

ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN ĐỘT BIẾN CỦA CÁC DÒNG LÚA TBR225 CHỈNH SỬA PROMOTER *OsSWEET14*

Trần Lan Đài¹, Phạm Thu Hằng², Cao Lệ Quyên²,
Phạm Thị Vân², Phạm Xuân Hội², Nguyễn Duy Phương^{2*}

¹Đại học Quy Nhơn,
²Viện Di truyền Nông nghiệp

*Tác giả liên hệ: phuongnd.bio@gmail.com

Ngày nhận bài: 29.11.2021

Ngày chấp nhận đăng: 05.04.2022

TÓM TẮT

Vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây nên bệnh bạc lá lúa thông qua cơ chế chính là tiết ra các protein TALE (Transcription activator-like effector) có khả năng kiểm soát hoạt động một số gen của tế bào chủ bằng cách liên kết với các trình tự EBE (Effector-binding elements) trên vùng promoter và hoạt hóa biểu hiện gen. Gây đột biến chính xác tại các vị trí tương tác của protein TALE trên vùng promoter của gen đích bằng các công cụ chỉnh sửa gen như CRSIPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein-9 nuclease) là một hướng nghiên cứu tiềm năng để cải tiến tính kháng bạc lá của các giống lúa trong sản xuất. Trong nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã tạo được một số dòng lúa TBR225 chuyển gen mang cấu trúc biểu hiện phức hệ CRSIPR/Cas9 chỉnh sửa vị trí EBE *AvrXa7/Tal5* trên promoter *OsSWEET14*. Để xác định tính ổn định di truyền và hiệu quả của các đột biến *OsSWEET14* tạo ra bởi hệ thống CRISPR/Cas9 trong nghiên cứu này, các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen *T₁* tiếp tục được đánh giá kiểu gen và kiểu hình. Phân tích trình tự gen của các dòng lúa TBR225 chuyển gen đã xác định được hiệu quả gây đột biến *OsSWEET14* của cấu trúc CRISPR/Cas9 đạt 65%, bao gồm hai loại đột biến thêm và mất nucleotide (Nu). Các đột biến này đã được di truyền chính xác sang thế hệ sau (tỷ lệ phân ly 1:2:1) và không xuất hiện thêm đột biến mới. Các phân tích kiểu hình bước đầu cho thấy đột biến trên promoter *OsSWEET14* không gây ảnh hưởng tới sinh trưởng và năng suất của cây lúa. Một số dòng lúa chỉnh sửa gen TBR225 thế hệ *T₁* có biểu hiện tính kháng đối với chủng vi khuẩn VXO_11 trong điều kiện nhà lưới. Kết quả thu được là tiền đề cho nghiên cứu phát triển giống lúa TBR225 kháng bạc lá trong tương lai.

Từ khóa: Bệnh bạc lá lúa, CRISPR/Cas9, *OsSWEET14*, TBR225, *Xanthomonas oryzae*.

Genetic Identification of Target Mutations in *OsSWEET14* Promoter-edited TBR225 Rice Lines

ABSTRACT

Understanding host-pathogen interactions is key in breeding disease-resistant crops, including bacterial leaf blight. As a key virulence strategy to cause bacterial leaf blight, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) secretes transcription activator-like effectors (TALEs) to control the expression of host target genes through binding to the effector-binding elements (EBEs) located on the promoter regions. Precise mutagenesis at the TALE-interaction sites on the host genes by using gene editing tools such as clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein-9 nuclease (CRSIPR/Cas9) has been seen as a promising way to improve BLB resistance of rice cultivars. In a previous study, we generated some transgenic TBR225 rice lines containing a single copy of CRISPR/Cas9 expression construct for editing *AvrXa7/Tal5* EBE on the promoter *OsSWEET14*. In this study, we continued to evaluate genotype and phenotype of *T₁* edited TBR225 lines to determine the genetic stability and phenotypic effective of the CRISPR/Cas9-induced *OsSWEET14* mutations. The genotypic analysis showed that 65% of transgenic TBR225 plants harbored the targeted *OsSWEET14* mutation, including nucleotide (Nu) insertion and deletion. The *OsSWEET14* mutations were stably inherited to the next generation with an expected segregation ratio consistent with Mendelian segregation (1:2:1). The preliminary phenotypic analysis suggested that the mutation of *OsSWEET14* promoter did not affect the growth and yield of gene-edited rice plants. Some *T₁* TBR225 lines showed the resistance to Xoo isolate

VXO_11 in the leaf-clipping experiment. The obtained results are a premise for development of the BLB-resistant TBR225 rice variety in the future.

Keywords: Bacterial leaf blight disease, CRISPR/Cas9, *OsSWEET14*, TBR225, *Xanthomonas oryzae*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) gây bệnh bạc lá cho nhiều giống lúa chủ lực, trong đó có giống lúa TBR225 của Việt Nam. Khả năng gây bệnh của *Xoo* phụ thuộc vào độc lực của một nhóm protein đặc biệt, gọi là TALE, hoạt động như những yếu tố hoạt hóa phiên mã của sinh vật nhân thực (Hutin & cs., 2015a). Khi *Xoo* lây nhiễm và xâm nhập vào tế bào thực vật, vùng lặp lại bảo thủ trên TALE sẽ liên kết với EBE trên promoter của các gen đích tại vị trí RVD (repeat variable diresidue - hai gốc axit amin liên kế biến đổi trên vùng lặp), dẫn đến hoạt hóa quá trình phiên mã của gen đích (Boch & cs., 2009; Moscow & Bogdanove, 2009). Các gen thuộc nhóm III của họ gen *SWEET* (*Sugars will Eventually be Exported Transporter*), đã được chứng minh là mục tiêu của một số protein TALE (Antony & cs., 2010; Zhang & cs., 2019; Zhou & cs., 2014). Các phân tích hệ thống sâu hơn ở lúa cho thấy tất cả các thành viên thuộc nhóm III của họ gen *OsSWEET* đều có thể hoạt động như các gen nhiễm "S" (susceptibility) là những gen được hoạt hóa bởi *Xoo* để thúc đẩy quá trình gây bệnh (Streubel & cs., 2013; van Schie & Takken, 2015). Nghiên cứu của Hutin (2015b) đã chứng minh các đột biến trên vùng EBE của các gen *S* này có thể giúp cây lúa kháng lại *Xoo*. Một số dòng lúa kháng các chủng *Xoo* của châu Á và châu Phi đã được tạo ra bằng cách gây đột biến trình tự EBE trên promoter của *OsSWEET14* nhờ các công cụ khác nhau như TALEN hoặc CRISPR/Cas9 (Blanvillain-Baufumé & cs., 2017; Vũ Hoài Sâm & cs., 2019). Các kết quả nghiên cứu trên đã cho thấy tiềm năng ứng dụng công nghệ chỉnh sửa hệ gen trong công tác chọn tạo giống lúa ưu tú kháng *Xoo* phổ rộng.

Trước đây, Phùng Thị Thu Hương & cs. (2018) đã xác định được hai vị trí EBE tiềm năng trên promoter *OsSWEET14* của cây lúa TBR225 có thể liên quan tới quá trình xâm nhiễm của *Xoo*, bao gồm *AvrXa7* và *Tal5*. Trong

nghiên cứu gần đây, Nguyễn Duy Phương & cs. (2019) đã chuyển cấu trúc biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa *AvrXa7/Tal5* trên promoter *OsSWEET14* vào cây lúa TBR225 và thu được một số dòng lúa mang cấu trúc T-DNA. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu sự di truyền các đột biến tạo ra bởi phức hệ CRISPR/Cas9 trên *OsSWEET14* và những ảnh hưởng của nó đến kiểu hình của cây lúa TBR225 ở thế hệ T_1 . Kết quả thu được sẽ là tiền đề cho nghiên cứu tạo giống lúa chủ lực TBR225 có khả năng kháng bệnh bạc lá phổ rộng bằng công nghệ gen sau này.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Hai mươi cây lúa TBR225 chuyển gen T_0 mang một bản sao của cấu trúc vector biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa *OsSWEET14* (Bảng 4) do bộ môn Bệnh học phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp cung cấp (Nguyễn Duy Phương & cs., 2019).

Chủng vi khuẩn bạc lá VXO_11 được phân lập năm 2013 tại Gia Lâm, Hà Nội và được lưu giữ tại Bộ môn Bệnh học phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp (Vũ Hoài Sâm & cs., 2019).

Các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu được thiết kế dựa trên những trình tự đã công bố trên GenBank và đặt mua từ hãng Invitrogen (Hoa Kỳ) (Bảng 1).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đánh giá kiểu hình của các dòng lúa TBR225

Cây lúa TBR225 chuyển gen T_0 được trồng trong điều kiện nhà lưới để theo dõi các đặc điểm sinh trưởng và khả năng tạo hạt (chắc). Hạt của cây lúa T_0 được rửa bằng nước, khử trùng bằng Javen 2% trong 20 phút, rửa lại bằng nước cất, sau đó được ngâm trong nước và ủ ở 37°C trong 3 ngày. Hạt nảy mầm tạo thành cây lúa T_1 được

2.2.2. Xác định kiểu gen bằng PCR và giải trình tự DNA

Cây lúa TBR225 ở giai đoạn 3 lá được sử dụng để tách chiết DNA. DNA tổng số được tách chiết từ mô lá theo phương pháp của Doyle & Doyle (1990), sử dụng dung dịch CTAB 2%.

Sự có mặt của cấu trúc biểu hiện gen chuyển trong cây lúa TBR225 được xác định bằng phương pháp PCR với lần lượt các cặp mồi Actin-F/Actin-R, HPT-F/HPT-R, Cas9-F/Cas9-t-R và gRNA-F/gRNA-R. Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt: (94°C - 30 giây, 56°C - 30 giây, 72°C - 30 giây) x 35 chu kỳ.

Trình tự promoter *OsSWEET14* của các dòng lúa TBR225 T₀ và T₁ được phân lập bằng cặp mồi SW14-F/SW14-R. Sản phẩm PCR sau đó được giải trình tự Nu theo của phương pháp Smith (1986). Kết quả giải trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit 2.0 và phân tích bằng phần mềm CRISPR ID v1.1.

2.2.3. Đánh giá tính kháng bạc lá của các dòng lúa chỉnh sửa gen

Thí nghiệm lây nhiễm *Xoo* và đánh giá tính kháng vi khuẩn bạc lá của các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen được thực hiện theo phương pháp cắt lá cải tiến của Ke & cs. (2017), sử dụng chủng vi khuẩn bạc lá VXO_11. Khả năng kháng bạc lá được xếp theo thang điểm: kháng mạnh - R (vết bệnh < 8cm), kháng vừa - MR (vết bệnh từ 8-12cm) và miễn cảm - S (vết bệnh > 12cm). Dòng lúa TBR225 không chuyển gen được sử dụng làm đối chứng.

2.2.4. Xử lý số liệu thống kê

Tỉ lệ phân ly đột biến được phân tích bằng kiểm định thống kê χ^2 ($P < 0,05$), sử dụng phần mềm Microsoft Office Excel v.2016.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định đột biến trên promoter *OsSWEET14* của cây lúa TBR225 chuyển gen T₀

Công nghệ CRISPR/Cas9 được sử dụng để gây đột biến chính xác gen mục tiêu, tuy nhiên

hiệu quả chỉnh sửa gen phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như vị trí trình tự đích trong hệ gen, bản chất di truyền của sinh vật, hệ thống CRISPR/Cas9, hệ thống chuyển gen... Trong nghiên cứu trước, Nguyễn Duy Phương & cs. (2019) đã bước đầu xác định sự xuất hiện của đột biến trên promoter *OsSWEET14* trong các cây lúa TBR225 chuyển gen bằng enzyme cắt giới hạn T7E1 (Vouillot & cs., 2015). Ở đây, để xác định chính xác kiểu gen của *OsSWEET14*, 20 cây lúa T₀ chuyển gen mang cấu trúc biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 đã được giải trình tự Nu.

Kết quả phân tích trình tự bằng phần mềm BioEdit (Hình 1, Bảng 2) đã thu được 13/20 cây lúa chuyển gen có mang đột biến trên vùng trình tự đích. Hiệu suất chỉnh sửa gen của cấu trúc CRISPR/Cas9 đạt 65% tính trên số cây mang một bản sao của gen chuyển; kết quả này cũng tương tự với kết quả của nghiên cứu đã công bố trước đây sử dụng cùng bộ khung vector biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 (Blanvillain-Baufumé & cs., 2017). Các đột biến được phát hiện trên *OsSWEET14* đều là các đột biến nhỏ (1-6 Nu), bao gồm loại đột biến thêm Nu (31,8% số alen đột biến) và mất Nu (68,2% số alen đột biến); không xuất hiện đột biến thay thế Nu (Bảng 2). Các đột biến thu được đều xuất hiện xung quanh vị trí nhận biết của phức hệ CRISPR/Cas9 trên trình tự EBE *Avrxa7/Tal5* của promoter *OsSWEET14* (Hình 1), phù hợp với các nghiên cứu về CRISPR/Cas9 đã công bố (Zhou & cs., 2014). Các dạng kiểu gen đột biến của *OsSWEET14* thu được bao gồm cả 3 dạng: đột biến dị hợp (đột biến trên 1 alen) chiếm 30,77%; đột biến đồng hợp (đột biến giống nhau trên 2 alen) và đột biến “bi-alen” (đột biến khác nhau trên 2 alen) chiếm tỉ lệ lần lượt 30,77% và 38,46% (Bảng 2).

3.2. Đánh giá kiểu hình của cây lúa TBR225 chỉnh sửa gen T₀

Để đánh giá kiểu hình của các cây lúa TBR225 chỉnh sửa gen T₀, 20 dòng lúa chuyển gen đã được chuyển từ môi trường nuôi cấy *in vitro* sang trồng trong điều kiện nhà lưới và theo dõi các chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển. Kết quả cho thấy các cây lúa chuyển gen đều có khả

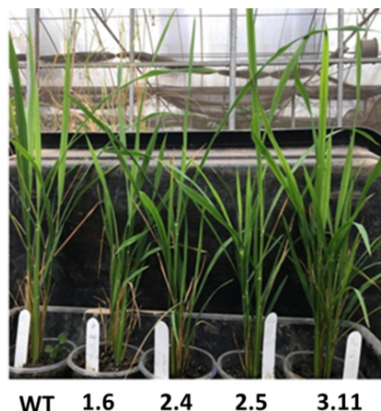
năng sinh trưởng kém hơn so với cây lúa được gieo trồng trực tiếp từ hạt, trong đó có một cây không thể sống sót đến khi thu hạt; điều này có thể lý giải bởi sự tồn dư của các loại hoocmon kích thích sinh trưởng có trong môi trường nuôi cấy *in vitro* (Trigiano & Gray, 2011). Khi so sánh các đặc điểm sinh trưởng của cây lúa chuyển gen mang đột biến gen *OsSWEET14*, các cây lúa chuyển gen (mang/không mang đột biến) và cây lúa đối chứng được tái sinh từ mô sẹo không mang cấu trúc T-DNA không có sự khác biệt đáng kể về đặc điểm sinh trưởng (Hình 2). Hầu hết các cây lúa TBR225 chuyển gen (19/20 dòng) đều có khả năng ra hoa và kết hạt, mặc dù số lượng hạt chắc thu được từ mỗi cây không giống nhau (Bảng 3). Kết quả này góp phần củng cố cho nhận định việc chuyển cấu trúc T-DNA và sử dụng phức hệ CRISPR/Cas9 để tạo ra đột biến trên gen *OsSWEET14* có thể không gây ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và sinh sản của cây lúa TBR225. Tuy nhiên, nhận định này cần được chứng minh thêm bằng các phân tích sâu hơn ở các thế hệ tiếp theo với số lượng mẫu đủ lớn và có sự đồng nhất về môi

trường nuôi trồng và chăm sóc các cây lúa thí nghiệm. Hạt của các dòng lúa chỉnh sửa gen T_0 được lưu giữ để phục vụ các thí nghiệm phân tích tiếp theo.

3.3. Xác định kiểu gen của các dòng lúa TBR225 T_1

Với mục đích xác định chính xác các đặc điểm di truyền của cấu trúc T-DNA cũng như các đột biến trên promoter *OsSWEET14*, hạt của các cây lúa T_0 (Bảng 3) được thu lại và gieo trồng trong điều kiện nhà lưới, sau đó phân tích bằng PCR và giải trình tự Nu.

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 1) đã thu được 68 dòng lúa T_1 không mang cấu trúc T-DNA từ 13 cây lúa chuyển gen T_0 ; tỉ lệ trung bình đạt 23,69% (Bảng 4). Phân tích sự phân ly của cấu trúc biểu hiện T-DNA, bao gồm cả cấu trúc biểu hiện *Cas9*, sgRNA và gen chọn lọc *HPT* cho thấy sự phân ly theo tỉ lệ 3:1 ở tất cả các dòng lúa T_1 , phù hợp với định luật của Mendel ($\chi^2 < 3,84$; $P > 0,05$).



Ghi chú: Cây lúa TBR225 ở thời điểm sau một tháng sinh trưởng trên bầu đất trong điều kiện nhà lưới. (ĐC) dòng lúa tái sinh từ mô sẹo không chuyển gen; (1.6) dòng lúa chuyển gen T_0 không mang đột biến *OsSWEET14*; (2.4; 2.5; 3.11) dòng lúa chuyển gen T_0 mang đột biến *OsSWEET14*.

Hình 2. Sinh trưởng của cây lúa TBR225 chuyển gen T_0

Bảng 3. Khả năng tạo hạt của cây lúa TBR225 chuyển gen T_0

Đặc điểm	Tên
Tạo hạt	1.1 (18), 1.5 (10), 1.6 (30), 1.7 (35), 1.9 (20), 1.12 (40), 1.14 (25), 1.19 (35), 1.27 (37), 1.29 (40), 2.1 (20), 2.2 (25), 2.3 (7), 2.4 (15), 2.5(30), 3.4 (20), 3.6 (30), 3.7 (27), 3.11 (30)
Không tạo hạt	1.26

Ghi chú: Kí tự trong ngoặc sau tên dòng thể hiện số hạt (chắc) thu được từ mỗi dòng lúa chỉnh sửa gen T_0 .

Bảng 4. Phân ly di truyền của dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen thể thệ T₁

Tên dòng T ₀	Số cây T ₁ kiểm tra	Di truyền cấu trúc T-DNA ở thể hệ T ₁					Di truyền đột biến OsSWEET14 ở thể hệ T ₁	
		<i>Actin</i> ^a	<i>HPT</i> ^b	<i>gRNA</i> ^b	<i>Cas9</i> ^b	χ^2 (3:1) (P < 0,05)	Phân ly đột biến ^c	χ^2 (1:2:1) (P < 0,05)
1.1(-2/-3)	19	19	4	4	4	0,158	5(-5), 10(-5/wt), 4 (wt)	0,158
1.5 (-3/-2)	25	25	4	4	4	1,080	4(-3), 16(-3/-2), 5(-2)	2,040
1.7 (-6/-6)	20	20	8	8	8	2,400	20 (-6/-6)	-
1.9 (+2/wt)	37	37	6	6	6	1,523	12(+2), 18(+2/wt), 7(wt)	1,378
1.12(+1/wt)	35	35	5	5	5	2,143	11(+1), 17(+1/wt), 7(wt)	0,943
2.3(-6/-6)	17	17	2	2	2	1,588	17(-6/-6)	-
2.4(-3/wt)	36	36	8	8	8	0,148	5(-3), 22(-3/wt), 9(wt)	2,667
2.5(-5/wt)	40	40	8	8	8	0,533	6(-5), 22(-5/wt), 12(wt)	2,200
3.4(+2/-3)	33	33	7	7	7	0,253	6(+2), 20(+2/-3), 7(-3)	1,545
3.6(+1/+1)	30	30	3	3	3	3,600	30(+1/+1)	-
3.7(-1/wt)	35	35	5	5	5	2,143	10(-1), 13(-1/wt), 12(wt)	2,543
3.11(-3/-3)	28	28	8	8	8	0,190	28(-3/-3)	-

Ghi chú: ^a: Số cây có kết quả PCR dương tính; ^b: Số cây có kết quả PCR âm tính; ^c: Số cây có cùng kiểu gen OsSWEET14; Kí tự trong ngoặc thể hiện số Nu đột biến thêm (+)/mất (-) trên OsSWEET14 hoặc không đột biến (wt).

Bảng 5. Kết quả đánh giá kiểu hình của dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen T₁^{*}

Tên dòng ¹	Loại đột biến ²	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Chiều cao (cm)	Số nhánh	Số hạt chắc trên bông	Tính kháng bạc lá ³
ĐC	wt	105	104,1	8	86,24 ± 1,60	S
1.5.3	-2 (GA)	106	110,7	5	85,05 ± 1,30	S
1.7.17	-6 (GAGCTT)	108	108,0	6	80,34 ± 1,29	R
1.7.49	-6 (TGATGA)	106	109,5	5	81,38 ± 1,40	R
1.12.37	+1 (A)	106	110,7	5	80,50 ± 1,40	S
1.12.46	+1 (C)	107	110,8	5	79,71 ± 1,20	S
2.3.34	+6 (GCTTGA)	110	116,5	7	77,08 ± 1,20	R
3.6.19	+1 (G)	119	92,5	5	79,31 ± 1,50	S
3.11.25	-3 (GCT)	112	111,5	5	77,32 ± 1,60	S

Ghi chú: ¹:(ĐC) Cây lúa TBR225 đối chứng không chuyển gen; ²: Chữ số thể hiện số Nu đột biến trên OsSWEET14; (+/-) thể hiện loại đột biến thêm/mất Nu trên OsSWEET14; kí tự chữ trong ngoặc thể hiện Nu bị đột biến (thêm/mất) trên OsSWEET14; ³: (R) vết bệnh < 8cm; (S) vết bệnh > 12cm; *: Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện nhà lưới (Viện Di truyền Nông nghiệp), vụ Xuân năm 2020.

Tương tự, khi phân tích sự di truyền các đột biến trên promoter OsSWEET14 từ thể hệ T₀ sang thể hệ T₁, kết quả cũng cho thấy các đột biến được phân ly theo đúng như định luật Mendel: các dòng mang kiểu gen đột biến dị hợp và bi-alel phân ly theo tỉ lệ gần với tỉ lệ 1:2:1 (χ^2 < 3,84; P < 0,05); các dòng mang kiểu

gen đột biến đồng hợp tạo ra 100% cá thể T₁ có kiểu gen đồng hợp. Tất cả các dòng lúa T₁ thuộc cùng một cây T₀ đều mang các đột biến đã có ở thể hệ T₀, không xảy ra hiện tượng xuất hiện thêm các đột biến mới. Kết quả này tương tự 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 (Wang & cs., 2016; Zhang & cs., 2019), trong đó các đột biến cũng được phân ly theo quy luật di truyền Men-đen.

3.4. Đánh giá kiểu hình của các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen T_1

Để đánh giá kiểu hình của dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen, 8 dòng lúa T_1 không chứa cấu trúc T-DNA và mang đột biến *OsSWEET14* ở dạng đồng hợp đại diện cho mỗi loại đột biến (Bảng 5) đã được chúng tôi lựa chọn để chăm sóc trong điều kiện nhà lưới và đánh giá một số chỉ tiêu nông học chính.

Kết quả quan sát (Bảng 5) cho thấy khả năng sinh trưởng phát triển của các dòng lúa T_1 không có sự khác biệt nhiều so với dòng đối chứng không chuyển gen về tất cả các chỉ tiêu được đánh giá, bao gồm thời gian sinh trưởng, chiều cao, 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 promoter *OsSWEET14* đã 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).

Để chứng minh hiệu quả của công cụ CRISPR/Cas9 trong việc cải tiến tính kháng bệnh bạc lá cho giống lúa TBR225, 8 dòng lúa chỉnh sửa gen T_1 tiếp tục được phân tích khả năng kháng bạc lá bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo với isolate VXO_11 trong điều kiện nhà lưới. Kết quả quan sát biểu hiện bệnh trên lá thu được sau 14 ngày lây nhiễm cho thấy 5/8 dòng lúa chỉnh sửa *OsSWEET14* (1.5.3, 1.12.37, 1.12.46, 3.6.19, 3.11.25) không thể hiện tính kháng với isolate VXO_11 (Bảng 5). Ngược lại, ba dòng lúa 1.7.17, 1.7.49 và 2.3.34 thể hiện tính kháng rõ rệt với isolate VXO_11; chiều dài vết bệnh trung bình quan sát được < 4 cm (Bảng 5). Sự khác biệt về tính kháng vi khuẩn bạc lá giữa các dòng lúa chỉnh sửa gen bước đầu cho thấy các đột biến khác nhau trên promoter

OsSWEET14 có thể ảnh hưởng khác nhau tới độc tính của vi khuẩn Xoo. Giả thuyết này cũng đã được Blanvillain-Baufumé & cs. (2017) đề cập đến trong công bố trước đây, khi nghiên cứu đột biến trên *OsSWEET14* của lúa Kitaake. Tuy nhiên, nhận định này cần được khẳng định lại bằng các phân tích sâu hơn ở các thế hệ tiếp theo. Mặc dù vậy, kết quả thu được cũng đã cho thấy hiệu quả bước đầu của việc cải tiến tính kháng bạc lá cho giống lúa ưu tú TBR225 bằng công nghệ CRISPR/Cas9.

4. KẾT LUẬN

Hiệu suất gây đột biến của cấu trúc CRISPR/Cas9 chỉnh sửa promoter *OsSWEET14* trong các dòng lúa TBR225 chuyển gen đạt 65%; trong đó tỉ lệ đột biến đồng hợp, dị hợp và bi-alel đạt lần lượt 30,77%, 30,77% và 38,46%. Các cây lúa TBR225 chuyển gen T_0 mang hai loại đột biến mất và thêm Nu tại vị trí nhận biết của sgRNA và di truyền chính xác sang thế hệ sau theo quy luật Men-đen. Tám dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen T_1 không mang DNA ngoại lai và có đặc điểm sinh trưởng tương đương giống đối chứng; trong đó 3 dòng có biểu hiện tính kháng bệnh bạc lá. Kết quả thu được là cơ sở để tiếp tục nghiên cứu cơ chế phân tử quá trình xâm nhiễm của vi khuẩn Xoo trên giống lúa TBR225, từ đó phát triển giống lúa năng suất cao kháng bệnh bạc lá phổ rộng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được cung cấp kinh phí bởi Công ty cổ phần Tập đoàn Thai Binh Seed và Bộ Khoa học và Công nghệ, thuộc 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” (Mã số: ĐM.36.DN/18). Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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 *Os-11N3*. *Plant Cell*. 22: 3864-3876.
- Blanvillain-Baufumé S., Reschke M., Solé M., Auguy F., Doucoure H., Szurek B., Meynard D., Portefaix 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 Biotechnol. J.* 15(3): 306-317.
- Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T. Nickstadt A. & Bonas Ulla (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*. 326: 1509-1512.
- Doyle J.J. & Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.
- Hutin M., Perez-Quintero A.L., Lopez C. & Szurek B. (2015a). MorTAL Kombat: the story of defense against TAL effectors through loss-of-susceptibility. *Front Plant Sci*. 6: 535.
- 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. *Plant J*. 84: 694-703.
- Ke Y., Hui S. & Yuan M. (2017). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* inoculation and growth rate on rice by clipping method. *Bio-protocol*. 7(19): e2568.
- Moscou M.A. & Bogdanove A.J. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*. 326: 1501
- 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): 1-7.
- 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: 42-49.
- 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): 674-679.
- Standard Evaluation System for Rice (SES) (2002), International Rice Research Institute (IRRI). Rice knowledge book.
- Streubel J., Pesce C., Hutin M., Koebnik R., Boch J. & Szurek, B. (2013). Five phylogenetically close rice *SWEET* genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytol*. 200: 808-819.
- Trigiano N.R. & Gray J.D. (2011). *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- van Schie C.N.C. & Takken L.W.F. (2014). Susceptibility genes 101: how to be a good host. *Annu. Rev. Phytopathol*. 52: 551-581.
- Vouillot L., Thelie A. & Pollet N. (2015). Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3: (Bethesda)*. 5: 407-415.
- Vũ Hoài Sâm, Nguyễn Thanh Hà, Cao Lê 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): 13-19.
- 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: e0154027.
- Zhang A., Liu Y., Wang F., Li T., Chen Z., Kong D., Bi J., Luo., Wang J., Tang J., Yu X., Liu G. & Lou L. (2019). Enhanced rice salinity tolerance via CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *OsRR22* gene. *Mol Breeding*. 39: 47.
- Zhou H., Liu B., Weeks P. D., Spalding H.M. & Yang B (2014). Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res*. 42(17): 10903-10914.