

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

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Hà Nội – 2023

Công trình được hoàn thành tại:

Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội
Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. GS. TS. Phạm Xuân Hội** - Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam
- 2. TS. Nguyễn Duy Phương** - Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

Phản biện 1: **PGS.TS. Nguyễn Văn Việt**

Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

Phản biện 2: **PGS.TS. Phạm Bích Ngọc**

Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Phản biện 3: **PGS.TS. Bùi Thị Việt Hà**

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc Gia Hà Nội

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng cấp Đại học Quốc gia chấm luận án Tiến sĩ họp tại:
Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học

Vào hồi..... giờ....., ngày..... tháng.....năm 2023

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Trung tâm thông tin Thư viện Quốc gia
- Trung tâm Thư viện và Tri thức số, Đại học Quốc gia Hà Nội

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 mắc 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 không 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/ tạo 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 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 miễn 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 cơ chế gây bệnh trên giống lúa TBR225 của vi khuẩn *Xoo* thu thập từ các tỉnh phía Bắc Việt Nam
- Thiết kế cấu trúc biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa promoter *OsSWEET* trên giống lúa TBR225
- Tạo 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*

- Đánh giá đặc điểm nông học, tính kháng vi khuẩn *Xoo* của các dòng lúa chỉnh sửa gen

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. Isolate VXO_11 gây bệnh trên TBR225 thông qua một TALE độc duy nhất liên kết với *OsSWEET14*/EBE *AvrXa7*; trong khi độc tính của isolate VXO_80 và VXO_100 phụ thuộc vào 2 TALE liên kết đồng thời trên *OsSWEET13*/EBE *PthXo2(A)* và *OsSWEET14*/EBE *AvrXa7*. 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. Các dòng lúa mang đột biến trên trình tự đích có khả năng kháng các isolate VXO, không mang cấu trúc T-DNA và có kiểu hình tương tự với dòng lúa đối chứng không chỉnh sửa gen. 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 chủng 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 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.

6. Bố cục của luận án

Luận án gồm 156 trang với 20 bảng và 53 hình, bao gồm: Phần mở đầu (4 trang); Tổng quan tài liệu (38 trang) ; Vật liệu và phương pháp nghiên cứu (23 trang); Kết quả nghiên cứu và thảo luận (65 trang); Kết luận và kiến nghị (3 trang); Các công trình công bố liên quan đến luận án (1 trang); Tài liệu tham khảo (22 trang) với 141 tài liệu tham khảo gồm 2 thứ tiếng: tiếng Việt (21 tài liệu) và tiếng Anh (120 tài liệu); Phụ lục (8 trang).

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

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

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 canh tác 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.

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%. Bệnh không chỉ ảnh hưởng đến năng suất mà còn làm giảm chất lượng gạo do tác động đến các quá trình chuyên hóa trong cây (hô hấp, quang hợp...) ở giai đoạn trổ bông, làm tăng tỉ lệ hạt lép, hạt dễ dập nát khi xay. 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.

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.

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). 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. 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. 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. 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.

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 cao như vậy 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. Bên cạnh những ưu điểm trên, giống lúa TBR225 vẫn có nhược điểm là mẫn 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.

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

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) trên cơ chất glucose đã xác định được một loại chất vận chuyển đường mới từ *Arabidopsis thaliana*, và đặt tên là SWEET. 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. Cho đến nay, các gen mã hóa protein SWEET có mặt phổ biến ở cả sinh vật nhân sơ, động vật và thực vật. 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.

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. Những gen *SWEET* được hóa 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*. Hiểu biết về các cơ chế tương tác 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.

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; và đầu N chứa tín hiệu tiết loại III và tín hiệu chuyển vị. 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 đích ở cây chủ có liên quan đến tính miễn cảm với bệnh hoặc kháng bệnh.

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^A) và PthXo2/PthXo2.1/PthXo2.2 (chủng JXO1 và MAFF311018). *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. Bằng cách sử dụng hai TALE nhân tạo ArtTAL12 và ArtTAL15, các nhà nghiên cứu đã nhận thấy *OsSWEET12* và *OsSWEET15* cũng được hoạt hóa bởi các TALE này và có tiềm năng gây ra sự miễn cảm ở cây lúa với vi khuẩn *Xoo*. Điều đáng chú ý là các gen kháng bạc lá trong trình 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. Các kết quả nghiên cứu 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

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). 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. 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 một công cụ chỉnh sửa gen vô cùng triển vọng.

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, 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_{Kit}* 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. 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. 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. Các thành tựu nghiên cứu trên đã chứng tỏ triển vọng rất lớn của hướng tiếp cận tạo giống lúa kháng bệnh 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. Giống lúa IR24 (chuẩn nhiễm vi khuẩn *Xoo*) do Trung tâm Tài nguyên Thực vật cung cấp.

Mẫu bệnh phẩm bẹc 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).

2.1.2. Chủng vi sinh vật

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α 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); chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA 105 mang vector pCAMBIA1302 chứa gen chỉ thị *GFP* (*Green fluorescent protein*); bộ chủng vi khuẩn *Xoo* và chủng vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) được cung cấp bởi Bộ môn Bệnh học phân tử (Viện di truyền Nông nghiệp).

2.1.3. Vector và oligonucleotide

Vector pEN-V1 (mang cấu trúc biểu hiện sgRNA) được tạo ra từ khung vector pENTR4 (Invitrogen) 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. Vector pCas9/sgRNA-SW14 và pCAMBIA1302 mang gen chỉ thị *GFP* do Bộ môn Bệnh học phân tử (Viện Di truyền Nông nghiệp) cung cấp. Các oligonucleotide sử dụng trong nghiên cứu được thiết kế 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 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.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phương pháp vi sinh vật học: Phân lập vi khuẩn *Xoo* từ các mẫu bệnh thu thập được; nuôi cấy vi khuẩn *Xoo* để lây nhiễm nhân tạo trên cây lúa TBR225; nuôi cấy *E.coli* và *Agrobacterium tumefaciens* phục vụ cho thí nghiệm thiết kế cấu trúc T-DNA và chuyển gen vào lúa.

Phương pháp sinh học phân tử: Tách chiết và định lượng DNA từ lúa và vi khuẩn; tách chiết RNA từ lúa và đánh giá biểu hiện gen bằng RT-qPCR; nhân dòng và giải trình tự gen.

Phương pháp *in vitro*: chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa gen đích vào phôi trưởng thành của giống lúa TBR225 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Phương pháp gieo trồng lúa, đánh giá sinh trưởng, phát triển và tính kháng bệnh: Gieo trồng lúa trong điều kiện nhà lưới, theo dõi các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển chính của cây lúa chuyển gen: thời gian sinh trưởng, chiều cao cây, số nhánh, số hạt chắc/bông, năng suất cá thể.

Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được xử lý với giá trị trung bình và độ lệch chuẩn sử dụng phần mềm Excel; phân tích so sánh các giá trị trung bình bằng phần mềm SPSS. Trình tự DNA được phân tích bằng các phần mềm BioEdit, CRISPR ID.

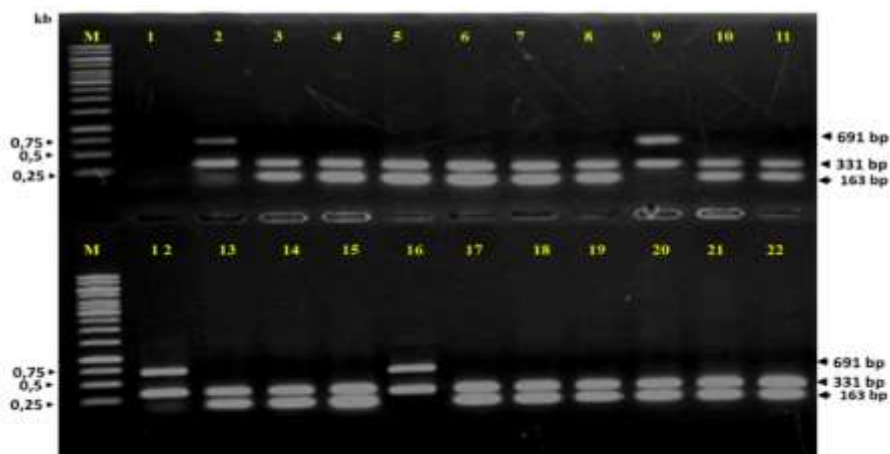
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

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

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. 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*, 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 mồi đặc hiệu cho chi *Xanthomonas*, loài *Xoo* và *Xoc*. 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*; 2 isolate thuộc loài *Xoc*.



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

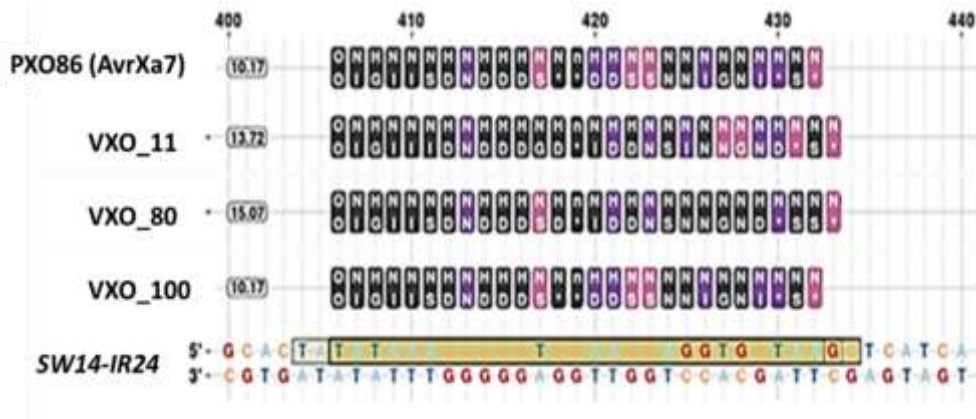
Ghi chú: Sản phẩm PCR đa môi (*Xo3756F/Xo3756R*, *Xoo80F/Xoo80R* và *Xoc3866F/Xoc3866R*) được điện di trên gel agarose 1,0%. Giếng M: Thang chuẩn DNA 1,0 kb (Promega); giếng 1: đối chứng âm (không có DNA khuôn); giếng 2 và 12: đối chứng dương *Xoc* (khuẩn lạc *Xoc*); giếng 3 và 13: đối chứng *Xoo* dương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

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

STT	Tên chủng	Địa điểm thu mẫu	Giống lúa	Năm
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

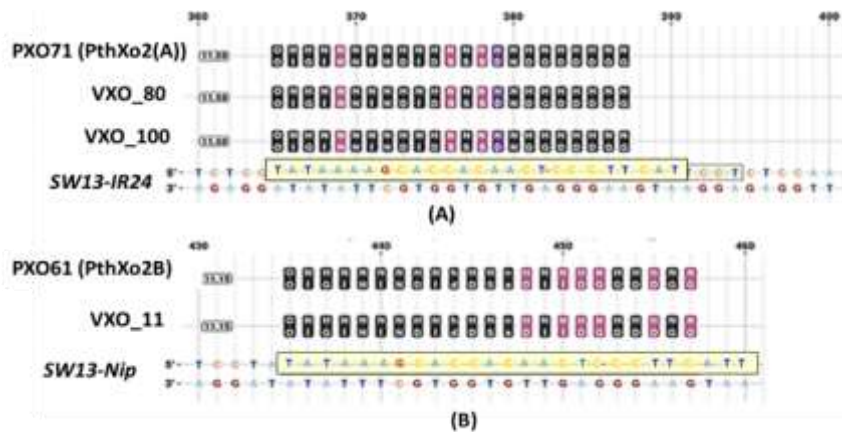
3.1.2. Nghiên cứu tương tác phân tử giữa VXO và giống lúa TBR225

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. 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. 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. Trong nghiên cứu này, để xác định 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 và phân tích vùng gen *tal*. 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. 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. Như vậy, rất có thể khi VXO xâm nhiễm vào cây lúa TBR225 cũng sẽ hoạt hóa gen *OsSWEET13* và *OsSWEET14* trên giống lúa này. Kết quả phân tích trình tự *SW13-TBR* và *SW14-TBR* của giống lúa TBR225 cho thấy các promoter này mang trình tự EBE *PthXo2(A)* và AvrXa7 liên kết đặc hiệu với các TALE tương ứng của các isolate VXO đã phân tích. Điều này cho phép khẳng định *OsSWEET13* và *OsSWEET14* là hai gen *S* chính của các isolate đã thu thập được, và bằng cách sử dụng công cụ CRISPR/Cas9 để gây đột biến chính xác các EBE trên vùng promoter của hai gen này có thể tăng cường tính kháng bạc lá trên giống lúa TBR225.



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.



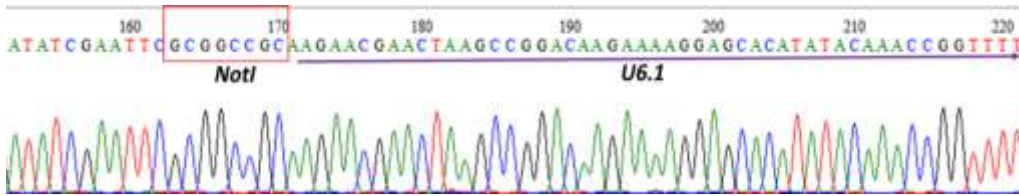
Hình 3.5. Phân tích trình tự TALE PthXo2 của isolate VXO

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.

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

Với mục đích chỉnh sửa đồng thời hai promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR*, cấu trúc vector “cho” thứ hai pEN-V2 được thiết kế để tạo vật liệu thiết kế cấu trúc chỉnh sửa đa gen trên lúa TBR225 bằng hệ thống Gateway cloning từ vector pEN-V1. Vector này được kiểm tra lần lượt bằng phản ứng PCR và cắt giới hạn thu được các băng DNA có kích thước đúng như đã tính toán lý thuyết. Kết quả này được khẳng định chắc chắn hơn thông qua giải trình tự vector pEN-V2. Cấu trúc vector này được sử dụng cho việc thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa promoter *OsSWEET* ở thí nghiệm tiếp theo.

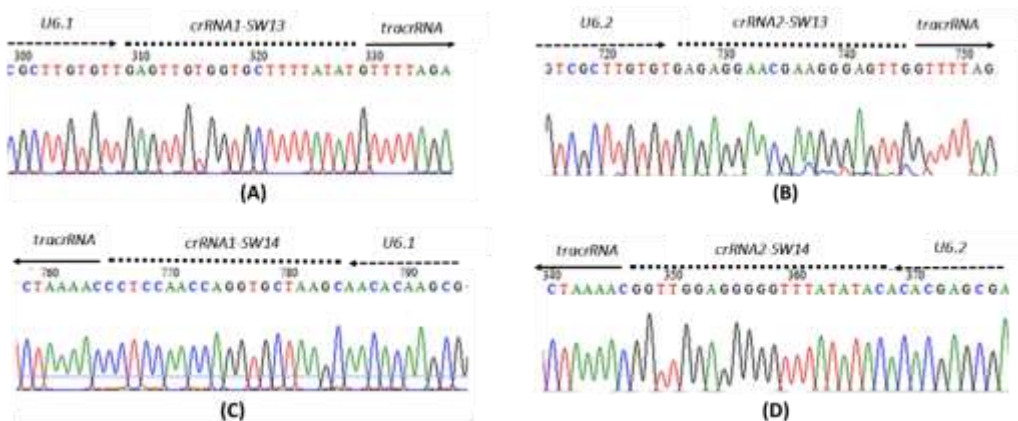


Hình 3.12. Giải trình tự vector pEN-V2

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.

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

Dựa trên các kết quả giải trình tự gen *tal* của các chủng vi khuẩn VXO, kết quả nghiên cứu biểu hiện gen *OsSWEET* và kết quả giải trình tự *SW13-TBR*, *SW14-TBR* đã xác định được hai EBE là *PthXo2(A)* và *AvrXa7* có thể liên quan đến độc tính của các chủng VXO đã phân lập. Do vậy, hai vị trí EBE này được lựa chọn để chỉnh sửa bằng hệ thống CRISPR/Cas9. Bằng phần mềm CRISPR.P 2.0, Mfold và CCTop, nghiên cứu đã thiết kế và lựa chọn 4 crRNA đặc hiệu cho 2 trình tự EBE trên. Từ đó thiết kế vector mang cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa đồng thời promoter *SW13-TBR* và *SW14-TBR*. Các trình tự crRNA này được ghép nối vào vector pEN-V1, pEN-V2 và pCas9. Vector tái tổ hợp được kiểm tra bằng cặp môi HPT-F/HPT-R; Ubi-F/Cas9-t-R; BtgZI-crRNA1-SW13-F/BsaI-crRNA2-SW13-R và BtgZI-crRNA1-SW14-F/BsaI-crRNA2-SW14-R. Kết quả thu được các băng DNA có kích thước phù hợp với kích thước lý thuyết. Cấu trúc vector chuyển gen này cũng được giải trình tự nucleotide bằng các môi khác nhau. Kết quả phân tích trình tự 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.



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 môi 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 (→).

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

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 *AvrXa7/PthXo3/TalF* (pCas9/sgRNA-SW14), và chuyển thành công vào giống lúa TBR225, thu được 2 dòng lúa mang đột biến tuy nhiên các đột biến này không nằm trên EBE *AvrXa7*. 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. 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%), 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 sẹ của lúa TBR225 được đồng nuôi cấy với chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 tái tổ hợp mang cấu trúc pCas9/sgRNA-SW14 trên môi trường MS có bổ sung chất dẫn dụ acetosyrigone để tăng hiệu quả biến nạp gen. Các dòng tế bào tái tổ hợp sinh trưởng trên môi trường chọn lọc và tái sinh chồi được chuyển sang môi trường tái sinh rễ để tạo cây con hoàn chỉnh. Kết quả thu được 30 dòng lúa tái sinh trồng trong điều kiện nhà lưới.

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 sẹ	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*

Kết quả giải trình tự *SW14-TBR* từ 20 dòng lúa mang cấu trúc gen chuyển thu được các dạng đột biến như bảng 3.7 và hình 3.27; 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%. Tỷ 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. 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). Ký tự phía bên phải thể hiện kiểu gen *SW14-TBR* đột biến; (wt) kiểu gen không đột biến; (+/-) đột biến thêm/bớt nucleotide; ký 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.

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 (Tỷ lệ)
Dị hợp ^a	S-4 (-4/wt), S-12 (+1/wt); S-24 (-3/wt); S-25 (-5/wt);	4 (20%)
Đồng hợp ^b	S-7(-6); S-17 (-3); S-23(-8); S-36 (+1);	4 (20%)
Bi-alen ^c	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: ^aĐột biến trên một alen. ^bĐột biến giống nhau trên cả 2 alen. ^cĐột biến khác nhau trên 2 alen. *Ký tự trong ngoặc thể hiện số nucleotide đột biến thêm (+) hay mất (-) trên *SW14-TBR*; wt: không đột biến.

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

Khi phân tích sự di truyền các đột biến trên *SW14-TBR* từ thế hệ T_0 sang thế hệ T_1 , kết quả cho thấy các đột biến được phân ly theo đúng như định luật Mendel. Cụ thể, các dòng

lúa TBR225 chỉnh sửa gen T₀ mang kiểu gen *SW14-TBR* đột biến dị hợp và bi-alen phân ly ở thế hệ T₁ 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 T₁ có kiểu gen đột biến đồng hợp. Tất cả các dòng lúa T₁ thuộc cùng một cây T₀ đều mang các đột biến đã có ở thế hệ T₀, không xảy ra hiện tượng xuất hiện thêm các đột biến mới (Bảng 3.8).

Bảng 3.8. Phân ly di truyền của dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen T₁

Tên dòng T ₀	Số cây T ₁ kiểm tra	Di truyền cấu trúc T-DNA ở thế hệ T ₁					Di truyền đột biến <i>SW14-TBR</i> ở thế hệ T ₁	
		<i>Actin</i> ^a	<i>HPT</i> ^b	<i>sgRNA</i> ^b	<i>Cas9</i> ^b	χ^2 (3:1)*	Phân ly đột biến ^c	χ^2 (1:2:1)*
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: ^aSố cây có kết quả PCR dương tính. ^b Số cây có kết quả PCR âm tính. ^c 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. * $P < 0,05$.

3.3.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của đột biến *SW14-TBR* đến kiểu hình của dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen T₂

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 T₂ tạo ra từ 11 dòng lúa chỉnh sửa gen T₁ 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). 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 chỉnh sửa gen về tất cả các tính trạng nông học được quan sát. 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 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 chứng tỏ 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.

Bảng 3.10. Kết quả đánh giá một số chỉ tiêu nông học của dòng lúa TBR225 đột biến *SW14-TBR T₂*

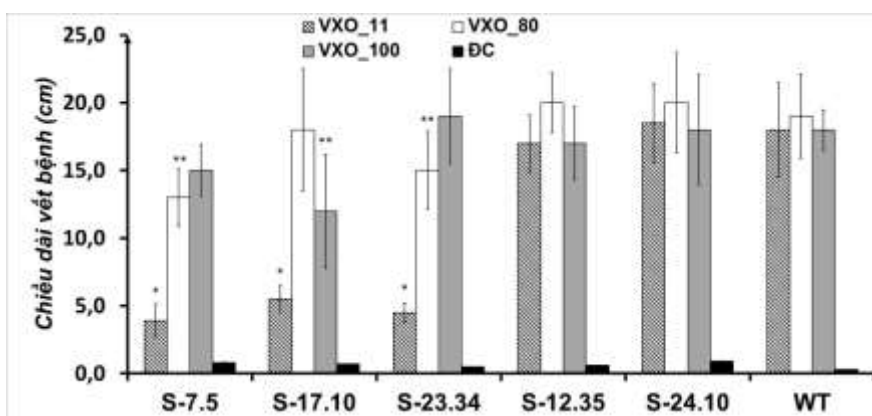
Tên dòng	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Chiều cao cây (cm)	Số nhánh	Số hạt chắc/bông	Năng suất cá thể (gam)
WT	107,10±5,34 ^{ab}	115,25±3,54 ^{ab}	6,90±1,02 ^{ab}	79,40±5,03 ^b	19,05±0,54 ^b
S-4.3	108,15±4,25 ^{ab}	115,20±5,25 ^{ab}	6,80±0,97 ^{ab}	82,65±6,72 ^b	22,45 ±0,88 ^a
S-5.2	110,30±3,05 ^{ab}	110,35±4,10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

Ghi chú: Các giá trị trung bình có cùng kí 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.

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 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*.

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). Kết quả thu được ba dòng lúa S-7.5, S-17.10 và S-23.34 thể hiện tính kháng rõ rệt với isolate VXO_11, điều này chứng tỏ *OsSWEET14* là gen *S* duy nhất đối với isolate VXO_11 của giống 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; gợi ý rằng hai isolate này có thể có ít nhất 2 đích tấn công trong hệ gen của giống lúa TBR225. Do vậy việc gây đột biến trên 1 EBE *AvrXa7* không đủ để tạo ra tính kháng hoàn toàn VXO_80 và VXO_100 cho giống lúa chủ lực này.



Hình 3.30. Đánh giá tính kháng bệnh bạc lá của dòng lúa TBR225 chỉnh sửa *SW14-TBR T₂*

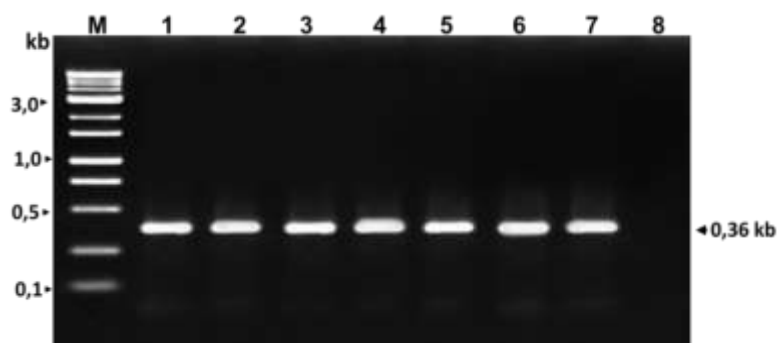
Ghi chú: Các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen (S-7.5, S-23.34, S-19.10, S-12.35 và S-24.10) và không chỉnh sửa gen (WT) được lây nhiễm nhân tạo các isolate VXO đại diện (VXO_11, VXO_80 và VXO_100). (ĐC) Thí nghiệm đối chứng âm (lây nhiễm cây lúa với dung dịch $MgCl_2$ không chứa vi khuẩn *Xoo*). Dấu sao 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, $\alpha = 0,05$)

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

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 tái tổ hợp 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.



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 (khuẩn 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) và thu được 59 dòng lúa tái sinh 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: * Tỷ 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*

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 T₀ 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 chuyển gen. 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 T₀

Promoter đột biến	Tên dòng lúa	Số cây (Tỉ lệ)*
<i>SW13-TBR</i> ^a	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%)
	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	
<i>SW13-TBR</i> và <i>SW14-TBR</i> ^c	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: ^aĐột biến trên *SW13-TBR*; ^bĐột biến trên *SW14-TBR*; ^cĐột biến trên *SW13-TBR* và *SW14-TBR*; *Số cây mang đột biến/Tổng số cây mang gen chuyển.

3.4.4. Nghiên cứu đặc điểm kiểu gen và kiểu hình của các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR* T₁

Các dòng lúa T₁ không mang cấu trúc T-DNA được tiếp tục giải trình tự nucleotide 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 T₁ bằng phần mềm BioEdit 4.0 cho thấy 15/80 dòng lúa T₁ chỉ mang đột biến trên *SW13-TBR* hoặc *SW14-TBR*; 65/80 dòng

lúa T₁ 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 T₀ đều được di truyền một cách chính xác sang thế hệ T₁ và không có sự xuất hiện các đột biến mới (Bảng 3.15).

Bảng 3.15. Kết quả giải trình tự *SW13-TBR* và *SW14-TBR* của dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen T₁

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.

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 T₁ 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). 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, chiều dài vết bệnh <5

cm (Bảng 3.16). 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). Các kết quả này 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 AvrXa7* đối với tính miễn cảm của giống lúa TBR225 với 2 isolate đại diện VXO_80 và VXO_100.

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

Tên dòng T ₁	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.

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 CRIPSR/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 T₂ 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 hoàn toàn với isolate VXO_11 và kháng nhẹ hoặc không kháng 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 biến 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 T₁ (D-12.1, D-12.7, D-12.28, D-12.31, D-25.2 và D-25.3) kháng hoàn toàn 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 kiến nghị 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 (T₂, T₃...)

–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^{co}, **Dai Tran Lan^{co}**, 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 Lê 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 Lê 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.