup>3</sup>Kí tự số trong dấu ngoặc thể hiện số cây mang đột biến đồng hợp trên cả hai gen.

Các dòng lúa T<sub>1</sub> không mang cấu trúc T-DNA được tiếp tục giải trình tự vùng promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR* để xác định sự có mặt của các đột biến. Kết quả phân tích trình tự nucleotide của các dòng lúa T<sub>1</sub> bằng phần mềm BioEdit 4.0 (Bảng 3.14) cho thấy 15/80 dòng lúa T<sub>1</sub> chỉ mang đột biến trên *SW13-TBR* hoặc *SW14-TBR*; 65/80 dòng lúa T<sub>1</sub> mang đột biến trên cả hai promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR*. Đặc biệt, 22 dòng lúa đã được xác định có mang đột biến đồng hợp trên cả hai promoter này. Phân tích bằng công cụ CRISPR ID cũng chỉ ra rằng tất cả các đột biến ở thế hệ T<sub>0</sub> đều được di truyền một cách chính xác sang thế hệ T<sub>1</sub> và không có sự xuất hiện các đột biến mới (Bảng 3.15).

Như vậy, bằng công cụ CRISPR/Cas9, 22 dòng lúa TBR225 mang đồng thời đột biến *SW13-TBR* và *SW14-TBR* ở dạng đồng hợp và không chứa cấu trúc T-DNA trong hệ gen đã được tạo ra. Trong số này, 12 dòng lúa (D-12.1, D-12.7, D-12.28, D-12.31, D-18.1, D-18.12, D-25.2, D-25.3, D-25.10, D-25.13, D-30.2, D-30.9) đại diện cho các loại đột biến khác nhau được tiếp tục sử dụng cho thí nghiệm đánh giá tính kháng với các isolate VXO đại diện.

**Bảng 3.15. Kết quả giải trình tự *SW13-TBR* và *SW14-TBR* của dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen  $T_1$**

Tên dòng	Kiểu gen đột biến		Tên dòng	Kiểu gen đột biến	
	<i>SW13-TBR</i>	<i>SW14-TBR</i>		<i>SW13-TBR</i>	<i>SW14-TBR</i>
D-11.30	-5	-2	D-25.3	-75	+1
D-12.1	+2	-198	D-25.10	-2	-2
D-12.7	+2	+1	D-25.13	-75	-2
D-12.28	+3	-198	D-25.19	-75	-2
D-12.31	+3	+1	D-30.2	-7	-3
D-12.58	+2	-198	D-30.5	-7	-3
D-18.1	+2	-3	D-30.9	+3	-3
D-18.7	+2	-2	D-30.12	+3	-3
D-18.12	-4	-3	D-30.14	+3	+1
D-18.15	-4	-3	D-30.19	-7	+1
D-25.2	-2	+1	D-30.47	-7	+1

**Ghi chú:** Kí tự số thể hiện số nucleotide thêm (+)/mất (-) trên *SW13-TBR* và *SW14-TBR*; kí tự in đậm thể hiện các dòng lúa mang đột biến khác nhau.

#### 3.4.4.2. Đánh giá tính kháng bạc lá của các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen $T_1$

Để bước đầu đánh giá hiệu quả của các đột biến trên *SW13-TBR* và *SW14-TBR* tạo ra bằng công cụ CRISPR/Cas9 đối với tính kháng VXO, mười hai dòng lúa  $T_1$  không mang cấu trúc T-DNA, mang đột biến các gen đích ở dạng đồng hợp đại diện cho mỗi loại đột biến (Bảng 3.15) và có kiểu hình đồng đều được lựa chọn cho thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo với các isolate VXO\_11 và VXO\_80. Ngoài ra, dòng lúa S-7.5 mang đột biến *SW14-TBR* dạng đồng hợp (mục 3.3.5.3) và cây lúa TBR225 không chỉnh sửa gen được sử dụng làm đối chứng cho thí nghiệm đánh giá tính kháng.

Kết quả đánh giá tính kháng cho thấy có sự khác rõ rệt về tính kháng với các isolate VXO giữa các dòng lúa (Bảng 3.16) và được chia thành 2 nhóm. Cụ thể, nhóm thứ nhất bao gồm 6 dòng lúa: D-18.1, D-18.12, D-25.10, D-25.13, D-30.2, D-30.9, thể hiện triệu chứng bạc lá rõ rệt trên tất cả các lá được lây nhiễm với cả hai isolate VXO\_11 và VXO\_80, tương tự như dòng lúa đối chứng (WT) không chỉnh sửa gen (Bảng 3.16, Hình 3.35). Nhóm thứ hai gồm 6 dòng lúa còn lại, D-12.1, D-12.7, D-12.28, D-12.31, D-25.2 và D-25.3, thể hiện tính kháng rõ rệt với cả hai isolate được lây nhiễm (Bảng 3.16), chiều dài vết bệnh <5 cm (Hình 3.35). Trong

khi đó, dòng lúa đối chứng S-7.5 chỉnh sửa *SW14-TBR* (mục 3.3.5.3) chỉ kháng với chủng VXO\_11 và không kháng với với chủng VXO\_80 (Bảng 3.16).

So sánh chi tiết kiểu gen đột biến giữa các dòng lúa kháng và không kháng VXO đã cho thấy các đột biến khác nhau có ảnh hưởng khác nhau tới độc tính của VXO trên cây lúa TBR225. Ví dụ, dòng D-25.2 và D-25.10 mang đột biến *SW14-TBR* khác nhau và *SW13-TBR* giống nhau biểu hiện tính kháng trái ngược nhau trong cả 2 thí nghiệm lây nhiễm VXO\_11 và VXO\_80, chứng tỏ đột biến +1 (A) trên *SW14-TBR* (dòng D-25.2) dường như có hiệu quả phá vỡ tương tác giữa TALE-EBE hơn so với đột biến -2 (CC) (dòng D-25.10). Tương tự, sự khác biệt về tính kháng giữa 2 dòng D-12.7 và D-18.1 cũng gợi ý rằng đột biến -3 (CCA) trên *SW14-TBR* (dòng D-18.1) không ngăn cản được quá trình hoạt hóa gen nhiễm *OsSWEET14* của VXO\_11 và VXO\_80. Điều này cũng phù hợp với kết quả thu được ở trên (mục 3.3.5.2) trong đó 8/11 dòng lúa mang đột biến EBE *AvrXa7* nhưng vẫn tăng cường biểu hiện *OsSWEET14* khi lây nhiễm với ba chủng VXO đại diện. Bên cạnh đó, các kết quả thu được đã cho thấy các đột biến +2 (TA), +3 (CAT), -75 (ACTCCCTTC) và -2 (AC) trên *SW13-TBR*, hay +1 (T), +1 (A) và -198 (TATAAACCCCCTCCAACCAG) trên *SW14-TBR* có thể phá vỡ tương tác giữa TALE *PthXo2(A)* và *AvrXa7* với gen *S* (Bảng 3.16). Tuy nhiên, nhận định này vẫn cần phải có thêm các bằng chứng thông qua các thí nghiệm đánh giá biểu hiện gen được thực hiện sau này.

Đặc biệt, các kết quả đánh giá tính kháng các isolate VXO của các dòng lúa TBR225 mang đột biến trên 2 vị trí EBE *PthXo2(A)* và *AvrXa7* ở dạng đồng hợp đã bước đầu chứng minh được vai trò quan trọng (có thể là mang tính quyết định) của *SW13-TBR/EBE PthXo2(A)* và *SW14-TBR/EBE AvxXa7* đối với tính miễn cảm của giống lúa TBR225 với 2 isolate đại diện VXO\_80 và VXO\_100. Mặc dù vẫn cần những thí nghiệm phân tích sâu hơn ở thế hệ tiếp theo, với số lượng mẫu lớn hơn để khẳng định cho nhận định này, các kết quả thu được đã cho thấy một số dòng lúa TBR225 đột biến *SW13-TBR* và *SW14-TBR* có thể kháng hoàn toàn được các isolate VXO đại diện được nghiên cứu.

**Bảng 3.16. Kết quả đánh giá tính kháng các dòng lúa chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR***

Tên dòng T <sub>1</sub>	Kiểu gen*		Tính kháng/nhiễm	
	<i>SW13-TBR</i>	<i>SW14-TBR</i>	VXO_11	VXO_80
ĐC	wt	wt	S	S
S-7.5	wt	-6 (AGGTGC)	R	S
D-12.1	+2 (TA)	-198 (TATAAACCCCTCCAACCAG)	R	R
D-12.7	+2 (TA)	+1 (T)	R	R
D-12.28	+3 (CAT)	-198 (TATAAACCCCTCCAACCAG)	R	R
D-12.31	+3 (CAT)	+1 (T)	R	R
D-18.1	+2 (TA)	-3 (CCA)	S	S
D-18.12	-4 (ACTC)	-3 (CCA)	S	S
D-25.2	-2 (AC)	+1 (A)	R	R
D-25.3	-75 (ACTCCCTTC)	+1 (A)	R	R
D-25.10	-2 (AC)	-2 (CC)	S	S
D-25.13	-75 (ACTCCCTTC)	-2 (CC)	S	S
D-30.2	-7 (TCCCTTC)	-3 (CCA)	S	S
D-30.9	+3 (GTC)	-3 (CCA)	S	S

**Ghi chú:** \*Kí tự chữ số thể hiện số nucleotide thêm (+)/mất (-) trên *SW13-TBR* và *SW14-TBR*; kí tự chữ trong ngoặc thể hiện các nu thêm/mất trên EBE *PthXo2(A)* và *AvrXa7*; (wt) không đột biến. (S) Nhiễm; (R) kháng.



**Hình 3.35. Cây nhiễm VXO nhân tạo trên dòng lúa TBR225 chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR* T<sub>1</sub>.**

**Ghi chú:** Các dòng lúa chỉnh sửa đồng thời *SW13-TBR* và *SW14-TBR* (D-25.2), chỉnh sửa *SW14-TBR* (S-7.5) và không chỉnh sửa gen (WT) được lây nhiễm nhân tạo với các isolate VXO đại diện (VXO\_11 và VXO\_80). Hình ảnh được ghi lại sau 14 ngày lây nhiễm.

### 3.4.4.3. Đánh giá kiểu hình các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen $T_1$

Một số dòng lúa TBR255 mang đột biến trên cả hai promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR* (D-12.1, D-12.7, D-12.28, D-12.31, D-25.2 và D-25.3) được tạo ra thông qua chuyển gen bằng *A. tumefaciens* đã thể hiện tính kháng hoàn toàn với các isolate VXO đại diện. Tuy nhiên, bên cạnh những đột biến thêm/mất nucleotide nhỏ, 3/6 dòng lúa chỉnh sửa gen này có mang đột biến mất đoạn lớn trên vùng promoter của 2 gen *OsSWEET13* và *OsSWEET14*, có khả năng gây ảnh hưởng tới hoạt động của gen đích trong điều kiện bình thường. Với mục đích kiểm tra xem các đột biến này có làm thay đổi các đặc điểm nông học của cây lúa TBR225 hay không, 8 dòng lúa chỉnh sửa gen mang các đột biến khác nhau, bao gồm 6 dòng lúa biểu hiện tính kháng và 2 dòng lúa không kháng các isolate VXO được chọn để theo dõi, đánh giá sơ bộ các chỉ tiêu nông học như: thời gian sinh trưởng, chiều cao, số nhánh và số hạt chắc/bông (Bảng 3.17).

**Bảng 3.17. Kết quả đánh giá kiểu hình các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR*  $T_1$**

Dòng lúa $T_1$		Thời gian sinh trưởng (ngày)	Chiều cao cây (cm)	Số nhánh	Số hạt chắc/bông
Tên dòng	Kiểu gen				
D-25.2	-2/+1	109	105	6	105,56 ± 4,32
D-25.3	-75/+1	117	107	7	102,72 ± 6,26
D-12.1	+2/-198	110	103	6	99,38 ± 3,40
D-12.7	+2/+1	120	108,5	7	100,34 ± 5,29
D-12.28	+3/-198	109	105,4	7	103,26 ± 5,30
D-12.31	+3/+1	112	110,9	8	100,68 ± 7,60
D-18.1	+2/-3	115	109,5	6	98,05 ± 4,30
D-30.9	+3/-3	117	110	7	100,34 ± 3,29
ĐC	wt	112	107,1	8	106,24 ± 5,60

**Ghi chú:** Kí tự số trước và sau dấu gạch chéo "/" lần lượt thể hiện kiểu gen của *SW13-TBR* và *SW14-TBR*, kí tự số chỉ số nucleotide đột biến thêm (+)/mất (-) trên hai gen này; wt: kiểu gen không đột biến. ĐC: cây lúa TBR225 đối chứng không chuyển gen. Thí nghiệm được thực hiện tại nhà lưới Bộ môn Bệnh học phân tử (Viện Di truyền nông nghiệp), vụ Xuân 2022.

Các dòng lúa mang gen đột biến có thời gian sinh trưởng từ 109-120 ngày; chiều cao cây dao động từ 103-110,9 cm; số nhánh khoảng 6-8 nhánh; số hạt chắc/bông thay đổi từ 94 đến 110 hạt. Nhìn chung, các dòng lúa chỉnh sửa gen sinh

trường tương đương so với cây lúa đối chứng không chuyển gen (Bảng 3.17, Hình 3.36). Quan sát này chứng tỏ các đột biến trên vùng gen đích có thể không gây ảnh hưởng tới các tính trạng nông học quan trọng của cây lúa TBR225 giống như phân tích ở cây chỉnh sửa đơn gen *SW14-TBR* (mục 3.3.5.1). Tuy nhiên, để có được đánh giá chính xác hơn, các phân tích cũng cần được thực hiện ở thế hệ tiếp theo (với số lượng mẫu phân tích lớn hơn).



**Hình 3.36. Hình thái cây lúa TBR225 chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR* T<sub>1</sub>**

**Ghi chú:** Cây lúa TBR225 đối chứng (không chỉnh sửa gen) (bên trái) và cây lúa TBR225 chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR* T<sub>1</sub> (dòng D-25.2) (bên phải) ở giai đoạn trổ bông.

Gần đây, hệ thống CRISPR/Cas9 đã trở thành một công cụ mạnh mẽ để chỉnh sửa gen ở nhiều sinh vật trong đó có cả thực vật. Với những ưu thế về hiệu quả chỉnh sửa gen, hệ thống này đã được sử dụng rộng rãi để cải thiện các đặc điểm nông học quan trọng của những cây trồng chính như cải dầu, cà chua, đậu tương, gạo, lúa mì và ngô [101]. Ngoại trừ các giống lúa tham chiếu *japonica* có khả năng tái sinh cao trong các thí nghiệm chuyển gen như Kitaake và Nipponbare, số lượng các nghiên cứu về việc cải tiến các giống lúa ưu tú *indica* về các tính trạng năng suất, chất lượng và chống chịu stress sinh học, phi sinh học bằng cách sử dụng công nghệ CRISPR/Cas9 cũng đang dần tăng lên, nhưng vẫn còn khá hạn chế [25, 71, 94, 122]. TBR225 là giống lúa *indica* với nhiều ưu điểm [1] nhưng

vẫn còn hạn chế là dễ nhiễm bệnh bạc lá, mẫn cảm với tất cả isolate VXO đã thử nghiệm (mục 3.1.1.3). Tiền đề để tạo ra chiến lược chỉnh sửa gen hiệu quả đối với giống lúa này là xác định các TALE “độc” chính của các isolate VXO hoạt hóa các gen chức năng tương ứng trên cây lúa TBR225. Oliva và cộng sự (2019) trên cơ sở phân tích TALE từ 60 chủng vi khuẩn *Xoo* thu được đã xác định được các gen *S* trên giống lúa Kitaake, IR64, Shiherang-sub1 liên quan đến độc tính gây bệnh của các chủng vi khuẩn này, từ đó sử dụng công cụ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa ba gen *OsSWEET11*, *OsSWEET13* và *OsSWEET14* tạo ra các dòng lúa kháng được tất cả các chủng *Xoo* thu thập ban đầu [94]. Trong nghiên cứu này, trên cơ sở xác định được TALE của các VXO hoạt hóa sự biểu hiện tương ứng trên gen *OsSWEET13* và *OsSWEET14* của giống lúa TBR225, hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 được thiết kế đã tạo ra các đột biến thể hiện phổ kháng rộng hơn so với việc thiết kế cấu trúc chỉnh sửa gen khi chưa có hiểu biết chính xác về tương tác giữa vi khuẩn *Xoo* và cây lúa TBR225, cây lúa chỉ kháng được VXO\_11 (mục 3.3.5). Những kết quả này cũng chứng tỏ rằng hệ thống CRISPR/Cas9 là công cụ tiềm năng trong việc chỉnh sửa đa gen để cải thiện những tính trạng mong muốn khác ngoài khả năng kháng bệnh. Cụ thể, khi chỉnh sửa đồng thời các gen *pyl1/4/6* mã hóa thụ thể ABA trên lúa, Maio và cộng sự (2018) đã thu được dòng lúa có khả năng sinh trưởng phát triển tốt và vẫn duy trì trạng thái ngủ của hạt như cây lúa đối chứng [89]. Tóm lại, những kết quả nghiên cứu trên đã góp phần minh chứng cho triển vọng của công nghệ CRISPR/Cas9 trong việc tạo ra giống lúa TBR225 kháng bạc lá và có thể mở rộng ở nhiều giống lúa thương mại khác trong tương lai.



## KẾT LUẬN

Từ các kết quả thu được trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

1. Đã phân lập, định danh được 15 isolate VXO có độc tính mạnh với giống lúa TBR225 từ 9 tỉnh trồng lúa phía Bắc trong giai đoạn từ 2016-2018. Ba isolate VXO đại diện thu thập trước (VXO\_11) và trong (VXO\_80 và VXO\_100) giai đoạn 2016-2018 đã được giải trình tự hệ gen đầy đủ. VXO\_11, VXO\_80 và VXO\_100 mang gen mã hóa TALE *AvrXa7*; VXO\_80 và VXO\_100 mang gen mã hóa TALE *PthXo2(A)*. Ba isolate VXO hoạt hóa sự biểu hiện của *OsSWEET13* chứa EBE *PthXo2(A)* và *OsSWEET14* chứa EBE *AvrXa7* trên giống lúa TBR225.

2. Đã thiết kế thành công hệ thống CRISPR/Cas9 cho phép chỉnh sửa đồng thời 4 vị trí khác nhau trong hệ gen lúa. Đã thiết kế được 4 trình tự crRNA nhận biết EBE *PthXo2(A)* và *AvrXa7* để tạo cấu trúc vector chuyển gen biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa đồng thời 2 promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR* của giống lúa TBR225.

3. Đã chuyển thành công cấu trúc T-DNA chỉnh sửa *SW14-TBR* vào lúa TBR225 và tạo được 11 dòng lúa mang đột biến trên *SW14-TBR* ở dạng đồng hợp không mang cấu trúc T-DNA trong hệ gen. Đã chứng minh được *OsSWEET14*/EBE *AvrXa7* đóng vai trò quyết định tới độc tính của isolate VXO\_11 và đóng vai trò quan trọng đối với độc tính của isolate VXO\_80 và VXO\_100 trên giống lúa TBR225. Các đột biến khác nhau trên *SW14-TBR* có ảnh hưởng khác nhau đến tương tác của VXO với gen *S OsSWEET14*; một số dạng đột biến đã ức chế quá trình hoạt hóa biểu hiện *OsSWEET14* của 3 isolate đại diện. Tất cả các đột biến trên *SW14-TBR* không làm thay đổi một số đặc điểm nông học chính của dòng lúa chỉnh sửa gen T<sub>2</sub> so với cây lúa TBR225 đối chứng. Ba dòng lúa S-7.5, S-17.10 và S-23.34 mang đột biến *SW14-TBR* kháng với isolate VXO\_11 và kháng nhẹ hoặc không kháng/mẫn cảm với isolate VXO\_80 và VXO\_100.

4. Đã chuyển thành công cấu trúc T-DNA chỉnh sửa đồng thời hai promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR* vào lúa TBR225 và thu được 12 dòng lúa mang đột

biên trên trình tự EBE của cả hai promoter này ở dạng đồng hợp không mang cấu trúc T-DNA trong hệ gen. Đã bước đầu xác định được độc tính của isolate VXO\_80 trên giống lúa TBR225 được quyết định bởi cả *OsSWEET13/EBE PthXo2(A)* và *OsSWEET14/EBE AvrXa7*. Sáu dòng chỉnh sửa gen T<sub>1</sub> (D-12.1, D-12.7, D-12.28, D-12.31, D-25.2 và D-25.3) kháng đồng thời với cả hai isolate VXO\_11 và VXO\_80 và có đặc điểm nông học tương đương với giống lúa TBR225 đối chứng không chỉnh sửa gen.

## KIẾN NGHỊ

Dựa trên các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi đưa ra một số hướng nghiên cứu tiếp theo như sau:

–Tiếp tục phân tích tính ổn định di truyền, đánh giá biểu hiện gen *OsSWEET13*, *OsSWEET14* và khả năng kháng bệnh bạc lá của các dòng lúa chỉnh sửa đồng thời 2 promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR* ở các thế hệ tiếp theo (T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>...)

–Tiếp tục thu thập và phân tích TALome của quần thể vi khuẩn *Xoo* Việt Nam để có chiến lược phù hợp cho công tác nghiên cứu chọn tạo giống cây trồng kháng bệnh bạc lá phổ rộng và bền vững.

–Tiếp tục mở rộng nghiên cứu chỉnh sửa gen cải tạo tính kháng bạc lá bằng hệ thống CRISPR/Cas9 trên các giống lúa chủ lực khác.

## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Phuong Nguyen Duy<sup>co</sup>, **Dai Tran Lan<sup>co</sup>**, Hang Pham Thu, Huong Phung Thi Thu, Ha Nguyen Thanh, Ngoc Phuong Pham, Huong Bui Thi Thu, Tran Bao Manh, Sebastien Cunac, Hoi Xuan Pham (2021), “Improved bacterial leaf blight disease resistance in the major elite Vietnamese rice cultivar TBR225 via editing of the *OsSWEET14* promoter”, *Plos One* 16(9), pp. e0255470.
2. Phạm Thu Hằng, **Trần Lan Đài**, Nguyễn Văn Cửu, Phạm Thị Vân, Đỗ Thị Hạnh, Phạm Xuân Hội, Nguyễn Duy Phương (2021), “Xây dựng quy trình chuyển gen vào giống lúa TBR225 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 417, tr. 66-73.
3. **Trần Lan Đài**, Phạm Thu Hằng, Cao Lệ Quyên, Phạm Thị Vân, Phạm Xuân Hội, Nguyễn Duy Phương (2022), “Đặc điểm di truyền đột biến của các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa promoter *OsSWEET14*”, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* 20(5), tr. 576-583.
4. **Trần Lan Đài**, Phùng Thị Thu Hương, Cao Lệ Quyên, Nguyễn Văn Cửu, Nguyễn Thị Thu Hà, Phạm Xuân Hội, Nguyễn Duy Phương (2022), “Thiết kế cấu trúc chỉnh sửa gen *OsSWEET* liên quan đến bệnh bạc lá trên lúa TBR225”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 11, tr. 11-18.
5. Pham Phuong Ngoc, **Tran Lan Dai**, Do Thi Hanh, Nguyen Quang Huy, Nguyen Duy Phuong (2022), “Functional characterization of the *OsSWEET13* promoter involved in the infection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) in rice cultivar TBR225”, *Academia Journal of Biology* 44(3), pp. 57-65.
6. **Trần Lan Đài**, Phạm Thu Hằng, Nguyễn Thị Thu Hà, Nguyễn Thanh Hà, Phạm Xuân Hội, Nguyễn Duy Phương (2023), “Nghiên cứu tính kháng bệnh bạc lá của các dòng lúa TBR225 đột biến promoter *OsSWEET14*”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 15, tr. 13-20.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tài liệu Tiếng Việt

1. Trần Mạnh Báo, Trần Thị Hợp, Trần Thị Tiệc, Nguyễn Thị Nhung, Nguyễn Văn Hoan (2016), “Kết quả chọn tạo giống lúa TBR225”, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* 9(14), tr. 1360-1367.
2. Nguyễn Thúy Diệp (2019), *Nghiên cứu tích hợp gen kháng bệnh bạc lá vào một số dòng/giống lúa phục vụ chọn tạo giống*, Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Hà Nội.
3. Phạm Thu Hằng, Đàm Quang Hiếu, Phan Tuấn Nghĩa, Phạm Xuân Hội (2016), “Thiết kế vector và chuyển gen *OsNAC1* liên quan đến tính chịu hạn vào giống lúa J02 (*Oryza sativa* L. japonica)”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 14(2), tr. 1-7.
4. Lã Văn Hiền, Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Xuân Vũ, Bùi Tri Thức, Ngô Xuân Bình, Nguyễn Tiến Dũng (2020), “Nghiên cứu khả năng tái sinh *in vitro* ở một số giống lúa (*Oryza sativa* L.) phục vụ nghiên cứu chuyển gen”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 11, tr. 11-16.
5. Lã Vinh Hoa, Tống Văn Hải, Phan Hữu Tôn, Trần Minh Thi, Li Yang Rui (2010), “Khảo sát nguồn gen cây lúa mang gen kháng bệnh bạc lá bằng chỉ thị phân tử DNA”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 8, tr. 9-16.
6. Phan Thị Hương, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Thị Thùy Linh, Nguyễn Tràng Hiếu, Ninh Thị Thảo (2014), “Xây dựng hệ thống tái sinh *in vitro* trên cây lúa”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 12(8), tr. 1249-1257.
7. Phùng Thị Thu Hương, Nguyễn Duy Phương, Phạm Xuân Hội (2018), “Nghiên cứu phân lập promoter *OsSWEET14* và thiết kế cấu trúc gRNA tăng cường khả năng kháng bệnh bạc lá của giống lúa TBR225”, *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn* 23, tr. 42-49.
8. Dương Đức Huy, Nguyễn Văn Hoan (2016), “Chuyển gen *Xa7* kháng vi khuẩn bạc lá vào dòng phục hồi để phát triển lúa lai hai dòng”, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* 14(12), tr. 1859-1867.
9. Nguyễn Thị Liên, Trần Thị Xuân Mai, Nguyễn Thị Pha (2012), “Phân lập và nhận diện vi khuẩn gây bệnh bạc lá (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) bằng kỹ thuật PCR đa thành phần”, *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 23a, tr. 155-164
10. Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Võ Thị Minh Tuyền, Chu Đức Hà, Nguyễn Thị Hồng,

- Trần Huy Dũng, Nguyễn Thị Thanh Thủy (2013), “Ứng dụng chỉ thị phân tử liên kết với các gen *Xa7*, *Xa21* để tạo vật liệu khởi đầu phục vụ cho công tác chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam* 2 (32), tr. 3-9.
11. Nguyễn Duy Phương, Phạm Thu Hằng, Phùng Thị Thu Hương, Phạm Xuân Hội (2019), “Chuyển cấu trúc chỉnh sửa promoter *OsSWEET14* vào giống lúa TBR225”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 17(1), tr. 65-73.
  12. Cao Lệ Quyên, Trần Tuấn Tú, Phạm Thị Vân, Phạm Xuân Hội (2019), “Xây dựng quy trình chuyển gen cho giống lúa Bắc Thơm số 7 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 11, tr. 25-30.
  13. Cao Lệ Quyên, Vũ Hoài Sâm, Nguyễn Thanh Hà, Nguyễn Thị Thu Hà, Phùng Thị Thu Hương, Trần Tuấn Tú, Phạm Xuân Hội, Nguyễn Duy Phương (2021), “Nghiên cứu đặc điểm di truyền đột biến promoter *OsSWEET14* trên các dòng lúa Bắc thơm 7 chỉnh sửa gen”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 18, tr. 74-81.
  14. Cao Lệ Quyên, Vũ Hoài Sâm, Nguyễn Thanh Hà, Phạm Thị Vân, Nguyễn Văn Cửu, Trần Tuấn Tú, Phạm Xuân Hội, Nguyễn Duy Phương (2022), “Nghiên cứu tính kháng bệnh bạc lá của các dòng lúa Bắc thơm 7 đột biến promoter *OsSWEET14*”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 10, tr. 3-9.
  15. Lưu Văn Quyết, Nguyễn Thị Mai Hương, Nguyễn Thị Minh, Nguyễn Thị Phương Nga, Đỗ Thị Hương, Trương Thị Thúy (2016), “Xác định gen kháng bạc lá hữu hiệu phục vụ chọn tạo giống lúa cho các tỉnh phía Bắc”, *Kỷ yếu Hội thảo Quốc gia về Khoa học cây trồng lần thứ hai*, tr. 325-330.
  16. Vũ Hoài Sâm, Nguyễn Thanh Hà, Cao Lệ Quyên, Nguyễn Duy Phương, Phạm Xuân Hội (2019), “Nghiên cứu vai trò gen *OsSWEET14* trong quá trình xâm nhiễm của vi khuẩn gây bệnh bạc lá trên lúa Bắc thơm 7”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 2(353), tr. 13-19.
  17. Phạm Thiên Thành, Tăng Thị Diệp, Tống Thị Huyền, Nguyễn Trí Hoàn, Dương Xuân Tú, Lê Thị Thanh (2020), “ Ứng dụng chỉ thị phân tử ADN chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam* 7(116), tr. 29-35.
  18. Nguyễn Thị Tho, Nguyễn Huy Chung, Nguyễn Tiến Hưng, Lê Thị Phương Lan, Lâm Thị Nhung, Lê Thị Trang, Đinh Xuân Hoàn (2022), “Cấu trúc quần thể vi khuẩn

- Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh bạc lá lúa ở vùng đồng bằng sông Hồng”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam* 133, tr. 56–60.
19. Phan Hữu Tôn (2016), “Khảo sát khả năng kháng bệnh bạc lá, đạo ôn, rầy nâu của 4 giống lúa phục tráng: Nếp Đèo Đàng, Tẻ Pude, Plechâu và Khẩu Dao”, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* 14 (4), tr. 551-559.
  20. Phan Hữu Tôn, Trịnh Thanh, Nguyễn Văn Giang, Nguyễn Văn Hùng, Tống Văn Hải (2013), “Khảo sát nguồn gen lúa nếp kháng bệnh bạc lá”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 6 (11), tr. 886-891.
  21. Dương Xuân Tú, Phạm Thiên Thành, Tăng Thị Diệp, Tống Thị Huyền, Lê Thị Thanh, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Trí Hoàn (2017), “Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa thơm kháng bệnh bạc lá cho các tỉnh phía Bắc”, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp* 60(2), tr. 59-64.

### **Tài liệu Tiếng Anh**

22. Antony G., Zhou J., Huang S., Li T., Liu B., White F., Yang B. (2010), “Rice *xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene *Os11N3*”, *The Plant Cell* 22, pp. 3864–3876.
23. Arulganesh T., Kumam Y., Kumar K.K., Arul L., Kokiladevi E., Nakeeran S., Varanavasiappan S., Manonmani S., Sudhakar D. (2021), “Genome editing of elite rice cultivar CO51 for bacterial leaf blight resistance”, *Electronic Journal of Plant Breeding* 12, pp. 1060-1068.
24. Azizi M.M.F., Lau H.Y. (2022), “Advanced diagnostic approaches developed for the global menace of rice diseases: a review”, *Canadian Journal of Plant Pathology* 544(442), pp. 627-651.
25. Blanvillain–Baufumé S., Reschke M., Solé M., Auguy F., Doucoure H., Szurek B., Meynard D., Porterfaix M., Cunnac S., Guiderdoni E., Boch J., Koebnik R. (2017), “Targeted promoter editing for rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* reveals differential activities for *SWEET14*–inducing TAL effectors”, *Plant Biotechnology Journal* 15, pp. 306–317.
26. Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S. (2009), “Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors”, *Science* 326, pp. 1509–1512.
27. Bogdanove A.J., Schornack S., Lahaye T. (2010), “TAL effectors: Finding plant

- genes for disease and defense”, *Current Opinion in Plant Biology* 13, pp. 394 - 401.
28. Bogdanove A.J., Schornack S., Lahaye T. (2010), “TAL effectors: finding plant genes for disease and defense”, *Current Opinon in Plant Biology* 13, pp. 394–401.
  29. Bolser D., Staines D.M., Pritchard E., Kersey P. (2016), “Ensembl Plants: Integrating Tools for Visualizing, Mining, and Analyzing Plant Genomics Data”, *Methods in Molecular Biology* 1374, pp. 115-40.
  30. Borkar S.G., Yumlembam R.A. (2016), *Bacterial diseases of crop plants*, CRC Press, Florida.
  31. Bortesi L., Fischer R. (2015), “The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond”, *Biotechnology Advances* 33(1), pp. 41-52.
  32. Chen H., Huh J.H., Yu Y.C., Ho L.H., Chen L., Tholl D., Frommer W.B., Guo W.J. (2015), “The *Arabidopsis* vacuolar sugar transporter SWEET2 limits carbon sequestration from roots and restricts *Pythium* infection”, *The Plant Journal* 83, pp. 1046-1058.
  33. Chen K., Wang Y., Zhang R., Zhang H., Gao C. (2019), “CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture”, *Annual Review of Plant Biology* 70, pp. 667-697.
  34. Chen L.Q., Hou B.H., Lalonde S., Takanaga H., Hartung M.L., Qu X.Q. (2010), “Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens”, *Nature* 468, pp. 527–532.
  35. Chen L.Q., Qu X.Q., Hou B.H., Sosso D., Osorio S., Fernie A.R. (2012), “Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport” *Science* 335, pp. 207–211.
  36. Chen S., Lin X.H., Xu C.G., Zhang Q.F. (2000), “Improvement of bacterial blight resistance of Minghui 63, an elite restorer line of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection”, *Crop Science* 40(1), pp.239-244.
  37. Cheng Q., Mao W., Xie W., Liu Q., Cao J., Yuan M., Zhang Q., Li X., Wang S. (2017), “Characterization of a disease susceptibility locus for exploring an efficient way to improve rice resistance against bacterial blight”, *Science China Life Sciences* 60, pp. 298–306.



38. Chong J., Piron M.C., Meyer S., Merdinoglu D., Bertsch C., Mestre P. (2014), “The SWEET family of sugar transporters in grapevine: *VvSWEET4* is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*”, *Journal of Experimental Botany* 65, pp. 6589–6601.
39. Chu Z., Fu B., Yang H., Xu C., Li Z., Sanchez A., Park Y. J., Bennetzen J. L., Zhang Q., Wang S. (2006a), “Targeting *xa13*, a recessive gene for bacterial blight resistance in rice”, *Theoretical and Applied Genetics* 112, pp. 455–461.
40. Chukwu S.C., Rafii M.Y., Ramlee S.I., Ismail S.I, Oladosu Y., Okporie E., Onyishi G., Utobo E., Ekwu L., Swaray S., Jalloh M. (2019), “Marker-assisted selection and gene pyramiding for resistance to bacterial leaf blight disease of rice (*Oryza sativa* L.)”, *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 33, pp. 440-455.
41. Cohn M., Bart R.S., Shybut M., Dahlbeck D., Gomez M., Morbitzer R., Hou B., Frommer W.B., Lahaye T., Staskawicz B.J. (2014), “*Xanthomonas axonopodis* virulence is promoted by a transcription activator-like effector mediated induction of a SWEET sugar transporter in cassava”, *Molecular Plant Microbe Interactions* 27, pp. 1186–1198.
42. Dehairs J., Talebi A., Cherifi Y., Swinnen J.V. (2016), “CRISP-ID: decoding CRISPR mediated indels by Sanger sequencing”, *Scientific Report* 6, pp. 28973.
43. Doench J.G., Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E.W., Donovan K.F., Smith I., Tothova Z., Wilen C., Orchard R., Virgin H. W., Listgarten J., Root D.E. (2016), “Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9”, *Nature Biotechnology* 34 (3), pp. 184-191.
44. Dokku P., Das K.M., Rao G.J.N. (2013), “Genetic enhancement of host plant-resistance of the Lalat cultivar of rice against bacterial blight employing marker-assisted selection”, *Biotechnology Letters* 35, pp. 1339–1348.
45. Doyle J. J., Doyle J. L. (1990), “Isolation of plant DNA from fresh tissue”, *Focus* 12, pp. 13–15.
46. Ellur R.K., Khanna A., Yadav A., Pathania S., Rajashekara H., Singh V.K., Krishnan S.G., Bhowmick P.K, Nagarajan M, Vinod KK, Prakash G, Mondal K.K, Singh N.K, Prabhu K.V., Singh A.K. (2016), “Improvement of basmati rice varieties for resistance to blast and bacterial blight diseases using marker assisted backcross breeding”, *Plant Science* 242, pp. 330–341.

47. Erkes A., Mücke S., Reschke M., Boch J., Grau J. (2019), “PrediTALe: a novel model learned from quantitative data allows for new perspectives on TALE targeting”, *PLoS Computational Biology* 15, pp. e1007206.
48. Feng C., Han J., Han X., Jiang J. (2015), “Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the *SWEET* gene family in tomato”, *Gene* 573, pp. 261–272.
49. Fiyaz R. A., Shivani D., Chaithanya K., Mounika K., Chiranjeevi M., Laha G. S., Viraktamath B.C., Rao L. V. S., Sundaram R. M. (2022), “Genetic improvement of rice for bacterial blight resistance: Present Status and future prospects”, *Rice Science* 29(2), pp. 118 – 132.
50. Furuya N., Taura S., Goto T., Thuy B.T, Ton P.H., Tsuchiya K., Yoshimura A. (2012), “Diversity in Virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* from Northern Vietnam”, *Japan Agricultural Research Quarterly* 46 (4), pp. 329-338.
51. Gu K., Tian D., Qiu C., Yin Z. (2009), “Transcription activator-like type III effector AvrXa27 depends on OsTFIIAγ5 for the activation of Xa27 transcription in rice that triggers disease resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*”, *Molecular in Plant Pathology* 10, pp. 829–835.
52. Gupta P.K., Balyan H.S, Gautam T. (2021), “*SWEET* genes and TAL effectors for disease resistance in plants: Present status and future prospects”, *Molecular Plant Pathology* 22(8), pp. 1014-1026.
53. Hoang D.D., Nghi K.O., Nguyen D.T, Pham V.D., Le C.L. (2008), “Pathotype Profile of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates from the rice ecosystem in Cuulong River Delta”, *Omonrice* 16, pp. 34-40.
54. Hsu Y.C., Chiu C.H., Yap R., Tseng Y.C., Wu Y.P. (2020), “Pyramiding bacterial blight resistance genes in Tainung82 for broad- spectrum resistance using marker-assisted selection”, *International Journal of Molecular Sciences* 21(4), pp. 1281.
55. Hu Y., Zhang J., Jia H., Sosso D., Li T., Frommer W.B., Yang B., White F.F., Wang N., Jones J.B. (2014), “Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease”, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States* 111, pp. 521–529.
56. Huang S., Antony G., Li T., Liu B., Obasa K., Yang B., White F.F. (2016), “The broadly effective recessive resistance gene *xa5* of rice is a virulence effector-dependent quantitative trait for bacterial blight”, *Plant Journal* 86(2), pp. 186-194.

57. Hummel A.W., Doyle E.L., Bogdanove A.J. (2012), “Addition of transcription activator-like effector binding sites to a pathogen strain-specific rice bacterial blight resistance gene makes it effective against additional strains and against bacterial leaf streak”, *New Phytologist* 195, pp. 883–893.
58. Hutin M., Sabot F., Ghesquière A., Koebnik R., Szurek B. (2015), “A knowledge-based molecular screen uncovers a broad-spectrum *OsSWEET13* resistance allele to bacterial blight from wild rice”, *The Plant Journal* 84, pp. 694–703.
59. Hutin M., Sabot F., Ghesquiere A., Koebnik R., Szurek, B. (2015b), “A knowledge-based molecular screen uncovers a broad spectrum *OsSWEET14* resistance allele to bacterial blight from wild rice”, *The Plant Journal* 84, pp. 694–703.
60. Iyer A.S., McCouch S.R. (2004), “The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance”, *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, pp. 1348–1354.
61. Jain M., Nijhawan A., Tyagi A.K., Khurana J.P. (2006), “Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative realtime PCR”, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345(2), pp. 646–651.
62. Jeger M., Candresse T., Chatzivassiliou E., Dehnen-Schmutz K., Gilioli G., Grégoire J.C., Caffier D. (2018), “Pest categorisation of *Xanthomonas oryzae* pathovars *oryzae* and *oryzicola*”, *EFSA Journal* 16 (1), pp. 05109.
63. Ji G.H., Wei L.F., Wu Y.P., Bai X.H. (2008), “Biological control of rice bacterial blight by *Lysobacter antibioticus* strain 13–1”, *Biological Control* 45, pp. 288–296.
64. Ji J., Yang L., Fang Z., Zhang Y., Zhuang M., Lv H., Wang Y. (2022), “Plant SWEET famil of sugar transporters: Structure, evolution and biological functions”, *Biomolecules* 12, pp. 205.
65. Jiang F., Doudna J.A. (2017), “CRISPR-Cas9 structures and mechanisms”, *Annual Review Biophysics* 46(1), pp. 505–529.
66. Jiang N., Yan J., Shi Y., He Z., Wu Y., Zeng Q., Liu X., Peng J. (2020), “Resistance Genes and their Interactions with Bacterial Blight/Leaf Streak Pathogens (*Xanthomonas oryzae*) in Rice (*Oryza sativa* L.) - an Updated Review”, *Rice* 13, pp.3.
67. Joshi J. B., Arual L., Ramalingam J., Uthandi S. (2020), “Advances in the *Xoo*-rice pathosystem interaction and its exploitation in disease management”, *Journal of Biosciences* 45, pp. 112.

68. Jun L., Yan L., Ligeng M. (2019), “CRISPR/Cas9-Based Genome Editing and its Applications for Functional Genomic Analyses in Plants”, *Small Methods* 3, pp. 1800473.
69. Ke Y., Hui S., Yuan M. (2017), “*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* inoculation and growth rate on rice by clipping method”, *Bio-protocol* 7(19), pp. e2568.
70. Khalil A.M. (2020), “The genome editing revolution: review”, *Journal Genetic Engineering and Biotechnology* 18 (1), pp. 68.
71. Kim Y. A., Moon H., Park C.J. (2019), “CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of *Os8N3* in rice to confer resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*”, *Rice* 12, pp. 67.
72. Lang J.M., Hamilton J.P., Diaz M.G.Q., Van S.M.A., Burgos M.R.G., Vera Cruz C. M., Buell C.R., Tisserat N.A., Leach J.E. (2010), “Genomics-based diagnostic marker de-velopment for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola*”, *Plant Disease* 94, pp. 311-319.
73. Lee S.W., Han M., Park C.J, Seo Y.S., Bartkey L. E., Jeon J.S. (2011), “The molecular Mechanism of Rice Resistance to the Bacterial Blight Pathogen, *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*”, *Advances in Btanical Research* 60, pp. 51-87.
74. Li L., Li J., Zhang Y., Wang N. (2019), “Diffusible signal factor (DSF)-mediated quorum sensing modulates expression of diverse traits in *Xanthomonas citri* and responses of citrus plants to promote disease”, *BMC Genomics* 20(1), pp. 55.
75. Li S., Wang Y., Wang S., Fang A., Wang J., Liu L., Zhang K., Mao Y., Sun W. (2015), “The Type III Effector AvrBs2 in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* Suppresses Rice Immunity and Promotes Disease Development”, *Molecular Plant - Microbe Interactions* 28(8), pp. 869-80.
76. Li T., Huang S., Zhou J., Yang B. (2013), “Designer TAL effectors induce disease susceptibility and resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice”, *Molecular Plant* 6(3), pp. 781–789.
77. Li T., Liu B., Spalding M.H., Weeks D.P., Yang B. (2012), “High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice”, *Nature Biotechnology* 30, pp. 390–392.
78. Liang G., Zhang H., Lou D., Yu D. (2016), “Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing”, *Scientific Reports* 6, pp. 21451.

79. Liang Y., Biswas S., Kim B., Serres J., Septiningsih E. (2021), “Improved Transformation and Regeneration of *Indica* Rice: Disruption of *SUBIA* as a Test Case via CRISPR-Cas9”, *International Journal of Molecular Sciences* 22(13), pp. 6989.
80. Liu H., Ding Y., Zhou Y., Jin W., Xie K., Chen L.L. (2017), “CRISPR-P 2.0: an improved CRISPR/Cas9 tool for genome editing in plants”, *Molecular Plant* 10(3), pp. 530-532.
81. Liu M., Rehman S., Tang X. (2019), “Methodologies for improving HDR efficiency”, *New Phytologist* 9, pp.1-9.
82. Liu Q., Yuan M., Zhou Y., Li X., Xiao J., Wang, S. (2011), “A paralog of the MtN3/saliva family recessively confers race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* in rice”, *Plant Cell and Environment* 34, pp. 1958–1969.
83. Liu X., Zhou X., Li K., Wang D., Ding Y., Liu X., Luo J., Fang C. (2020), “A simple and efficient cloning system for CRISPR/Cas9-mediated genome editing in rice”, *PeerJ* 8, pp. e8491.
84. Liu Z., Dong H., Cui Y., Cong L., Zhang D. (2020), “Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria”, *Microb Cell Fact* 19(1), pp. 1-14.
85. Lu H., Patil P., Sluys M.V., White F.F., Ryan R.P., Maxwell Dow J., Rabinowicz P., Salzberg S.L., Leach J.E., Sonti R., Brendel V., Bogdanove A.J. (2008), “Acquisition 76 and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *Xanthomonas*”, *Plos One* 3(11): e3828.
86. Mei Y., Wang Y., Chen H., Sun Z.S., Da J.X. (2016), “Recent progress in CRISPR/Cas9 technology”, *Journal Genetics and Genomics* 43(2), pp. 63–75.
87. Mengstie M.A., Wondimu B. Z. (2021), “Mechanism and Application of CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing”, *Biologics: Target and Therapy* 15, pp. 353-361.
88. Mew T. W., Alvarez A. M., Leach J. E., Swings J. (1993), “Focus on bacterial blight of rice”, *Plant Disease* 77, pp. 5–12.
89. Miao C., Xiao L., Zou C., Zhao., Bressan R, Zhu J.K. (2018), “Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity”, *The Proceeding of the National Academy of Sciences* 115(23), pp. 6058-6063.
90. Moscou M. A., Bogdanove A. J. (2009), “A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors”, *Science* 326 (5959), pp. 1501.
91. Nino-Liu D.O., Ronald P.C., Bogdanove A.J. (2006), “*Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crops”, *Molecular Plant Pathology* 7(5), pp. 303- 324.

92. Nishimasu H., Ran F.A, Hsu P.D., Konermann S., Shehata S., Dohmae N. (2017), “Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA”, *Cell* 176(12), pp. 139–148.
93. Ogawa T., Yamamoto T., Khush G.S., Mew T.W. (1991), “Breeding of near-isogenic lines of rice with single genes for resistance to bacterial blight pathogen (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*)”, *Japan Journal of Breeding* 41, pp. 523–529.
94. Oliva R., Ji C., Atienza-Grande G., Huguet-Tapia J.C., Perez-Quintero A., Li T., Cunnac S., Yang B. (2019), “Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing”, *Nature Biotechnology* 37, pp. 1344–1350.
95. Patel S.J., Chauhan H.L., Mehta A.N., Gohil N.M. (2009), “Management of bacterial blight of rice with chemicals, botanicals and antagonists”, *Journal of Plant Disease Sciences* 4(2), pp. 208-211.
96. Patil G., Valliyodan B., Deshmukh R., Prince S., Nicander B., Zhao M., Sonah H., Song L., Lin L., Chaudhary J., Liu Y., Joshi T., Xu D., Nguyen H. T (2015), “Soybean (*Glycine max*) *SWEET* gene family: Insights through comparative genomics, transcriptome profiling and whole genome re-sequencing analysis”, *BMC Genomics* 16, pp. 520.
97. Pérez-Quinter A.L., Lamy L., Zarate C.A., Cunnac S., Doyle E., Bogdanove A. (2018), “DaTALbase: a database for genomic and transcriptomic data related to TAL effectors”, *Molecular Plant -Microbe Interactions* 31(4), pp. 471–480.
98. Pérez-Quintero A.L., Rodriguez-R L.M., Dereeper A., López C., Koebnik R., Szurek B. (2013), “An improved method for TAL effectors DNA-binding sites prediction reveals functional convergence in TAL repertoires of *Xanthomonas oryzae* strains”, *PLoS One* 8, pp. e68464.
99. Puchta H. (2005), “The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution”, *Journal of Experimental Botany* 56(409), pp. 1-14.
100. Qin J., Jiang Y., Lu Y., Zhao P., Wu B., Li H., Wang Y., Xu S., Sun Q., Liu Z. (2020), “Genome-wide identification and transcriptome profiling reveal great expansion of *SWEET* gene family and their wide-spread responses to abiotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.)”, *Journal of Integrative Agriculture* 19, pp. 1704–1720.
101. Razzaq A., Saleem F., Kanwa M., Mustafa G., Yousaf S., Imran Arshad H.M., Hameed M.K., Khan M.S., Joyia F.A. (2019), “Modern Trends in Plant Genome Editing: An Inclusive Review of the CRISPR/Cas9 Toolbox”, *International journal of molecular sciences* 20(16), pp. 4045.

102. Reinke R., Kim S.M., Kim B.K. (2018), “ Developing *japonica* rice introgression lines with multiple resistance genes for brown planthopper, bacterial blight, and rice stripe virus using molecular breeding”, *Molecular Genetics and Genomics* 293, pp. 1565-1575.
103. Sahoo K.K., Tribathi A.K., Pareek A., Sopory S.K., Pareek S.S. (2011), “An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivars”, *Plant Methods* 7(1), pp. 49.
104. Sahoo R.K., Tuteja N. (2012), “Development of *Agrobacterium*-mediated transformation technology for mature seed-derived callus tissues of indica rice cultivar IR64”, *GM crop & food* 3(2), pp. 123-128.
105. Sambrook J., Russel D.W. (2001), *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
106. Shekhar S., Sinha D., Kumari A. (2020), “An Overview of Bacterial Leaf Blight Disease of Rice and Different Strategies for its management”, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 9 (4), pp. 2250-2265.
107. Smith L.M., Sanders J.Z., Kaiser R.J., Hughes P., Dodd C., Connell C.R., Heiner C., Kent S.B., Hood L.E. (1986), “Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis”, *Nature* 321(6071), pp. 674–679.
108. Song C., Yang B. (2010), “Mutagenesis of 18 type III effectors reveals virulence function of XopZ(PXO99) in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*”, *Molecular Plant - Microbe Interactions* 23, pp. 893–902.
109. Song W., Wang G., Chen L., Kim H., Pi L., Holsten T., Gardner J., Wang B., Zhai W., Zhu L., Fauquet C., Ronald P. (1995), “A receptor kinaselike protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa21*”, *Science* 270, pp. 1804–1806.
110. Stemmer M., Thumberger T., Keyser M.D., Wittbrodt J., Mateo J.L. (2015), “CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool”, *PloS One* 10(4), pp. e0124633.
111. Streubel J., Pesce C., Hutin M., Koebnik R., Boch J., Szurak B. (2013), “Five phylogenetically close rice *SWEET* genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*”, *New Phytologist* 200(3), pp. 808-819.

112. Sudir S., Dini Y. (2016), “Composition and distribution of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pathotypes, the pathotypes of rice bacterial leaf blight in Indonesia”, *Agrivita Journal of Agricultural Science* 38(2), pp. 174-185.
113. Sun X., Cao Y., Yang Z., Xu C., Li X., Wang S., Zhang Q. (2004), “ *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein”, *The Plant Journal* 37, pp. 517–527.
114. Swings J., Van Den Moore M., Vauterin L., Hoste B., Gillis M., Mew T.W., Kerster K. (1990), “Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. nov., nom. rev.”, *International Journal of Systematic Evolutionary Bacteriology* 40(3), pp. 309–311.
115. Tian D., Yin Z. (2009), “Constitutive heterologous expression of *avrXa27* in rice containing the R gene *Xa27* confers enhanced resistance to compatible *Xanthomonas oryzae* strains”, *Molecular Plant Pathology* 10, pp. 29–39.
116. Tran Q.T., Lam T.H., Nguyen D.K. (2017), “Polulation diverisy of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing bacterial leaf blight in rice fiels of Can Tho”, *Journal of Biotechnology* 15 (4), pp.753-761.
117. Vega-Sa´nchez M. E., Zeng L., Chen S., Leung H., Wang G.L. (2008), “SPIN1, a K homology domain protein negatively regulated and ubiquitinated by the E3 ubiquitin ligase SPL11, is involved in flowering time control in rice”, *The Plant Cell* 20, pp. 1456–1469.
118. Vu Hoai Sam, Pham Thi Van, Nguyen Thanh Ha, Nguyen Thi Thu Ha, Phung Thi Thu Huong, Pham Xuan Hoi, Nguyen Duy Phuong, Cao Le Quyen (2021), “Design and transfer of *OsSWEET14*- editing T-DNA construct to Bac thom 7 rice cultivar”, *Academia Journal of Biology* 43(1), pp. 99-108.
119. Wang F., Wang C., Liu P., Lei C., Hao W., Gao Y., Liu Y.G., Zhao K. (2016), “Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas 9- targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene *OsERF922*”, *PLoS One* 11, pp. e0154027.
120. Wang K. (2006), *Agrobacterium Protocols, 2nd edition*, Methods Molecular Biology, Humana Press, Totowa, New Jersey.
121. Xu J., Jiang J., Dong X., Ali J., Mou T. (2012), “Introgression of bacterial blight (BB) resistance genes *Xa7* and *Xa21* into popular restorer line and their hybrids by molecular marker-assisted backcross (MABC) selection scheme”, *African Journal of Biotechnology* 11, pp. 8225–8233.



122. Xu Z., Xu X., Gong Q., Li Z., Li Y., Wang S., Yang Y., Ma W., Liu L., Zhu B., Zou L., Chen G. (2019), “Engineering Broad-Spectrum Bacterial Blight Resistance by Simultaneously Disrupting Variable TALE-Binding Elements of Multiple Susceptibility Genes in Rice”, *Molecular Plant*, 12 (11), pp.1434-1446.
123. Yan C., Shou H.W., Cheng Q.L., Shuang W., De Z.W., Shi X.D. (2004), “Improvement of resistance to bacterial blight by marker-assisted selection in a wide compatibility restorer line of hybrid rice”, *Rice Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences* 11(5), pp. 231–237.
124. Yang B., Sugio A., White F.F. (2006), “Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice”, *Proceeding of the National Academy of Science of America* 103(27), pp. 10503-10508.
125. Yang H., Ren S., Yu S. (2020), “Methods favoring homology-directed repair choice in response to CRISPR/cas9 induced-double strand breaks”, *International Journal of Molecular Sciences* 21(18), pp. 1–20.
126. Yang J., Luo D., Yang B., Frommer W.B., Eom J.S. (2018), “*SWEET11* and *15* as key players in seed filling in rice”, *New Phytologist* 218(2), pp. 604–615.
127. Yang L., Ding J., Zhang C., Jia J., Weng H., Liu W., Zhang D. (2005). “Estimating the copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR”, *Plant Cell Reports* 23(10-11), pp. 759-63.
128. Yap R., Hssu Y.C., Wu Y.P., Lin Y.R., Kuo C.W. (2016), “ Multiplex PCR genotyping for five bacterial blight resistance genes applied to marker-assisted selection in rice (*Oryza sativa*)”, *Plant Breeding* 135 (3), pp. 309-317.
129. Yoshimura S., Yamanouchi U., Katayose Y., Toki S., Wang Z.X., Kono I., Kurata N., Yano M., Iwata N., Sasaki T. (1998), “Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, pp. 1663- 1668.
130. Yu Y., Streubel J., Balzergue S., Champion A., Boch J., Koebnik R., Feng J., Verdier V., Szurek B. (2011), “Colonization of rice leaf blades by an African strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* depends on a new TAL effector that induces the rice nodulin-3 *Os11N3* gene”, *Molecular Plant Microbe Interactions* 24, pp. 1102–1113.
131. Yuan M., Ke Y., Huang R., Ma L., Yang Z., Chu Z., Xiao J., Li X., Wang S. (2016) “A host basal transcription factor is a key component for infection of rice by TALE-carrying bacteria”, *Eelife* 5, pp. e19605.

132. Yuan M., Wang S. (2013), “Rice *MtN3/saliva/SWEET* family genes and their homologs in cellular organisms”, *Molecular Plant* 6, pp. 665–667.
133. Zafar K., Khan M.Z., Amin I., Mukhtar Z., Yasmin S., Arif M., Ejaz K., Mansoor S. (2020), “Precise CRISPR-Cas9 Mediated Genome Editing in Super Basmati Rice for Resistance Against Bacterial Blight by Targeting the Major Susceptibility Gene”, *Frontier in Plant Science* 11, pp. 575.
134. Zaka A., Grande G., Coronejo T., Quibod I.L., Chen C.W., Chang S.J. Szurek B., Arif M., Cruz C.V., Oliva R. (2018), “Natural variations in the promoter of *OsSWEET13* and *OsSWEET14* expand the range of resistance against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*”, *PLoS One* 13, pp. e0203711.
135. Zeng X., Luo Y., Vu N.T.Q., Shen S., Xia K., Zhang M. (2020), “CRISPR/Cas9-mediated mutation of *OsSWEET14* in rice cv. Zhonghua11 confers resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* without yield penalty”, *BMC Plant Biology* 20, pp. 313.
136. Zhang A., Liu Y., Wang F. (2019), “Enhanced rice salinity tolerance via CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *OsRR22* gene”, *Molecular Breeding* 39, pp. : 47.
137. Zhang F. (2019), “Development of CRISPR-Cas systems for genome editing and beyond”, *Quarterly Reviews of Biophysics* 52, pp. E6.
138. Zhang Z., Li X., Jiang G., Xu Y., He Y. (2016), “Pyramiding of *Xa7* and *Xa21* for the improvement of disease resistance to bacterial blight in hybrid rice”, *Plant breeding* 125(6), pp. 600 – 605.
139. Zhou H., Liu B., Weeks D. P., Spalding M. H. And Yang B (2014), “Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice“, *Nucleic Acids Research* 42(17), pp. 10903-10914.
140. Zhou J., Peng Z., Long J., Sosso D., Liu B.O., Eom J.S., Huang S., Liu S., Cruz C.V., Frommer W.B., White F.F., Yang B. (2015), “Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice”, *The Plant Journal* 82, pp. 632–643.
141. Zuker. M. (2003), “Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction”, *Nucleic Acids Research* 31 (13), pp. 3406-3415.

## PHỤ LỤC

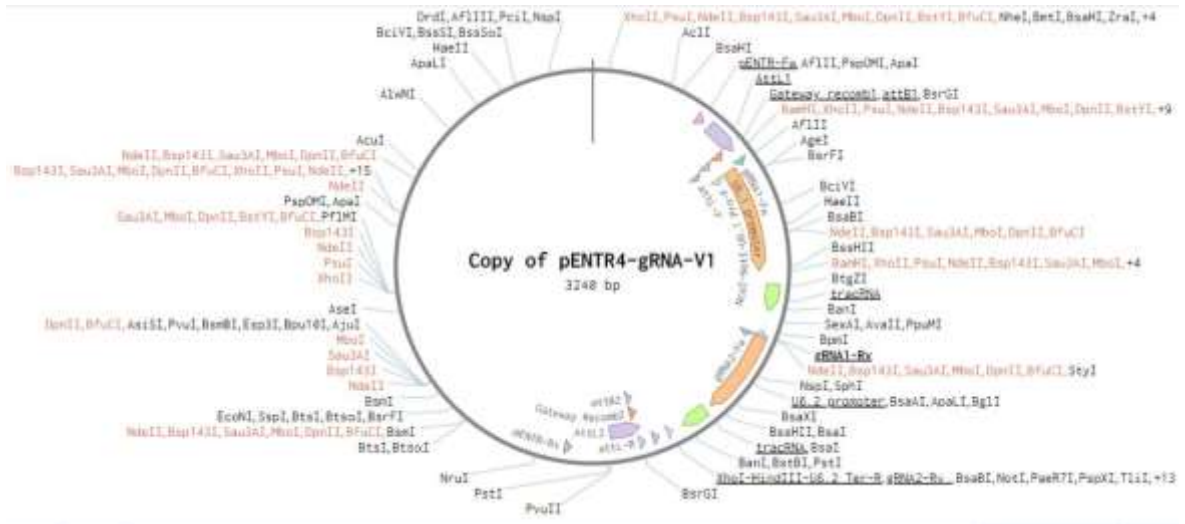
### Phụ lục 1. Một số gen/QTL kháng bệnh bạc lá đã được công bố

Tên gen kháng	Nhiễm sắc thể	Giống, dòng lúa đại diện	Nguồn	Phân lập/Nhân dòng
<i>Xa1</i>	4	Kogyoku, Java 14	Nhật Bản	+
<i>Xa2</i>		Rentai Emas II, Tẻ tép	Việt Nam	-
<i>Xa3/Xa26</i>	11	Wase Aikoku 3	Nhật Bản	+
<i>Xa4</i>		TKM6, IR20, IR22, IR72	Ấn Độ	+
<i>xa5</i>	5	DZ192, IR1545-339	Bangladesh	+
<i>Xa6/xa3</i>	11	Malagkit Sungsong Zenith	Hoa Kỳ	-
<i>Xa7</i>	6	DV85, DZ78	Bangladesh	-
<i>xa8</i>	7	PI231129	Hoa Kỳ	-
<i>Xa-9</i>	11	Khaolay Nhay	Lào	-
<i>Xa10</i>	11	Cas 209	Philippines	+
<i>Xa11</i>	3	RP 9-3	Philippines	-
<i>Xa12</i>	4	Kogyoku, Java 14	Nhật Bản	-
<i>xa13</i>	8	BJ1, Chinsurh E oroII	Ấn Độ	+
<i>Xa14</i>	4	TN1	Trung Quốc	-
<i>xa15</i>	N/A	M41	Nhật Bản	-
<i>Xa16</i>	N/A	Tẻ tép	Việt Nam	-
<i>Xa17</i>	N/A	Asominori	Nhật Bản	-
<i>Xa18</i>	N/A	IR24, Milyang 23, Toyonishiki	Nhật Bản	-
<i>xa19</i>	N/A	XM5	Philippines	-
<i>xa20</i>		XM6	Philippines	-
<i>Xa21</i>	NST11	<i>O. longistaminata</i>	Châu Phi, Mali	+
<i>Xa22 (t)</i>		Zachanglong	Trung Quốc	-
<i>Xa23</i>		<i>O. rufipogon</i>	Trung Quốc	+
<i>xa24</i>	2	DV86, DV85, Aus 295	Bangladesh	-
<i>xa25(t)</i>	12	HX-3, Minghui 63	Trung Quốc	+
<i>xa26(t)</i>	11	Minghui 63	Trung Quốc	-
<i>Xa27(t)</i>	6	<i>O. minuta</i> IRGC101141, IRBB27	Philippines	+

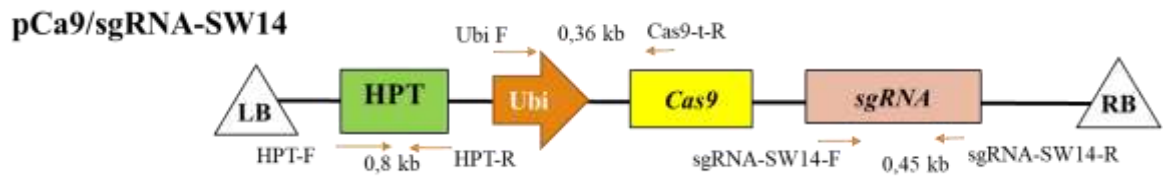
<i>xa28(t)</i>	N/A	Lota Sail	Bangladesh	-
<i>Xa29(t)</i>	1	B5	Tây Ban Nha, Bồ Đào Nha	-
<i>Xa30(t)</i>	11	<i>O. rufipogon</i> Y238	Ấn Độ	-
<i>xa31(t)</i>	4	Zhachanglong	Trung Quốc	-
<i>xa32(t)</i>	11	C4064	Úc	-
<i>Xa33</i>	7	<i>O. nivara</i>	Thái Lan	-
<i>Xa33 (t)</i>	6	Ba7, <i>O. nivara</i>	Thái Lan	-
<i>xa34(t)</i>	1	<i>O. brachyantha</i>	Sri Lanka	-
<i>Xa35 (t)</i>	11	<i>O. minuta</i>	Philippines	-
<i>Xa36(t)</i>	11	C4059	Trung Quốc	-
<i>Xa38</i>	4	<i>O. nivara</i> IRGC81825	Ấn Độ	-
<i>Xa39</i>	11	FF329	Ấn Độ, Philippines	-
<i>Xa40 (t)</i>	11	IR65482-7-216-1-2	Hàn Quốc	-
<i>xa41(t)</i>	11	Rice germlasn	-	+
<i>xa42</i>	3	XM14, đột biến của IR24	Nhật Bản	-
<i>Xa43(t)</i>	11	P8	Nhật Bản	-
<i>xa44(t)</i>	11	IR73571-3B-11-3-K3	Nhật Bản	-
<i>xa45(t)</i>	8	<i>O. glaberrima</i> IRGC102600B	Philippines	-
<i>Xa46(t)</i>	11	H120 đột biến	Nhật Bản	-

**Ghi chú:** N/A: chưa xác định ; +/- : đã/chưa được phân lập và nghiên cứu [49]

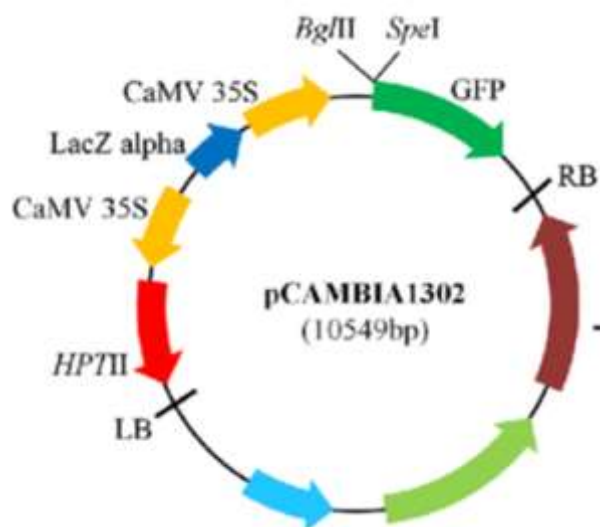
## Phụ lục 2. Sơ đồ cấu trúc vector pENTR4-V1



## Phụ lục 3. Sơ đồ cấu trúc vector pCas9/sgRNA [11]



## Phụ lục 4. Sơ đồ cấu trúc vector pCAMBIA1302



**Phụ lục 5. Trình tự các oligonucleotide sử dụng trong nghiên cứu**

Tên mồi	Trình tự	Gen/Vector	Kích thước (bp)
U6.1-Pro-F	<u>CCATGGGCGGCCGCAAGAACGAACTA</u> AGCCGG	[U6:sgRNA] , pEN-V1	915
U6.2-Ter-R	<u>CTCGAGAAGCTTGCCAGTGTGATGGAT</u>		
attL-F	GTACAAAAAAGCAGGCT	pEN-V1	1045
attL-R	GTACAAGAAAGCTGGGT		
BtgZI-crRNA1-SW13-F	<u>TGTTGAGAGGAACGAAGGGAGTTG</u>	crRNA1-SW13	
BtgZI-crRNA1-SW13-R	<u>AAACCAACTCCCTTCGTTCTCTC</u>		
BsaI-crRNA2-SW13-F	<u>GTGTGAGTTGTGGTGCTTTTATAT</u>	crRNA2-SW13	
BsaI-crRNA2-SW13-R	<u>AAACATATAAAAGCACCACAACCTC</u>		
BtgZI-crRNA1-SW14-F	<u>TGTTGCTTAGCACCTGGTTGGAGG</u>	crRNA1-SW14	
BtgZI-crRNA1-SW14-R	<u>AAACCCTCCAACCAGGTGCTAAGC</u>		
BsaI-crRNA2-SW14-F	<u>GTGTGTATATAAACCCCTCCAACC</u>	crRNA2-SW14	
BsaI-crRNA2-SW14-R	<u>AAACGGTTGGAGGGGGTTTATATAC</u>		
SW11-qPCR-F	AGTCGACGGGAGGGTACAG	OsSWEET11	185
SW11-qPCR-R	TTCGGGTACATGACGTAGGG		
SW13-qPCR-F	GCCTGTCCCTGCAGCATC	OsSWEET13	172
SW13-qPCR-R	CCGAACACCCCCACGTTT		
SW13-F	CCGTATCAGGATTCAGGAATA	SW13-TBR	615
SW13-R	CCAGCCATTTTTGTGTGCTA		
sgRNA-SW14-F	GTGTGGCTTGATGAGCTTAGCACC	pCas9/sgRNA-SW14	457
sgRNA-SW14-R	AAACGGTGCTAAGCTCATCAAGCC		
SW14-qPCR-F	ACTTGCAAGCAAGAACAGTAGT	OsSWEET14	168
SW14-qPCR-R	ATGTTGCCTAGGAGACCAAAGG		
SW14-Pro-F	AACAAAAAAAAGCTAGCAGA	SW14-TBR	711
SW14-In-R	CTTCGCCTTTGGTCTCCTAG		
Ubi-F	CCCTGCCTTCATACGCTATT	pCas9	361
Cas9-t-R	GCCTCGGCTGTCTCGCCA		
HPT-F [133]	AAGGAGGTGATCCAGCC	HPT, pCas9	806
HPT-R [133]	GAGTTTGATCCTGGCTCAG		
Actin-F [61]	TGATGGTGTGTCAGCCACACT	OsActin	230
Actin-R [61]	TGGTCTTGGCAGTCTCCATT		
EF1 $\alpha$ -F [61]	AGGCGCTGCTCAACTTCCCG	OsEF1 $\alpha$	101
EF1 $\alpha$ -R [61]	CACGCACTCACCGTCGCTCA		
Xo3756F [72]	CATCGTTAGGACTGCCAGAAG		331
Xo3756R [72]	GTGAGAACCACCGCCATCT		
Xoo80F [72]	GCCGCTAGGAATGAGCAAT		163
Xoo80R [72]	GCGTCCTCGTCTAAGCGATA		
Xoc3866F [72]	ATCTCCCAGCATGTTGATCG		691
Xoc3866R [72]	GCGTTCAATCTCCTCCATGT		

**Ghi chú:** Phần gạch chân là trình tự nhận biết của các enzyme cắt giới hạn; chữ in đậm chỉ nu được tổng hợp bổ sung thêm vào đầu 5' trình tự crRNA để tăng hiệu quả hoạt động dưới sự điều khiển của promoter U6

### Phụ lục 6. Thành phần môi trường AB

Thành phần	Nồng độ/hàm lượng
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g/l
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	1 g/l
CaCl <sub>2</sub>	0,01 g/l
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	2,5 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,3 g/l
KCl	0,15 g/l
Glucose	5 g/l
Agar	15 g/l

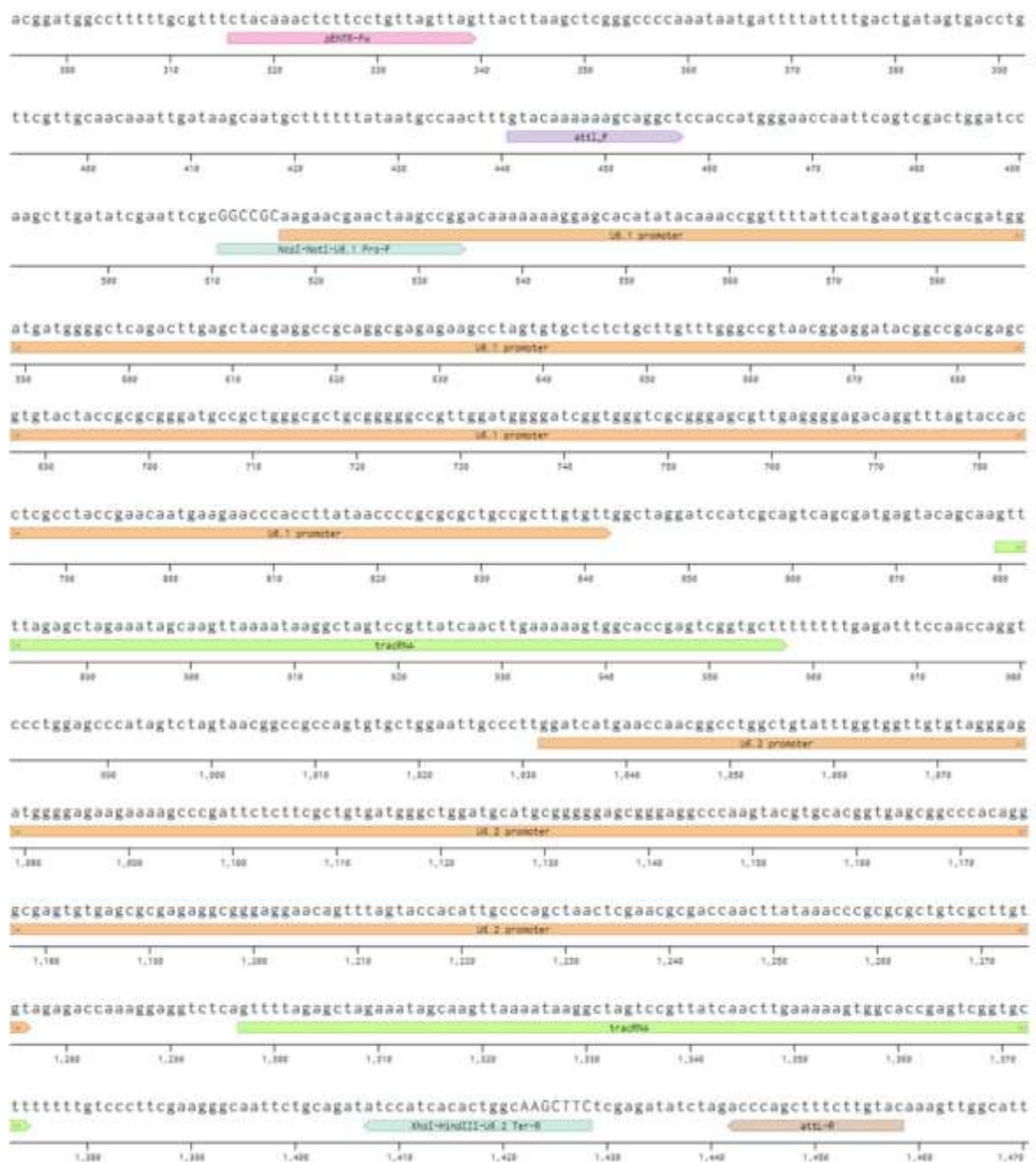
### Phụ lục 7. Thành phần môi trường MS và N6 cơ bản

Thành phần	Nồng độ/Hàm lượng	
	Môi trường MS	Môi trường N6
Muối MS	1 X	1X
Vitamin MS	1X	1 X
Sucrose	30 mg/L	-
Myoinositol	0,1 g/L	-
Casein	0,5 g/L	-
L-Proline	0,5 g/L	0,5 g/L
Agar	8,0 g/L	-

### Phụ lục 8. Thành phần môi trường tái sinh chồi

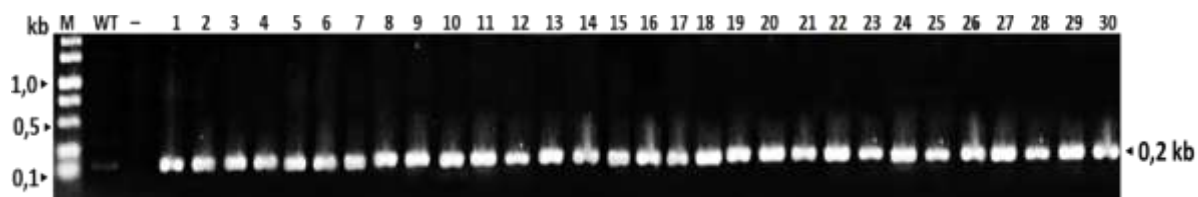
Môi trường	Thành phần môi trường
TS1	MS + 1 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP + 30 g/l sucrose + 2,5 g/l phytigel
TS2	MS + 1 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP + 30g/l sucrose + 2,5 g/l phytigel
TS3	MS + 1 mg/l NAA + 1,5 mg/l BAP + 30 g/l sucrose + 2,5 g/l phytigel
TS4	MS + 1 mg/l NAA + 2,0 mg/l BAP + 30g/l sucrose + 2,5 g/l phytigel

## Phụ lục 9. Kết quả giải trình tự cấu trúc biểu hiện [U6:sgRNA] trên pEN-V2



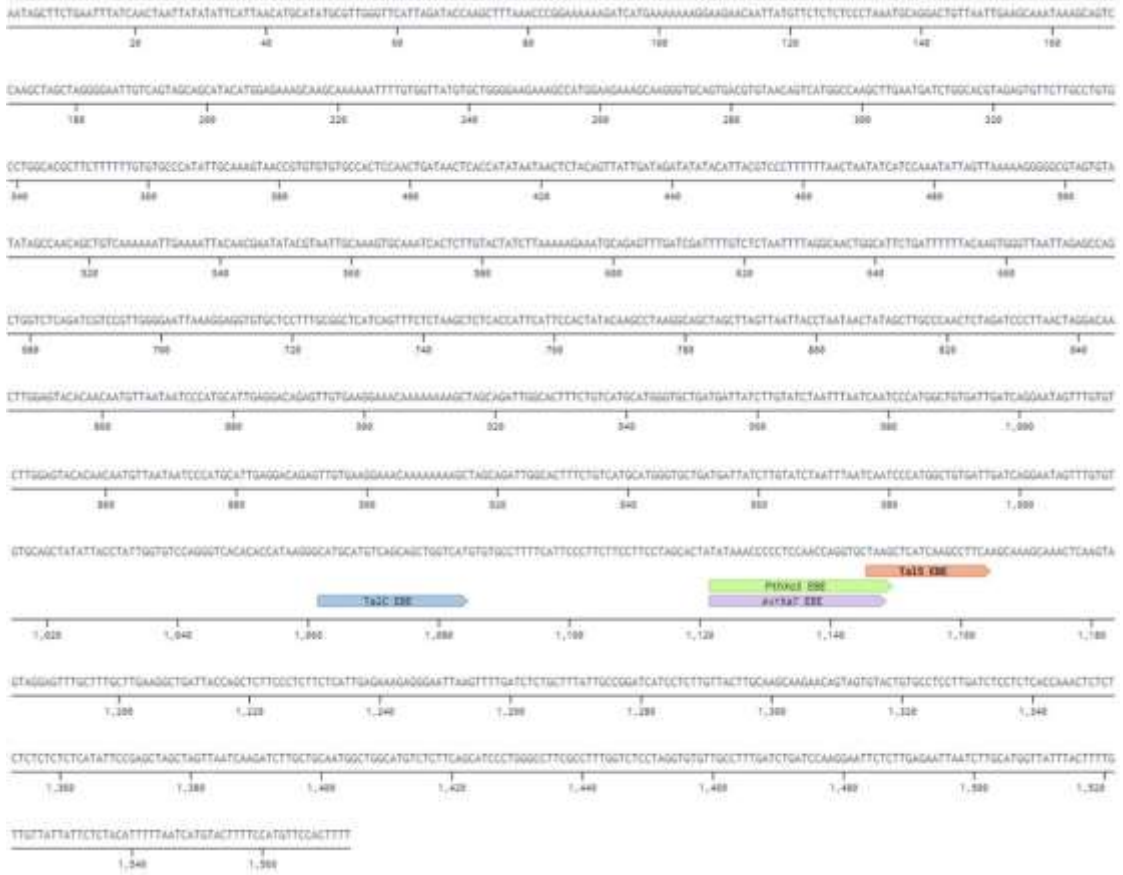


### Phụ lục 10. PCR cây lúa chuyển gen với môi đặc hiệu cho gen *Actin*



**Ghi chú:** Sản phẩm PCR với cặp môi *Actin-F/Actin-R* được điện di trên gel agarose 1,0%. Giếng 1-30: khuôn là mẫu DNA của cây lúa TBR225 tái sinh, giếng WT: đối chứng dương (khuôn là mẫu DNA của cây lúa TBR225 không chuyển gen); giếng (-): đối chứng âm (không bổ sung DNA khuôn).

### Phụ lục 11. Trình tự đoạn promoter *SW14-TBR*



### Phụ lục 12. Khả năng tạo hạt của cây lúa TBR225 chỉnh sửa *SW14-TBR* T<sub>0</sub>

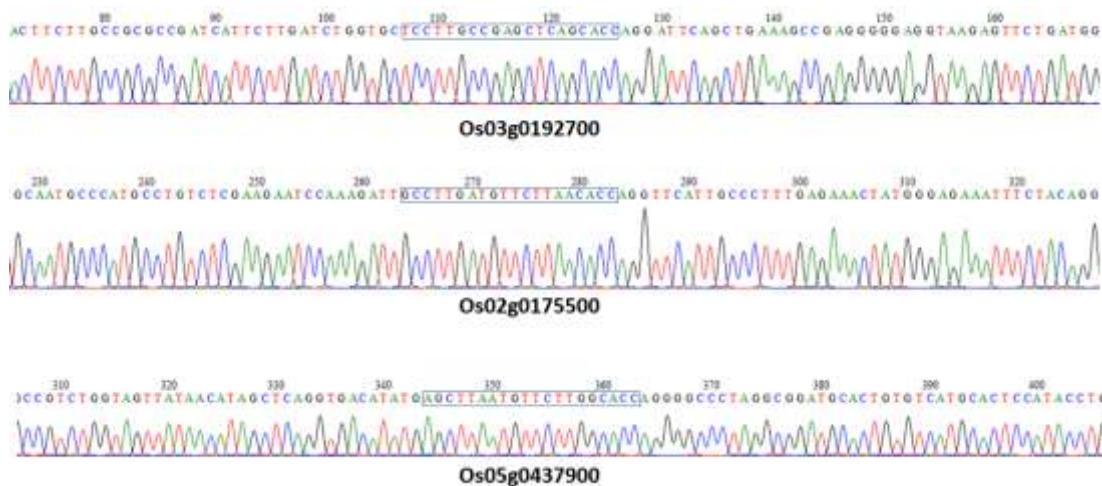
Đặc điểm	Tên dòng
Tạo hạt	S-1 (30); S-5 (40); S-7 (30); S-9 (37); S-12 (40); S-23 (30); S-24 (50); S-25 (60); S-34 (60); S-36 (100); S-4 (100); S-17 (70)
Không tạo hạt	S-26

**Ghi chú:** Kí tự trong ngoặc sau tên dòng thể hiện số hạt (chắc) thu được từ mỗi dòng lúa chỉnh sửa gen.

**Phụ lục 13. Các vị trí tương đồng với trình tự crRNA của cấu trúc pCas9/sgRNA-SW14 trong hệ gen lúa [7]**

<b>Trình tự tương đồng với crRNA</b>	<b>Vị trí</b>		<b>Tên gen</b>	<b>Trình tự mỗi giải trình tự</b>
G <b>CGAC</b> GATGA[GCTTAGCACC]	990	-	Os07g0298900	
G <b>ATTTGAT</b> TG[GCTTAGCACC]	3965	-	Os08g0130100	
A <b>GATTGAT</b> GG[G <b>TTTAGCACC</b> ]	1467	-	ENSRNA049471700	
G <b>CTTTGAT</b> CA[G <b>CTTAGCACC</b> ]	20942	-	Os04g0222250	
G <b>CTCTGAT</b> CA[G <b>CTTAGCACC</b> ]	7324	-	Os11g0617532	
G <b>CTCTGAT</b> CA[G <b>CTTAGCACC</b> ]	9408	-	Os10g0208900	
G <b>CCTTG</b> GTCA[G <b>CTCAGCACC</b> ]	2053	-	Os04g0113000	
T <b>CCTTG</b> CCGA[G <b>CTCAGCACC</b> ]	0	E	Os03g0192700	F: TGCCGTATGTTGGAGACAG R: AGCTCAGGATGGTAGCCACT
G <b>TTTTG</b> GTGA[G <b>GTAAGCACC</b> ]	370	-	Os01g0834600	
GG <b>TTTGAT</b> CA[G <b>CCCAGCACC</b> ]	8711	-	Os08g0356001	
GG <b>CCAGAG</b> GGA[A <b>CTTG</b> GCACC]	1584	-	Os01g0650200	
G <b>CTTTGAT</b> CA[G <b>CCCAGCACC</b> ]	7354	-	Os10g0410350	
G <b>CTTTGAT</b> CA[G <b>CCCAGCACC</b> ]	51821	-	Os06g0302650	
G <b>CCCTGAT</b> AA[G <b>CCCAGCACC</b> ]	4729	-	Os01g0865100	
G <b>CCCTGAT</b> CA[G <b>CCCAGCACC</b> ]	35470	-	Os12g0254201	
A <b>GCTTA</b> AATGT[T <b>CTTG</b> GCACC]	0	E	Os05g0437900	F: GCGGATAGTGGCAAGTTCCT R: GTGGTGCTGCGAAATGACTC
G <b>CCTTGAT</b> GT[T <b>CTTA</b> ACACC]	0	E	Os02g0175500	F: CAGCAAGGACATGACAGCCA R: GGGTATATCTGCGCCACACC
A <b>GCTAGAT</b> TA[G <b>CTTAGCTCC</b> ]	1715	-	Os02g0745000	

**Phụ lục 14. Giải trình tự xác định đột biến off-target trên dòng lúa S-7.5**



**Phụ lục 15. Khả năng tạo hạt của dòng lúa chỉnh sửa SW13-TBR và SW14-TBR T<sub>0</sub>**

Đặc điểm	Tên dòng
Tạo hạt	D-6 (10); D-7 (15); D-11 (80); D-12 (100); D-18 (120); D-21 (50); D-22 (13), D-25 (80); D-26 (110); D-30 (30); D-40 (12)
Không tạo hạt	D-67
<i>Ghi chú: Kí tự trong ngoặc sau tên dòng thể hiện số hạt (chắc) thu được từ mỗi dòng lúa chỉnh sửa gen.</i>	