

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PTNT
VIỆN KHOA HỌC NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

VŨ HOÀI SÂM

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ CRISPR/CAS9
CHỈNH SỬA PROMOTER *OsSWEET14* NHẪM NÂNG CAO
TÍNH KHÁNG BỆNH BẠC LÁ Ở GIỐNG LÚA BẮC THƠM 7

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP

Hà Nội – 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PTNT
VIỆN KHOA HỌC NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

VŨ HOÀI SÂM

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ CRISPR/CAS9
CHỈNH SỬA PROMOTER *OsSWEET14* NHẪM NÂNG CAO
TÍNH KHÁNG BỆNH BẠC LÁ Ở GIỐNG LÚA BẮC THƠM 7**

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học;
Mã số: 9420201

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP

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, với kinh phí được hỗ trợ từ Đề tài: “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ chỉnh sửa hệ gen để cải tạo tính trạng mùi thơm và kháng bạc lá trên một số giống lúa chủ lực của Việt Nam”, năm 2017-2020. Các số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận án này là trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình khác.

Tôi xin cam đoan rằng mọi sự giúp đỡ, hợp tác cho việc thực hiện luận án này đã được cảm ơn và các thông tin trích dẫn trong luận án này đều được chỉ dẫn rõ nguồn gốc.

Tác giả luận án

Vũ Hoài Sâm

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, tôi đã nhận được sự quan tâm, giúp đỡ nhiệt tình của các Thầy, Cô giáo, các tập thể, cá nhân cùng các bạn bè, đồng nghiệp và gia đình.

Tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới GS.TS. Phạm Xuân Hội và TS. Nguyễn Duy Phương – những người Thầy đã hết sức tận tình hướng dẫn khoa học và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện đề tài nghiên cứu cũng như hoàn thành luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn TS. Cao Lệ Quyên (chủ nhiệm đề tài), cùng các cán bộ Bộ môn Bệnh học phân tử đã luôn nhiệt tình giúp đỡ, tạo điều kiện tốt nhất và đóng góp nhiều ý kiến quý báu cho tôi trong quá trình nghiên cứu thực hiện đề tài. Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Di truyền nông nghiệp và phòng Khoa học đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong thời gian học tập và triển khai thí nghiệm.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Dược liệu, đồng nghiệp, em Nguyễn Thị Hương và các em phòng Công nghệ Sinh học nơi công tác đã tạo điều kiện cho tôi được đi học và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình làm việc và học tập.

Tôi xin trân trọng cảm ơn các Thầy, Cô giáo, các anh, chị, em Ban Thông tin và Đào tạo, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam đã tận tình giúp đỡ và chỉ bảo tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thiện hồ sơ luận án.

Cuối cùng, tôi vô cùng biết ơn những người thân trong gia đình đã luôn bên cạnh, động viên khích lệ, tiếp thêm sức mạnh và nghị lực để tôi hoàn thành quá trình học tập và nghiên cứu này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày tháng năm 2022

Vũ Hoài Sâm

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT.....	v
DANH MỤC BẢNG.....	vii
DANH MỤC HÌNH.....	viii
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU VỀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU.....	5
1.1 Giới thiệu về công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9	5
1.1.1 Giới thiệu chung về công nghệ chỉnh sửa gen.....	5
1.1.2 Cấu trúc và cơ chế chỉnh sửa của công nghệ CRISPR/Cas9	7
1.1.3 Ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas9 trong khoa học cây trồng.....	13
1.2 Giới thiệu về bệnh bạc lá ở lúa và vi khuẩn gây bệnh	17
1.2.1 Bệnh bạc lá lúa.....	17
1.2.2 Vi khuẩn gây bệnh bạc lá lúa	20
1.2.3 Gen <i>OsSWEET14</i> và mối liên hệ với vi khuẩn <i>Xoo</i> gây bệnh bạc lá lúa.....	26
1.3 Tình hình nghiên cứu tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá	30
1.3.1 Nghiên cứu chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá dựa trên gen kháng	30
1.3.2 Nghiên cứu chọn tạo giống lúa kháng bạc lá dựa trên gen “nhiễm”	32
1.4 Giống lúa BT7 và các nghiên cứu cải tiến giống lúa BT7.....	34
1.4.1 Giới thiệu chung về giống lúa BT7.....	34
1.4.2 Bệnh bạc lá trên giống lúa BT7	35
1.4.3 Nghiên cứu cải tiến di truyền giống lúa BT7.....	35
1.5 Chuyển gen vào lúa thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	36
1.5.1 Vai trò của chuyển gen nhờ <i>A. tumefaciens</i> đối với CRISPR/Cas9.....	36
1.5.2 Hiệu quả chuyển gen lúa nhờ <i>A. tumefaciens</i>	38
1.5.3 Các yếu tố ảnh hưởng đến q chuyển gen vào IE lúa.....	40
1.5.4 Nghiên cứu chuyển gen vào giống lúa BT7 nhờ <i>A. tumefaciens</i>	41
CHƯƠNG 2. NGUYÊN LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP	43
2.1 Nguyên liệu	43
2.1.1 Đối tượng nghiên cứu	43
2.1.2 Vật liệu nghiên cứu	43
2.1.3 Hoá chất	43

2.1.4	Thiết bị	44
2.2	Nội dung nghiên cứu	44
2.3	Phương pháp nghiên cứu	45
2.3.1	Các kĩ thuật chung trong nghiên cứu sinh học phân tử.....	45
2.3.2	Tối ưu quy trình chuyển gen vào giống lúa BT7 sử dụng IE.....	51
2.3.3	Đánh giá sự tương tác giữa vi khuẩn <i>Xoo</i> và <i>OsSWEET14</i> trên BT7.....	55
2.3.4	Thiết kế cấu trúc T-DNA chỉnh sửa <i>SW14-BT</i>	58
2.3.5	Tạo dòng lúa BT7 chỉnh sửa <i>SW14-BT</i>	61
2.3.6	Đánh giá đặc điểm của dòng lúa BT7 chỉnh sửa <i>SW14-BT</i>	64
2.4	Phương pháp xử lý số liệu	65
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN		66
3.1	Nghiên cứu xây dựng quy trình chuyển gen vào IE giống lúa BT7	66
3.1.1	Tối ưu hệ thống tái sinh in vitro từ IE cho giống lúa BT7.....	66
3.1.2	Tối ưu quy trình chuyển gen vào IE lúa BT7 qua <i>A. tumefaciens</i>	73
3.1.3	Quy trình chuyển gen vào IE giống lúa BT7 thông qua <i>A. tumefaciens</i>	80
3.2	Thiết kế cấu trúc T- DNA chỉnh sửa <i>SW14-BT</i>.....	82
3.2.1	Nghiên cứu sự tương tác giữa VXO và <i>OsSWEET14</i> ở giống lúa BT7	82
3.2.2	Thiết kế cấu trúc T-DNA chỉnh sửa <i>SW14-BT</i>	94
3.3	Tạo dòng lúa BT7 chỉnh sửa <i>SW14-BT</i>.....	103
3.3.1	Tạo chủng <i>A. tumefaciens</i> mang cấu trúc T-DNA chỉnh sửa <i>SW14-BT</i>	103
3.3.2	Chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa <i>SW14-BT</i> vào lúa BT7	104
3.3.3	Sàng lọc kiểu gen và kiểu hình của dòng lúa BT7 tái sinh	106
3.3.4	Sàng lọc kiểu gen và kiểu hình của dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen T ₁	113
3.4	Đánh giá đặc điểm của lúa BT 7 chỉnh sửa <i>SW14-BT</i>.....	117
3.4.1	Đánh giá đặc điểm nông sinh học dòng lúa BT7 chỉnh sửa <i>SW14-BT</i>	117
3.4.2	Nghiên cứu biểu hiện <i>OsSWEET14</i> trong dòng lúa chỉnh sửa <i>SW14-BT</i>	120
3.4.3	Đánh giá khả năng kháng bạc lá của lúa BT7 chỉnh sửa <i>SW14-BT</i>	123
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....		127
Kết luận.....		127
Đề nghị.....		128
DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....		129
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....		130
PHỤ LỤC.....		146

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
Alt-NHJI	: Alternative non-homologous end joining	Ghép nối tận cùng không tương đồng thay thế
AS	: Acetosyringone	
BAP	: 6-benzyl amino purine	
BLB	: Bacterial leaf blight	Bệnh bạc lá do vi khuẩn
BT7	: Bacthom7 cultivar	Giống lúa Bắc thom 7
Cas9	: CRISPR-associated 9	
cDNA	: Complementary Deoxiribonuceic acid	Trình tự DNA bổ sung
cNHEJ	: Classical non-homologous end-joinng	Ghép nối tận cùng không tương đồng gốc
CRISPR	: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	Nhóm trình tự ngắn, đối xứng, lặp lại phổ biến
crRNA	: CRISPR RNA	
Cs	: Et al. (and others)	Cộng sự
CTAB	: Cetyl three methylammonium bromide	
DAP	: Days after pollination	Ngày sau thụ phấn
DNA	: Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
DSB	: DNA double-strand break	Đứt gãy DNA sợi đôi
EBE	: Effector binding element	Yếu tố liên kết thụ thể
gRNA	: guide RNA	RNA dẫn đường
HDR	: Homology directed repair	Sửa chữa ADN theo cơ chế tái tổ hợp tương đồng
HPT	: Hygromycin phosphotransferase	
IE	: Immature embryos	Phôi non
LB	: Luria-Bertani medium	Môi trường Luria-Bertani nuôi vi khuẩn
MMEJ	: Microhomology-mediated end-joining	Ghép nối tận cùng tương đồng nhỏ
NAA	: α -naphthalene acetic acid	Axit α -naphthalene acetic
NHEJ	: Non-homologous end joining	Ghép nối tận cùng không tương đồng
Nu	: Nucleotide	
NST	: Chromosome	Nhiễm sắc thể

OD	: Optical density	Mật độ quang học
PAM	: Protospacer adjacent motif	Trình tự gần protospacer
PCR	: Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphisms	Đa hình chiều dài đoạn giới hạn
PGRs	: Plant growth regulators	Chất điều hòa sinh trưởng thực vật
R gene	: Resistance gene	Gen kháng
RNA	: Ribonucleic acid	Axit ribonucleic
RT-PCR	: Reverse transcriptase-polymerase chain-reaction	Phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược
SD	: Standard Deviation	Độ lệch chuẩn
SDSA	: Synthesis-dependent strand annealing	Ghép sợi phụ thuộc vào sự tổng hợp
S gene	: Susceptibility gene	Gen nhiễm
sgRNA	: Single guide RNA	RNA dẫn đường sợi đơn
SNP	: Single nucleotide polymorphism	Đa hình nucleotide đơn
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences	Phần mềm thống kê khoa học xã hội
SSA	: Single-strand annealing	Ghép sợi đơn
<i>SW14-BT</i>	:	Promoter <i>OsSWEET14</i> giống lúa Bắc thơm 7
<i>SWEET</i>	: Sugar will eventually be exported transporters	Protein vận chuyển đường
T-DNA	: Transfer DNA	DNA nhảy
T3SS	: Type III secretion system	Hệ thống chất tiết loại III
T7E1	: T7 Endonuclease I	
TAL	: Transcription activator-like	Protein giống yếu tố hoạt hóa phiên mã
TALLEN	: Transcription activator-like effector nucleases	Nuclease chứa thụ thể giống yếu tố hoạt hóa phiên mã
TE	: Tris-EDTA	
VXO	: Vietnam <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Vi khuẩn <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> thu thập ở Việt Nam
<i>Xoo</i>	: <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Vi khuẩn
ZFN	: Zinc-finger nuclease	Nuclease ngón tay kẽm

DANH MỤC BẢNG

TT bảng	Tên bảng	Trang
1.1	Đặc điểm chính của các công nghệ chỉnh sửa gen	6
1.2	Ứng dụng CRISPR/Cas9 cải tiến di truyền cây lúa	15
1.3	Hiệu quả chuyển gen thông qua <i>A. tumefaciens</i> (2010-2017)	39
2.1	Thang điểm đánh giá tính kháng bệnh bạc lá	65
3.1	Hiệu quả khử trùng của NaOCl 1,0% đối với hạt non giống lúa BT7	67
3.2	Ảnh hưởng của ánh sáng đến tỉ lệ tăng sinh của mô sẹo phát sinh. từ IE lúa BT7	69
3.3	Ảnh hưởng của ánh sáng đến chất lượng mô sẹo phát sinh từ IE lúa BT7	70
3.4	Ảnh hưởng của chất ĐHST và nước dừa đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo	72
3.5	Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn và thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen vào IE giống lúa BT7	74
3.6	Ảnh hưởng của tuổi IE đến hiệu quả chuyển gen vào lúa BT7	77
3.7	Ảnh hưởng của nồng độ AS đến quá trình chuyển gen vào IE giống lúa BT7	79
3.8	Trình tự và đặc điểm các sgRNA ứng viên chỉnh sửa <i>SW14-BT</i>	95
3.9	Phân tích hiệu quả hoạt động của sgRNA mang các crRNA ứng viên chỉnh sửa <i>SW14-BT</i>	96
3.10	Trình tự DNA trong hệ gen lúa tương đồng với crRNA	97
3.11	Kết quả biến nạp cấu trúc pCas9/gRNA-SW14 vào lúa BT7	104
3.12	Kết quả sàng lọc kiểu gen các dòng lúa BT7 tái sinh	106
3.13	Kiểu gen <i>SW14-BT</i> của các dòng lúa chuyển gen T ₀	109
3.14	Khả năng tạo hạt của dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen T ₀	113
3.15	Phân ly di truyền cấu trúc T-DNA của dòng lúa BT7 T ₁	114
3.16	Phân ly di truyền đột biến <i>SW14-BT</i> ở dòng lúa chỉnh sửa gen T ₁	115
3.17	Kiểu gen <i>SW14-BT</i> của các dòng lúa BT7 T ₁ mang đột biến đồng hợp và không chứa T-DNA	115
3.18	Kết quả đánh giá kiểu hình dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen T ₁	117
3.19	Một số đặc điểm nông học chính của các dòng lúa BT7 chỉnh sửa <i>SW14-BT</i>	118

DANH MỤC HÌNH

TT hình	Tên hình	Trang
1.1	Cơ chế chỉnh sửa gen	5
1.2	Hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9	9
1.3	Các bước cơ bản thực hiện chỉnh sửa gen bằng CRISPR/Cas9	12
1.4	Triệu chứng bệnh và phương thức xâm nhiễm của <i>Xoo</i> trên cây lúa	17
1.5	Bản đồ phân bố bệnh bạc lá lúa trên thế giới	19
1.6	Cánh đồng lúa bị thiệt hại bởi BLB	20
1.7	Mô hình cấu trúc và cơ chế hoạt động của TALE	23
1.8	Quan hệ phát sinh chủng loại họ protein OsSWEET	26
1.9	Các EBE trên promoter <i>OsSWEET14</i>	29
2.1	Sơ đồ thực hiện các nội dung nghiên cứu chính của luận án	45
2.2	Lây nhiễm vi khuẩn <i>Xoo</i> trên lúa bằng phương pháp cắt lá	56
2.3	Sơ đồ vector pGEM/OsSWEET14.	58
2.4	Sơ đồ thiết kế vector pENTR4/gRNA-SW14	59
2.5	Sơ đồ vector pCas9	60
3.1	Sự phát triển của IE BT7 sau khi khử trùng bằng NaOCl 1%	68
3.2	Tạo mô sẹo từ IE giống lúa BT7	69
3.3	Tái sinh chồi từ mô sẹo tạo thành từ IE của giống lúa BT7	73
3.4	Đồng nuôi cấy mô sẹo tạo thành từ IE giống lúa BT7 với <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	75
3.5	Chuyển gen vào mô sẹo tạo thành từ IE giống lúa BT7 có DAP khác nhau	78
3.6	Chuyển gen vào lúa BT7 sử dụng AS có nồng độ khác nhau	79
3.7	Quy trình chuyển gen vào IE giống lúa BT7 thông qua <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	81
3.8	Lây nhiễm nhân tạo <i>Xoo</i> trên giống lúa BT7	83
3.9	Độc tính của VXO trên lúa BT7	83
3.10	Tách chiết RNA từ mẫu lá BT7 lây nhiễm nhân tạo VXO	85
3.11	Biểu hiện của <i>OsSWEET14</i> trong cây lúa BT7 nhiễm <i>Xoo</i>	86

3.12	Phân lập đoạn promoter <i>SW14-BT</i> của lúa BT7	88
3.13	Kiểm tra vector pGEM/SW14-BT	90
3.14	So sánh trình tự nucleotide promoter <i>OsSWEET14</i>	92
3.15	Phân tích trình tự <i>SW14-BT</i>	93
3.16	Cấu trúc bậc II của sgRNA chứa crRNA-8	97
3.17	Vị trí nhận biết của crRNA trên <i>SW14-BT</i>	98
3.18	Ghép nối <i>gRNA-SW14</i> vào vector pENTR4-gRNA	99
3.19	Kiểm tra vector tái tổ hợp pENTR4/gRNA-SW14	100
3.20	Giải trình trình tự pENTR4/gRNA-SW14	100
3.21	Kiểm tra vector pCas9/gRNA-SW14	102
3.22	Cấu trúc vector pCas9/gRNA-SW14	102
3.23	PCR trực tiếp khuẩn lạc <i>Agrobacterim tumefaciens</i> được biến nạp pCas9/gRNA-SW14	103
3.24	Chuyển cấu trúc chỉnh sửa SW14-BT vào lúa BT7	105
3.25	Cây lúa BT7 chuyển gen	105
3.26	Xác định đột biến trên <i>SW14-BT</i> bằng T7E1	109
3.27	Giải trình tự <i>SW14-BT7</i> của các dòng lúa BT7 chuyển gen T ₀	110
3.28	Cây lúa BT7 chỉnh sửa gen T ₀ trồng trong nhà lưới	112
3.29	Hình thái cây lúa BT7 chỉnh sửa <i>SW14-BT</i>	118
3.30	Biểu hiện của <i>OsSWEET14</i> ở dòng lúa BT7 chỉnh sửa <i>SW14-BT</i>	121
3.31	Đánh giá tính kháng <i>Xoo</i> của dòng lúa BT7 đột biến <i>SW14-BT</i>	124
3.32	Lây nhiễm <i>Xoo</i> nhân tạo trên dòng lúa BT7 đột biến <i>SW14-BT</i>	125

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

CRISPR-Cas9 là một công nghệ chỉnh sửa gen tiên tiến, cho phép cải biến DNA hệ gen trong tế bào một cách chính xác và hiệu quả. Hệ thống này tạo ra đứt gãy DNA sợi đôi tại vị trí xác định trong hệ gen và thông qua cơ chế tự sửa chữa DNA của tế bào để tạo ra những đột biến có chủ đích trong hệ gen. Chọn giống chính xác bằng công nghệ CRISPR/Cas9 có thể khắc phục được những hạn chế vốn có của các phương pháp chọn giống truyền thống như tiết kiệm thời gian và chi phí, giữ được toàn bộ nền di truyền với các đặc tính nông sinh học quý của giống gốc. Việc ứng dụng công nghệ này đã tạo ra một cuộc cách mạng trong nghiên cứu khoa học sự sống nói chung và khoa học nông nghiệp nói riêng, mang lại cơ hội mới cho lĩnh vực chọn giống chính xác, đang và sẽ góp phần nâng cao phẩm chất giống ở nhiều loại cây trồng ở Việt Nam.

Bệnh bạc lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (gọi tắt là *Xoo*) là một trong những bệnh hại nguy hiểm nhất trên lúa hiện nay, gây ra những thiệt hại nặng nề trong sản xuất lúa gạo ở Việt Nam và nhiều nơi trên thế giới. Cho đến nay, các biện pháp phòng trừ thông thường hầu như không mang lại hiệu quả đối với bệnh bạc lá lúa; sử dụng giống lúa kháng vẫn là cách tốt nhất để đối phó với bệnh bạc lá do vi khuẩn *Xoo* gây ra. Giống lúa Bắc thơm 7 (BT7) là một trong những giống chủ lực ở miền Bắc với rất nhiều ưu điểm như chất lượng gạo thơm, ngon, năng suất cao và được nhiều người ưa chuộng. Tuy nhiên, giống lúa này rất mẫn cảm với bệnh bạc lá, dẫn đến sản lượng thu hoạch bị ảnh hưởng nghiêm trọng, đặc biệt ở vụ Mùa. Vì vậy, nghiên cứu chọn tạo giống lúa BT7 kháng bệnh bạc lá là yêu cầu tất yếu, giúp đảm bảo tính bền vững và hiệu quả trong sản xuất lúa gạo ở khu vực phía Bắc.

Xoo xâm nhiễm vào tế bào lúa và gây bệnh thông qua hệ thống tiết loại III (Type III secretion system - T3SS). Các protein TAL (Transcription activator-like effector) thuộc T3SS liên kết với vùng promoter và hoạt hóa sự biểu hiện của các gen “nhiễm” (susceptibility gene – *S* gene), gây bệnh bạc lá cho cây lúa. *OsSWEET14* thuộc họ gen mã hóa protein vận chuyển đường SWEET (Sugar will eventually be

exported transporter) đã được biết là gen “nhiễm” quan trọng có liên quan tới bệnh bạc lá ở lúa. Khi gen này được hoạt hóa bởi các protein TAL, tế bào thực vật sẽ tăng cường vận chuyển đường đến gian bào, cung cấp dinh dưỡng cho *Xoo* sinh trưởng và phát triển. Các đột biến xảy ra trên vùng promoter của gen “nhiễm” tại vị trí liên kết (Effector binding element – EBE) với protein TAL có thể phá vỡ mối liên kết giữa protein TAL của *Xoo* và gen “nhiễm”, tạo ra tính kháng bạc lá cho cây lúa. Điều này đã mở ra một hướng nghiên cứu đầy tiềm năng nhằm cải tiến tính kháng bệnh bạc lá cho các giống lúa chủ lực bằng công nghệ chỉnh sửa gen. Ý tưởng gây đột biến chính xác gen “nhiễm” bằng công nghệ CRISPR/Cas9 để cải tiến tính kháng bạc lá cho giống lúa BT7 là chiến lược chọn giống hoàn toàn mới ở Việt Nam, đáp ứng được đồng thời nhu cầu cấp thiết của sản xuất cũng như nền khoa học nông nghiệp Việt Nam.

Vì vậy, tôi đã thực hiện luận án “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa promoter *OsSWEET14* nhằm nâng cao tính kháng bệnh bạc lá ở giống lúa BT7”.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Mục tiêu chung:

Ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 để tăng cường tính kháng bệnh bạc lá cho giống lúa BT7 thông qua chỉnh sửa promoter *OsSWEET14*.

Mục tiêu cụ thể:

- Tối ưu quy trình chuyển gen vào phôi non (immature embryo – IE) giống lúa BT7 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.
- Thiết kế cấu trúc T-DNA biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa promoter *OsSWEET14* của giống lúa BT7 (gọi tắt là *SW14-BT*).
- Tạo dòng lúa BT7 mang đột biến chính xác trên *SW14-BT* bằng hệ thống CRISPR/Cas9.
- Sàng lọc dòng lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT* tăng cường tính kháng với vi khuẩn *Xoo* Việt Nam.

3. Những đóng góp mới của luận án

- Tối ưu các điều kiện để chuyển gen vào IE giống lúa BT7 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*; quy trình chuyển gen tối ưu đạt hiệu suất 20,68%.

- Xác định được *OsSWEET14* hoạt động như một gen “nhiễm” quan trọng đối với bệnh bạc lá ở giống lúa BT7.

- Thiết kế thành công hệ thống vector chuyển gen mang cấu trúc biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa *SW14-BT*.

- Ứng dụng thành công hệ thống CRISPR/Cas9, tạo ra tám dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen mang đột biến *SW14-BT* ở dạng đồng hợp, không chứa cấu trúc T-DNA trong hệ gen và có một số đặc điểm nông sinh học chính tương tự giống lúa đối chứng không chỉnh sửa gen.

- Tạo được hai dòng lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT* thể hiện tính kháng hoàn toàn với chủng vi khuẩn VXO_11.

4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

4.1. Ý nghĩa khoa học

Việc xác định được các yếu tố môi trường nuôi cấy và yếu tố vật lý tác động đến chuyển gen vào IE giống lúa BT7 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* đã bổ sung các dẫn liệu khoa học cho nghiên cứu chuyển gen vào các giống lúa *indica*.

Trên cơ sở phân tích mức độ biểu hiện *OsSWEET14* khi lây nhiễm các chủng vi khuẩn VXO và đánh giá tính kháng bệnh bạc lá của các dòng lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT* biểu hiện *OsSWEET14*, luận án đã bước đầu xác định được cơ chế gây bệnh ở mức độ phân tử của một số chủng VXO trên giống lúa BT7. Kết quả luận án đã cho thấy sự đa dạng của quần thể *Xoo* ở Việt Nam, ít nhất là về hệ protein tiết loại III TAL liên quan tới độc tính của vi khuẩn trên cây lúa. Chủng VXO_11 gây bệnh trên BT7 thông qua một protein TAL độc duy nhất liên kết với vị trí EBE *AvrXa7/PthXo3/TalF*; trong khi độc tính của hai chủng VXO_60 và VXO_96 phụ thuộc vào ít nhất 2 protein TAL khác nhau.

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 chủ lực trong sản xuất (BT7)

của Việt Nam. Đây là nguồn dẫn liệu tham khảo tốt cho công tác nghiên cứu liên quan đến chỉnh sửa gen bằng công nghệ CRISPR/Cas9.

4.2. Ý nghĩa thực tiễn

Luận án đã tạo được dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen có khả năng kháng chủng vi khuẩn VXO_11, mang các đặc tính nông sinh học chính không khác biệt so với với giống gốc ban đầu khi trồng ở điều kiện nhà lưới. Đây là nguồn nguyên liệu cho nghiên cứu chọn tạo và phát triển dòng/giống lúa BT7 kháng bệnh bạc lá sau này.

Các cấu trúc vector chỉnh sửa promoter *OsSWEET14* là sản phẩm trung gian trong quá trình thực hiện đề tài này có thể được sử dụng cho các nghiên cứu tương tự nhằm cải tạo tính kháng bệnh bạc lá cho các giống lúa chủ lực khác ở Việt Nam.

Đây là nghiên cứu đầu tiên áp dụng công nghệ chỉnh sửa gen (CRISPR/Cas9) vào cải tạo giống lúa 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.

5. Phạm vi nghiên cứu:

Địa điểm nghiên cứu:

Các thí nghiệm về vi khuẩn, nuôi cấy mô và sinh học phân tử được thực hiện tại Bộ môn Bệnh học Phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp.

Các thí nghiệm nông học, gieo trồng, đánh giá tính kháng bệnh được thực hiện tại nhà lưới an toàn sinh học của Viện Di truyền Nông nghiệp, tại số 1 đường Phạm Văn Đồng, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội.

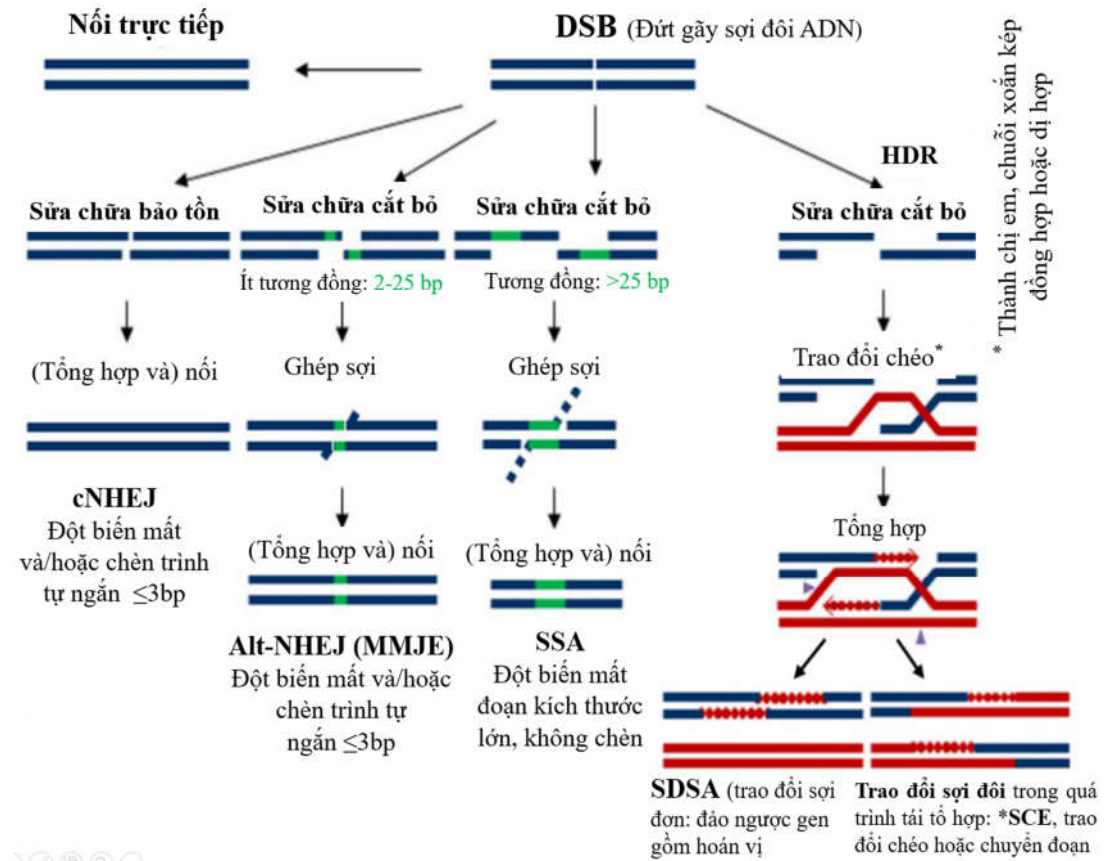
Thời gian thực hiện: Từ 08/2017 – 12/2021.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU VỀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

1.1 Giới thiệu về công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9

1.1.1 Giới thiệu chung về công nghệ chỉnh sửa gen

Chỉnh sửa gen (hay còn được gọi là chỉnh sửa hệ gen) là một tập hợp các công cụ giúp các nhà khoa học thay đổi DNA của sinh vật. Phương pháp này lợi dụng hệ thống sửa chữa DNA của tế bào để tạo ra những thay đổi nhỏ trong trình tự DNA đích, thông qua việc sử dụng các nuclease tổng hợp để tạo ra đột biến đứt gãy sợi đôi (double-stranded breaks - DSB) tại vị trí xác định trong hệ gen. Đột biến xảy ra trên phân tử DNA thường là: (1) ghép nối trực tiếp và (2) mất/chèn đoạn hoặc trao đổi chéo hoặc chuyển đoạn (Hình 1.1) [118].



Hình 1.1: Cơ chế chỉnh sửa gen

Ghi chú: Các mức độ khác nhau của tái tổ hợp, có sự tương đồng và không tương đồng. Tái tổ hợp không tương đồng: Con đường tạo ra cNHEJ sửa chữa bảo

tồn theo nguyên tắc bổ sung; con đường cắt bỏ sai hỏng tạo ra đột biến mới altNHEJ/MMEJ (mất hoặc chèn dưới 3 nucleotide) và ghép sợi đơn (SSA) xảy ra khi có đoạn trình tự tương đồng tồn tại ở đâu đó trong hệ gen. Cả 3 loại sửa chữa này đều khác với tái tổ hợp tương đồng (HDR), ở đó, sau khi cắt bỏ đoạn sai hỏng, phần nhô ra của sợi đơn này sẽ trao đổi chéo với phần tương đồng không bị hư hại (một phần) của sợi đơn phân tử khác và ghép sợi đôi (liên kết bổ sung - SDSA), gây ra sự đảo ngược hoặc hoán vị gen alen. Ngoài ra, các cấu trúc tái tổ hợp (đường nối Holiday) trung gian có thể được hình thành bởi sự trao đổi đoạn sợi đôi giữa phân tử khuôn và phân tử lỗi hỏng. Dựa vào phân tử khuôn, sự trao đổi đoạn sợi đôi tạo ra nhiễm sắc tử chị em (SCE), trao đổi chéo trong giảm phân hoặc các dạng sắp xếp lại khác [118].

Bảng 1.1. Đặc điểm chính của các công nghệ chỉnh sửa gen

Đặc điểm	Meganuclease	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
Nguồn gốc	SV nhân sơ và SV nhân thực	Sinh vật nhân thực	Vi khuẩn Xanthomonas	SV nhân sơ (Streptococcus pyogenes)
Mô-đun liên kết	DNA – Protein	DNA - Protein	DNA - Protein	DNA – RNA
Mô-đun cắt	Protein đơn	Cặp Protein (FokI)	Cặp Protein (FokI)	Cas9 + gRNA
Chiều dài trình tự đích	12 – 40 bp	18 – 24 bp	24 – 59 bp	20 bp
Tần suất điểm cắt	1/1.000 bp	1/140 bp	1 tiểu đơn vị/1 bp	1/13 bp (PAM)
Độ đặc hiệu	Trung bình	Trung bình	Trung bình	Cao
Khả năng thí nghiệm	Phức tạp, đắt đỏ cần chuyên môn cao và kinh nghiệm	Đắt đỏ, cần thời gian dài	Nhanh, đơn giản, chi phí thấp	Nhanh, đơn giản, giá rẻ

Nghiên cứu chỉnh sửa gen với sự phát triển của bốn công cụ dựa trên bốn loại nuclease khác nhau, bao gồm Meganuclease, ZFN (Zinc-Finger Nuclease), TALEN (Transcription Activator-Like Effector nuclease) và CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein) đã gặt hái nhiều thành công trong gần ba thập kỉ qua. Công nghệ Meganuclease và ZFN là hai công nghệ thế hệ thứ nhất, có nhược điểm là khá đắt đỏ và khó thiết kế nên khó có thể áp dụng để nghiên cứu chỉnh sửa gen. TALEN và CRISPR/Cas là hai công

nghe chỉnh sửa gen thế hệ thứ hai; đã được cải tiến và hoàn thiện hơn, vì vậy, dễ sử dụng và linh hoạt hơn nhiều. Tất cả các hệ thống chỉnh sửa gen đều có đặc điểm chung là được cấu tạo bởi 2 thành phần chính: (1) thành phần nhận biết và liên kết với DNA đích (yếu tố gắn DNA) và (2) thành phần cắt DNA đích (yếu tố cắt DNA). Tuy nhiên, mỗi hệ thống có những đặc điểm đặc trưng riêng khiến cho chúng được sử dụng với các mục đích khác nhau (Bảng 1.1) [36].

Do có kích thước hệ gen tương đối nhỏ, nguồn đa dạng gen di truyền sẵn có, hiệu quả chuyển gen cao, dữ liệu đã công bố về hệ gen nhiều hơn so với các loại ngũ cốc khác, vì vậy, cây lúa được xem như một trong các hệ thống mô hình tuyệt vời nhất để nghiên cứu chức năng hệ gen, đặc biệt là các nghiên cứu ứng dụng công nghệ chỉnh sửa gen. Ngày càng có nhiều các công bố khoa học (Phụ lục 1) đã chứng minh cho thấy thành công của việc ứng dụng các công nghệ chỉnh sửa gen khác nhau vào cây lúa nhằm phát hiện vai trò của các gen chức năng và khả năng cải tiến các tính trạng quý như cải thiện chất lượng và năng suất hạt, nâng cao sức sống của cây, nâng cao hàm lượng các chất dinh dưỡng, cải thiện stress phi sinh học và stress sinh học...[103].

1.1.2 Cấu trúc và cơ chế chỉnh sửa của công nghệ CRISPR/Cas9

1.1.2.1. Cấu trúc và chức năng sinh học của công nghệ CRISPR/Cas9

Các nhà khoa học đã chứng minh CRISPR cùng với các gen *Cas* tạo nên đáp ứng miễn dịch thích ứng ở vi khuẩn và vi khuẩn cổ đại để chống lại virus và phage [73, 112]. Các locus *CRISPR* này đã được phát hiện trong hệ gen của vi khuẩn và tảo từ lâu; tuy nhiên, các nhà khoa học phải mất hơn 20 năm nghiên cứu mới tìm ra chức năng sinh học của hệ thống CRISPR trong vi khuẩn, vi khuẩn cổ đại và tảo [73, 112].

Một hệ thống CRISPR/Cas tự nhiên bao gồm: các gen *Cas* mã hóa bởi các đơn vị lặp đối xứng nghịch đảo tương đồng, các endonuclease hoạt động qua trung gian RNA, các RNA ngắn (được gọi là “spacer”) sinh ra bởi sự xuất hiện của các trình tự DNA ngắn di động (được gọi là “protospacer”). Protospacer có trình tự bổ sung với các spacer di chuyển xung quanh vị trí trình tự lặp đối xứng nghịch đảo tương đồng khi tế bào vi khuẩn bị tấn công. Các spacer này có vai trò phát hiện sự xuất hiện của DNA ngoại lai khi tế bào bị xâm nhiễm và cho phép hệ thống CRISPR/Cas cắt DNA ngoại lai. Cơ chế hoạt động của hệ thống miễn dịch qua trung gian CRISPR/Cas bao

gồm ba bước: thu nhận, biểu hiện và can thiệp. Ở bước thu nhận, một spacer mới (trình tự của DNA ngoại lai) được thu nhận và chèn vào cấu trúc tuần tự trên locus CRISPR. Tiền chất CRISPR-RNA (pre-crRNA) và protein Cas được sinh tổng hợp ở bước biểu hiện. Nhờ RNase III, pre-crRNA bị cắt ra thành các phân tử crRNA trưởng thành; crRNA sẽ kết hợp với protein Cas ở bước can thiệp để cắt các DNA ngoại lai. Motif CRISPR gắn liền với mỗi protospacer và nằm sát với trình tự DNA đích được đặt tên là trình tự liền kề protospacer (protospacer adjacent motif – PAM). Trình tự PAM nằm trên hệ gen của virus và phage nhưng không xuất hiện trên locus CRISPR trong hệ gen vi khuẩn [112].

Các phân tích tin sinh học đã chỉ ra rằng Cas9 là một protein kích thước lớn đa chức năng, gồm hai phần: (i) thành phần nhận biết có vai trò phát hiện DNA đích và tương tác với sgRNA; (ii) thành phần nuclease chứa 2 domain RuvC-like và HNH, trong đó RuvC cắt sợi DNA đích không bổ sung với gRNA và HNH cắt sợi DNA bổ sung với gRNA. Nuclease Cas9 phát hiện DNA đích trong hệ gen có chứa trình tự dài 20 bp tương đồng với trình tự lõi hay trình tự dẫn đường trên phân tử sgRNA. Cơ chế hoạt động này tạo nên tính đặc hiệu của Cas9 [112].

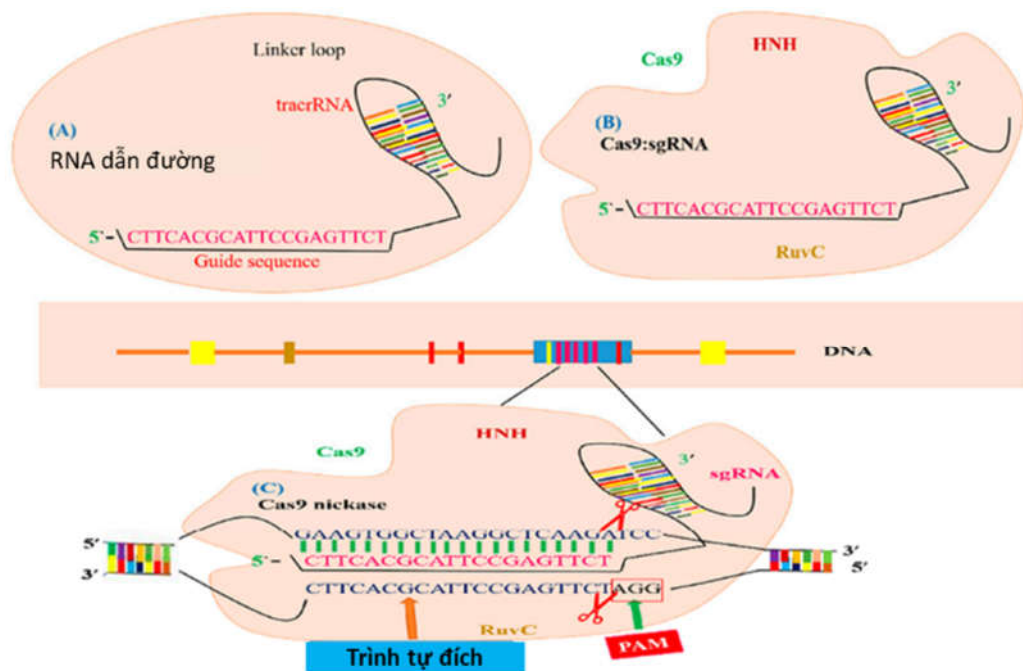
Trình tự PAM chứa 2 nucleotide bảo thủ nằm phía trước vị trí liên kết với crRNA để protein Cas nhận biết trình tự đích. Protein Cas không thể phát hiện và cắt hiệu quả DNA nếu thiếu bước nhận biết trình tự PAM. Trong hệ thống miễn dịch tự nhiên của vi khuẩn, trình tự PAM có ý nghĩa đặc biệt quan trọng giúp phân biệt DNA vi khuẩn và DNA ngoại lai xâm nhiễm. Đặc điểm này giúp vi khuẩn bảo vệ DNA của mình khỏi sự tác động của nuclease. Trình tự PAM được phức hệ Cas9:sgRNA phát hiện và Cas9 endonuclease sẽ cắt tạo đứt gãy DNA tại vị trí cách trình tự PAM 3 bp. Ở một vài hệ thống CRISPR, trình tự PAM đặc biệt quan trọng đối với hoạt động chức năng của protein Cas, ví dụ như trình tự PAM 5'-NNNNGATT được nhận biết bởi protein Cas của *Neisseria meningitidis*. Tương tự, protein Cas của *S. thermophiles* phát hiện trình tự PAM 5'-NGGNG hay 5'-NNAGAA, protein Cas của *S. pyogenes* phát hiện trình tự PAM 5'-NGG [73, 112].

Có thể thấy, phức hệ CRISPR/Cas9 có cấu trúc không phức tạp, dễ tùy biến để bám đặc hiệu DNA và đặc biệt là có thể thiết kế và thao tác không cần sử dụng DNA hay plasmid. Điều đó giúp giảm thiểu lo ngại tương tự trong trường hợp của

sinh vật biến đổi gen [69, 75]. Do lợi thế về kỹ thuật không quá phức tạp trong thiết kế cấu trúc, tính hiệu quả cao, chi phí vừa phải... nên công nghệ chỉnh sửa hệ gen sử dụng CRISPR/CAS9 được ứng dụng phổ biến không chỉ trong lĩnh vực y tế mà còn cả trong lĩnh vực sinh học nông nghiệp để phục vụ nhiều mục đích nghiên cứu khác nhau như nghiên cứu chức năng gen, cải tạo giống cây trồng....

1.1.2.2. Cơ chế chỉnh sửa gen đích của hệ thống CRISPR/Cas9

Năm 2012, lần đầu tiên công nghệ CRISPR/Cas9 được áp dụng để chỉnh sửa gen sinh vật trong công trình nghiên cứu của Jinek *et al.* tại trường đại học California. Các tác giả này đã đưa vào tế bào một phức hệ bao gồm nuclease Cas9 và RNA dẫn đường (guide RNA - gRNA) tự thiết kế để cắt đoạn DNA tại những vị trí mong muốn [68].



Hình 1.2: Hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9

Ghi chú: Hệ thống CRISPR/Cas9 bao gồm gRNA (A) và Cas9: sgRNA (B). (C) Nuclease 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. [73, 112]

Hiện nay, hệ thống miễn dịch của *S. pyogenes* (CRISPR/Cas9) được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu chỉnh sửa gen bằng công cụ CRISPR/Cas. Hệ thống CRISPR/Cas9 này đã được cải biến chỉ chứa hai thành phần: (i) phân tử sgRNA

(single-guide RNA) không mã hóa protein chứa trình tự dẫn đường được tạo ra bằng cách kết hợp protospacer với crRNA và tracrRNA; và (ii) enonuclease Cas9 kết hợp với sgRNA để tạo thành phức hệ CRISPR/Cas9 để cắt DNA sợi đôi (dsDNA). Protein Cas9 được dẫn đường bởi sgRNA và nhận biết DNA đích nhờ sự có mặt của trình tự “lõi” trong sgRNA và trình tự PAM 5’-NGG’-3’ nằm gần trình tự đích (Hình 1.2) [112].

Đặc điểm quan trọng nhất của phương pháp chỉnh sửa gen CRISPR/Cas là tạo ra đứt gãy DNA ở vị trí xác định, từ đó có thể tạo ra những thay đổi trên hệ gen thông qua hai con đường sửa chữa DNA: ghép nối tận cùng không tương đồng (Non-homologous end joining - NHEJ) và sửa chữa chính xác nhờ tái tổ hợp tương đồng (homology-directed repair - HDR). Sau khi phát hiện ra vị trí đích, Cas9 cho phép sgRNA bắt cặp với trình tự đích. Sau khi phát hiện ra cơ chế hoạt động quan trọng này, hệ thống CRISPR/Cas9 loại II tự nhiên đã được đơn giản hóa, trong đó phân tử kép tracrRNA:crRNA đã được cải biến thành một phân tử RNA dẫn đường đơn (sgRNA). Phân tử sgRNA cải biến có thể dẫn đường cho protein Cas9 tái tổ hợp để cắt đặc hiệu DNA trong thí nghiệm *in vitro*. Sợi DNA bị đứt gãy đầu bằng có thể được sửa chữa theo con đường HDR hoặc NHEJ [73, 112].

Cơ chế sửa chữa NHEJ thường dễ xảy ra lỗi và gây ra hiện tượng chèn hoặc mất nucleotide trên trình tự đích. Cơ chế sửa chữa này được tế bào sử dụng phổ biến trong hầu hết các pha của chu trình tế bào và không yêu cầu phải có trình tự khuôn tương đồng khi sửa chữa. Chính vì vậy, cơ chế này trở thành phương thức phổ biến để bất hoạt gen bằng cách tạo ra những biến đổi nhỏ (chèn/mất Nu) tại những vị trí xác định trên gen đích. Khi một cặp sgRNA được biểu hiện, con đường NHEJ có thể tạo ra một đột biến mất đoạn lớn trên NST. Ưu điểm vượt trội của hệ thống CRISPR so với TALEN và ZFN đó là có thể dễ dàng tấn công đồng thời vào nhiều vị trí khác nhau chỉ bằng một loại protein Cas9. Chỉnh sửa đa gen có khá nhiều ứng dụng như bất hoạt đa gen, xóa đoạn NST lớn, đảo vị trí đoạn NST, chèn gen. Do có thể chỉnh sửa đồng thời nhiều gen liên quan tới những tính trạng đa gen, hệ thống CRISPR là một phương pháp rất hiệu quả cho nghiên cứu chọn giống quy tụ [73, 112].

Con đường sửa chữa HDR chỉ hoạt động khi trong tế bào có mặt một trình tự đích tương đồng đặc hiệu với vị trí DNA bị đứt gãy. Ở thực vật, nhiều thành tựu chỉnh sửa gen đã đạt được bằng cơ chế HDR, ví dụ như thay thế gen, chỉnh sửa chính xác DNA, chuyển gen có định hướng. HDR bắt đầu ở pha S và G2 trong chu trình tế bào. Quá trình sửa chữa DSB yêu cầu một trình tự khuôn tương đồng với vị trí bị đứt gãy. Sợi khuôn để sửa chữa có thể nằm sẵn trên sợi NST trong cặp tương đồng hoặc được đưa từ bên ngoài vào tế bào, ví dụ như một phân tử DNA sợi đôi hay DNA sợi đơn ngoại sinh chứa trình tự đã được cải biến theo ý muốn để chèn vào vị trí đứt gãy. Chỉnh sửa chính xác hệ gen bằng cơ chế HDR đã được ứng dụng trên nhiều đối tượng sinh vật khác nhau. Tuy nhiên, ở thực vật, chỉnh sửa gen bằng HDR vẫn là một thách thức do hiệu suất thấp và những hạn chế trong phương thức đưa trình tự khuôn vào trong tế bào thực vật [73, 162].

1.1.2.3. Các bước thực hiện chỉnh sửa gen bằng hệ thống CRISPR/Cas9

Để chỉnh sửa gen thực vật bằng CRISPR/Cas9, quá trình thực hiện cơ bản gồm 5 bước chính như sau (Hình 1.3) [65]:

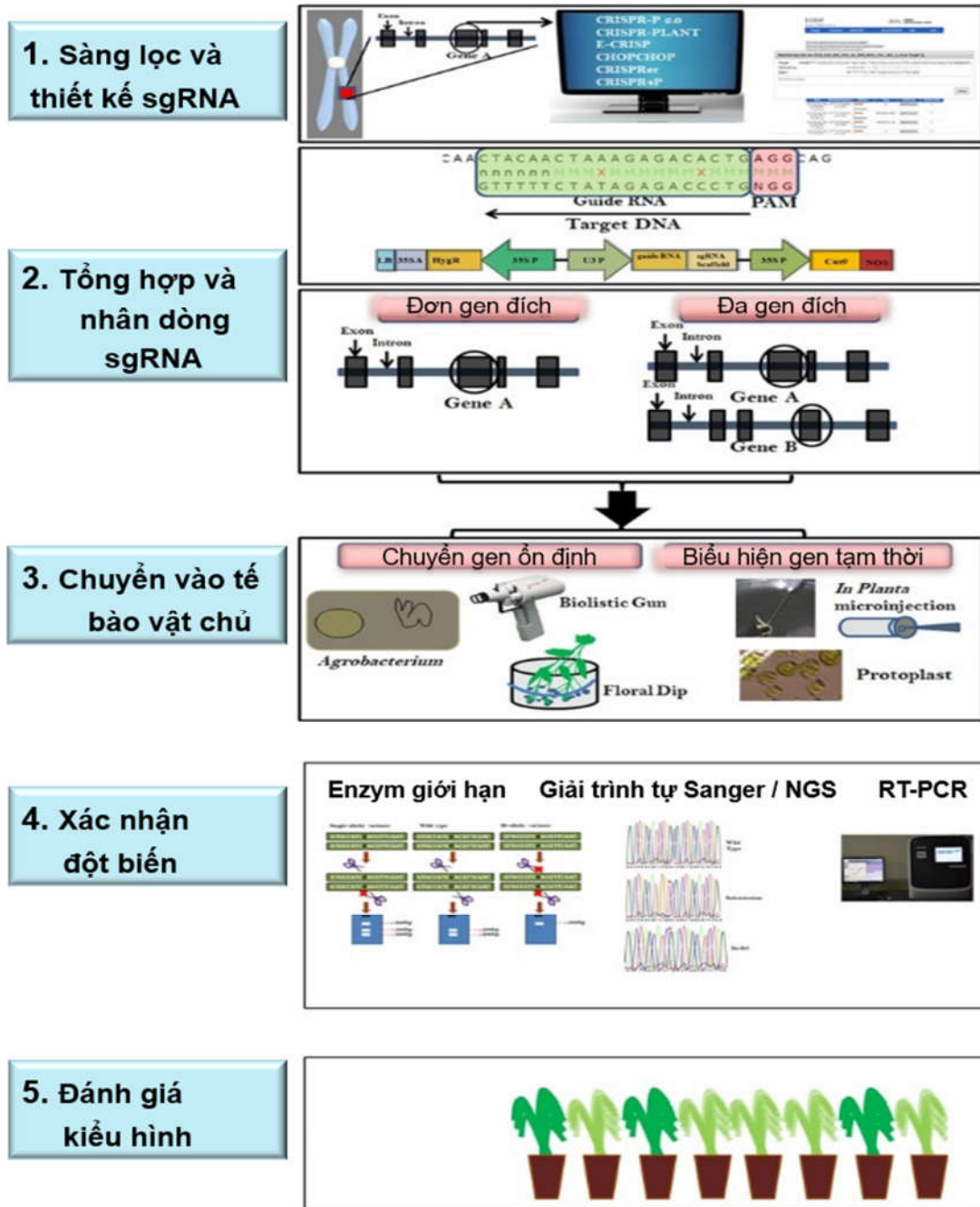
Bước 1: Sàng lọc vị trí gen đích và thiết kế sgRNA: Xác định gen đích và vị trí cần chỉnh sửa, từ đó định hướng thiết kế trình tự gRNA để có thể chỉnh sửa đúng mục tiêu.

Bước 2: Tổng hợp sgRNA và thiết kế cấu trúc vector biểu hiện sgRNA-Cas9: từ trình tự sgRNA đã được lựa chọn, tiến hành cắt, ghép với vector biểu hiện thích hợp với tế bào vật chủ.

Bước 3: Biến nạp cấu trúc vector vào tế bào vật chủ: bằng các biện pháp chuyển gen theo hướng ổn định (thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*, súng bắn gen hoặc nuôi cấy ngập chìm) hoặc theo hướng biểu hiện tạm thời gen bằng phương pháp vi tiêm hoặc nuôi cấy protoplast.

Bước 4: Xác định thể đột biến thông qua việc sàng lọc các cá thể mang gen đích đã được chỉnh sửa bằng các phương pháp sử dụng enzyme cắt giới hạn, giải trình tự hoặc bằng phương pháp PCR.

Bước 5: Đánh giá kiểu hình và chọn dòng chỉnh sửa gen mục tiêu thông qua việc trồng cây và đánh giá các đặc điểm kiểu hình, phân tích kiểu gen các dòng lúa sống sót để chọn dòng đã có sự chỉnh sửa gen mục tiêu.



Hình 1.3: Các bước cơ bản thực hiện chỉnh sửa gen bằng CRISPR/Cas9

1.1.3 Ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas9 trong khoa học cây trồng

1.1.3.1. Trên thế giới

Ứng dụng CRISPR/Cas9 vào lĩnh vực nghiên cứu cơ bản trong khoa học cây trồng đã giúp tìm hiểu được chức năng của rất nhiều gen, từ đó mở ra hướng đi mới cho việc chọn tạo các giống cây trồng mới có năng suất cao và phẩm chất tốt phục vụ sản xuất thông qua bất hoạt gen, hay biểu hiện, thay thế gen hoặc tạo đột biến điểm chính xác theo ý muốn [94]. Ví dụ, Gen *Drb2a* và *Drb2b* được phát hiện có chức năng điều hoà đáp ứng stress mặn và hạn ở cây đậu tương, gen *SIMAPK3* là chịu hạn ở cà chua thông qua thông qua bất hoạt đơn gen; *CHL1* (*magnesium-chelatase subunit I*) được chứng minh là có chức năng tổng hợp diệp lục trong quá trình quang hợp qua thí nghiệm chỉnh sửa đa gen; hộp CARG trong vùng CRE của WUS đặc biệt quan trọng với sự hình thành vòng nhiễm sắc thông qua thí nghiệm gây đột biến mất đoạn nhiễm sắc thể; gen nội sinh *ANT1* có liên quan đến tích lũy anthocyanin làm cho cây cà chua có kiểu hình màu tím đậm thông qua loại đột biến chèn các trình tự chức năng vào vị trí nhất định trong hệ gen [73].

Loại bỏ các yếu tố tiêu cực là một trong những phương thức hiệu quả để cải tiến di truyền của cây trồng. Ví dụ, bất hoạt các gen kiểm soát các tính trạng không mong muốn là ứng dụng đơn giản nhất và phổ biến nhất của CRISPR/Cas9. Các tính trạng cây trồng đã được cải tiến bằng CRISPR/Cas9 theo phương thức này bao gồm năng suất, chất lượng, chống chịu yếu tố stress sinh học và phi sinh học. Kỹ thuật chọn giống lai và nhiều vấn đề quan trọng khác liên quan tới năng suất cây trồng cũng đã được cải tiến nhờ công cụ này [46]. Ngoài lúa, nhiều cây trồng khác cũng đã được nghiên cứu ứng dụng CRISPR/Cas9 để tạo ra giống 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 γ -aminobutyric cao; khoai tây có hàm lượng độc tố steroid glycoalkaloid thấp do giảm sự hình thành rễ tơ. Một ứng dụng triển vọng khác của CRISPR/Cas9 trên cây cao lương là giảm hàm lượng kafirin, nguồn gốc hình thành nên các protein khó tiêu và không chứa lysine, một loại axit amin thiết yếu, bằng cách sử dụng một sgRNA tác

động tới vùng bảo thủ của tất cả các gen *k1C*. Trong một nghiên cứu khác, hàm lượng protein zein trong hạt ngô có thể giảm tới 12,5% bằng cách bất hoạt gen *PPR* và *RPL*. Công nghệ chỉnh sửa gen cũng đã giúp tạo ra các dòng ngô có hàm lượng tryptophan và lysine tăng đáng kể, đây là những axit amin rất tốt cho sức khỏe con người. Tương tự, gen mã hóa polyphenol oxidase (*PPO*) tạo ra đốm nâu trên nấm mỡ *Agaricus bisporus* cũng được bất hoạt bằng công cụ CRISPR/Cas9 để tạo ra giống nấm có màu bắt mắt và bảo quản được lâu hơn. Tính kháng bệnh do nấm, vi khuẩn và virus của nhiều loài thực vật thông qua công cụ CRISPR/Cas9 cũng đã được công bố. Promoter *CsLOB1* chứa yếu tố liên kết với effector (effector-binding element - EBE) *PthA4*; khi effector *PthA4* của *Xanthomonas citri* ssp. *citri* (*Xcc*) nhận biết và liên kết với EBE *PthA4*, effector hoạt hóa biểu hiện của *LOB1* và dẫn tới những triệu chứng của bệnh loét quả, một loại bệnh hại nguy hiểm trên cây có múi. Các dòng cây mang đột biến tại vị trí EBE *PthA4* biểu hiện tính kháng với bệnh loét quả do *Xcc*; dòng cà chua đột biến gen *eif4g* kháng potyvirus phổ rộng hay bông đột biến gen *clcuD* kháng bệnh xoắn lá đều đã được công bố từ các ứng dụng chỉnh sửa gen bằng công nghệ CRISPR/Cas9 [46, 110].

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 khác ngoài lúa, như lúa mì, ngô, bông, đậu tương, cà chua và khoai tây. Sự phát triển của các giống cây trồng chống chịu stress phi sinh học nhờ công cụ CRISPR/Cas9 đã giúp hiện đại hóa các chương trình chọn giống cây trồng [73, 83, 112]. Mặc dù là phương pháp chọn tạo mới được áp dụng, nhưng các nghiên cứu chọn giống bằng công nghệ CRISPR/Cas9 ngày càng gia tăng nhanh chóng, đặc biệt trong 5 năm trở lại đây. Lúa là cây lương thực chính của cả thế giới, đây cũng là đối tượng được nghiên cứu ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 để chọn tạo giống chiếm số lượng công trình công bố nhiều nhất (Bảng 1.2).

Tóm lại, 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 [46, 73, 88, 112].

Bảng 1.2: Ứng dụng CRISPR/Cas9 cải tiến di truyền cây lúa

Mục tiêu	Gen đích	Loại đột biến	Vị trí đột biến	Tính trạng	Tài liệu
Cải thiện năng suất	<i>OsLOLG5</i>	Mất nucleotide	Exon (dịch khung)	Tăng số hạt và trọng lượng hạt	[139]
	<i>OsPIN5b</i>	Mất nucleotide	Exon1 (dịch khung)	Tăng số nhánh và chiều dài bông	[155]
	<i>OsGS3, OsGW2, OsGN1a</i>	Mất nucleotide	Exon 2, Exon 1; Exon 4 (dịch khung)	Tăng chiều dài, chiều rộng và số hạt	[160]
Cải thiện chất lượng	<i>OsAAP10</i>	Thêm/ Mất nucleotide	Exon1 (dịch khung)	Gạo dẻo, cơm ngon (ECQ)	[137]
	<i>OsGBSS1</i>	Thêm/ Mất nucleotide	Promoter và 5'UTR	Hàm lượng amylose thấp	[153]
	<i>SSU-ctrl và ZmPsy</i>	Thêm nucleotide	Vùng ẩn nấu an toàn của hệ gen (GSHs)	Giàu carotenoid	[50]
	<i>OsPLDa1</i>	Mất nucleotide	Exon (Mất exon)	Giảm acid phytic	[78]
Kháng stress sinh học	<i>SWEET11, 13 và 14</i>	Thêm/ Mất nucleotide	Vùng promoter	Kháng bệnh bạc lá	[144]
Kháng stress phi sinh học	<i>OsSRL1, OsSRL2</i>	Mất nucleotide	Exon (Dịch khung)	Chịu hạn	[92]
	<i>OsRP22</i>	Mất nucleotide	Exon 1; dịch khung	Chịu mặn	[157]
	<i>OsDST</i>	Mất nucleotide	Exon; dịch khung	Chịu hạn, chịu mặn	[79]
Kháng thuốc diệt cỏ	<i>OsAL1</i>	Thay thế nucleotide	Exon; bất hoạt	Chịu bispyribacsodium	[28]
	<i>OsSF3B1</i>	Thêm/Mất nucleotide	Bớt và thay thế	Exon; dịch khung và bất hoạt gen	[39]

1.1.3.2. Ở Việt Nam

Ở Việt Nam, các nghiên cứu chỉnh sửa gen nói chung và ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa gen nói riêng ở cây trồng còn khá mới mẻ. Nghiên cứu ứng dụng công nghệ chỉnh sửa hệ gen để cải tạo tính kháng bạc lá ở giống lúa Bắc thơm số 7 và tính trạng mùi thơm ở giống lúa OM5451 là các công trình đầu tiên thuộc lĩnh vực này được đầu tư từ năm 2017 (Nội dung nghiên cứu của Luận án này nằm trong khuôn khổ nhiệm vụ này được thực hiện tại Bộ môn Bệnh học phân tử - Viện Di truyền).

Đồng thời, một số nhóm nghiên cứu độc lập của Viện Di truyền cũng đã nghiên cứu ứng dụng công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 như một công cụ để xác định và nghiên cứu đặc điểm của một số gen mới liên quan đến sự hình thành cấu trúc bông và phát triển bộ rễ ở lúa. Bên cạnh đó, trong khuôn khổ hợp tác giữa AGI, JIRCAS và RIKEN, hướng nghiên cứu xác định gen liên quan tới quá trình ra hoa của cây sắn cũng đã được thực hiện [6].

Với mục tiêu tạo ra dòng lúa có khả năng chịu mặn cao hơn, Viện Công nghệ Sinh học cũng đã áp dụng công nghệ CRISPR/Cas9 triển khai nghiên cứu từ năm 2018. Tiếp đó, hai gen mới *GmGOLSIA* và *GmGOLSIB* (gen sinh tổng hợp galactinol) ở đậu tương thông qua con đường bất hoạt gen bằng công nghệ CRISPR/Cas9 cũng đã được công bố năm 2020 [81].

Nhóm nghiên cứu của Đại học Nông Lâm – Đại học Thái Nguyên cũng đã phối hợp cùng Viện Di truyền nông nghiệp thực hiện nghiên cứu cải tiến tính trạng kích thước hạt lúa thông qua việc bất hoạt gen *GS3* ở giống lúa Bắc thơm 7 và đã thu được những kết quả khả quan. Ngoài ra, một số cơ quan khác như Học Viện Nông nghiệp, Viện nghiên cứu hệ gen cũng đã bước đầu có những nghiên cứu ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa gen trên đối tượng cây cà chua.

Các nghiên cứu ở trên đã cho thấy công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 có tiềm năng ứng dụng rất lớn trong không chỉ nghiên cứu khoa học cơ bản mà còn cả trong lĩnh vực nghiên cứu ứng dụng nhằm hướng tới việc đẩy mạnh sản xuất nông nghiệp ở Việt Nam.

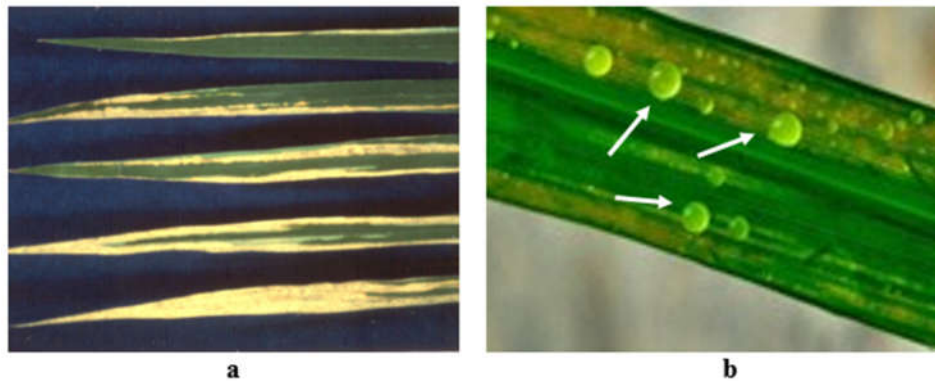
1.2 Giới thiệu về bệnh bạc lá ở lúa và vi khuẩn gây bệnh

1.2.1 Bệnh bạc lá lúa

1.2.1.1. Triệu chứng và dịch tễ bệnh bạc lá lúa

Bệnh bạc lá (bacterial leaf blight disease) lúa còn gọi là bệnh cháy bìa lá cây lúa, do vi khuẩn *Xoo* gây ra, là một trong những bệnh nhiệt đới điển hình gây hại đối với nhiều vùng trồng lúa trên khắp thế giới [42]. Lúa nhiễm bệnh có 3 triệu chứng điển hình là: Bạc lá, vàng nhạt, héo xanh (còn được gọi là Kressek). Trong đó, biểu hiện vàng nhạt là ảnh hưởng sau, là hậu quả của sự bạc lá hay Kressek gây nên hoặc cũng có thể là do độc tố của vi khuẩn sản sinh ra. Bệnh bạc lá lúa phát sinh phá hại suốt từ thời kỳ mạ đến thời kỳ chín, nhưng có triệu chứng điển hình trên ruộng là cây ở thời kỳ từ sau đẻ nhánh đến trổ và chín sữa [100].

Khi cây lúa bị nhiễm *Xoo*, vết bệnh xuất hiện ở mép lá, müt lá, sau đó lan dần vào phiến lá hoặc lan thẳng xuống gân chính, một số ít trường hợp vết bệnh bắt đầu ngay giữa phiến lá. Vết bệnh lan rộng theo đường gợn sóng hoặc thẳng; mô bệnh xanh tái vàng lục và cuối cùng chết khô có màu nâu xám (Hình 1.4 a). Ranh giới giữa mô bệnh với mô lành trên phiến lá rất rõ rệt, có giới hạn theo đường gợn sóng màu vàng hoặc không vàng, hoặc chỉ một đường viền màu nâu sẫm, đứt quãng hay không đứt quãng [100].



Hình 1.4: Triệu chứng bệnh và phương thức xâm nhiễm của *Xoo* trên cây lúa

Ghi chú: (a) Triệu chứng bệnh bạc lá lúa: Bệnh phát triển từ mép lá, tiến triển, lan rộng và làm cháy khô hết mặt lá (diễn biến theo thứ tự lá từ trên xuống dưới trong ảnh) [100]; (b) Tế bào của *Xoo* bao quanh thủy khổng lá lúa [IRRI].

Vi khuẩn *Xoo* xâm nhiễm vào lúa qua thùy không, lỗ khí ở trên nút lá, đặc biệt qua vết thương xây xát trên lá và rễ. Khi tiếp xúc với bề mặt có màng nước ướt, vi khuẩn *Xoo* tiến vào bên trong các lỗ khí, ở vị trí các vết thương; khi đã ở trong hệ mạch, *Xoo* sẽ nhân lên và di chuyển theo cả hai hướng và gây tổn thương dọc theo gân lá. Ở vị trí vết bệnh thường tiết ra những giọt keo chứa mầm bệnh (Hình 1.4b), thông qua sự va chạm giữa các lá lúa nhờ mưa gió để truyền lan tới các lá, các cây khác.

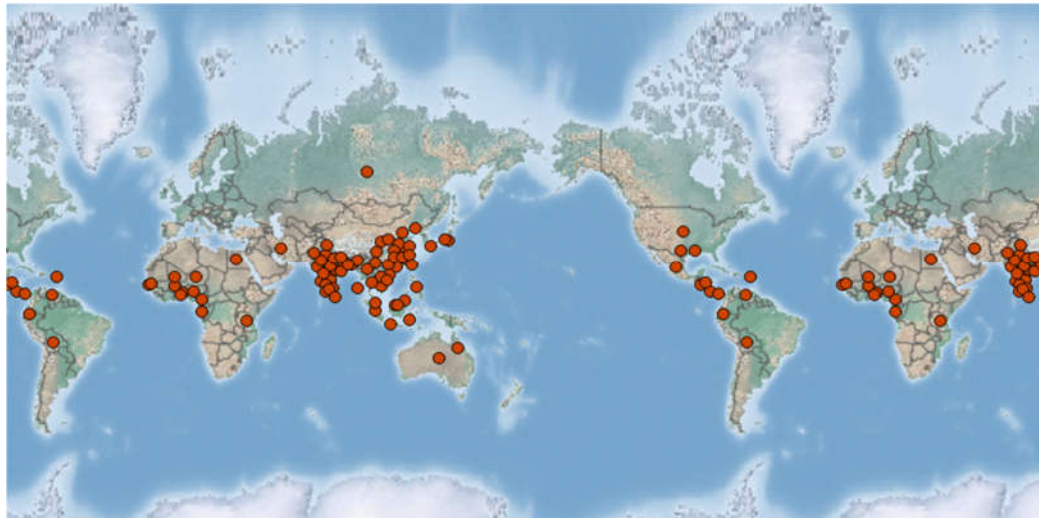
Sự lây lan vi khuẩn trên đồng ruộng diễn ra chủ yếu trong nước mưa, nước lụt và nước tưới tiêu; ngoài ra vi khuẩn có thể lây lan nhờ sương và gió. Tuy nhiên, vi khuẩn chỉ tồn tại được trong nước không quá 15 ngày. Đặc biệt, trong canh tác, vi khuẩn dễ dàng xâm nhiễm vào hệ thống mạch dẫn của cây lúa khi nhỏ mạ bị đứt rễ hoặc lúc lá lúa bị tổn thương. Do đó, điều kiện thời tiết ẩm ướt, nhiều mưa, bão rất thuận lợi cho bệnh bạc lá phát sinh và lây lan trên đồng ruộng. Bệnh rất dễ phát sinh thành dịch, nhất là ở những nơi gieo cấy các giống mẫn cảm với vi khuẩn *Xoo*. Bệnh nặng khiến lá lúa cháy, đặc biệt lá đòng cháy sẽ làm lúa lép lửng cao, giảm năng suất nghiêm trọng [106].

1.2.1.2. Phạm vi phân bố bệnh bạc lá lúa

Bệnh bạc lá được xem là một trong những bệnh phá hoại sinh học chính khắp thế giới, được phát hiện lần đầu tiên ở vùng Fukuoko, Kyushu, Nhật Bản từ năm 1884 [104]. Sau đó, bệnh đã xuất hiện ở các nước Đông Nam Á từ đầu những năm 1950 như Việt Nam (1945), Ấn Độ (1951), Trung Quốc (1957) và Philippines (1957). Châu Á là nơi tập trung bệnh nhiều nhất, do 90% lúa gạo trên thế giới được trồng ở vùng này [123]. Dần dần, nó diễn ra ở Úc, Bangladesh, Campuchia, Indonesia, Ấn Độ và nhiều nước khác [106]. Cho đến nay bệnh vẫn đang lan rộng và ảnh hưởng nghiêm trọng đến sản xuất lúa ở nhiều nơi trên thế giới (Hình 1.5). Bệnh bạc lá lúa cũng xuất hiện ở một số nước châu Phi, châu Úc, Bắc Mỹ (Louisiana và Texas), Trung và Nam Mỹ; tuy nhiên tác hại của bệnh chỉ ảnh hưởng chủ yếu đối với kinh tế nông nghiệp của châu Á [31]. Bệnh bạc lá trở thành đại dịch trên cây lúa vào những năm 1960, là thời kỳ các giống cao sản bắt đầu được

đưa vào trong sản xuất, gây thiệt hại 20 – 50% năng suất [123] và thậm chí 100% [27].

Theo thống kê của tổ chức Lương thực Thế giới (FAO), bệnh bạc lá lúa không những làm giảm năng suất mà còn làm giảm đáng kể chất lượng gạo. Nguyên nhân là do bệnh làm tăng cường hô hấp, giảm cường độ quang hợp, kéo dài thời gian trổ dẫn đến tỉ lệ hạt lép cao, gạo đem xay dễ bị dập nát [123]. Năm 1954, Nhật Bản có diện tích nhiễm bệnh lên tới 90.000 – 150.000 ha trồng lúa, thiệt hại sản lượng hàng năm ước tính 22.000 – 110.000 tấn. Ở Ấn Độ, sản lượng lúa gạo sụt giảm do bệnh bạc lá có năm lên tới 60%. Tương tự, Philippine cũng bị sụt giảm sản lượng lúa gạo ước tính 22,5% trong những năm xảy ra bệnh dịch [37].



Hình 1.5: Bản đồ phân bố bệnh bạc lá lúa trên thế giới

Ghi chú: Vị trí phân bố bệnh bạc lá lúa thể hiện bằng chấm tròn đỏ [41].

Ở Việt Nam, bệnh bạc lá được phát hiện từ lâu trên các giống lúa mùa cũ, từ cuối tháng 3 trở đi vào vụ lúa Mùa (ở nhiệt độ từ 28°C đến 34°C) [26, 37], các tỉnh phía Bắc mưa ẩm nhiều rất thuận lợi cho việc phát triển của vi khuẩn, bệnh dễ lây lan và phát triển mạnh thành dịch. Đến nay, bệnh bạc lá đã lan rộng và gây hại ở tất cả các địa phương trồng lúa khắp cả nước. Năng suất lúa giảm nghiêm trọng do bệnh bạc lá xảy ra ngày càng phổ biến, tập trung nhiều ở các tỉnh phía Bắc và vùng đồng bằng sông Cửu Long.



Hình 1.6: Cảnh đồng lúa bị thiệt hại bởi BLB

Ghi chú: Hình ảnh được chụp ở Telangana, Ấn độ © Yugander Arra (Ảnh trái); Thái Bình, Việt Nam 20/5/2019 (Ảnh phải).

Theo số liệu thống kê của Cục Bảo vệ Thực vật, diện tích lúa nhiễm bệnh bạc lá ở nước ta năm 2013 là 72.343 ha; năm 2016, diện tích nhiễm là 149.551 ha (tăng 129% so với năm 2015), nhiễm nặng trên 19.045 ha (tăng gần 10 lần so với năm 2015), mất trắng 385 ha (tăng 25 lần so với năm 2015). Năm 2018, tính đến 13/9/2018, diện tích nhiễm bệnh bạc lá là 24.542 ha, nhiễm nặng trên 2.342 ha. Trong đó, diện tích nhiễm tập trung chủ yếu ở các tỉnh phía Nam: 6.246 ha (nhiễm nặng trên 637 ha), khu IV: 4.883,8 ha (nhiễm nặng trên 1.592 ha); ở khu vực Phía Bắc, diện tích nhiễm bệnh là 3.412 ha (nhiễm nặng 113 ha) (<http://www.ppd.gov.vn/>). Ở miền Bắc Việt Nam, nhiều giống lúa chủ lực có năng suất và chất lượng cao, được trồng phổ biến ở nhiều địa phương nhưng sản lượng bị ảnh hưởng rất lớn bởi bệnh bạc lá. Năm 2017, hàng chục nghìn ha lúa ở Hải Dương bị nhiễm nặng bệnh bạc lá, có vùng thiệt hại tới 60% năng suất [24]

Có thể thấy, mặc dù đã được phát hiện từ lâu, tuy nhiên cho đến nay bệnh bạc lá vẫn được xếp là bệnh gây hại nghiêm trọng nhất trong sản xuất lúa gạo không chỉ ở Việt Nam mà còn ở nhiều nơi trên khắp thế giới.

1.2.2 Vi khuẩn gây bệnh bạc lá lúa

1.2.2.1. Vi khuẩn *Xanthomonas oryzae*

Loài vi khuẩn gây bệnh bạc lá lúa được xác định thuộc giới vi khuẩn *Bacteria*, ngành *Proteobacteria*, lớp *Gammaproteobacteria*, bộ *Xanthomonadales*, họ *Xanthomonadaceae*, chi *Xanthomonas*. Vi khuẩn này trước đây có nhiều tên gọi

khác nhau như: *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, *Xanthomonas 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 ở lúa là *Xoo* [132].

Xoo là vi khuẩn Gram âm, có sắc tố vàng và không sinh bào tử. Tế bào vi khuẩn có dạng hình que với hai đầu hơi tròn, có lông roi ở một đầu, kích thước $0,4 - 0,6 \times 1,1 - 2,0 \mu\text{m}$, bao quanh tế bào là một màng nhầy. Hình thái khuẩn lạc có thể được kiểm tra trên môi trường nhân tạo (thường sau 3 ngày nuôi cấy). Khuẩn lạc của vi khuẩn này có dạng hình tròn, lồi, nhầy và bóng, màu vàng sáp, hiếu khí. Nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn phát triển là $25 - 30^\circ\text{C}$, nhiệt độ tối thiểu là 5°C và tối đa là 40°C . *Xoo* có thể sống trong khoảng pH khá rộng từ 5,7 – 8,5 nhưng thích hợp nhất vẫn là 6,8 – 7,2 [49, 106].

1.2.2.2. Đa dạng sinh học các nòi vi khuẩn *Xoo*

Trong tự nhiên tồn tại rất nhiều chủng *Xoo*, các chủng mới cũng dễ dàng xuất hiện và độc lực của chúng cũng thay đổi rất nhanh. Cấu trúc quần thể *Xoo* có thể bị ảnh hưởng bởi tác động của môi trường như những biến đổi theo mùa vụ hay biến đổi do xuất hiện gen kháng mới trên lúa [37]. Phân lập các nòi vi khuẩn *Xoo* ở Philippines để phân loại khả năng kháng bạc lá của nhiều giống lúa cho thấy vi khuẩn bạc lá rất phong phú và đa dạng về thành phần nòi [82]. Khi nghiên cứu đa hình bằng RFLP (restriction fragment length polymorphism) và phân tích độc lực của 308 chủng *Xoo* Châu Á bao gồm Trung Quốc, Ấn Độ, Indonesia, Hàn Quốc, Malaysia, Nepal và Philippines cũng đã chứng tỏ các chủng vi khuẩn *Xoo* có mức độ đa dạng di truyền rất cao [26]. Trong nghiên cứu đó, các chủng *Xoo* thu được được phân chia thành năm nhóm; ba trong số năm nhóm nằm biệt lập ở các quốc gia riêng rẽ, điều này chứng tỏ có mối tương quan di truyền giữa phân bố địa lý và các loài cụ thể. Kết quả nghiên cứu này cho thấy cần có chiến lược tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá mang các gen kháng *Xoo* đặc trưng riêng của từng khu vực, hay thậm chí cho từng quốc gia [26].

Ở Việt Nam, thời kỳ đầu mới nghiên cứu về bệnh bạc lá lúa, vi khuẩn gây bệnh được phân thành 10 nhóm nòi theo vùng địa lý, trong đó 80,42% thuộc 4 nhóm nòi phổ biến ở các tỉnh đồng bằng Bắc Bộ, đồng bằng Nam Bộ và rải rác ở các vùng trong cả nước. Đánh giá bước đầu cho thấy, các nòi vi khuẩn *Xoo* ở nước

ta được xem là phức tạp và đa dạng hơn ở các nước, do phần lớn nòi phát hiện thấy ở Việt Nam cũng có mặt ở Philippine và Indonesia [18]. Với chiến lược chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá ở Miền Bắc, Học viện Nông nghiệp Việt Nam ban đầu đã phân lập và xác định được 16 chủng vi khuẩn *Xoo* gây bệnh khác nhau [21]. Sau đó, từ 138 mẫu bệnh bạc lá thu từ các tỉnh Bắc Giang, Hà Nội, Thái Bình, Hoà Bình, Hải Dương, Thanh Hoá, Nam Định... nhóm nghiên cứu của Lưu Văn Quyết đã lọc ra 16 “isolate” (chủng phân lập, gọi tắt là “chủng”) cùng với 4 chủng của Học viện Nông nghiệp Hà Nội, dựa vào kết quả phản ứng cùng kháng hay cùng nhiễm trên các giống lúa chỉ thị đã phân 20 chủng này thành 3 nhóm nòi [17].

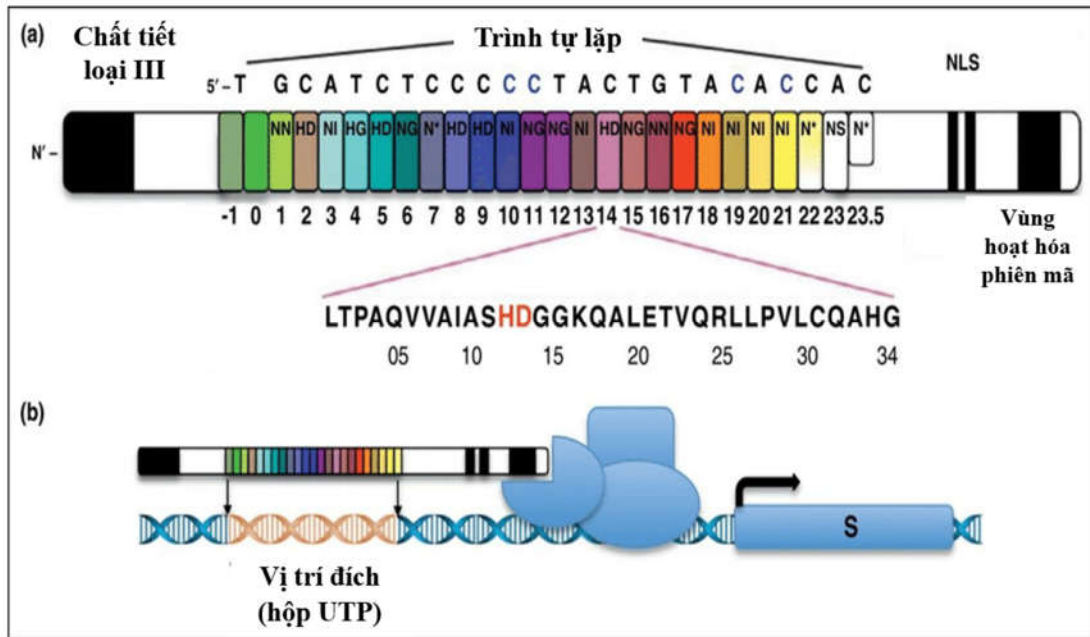
Gần đây, trong các nghiên cứu được tiến hành tại bộ môn Bệnh học Phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp, cho thấy phần lớn các chủng trong quần thể vi khuẩn bạc lá thu thập trong các năm 2013-2017 cũng có khả năng bẻ gãy tính kháng của gen *Xa21* trong dòng đẳng gen IRBB21. Năm 2022, Nguyễn Thị Thơ và cs. kết luận khả năng gây bệnh trên bộ giống chỉ thị của các mẫu vi khuẩn *Xoo* thu thập tại vùng đồng bằng sông Hồng biến động rất lớn, và rất khác so với bộ nòi tiêu chuẩn của IRRI. 56,2% các isolate trong các mẫu thu thập có khả năng vượt qua các dòng đơn gen kháng, có 26,8% các isolate vượt qua các dòng mang 2 gen kháng, 17% các isolate có khả năng vượt qua các dòng mang tổ hợp 3 - 5 gen kháng. Dựa vào khả năng gây bệnh trên 28 giống chỉ thị, 47 isolate vi khuẩn *Xoo* thu thập từ các tỉnh thuộc vùng đồng bằng sông Hồng được chia làm 4 nhóm [20].

Điều này cho thấy, tính biến động của quần thể vi khuẩn gây bệnh bạc lá trong nước, đặc biệt ở các tỉnh miền Bắc vẫn luôn tiến triển không ngừng, công tác chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá phổ rộng vẫn luôn là một thách thức lớn cho các nhà khoa học, các nhà chọn tạo giống. Vì vậy, việc ứng dụng các phương pháp hiện đại nhằm nghiên cứu chuyên sâu, rút ngắn thời gian, cũng như chi phí để tạo ra giống mới là lĩnh vực nghiên cứu luôn được quan tâm.

1.2.2.3. Cơ chế phân tử tương tác giữa vi khuẩn *Xoo* và tế bào lá lúa

Độc lực của nhiều vi khuẩn gây bệnh thực vật tương quan với khả năng sản xuất polysaccharide ngoại bào (extracellular polysaccharide – EPS) của chúng. Tầm quan trọng của EPS đối với khả năng gây bệnh của một số loài thuộc chi *Xanthomonas* đã được chứng minh ở các chủng đột biến thiếu EPS như *Xoo*,

Xcc (*X. campestris* pv. *campestris*) và *Xac* (*X. axonopodis* pv. *citri*). EPS rất quan trọng trong việc hình thành màng sinh học (biofilm) và tính bền vững biểu mô của *Xoo*. Sự có mặt của EPS thúc đẩy quá trình xâm nhiễm của vi khuẩn vào mô thực vật và giúp bảo vệ vi khuẩn khỏi các điều kiện môi trường khắc nghiệt. EPS góp phần làm tắc nghẽn hệ mạch, dẫn tới hậu quả làm héo và cháy lá lúa [96].



Hình 1.7: Mô hình cấu trúc và cơ chế hoạt động của TALE

Ghi chú: (a) TALE có vùng đầu N bảo thủ nhận biết chất tiết loại III của vi khuẩn, trình tự nucleotide lặp lại, dấu hiệu vùng nhân; vùng đầu C bảo thủ là tổ chức đầy đủ để hoạt hoá sự phiên mã. Hình ảnh thể hiện vùng lặp lại của *PthXo1*, gồm 23,5 đoạn lặp lại liên kết với DNA đích trong vùng promoter *Os8N3* của lúa, trong đó ở vị trí acid amin thứ 14 là đoạn trình tự HD (màu đỏ) là điểm nhận biết cytozyn của gen đích; (b) TALE được dịch mã trong nhân tế bào thực vật và liên kết với vị trí đích (được xem là điều hoà UP bởi TAL hoặc hộp UTP hoặc EBE (Effector Binding Elements – Yếu tố liên kết tác nhân) nằm ở đầu 5' vùng promoter của gen được hoạt hoá (gen S là gen gây nhiễm bệnh, *susceptibility*; gen R là gen kháng bệnh, *resistance*). Vùng kết thúc C của TALE hoạt hoá gen S hay gen R thông qua có chế phiên mã. Thực vật có thể chống lại sự nhiễm bệnh thông qua ít nhất 3 cơ chế: EBE đột biến làm giảm ái lực liên kết với DNA; các nhân tố phiên mã đột biến gây ức chế sự liên kết protein-protein với vùng hoạt hoá axit TALE; hoặc bằng cách ghép trình tự của hộp UTP (EBE) với vùng promoter của gen kháng do đó dẫn đến kiểu hình miễn dịch trên sự lây nhiễm [30].

Trong số các hệ thống EPS (bao gồm cụm gen tổng hợp lipopolysacaride – LPS, các hệ thống tiết loại I – VI...), hệ thống tiết loại III (type III secretion system -T3SS) đóng vai trò rất quan trọng đối với khả năng gây bệnh của *Xoo*. T3SS là tập hợp của các protein cấu trúc được mã hoá bởi sự phản ứng nhạy cảm và gen gây bệnh (*hrp*). T3SS có vai trò thúc đẩy quá trình bài tiết cũng như vận chuyển polysacaride ngoại bào vào thẳng vùng nhân của tế bào vật chủ. Đồng thời T3SS cũng sản xuất ra các TALE (Transcription activators-like effector – tạm dịch: tác nhân hoạt hoá quá trình phiên mã, gọi tắt là protein TAL), vận chuyển vào nhân tế bào chủ, bám đặc hiệu vào trình tự phía trước gen đích và tăng cường biểu hiện gen đích nhằm thu được lợi ích tối đa cho vi khuẩn [35]. Protein TAL có cấu trúc đặc biệt gồm hai đầu N và C bảo thủ và một vùng lặp lại; mỗi vùng trình tự lặp gồm từ 33 – 35 amino acid, trong đó có hai vị trí siêu biến đổi (repeat variable residue – RVD) nằm ở amino acid thứ 12 và 13. Các protein TAL chỉ khác nhau ở các RVD; đây là các vị trí tương tác đặc hiệu với DNA, ví dụ: NI liên kết với adenin (A), HD liên kết với cytozin (C), NG liên kết với thiamin (T), NN liên kết với guanin hoặc adenin (G hoặc A) và NS liên kết với N (A, C, G hoặc T) [35]. Chính sự khác nhau này sẽ quyết định trình tự đặc hiệu mà protein TAL có thể liên kết, do đó quyết định gen đích mà protein TAL có khả năng điều khiển theo hướng hỗ trợ sự sinh trưởng của vi khuẩn, tương tác hoặc ức chế hệ thống miễn dịch của tế bào vật chủ (Hình 1.7) [47, 70, 140].

Cho đến nay, hơn 50 họ T3SS đã được xác định, trong đó bao gồm các protein tương tự yếu tố hoạt hóa phiên mã (transcription activator-like – TAL). Protein TAL được vận chuyển vào nhân tế bào chủ, bám đặc hiệu vào vùng khởi động (promoter) để hoạt hóa biểu hiện của gen đích nhằm thu được lợi ích tối đa cho quá trình sinh trưởng của vi khuẩn. Yếu tố điều hòa *cis* trên promoter của gen đích liên kết đặc hiệu với protein TAL được gọi là EBE (effector-binding element) [35]. Các gen đích của protein TAL bao gồm các gen vận chuyển đường thuộc họ *OsSWEET*, gen vận chuyển sulfate [43, 58, 127, 128]. Các gen đích này được gọi là các gen “nhiễm” (susceptibility gene – gen *S*), các protein TAL được gọi là “effector độc” đối với gen “nhiễm” đó.

Tuy nhiên, trong tự nhiên, thực vật đã lợi dụng mối tương tác giữa “effector độc” với gen “nhiễm” để hình thành tính kháng tự nhiên với từng chủng *Xoo* thích hợp. Một số giống lúa đã xuất hiện trình tự nhận biết đặc hiệu (EBE) của protein TAL trên promoter của các gen độc cho *Xoo* như *Xa10*, *Xa23*... Khi xâm nhiễm vào tế bào vật chủ, nếu các vi khuẩn *Xoo* tiết ra protein TAL tương thích (nhận biết EBE phù hợp) với các gen độc, sẽ dẫn tới sự tăng cường biểu hiện của các gen độc và gây chết tế bào vi khuẩn thông qua phản ứng đáp ứng quá mẫn (hypersensitive responses – HR). Kết quả của quá trình này là vi khuẩn sẽ không thể tiếp tục nhân lên trong mô lá mặc dù đã xâm nhiễm cây chủ thành công. Ở một khía cạnh khác, một số giống lúa xuất hiện các đột biến trong trình tự EBE đích của protein TAL trên vùng promoter các gen “nhiễm” tương ứng. Khi đó, mặc dù vi khuẩn có thể xâm nhiễm, tiết “effector độc” vào nhân tế bào cây chủ nhưng các protein này không thể bám vào promoter, do đó không thể tăng cường biểu hiện các gen “nhiễm”; dẫn tới vi khuẩn không thể tiếp tục phát triển trong mô lá, vết bệnh không phát triển và cây có khả năng kháng với chủng vi khuẩn đó [71].

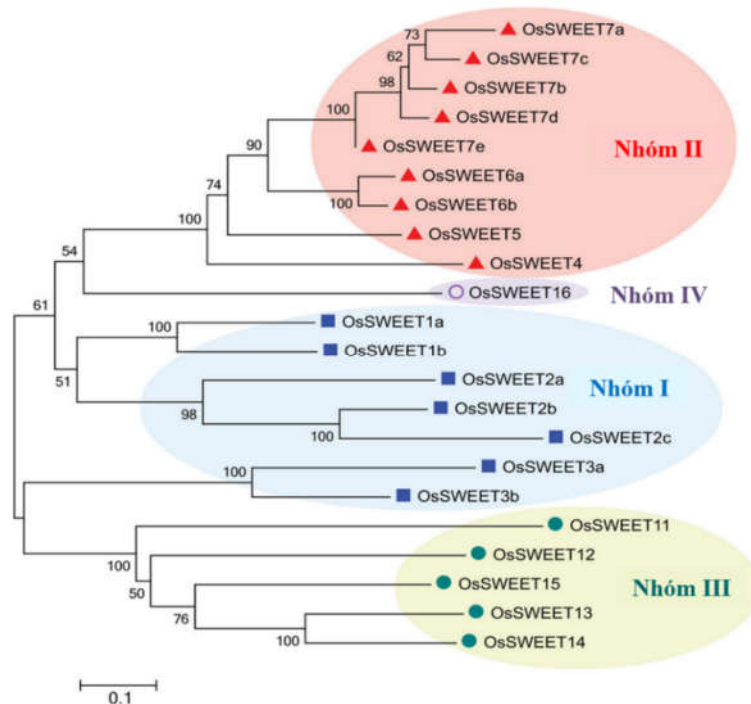
Vai trò của protein TAL trong việc thúc đẩy triệu chứng bệnh đã được phát hiện trong quá trình nghiên cứu mối tương tác giữa vi khuẩn *Xoo* và các giống lúa, tuy nhiên cơ chế liên quan đến khả năng bám đặc hiệu của protein TAL mới chỉ được biết đến gần đây. Thực chất, trong quá trình tương tác mầm bệnh-cây chủ, tính kháng liên quan tới gen *R* di truyền theo cơ chế gen trội; trong khi tính kháng liên quan tới gen *S* di truyền theo cơ chế gen lặn. Sự tương tác đặc hiệu giữa gen *R* (gen cây chủ) và sản phẩm của gen *Avr* (*Avirulence*) (gen của mầm bệnh) tương ứng với gen *R* tạo nên hàng rào phòng vệ chống lại mầm bệnh [109]. Đối với vi khuẩn *Xoo* gây bệnh bạc lá lúa, nhóm gen *Avr* được xem là có vai trò quyết định sự đặc hiệu giữa ký sinh và ký chủ. Cho đến nay, 45 gen có liên quan đến tính kháng bệnh bạc lá lúa đã được phát hiện, trong số đó có 18 gen lặn và 9 gen đã được nhân dòng [77]. Các gen này được đặt tên với tiền tố ‘*Xa*’ kèm theo số thứ tự; trong đó, chữ ‘*X*’ viết hoa thể hiện tính kháng di truyền theo quy luật di truyền gen trội; ngược lại, 18 gen lặn được biểu thị bằng chữ ‘*x*’ thường. Gen kháng bạc lá được phân chia thành 4 nhóm dựa trên các protein mã hóa của chúng, bao gồm:

gen mã hóa thụ thể kinase (RLK) (*Xa21*, *Xa3/Xa26* và *Xa4*); gen mã hóa protein vận chuyển đường (Sugar will eventually be exported transporter - SWEET) (*xa13*, *xa25* và *xa41*); gen chức năng (*E*) (*Xa10*, *Xa23* và *Xa27*) và các gen khác (*Xa1* và *xa5*) [67].

1.2.3 Gen *OsSWEET14* và mối liên hệ với vi khuẩn *Xoo* gây bệnh bạc lá lúa

1.2.3.1. Gen nhiễm thuộc họ *OsSWEET* liên quan đến bệnh bạc lá lúa

Họ gen *SWEET* bao gồm các gen mã hóa cho các protein màng tham gia vào quá trình vận chuyển đường của tế bào. Đây là họ gen đã được phát hiện có vai trò chính trong quá trình sinh trưởng và phát triển ở trên 30 loài thực vật [48, 127]. Họ protein *SWEET* là một họ không đồng nhất, cho đến nay, các nhà khoa học đã xác định được 22 gen *SWEET* trong hệ gen lúa, được chia thành 4 nhóm (Hình 1.8), đóng vai trò thiết yếu trong dinh dưỡng hạt phấn, làm đầy hạt, sự già hoá và sự tương tác giữa mầm bệnh và cây chủ ký sinh [47, 127].



Hình 1.8: Quan hệ phát sinh chủng loại họ protein *OsSWEET* [127]

Kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả Chen *et al.* (2010) đã cho thấy chỉ có 5 trong số 22 gen *SWEET* có liên quan và là đích tấn công của vi khuẩn *Xoo* để

hoạt hóa vận chuyển đường tích lũy ở ngoài màng sinh chất, cung cấp dinh dưỡng cho *Xoo* sinh trưởng và phát triển, bao gồm *OsSWEET11*(*Os8N3/Xa13*), *OsSWEET12*, *OsSWEET13* (*Xa25*), *OsSWEET14* và *OsSWEET15*. Đây được xác định là những gen “nhiễm” chính ở các giống lúa miễn cảm với *Xoo*.

Đối với các gen *SWEET* là các gen nhiễm, các TALE của *Xoo* liên kết với vùng promoter của gen *SWEET* ở cây chủ và hoạt hóa biểu hiện gen. Phát hiện này đã mở ra một hướng đi hoàn toàn mới trong nghiên cứu tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá bằng công nghệ DNA tái tổ hợp. Nhóm nghiên cứu của Zeng *et al.* (2015) đã đưa các trình tự DNA nhận biết bởi protein TAL độc của một số chủng vi khuẩn *Xoo* châu Á vào promoter nhân tạo trên gen độc *Xa10* để tạo ra giống lúa chuyển gen kháng bạc lá phổ rộng [154]. Nhóm nghiên cứu khác cũng đã xác định được một nhóm các gen "nhiễm" quan trọng thuộc họ *SWEET* của lúa dựa trên những hiểu biết về hiểu biết về protein TAL [127]. Từ năm 2010 đến năm 2013, nhiều protein TAL của *Xoo* hoạt hóa gen *SWEET* gây bệnh bạc lá lúa đã được xác định, như PthXo1 của chủng PXO99^A hoạt hóa gen *OsSWEET11* (*Os8N3, Xa13*) [47, 133]; ArtTAL12 hoạt hóa gen *OsSWEET12*; PthXo2, PthXo2.1, PthXo2.2 [127, 159] hoạt hóa gen *OsSWEET13* (*Xa25*) [159]; *PthXo3, AvrXa7, TalC, TalF* hoạt hóa gen *OsSWEET14* (*Os11N3, Xa41*) [127,133]; ArtTAL15 hoạt hóa gen *OsSWEET15* [133].

Gen kháng *xa13, xa25, xa41(t)* có bản chất là gen *OsSWEET11, OsSWEET13* và *OsSWEET14* mang đột biến trên vùng EBE ở nhiều giống lúa, đã được xác định là có khả năng kháng lại sự tấn công của nhiều chủng *Xoo* khác nhau [61, 144]. Nghiên cứu sâu hơn cho thấy, *xa13/OsSWEET11* và gen mã hóa protein vận chuyển đồng *COPT1* và *COPT5* tham gia vào quá trình phân phối đồng trong tế bào; protein TAL do vi khuẩn tiết ra lợi dụng *xa13* để loại bỏ đồng (một chất có hoạt tính kháng khuẩn) khỏi mạch xylem, từ đó tạo điều kiện cho sự nhân lên của mầm bệnh và lây lan nhanh chóng [150].

Tương tự, *xa25/OsSWEET13* đã được nghiên cứu ở các giống lúa japonica như Nipponbare và Kitaake. Các công bố mới đây cho thấy *OsSWEET13* là gen “nhiễm” quan trọng, bị tấn công trực tiếp bởi protein TAL PthXo2. Hai biến thể

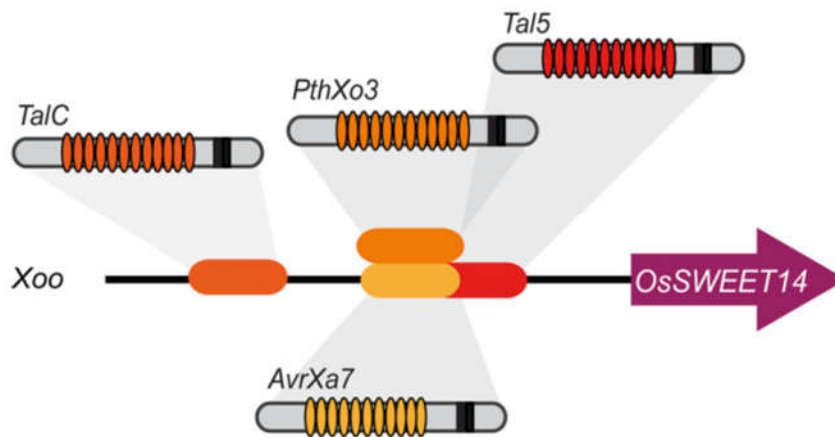
khác của PthXo2 có khả năng liên kết với các trình tự EBE khác nhau trong promoter của *OsSWEET 13* và hoạt hoá sự biểu hiện của gen này [144]. Nhóm nghiên cứu của Zeng (2015) đã đưa các trình tự DNA nhận biết bởi protein TAL độc của một số chủng vi khuẩn *Xoo* châu Á vào promoter nhân tạo trên gen độc *Xa10* để tạo ra giống lúa chuyển gen kháng bạc lá phổ rộng [154]. Nhóm nghiên cứu khác cũng đã xác định được một nhóm các gen “nhiễm” quan trọng thuộc họ *SWEET* của lúa dựa trên những hiểu biết về protein TAL [127].

1.2.3.2. Gen *OsSWEET14* và các EBE trên vùng promoter

Gen *OsSWEET14* (*Os11N3* hay *xa41*) nằm trên NST số 11 trong hệ gen lúa, có chiều dài 303 A°, mã hóa protein có khối lượng phân tử 32.701 Da, đã được xác định là đích tác động của 4 protein TAL TalC, PthXo3, AvrXa7, TalF/Tal5 và hoạt động như một gen “nhiễm” quan trọng đối với *Xoo* [34, 107]. Năm 2015, gen kháng *xa41(t)* đã được phát hiện thông qua việc giải trình tự vùng promoter của một tập đoàn gồm 169 giống lúa châu Phi [61]. Gen kháng *xa41(t)* xuất hiện cả trên giống lúa hoang và giống lúa sản xuất ở châu Phi và có tính kháng rộng với cả chủng vi khuẩn bạc lá châu Phi và châu Á. Bản chất của gen kháng *xa41(t)* là sự xuất hiện một đột biến trên vùng promoter *OsSWEET14* trên giống lúa *O. glaberrima* và một số giống *O. barthii* ở Châu Phi [61, 67]. Alen *OsSWEET14* trên các giống lúa kháng *Xoo* bị mất đoạn 18 bp ở vị trí thứ 8 từ hộp TATA, dẫn tới ngăn cản AvrXa7 và Tal5 hoạt hóa sự biểu hiện của *OsSWEET14*. Trong khi *xa13* và *xa25* chỉ có khả năng kháng đặc hiệu với một số chủng vi khuẩn, *xa41(t)* có tính kháng rộng với cả chủng vi khuẩn bạc lá châu Phi và châu Á (> 50% số chủng thu thập từ năm 1965 đến năm 2013). Vì vậy, *OsSWEET14* là gen được quan tâm hơn cả so với 4 gen còn lại trong họ gen *OsSWEET* nhóm III khi nghiên cứu chọn tạo giống bạc lá lúa dựa trên gen *S*, đặc biệt thích hợp là gen đích được lựa chọn trong các nghiên cứu chỉnh sửa gen nhằm chọn dòng lúa kháng bệnh bạc lá.

Trình tự gen *OsSWEET14* là một ví dụ điển hình của quá trình tiến hóa hội tụ. Gen này là mục tiêu tấn công của nhiều protein TAL từ các chủng *Xoo* khác nhau về mặt phát sinh loài: AvrXa7 từ chủng PXO86 (Philippines), PthXo3 từ chủng PXO61 (Philippines), Tal5/TalF từ chủng MAL1 (Mali) và TalC từ chủng

BAI3 (Burkina Faso). Đặc biệt, các EBE là mục tiêu của 4 protein TAL này nằm chồng chéo hoặc khá gần nhau (Hình 1.9) [61]. Hơn nữa, TalC hoạt hóa *OsSWEET14* nhờ khả năng liên kết với trình tự DNA nằm ngược chiều với các EBE *AvrXa7*, *PthXo3* và *Tal5/TalF* [61]. Việc ứng dụng công nghệ chỉnh sửa gen gây đột biến ở trình tự của các EBE này nhằm phá vỡ khả năng liên kết của các protein TAL của vi khuẩn *Xoo* với *OsSWEET14* là một hướng nghiên cứu được rất nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới quan tâm nhằm tạo ra giống lúa kháng bệnh bạc lá bằng công nghệ gen.



Hình 1.9 Các EBE trên promoter *OsSWEET14*

Ghi chú: Trình tự của các EBE hội tụ trên vùng promoter *OsSWEET14* bao gồm
AvrXa7 - ATAAACCCCTCCAACCAGGTGCTAA [31],
PthXo3 - ATATAAACCCCTCCAACCAGGTGCTAAG [31],
Tal5/TalF - TAAGTCATCAAGCCTTCA [127],
TalC - CATGCATGTCAGCAGCTGGTCAT [150].

Hơn nữa, kết quả nghiên cứu của Blanvilain *et al.* (2017) đã chứng minh rằng gây đột biến EBE *AvrXa7* và *Tal5* dù chỉ là indel cũng có khả năng kháng phổ rộng đối với các chủng vi khuẩn *Xoo*. Đặc biệt, đột biến mất 2 bp ở đầu 5' của EBE *Tal5* cũng đủ để nâng cao tính kháng bệnh bạc lá. Trong khi đó, gây đột biến ở EBE *TalC*, dù có làm thay đổi sự biểu hiện của gen *OsSWEET14* nhưng các dòng lúa đột biến này chỉ có khả năng kháng nhẹ với các chủng khuẩn mang protein TalC và hoàn toàn không kháng các chủng vi khuẩn mang các protein TAL khác khi được lây nhiễm nhân tạo trong cùng điều kiện như nhau [34]. Như vậy, có thể

thấy *AvrXa7* và *Tal5* là những EBE chính trên gen nhiễm *OsSWEET14*, đóng vai trò quan trọng đối với tính miễn cảm của cây lúa với bệnh bạc lá [34, 61].

1.3 Tình hình nghiên cứu tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá

Để tạo giống lúa kháng bạc lá, có rất nhiều phương pháp đã được áp dụng: phương pháp lai truyền thống, phương pháp chuyển gen kháng, tạo các dòng đẳng gen (Near-isogenic lines – NILs) có mang gen kháng sau đó lai quy tụ nhiều gen kháng hoặc nhiều QTL các nguồn bố mẹ vào một giống, lai trở lại và áp dụng chỉ thị phân tử (Marker assisted selection - MAS). Trước đây, các phương pháp chọn tạo giống lúa kháng bạc lá chủ yếu dựa trên gen kháng vốn có trong tự nhiên. Gần đây, với những phát hiện về tương tác phân tử giữa protein TAL của vi khuẩn *Xoo* và gen cây chủ, nhiều nghiên cứu đã ứng dụng các công nghệ chuyển gen hay chỉnh sửa gen để cải tiến tính kháng bạc lá cho cây lúa.

1.3.1 Nghiên cứu chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá dựa trên gen kháng tự nhiên

Xa21 là gen kháng đầu tiên được phát hiện trong tự nhiên. Đây là một họ đa gen, định vị trên NST số 11, có 7 gen thành viên được đặt tên lần lượt là *A1*, *A2*, *B*, *C*, *D*, *E* và *F*. Các gen này đã được tách dòng và phân thành 2 nhóm dựa trên trình tự DNA tương đồng [61, 131]. Cho đến nay, đã có ít nhất 45 gen kháng bệnh bạc lá lúa (*Xa/xa* – gen kháng trội/gen kháng lặn) đã được công bố trên toàn thế giới [72]. Vị trí của các gen kháng vẫn đang được tiếp tục nghiên cứu [61, 131]. Các gen kháng bệnh bạc lá biểu hiện khả năng kháng bệnh không giống nhau ở các khu vực khác nhau trên thế giới. Phần lớn các giống lúa kháng hiện nay có phổ kháng hẹp. Ví dụ, *Xa4* kháng hiệu quả với các chủng *Xoo* ở Philippines, Trung Quốc, Indonesia, nhưng lại không có khả năng kháng với các chủng *Xoo* ở Việt Nam và Ấn Độ; *xa5*, *Xa7*, *Xa21* có khả năng kháng tốt với nhiều chủng *Xoo* khác nhau trên thế giới. Vì vậy, các gen này được sử dụng rộng rãi trong các chương trình chọn giống của nhiều quốc gia trên thế giới.

Tuy nhiên, việc phát triển các giống lúa kháng mang đơn gen kháng sau một thời gian đã tỏ ra không hiệu quả do vi khuẩn đã biến chủng và đã có thể phá vỡ tính kháng bệnh của cây. Vì vậy, việc chuyển tổ hợp các gen kháng được cho

là giải pháp hiệu quả để làm chậm sự xuất hiện các chủng vi khuẩn *Xoo* có khả năng gây bệnh trên các dòng lúa mang gen kháng. Hướng nghiên cứu tích hợp nhiều gen kháng có khả năng tạo ra tính kháng phổ rộng và ổn định cho cây lúa [33]. Vì vậy, nhiều dòng lúa đẳng gen tích hợp đa gen kháng (pyramiding line) đã được tạo ra để phục vụ công tác lai tạo giống kháng bệnh, bao gồm các dòng mang 2 gen kháng như IRBB50 (*Xa4-xa5*), IRBB51 (*Xa4-xa13*), IRBB52 (*Xa4-Xa21*), IRBB54 (*xa5-Xa21*) và IRBB55 (*xa13-Xa21*); các dòng mang 3 gen kháng như IRBB56 (*Xa4-xa5-xa13*), IRBB57 (*Xa4-xa5-Xa21*), IRBB59 (*Xa4-xa13-Xa21*), IRBB61 (*Xa4-xa5-Xa7*) và IRBB62 (*Xa4-Xa7-Xa21*); dòng mang 5 gen kháng như IRBB66 (*Xa4 -xa5-Xa7-xa13-Xa21*) [131]. Sử dụng các dòng lúa đẳng gen này, thông qua việc kết hợp giữa lai tạo và chọn lọc dòng bằng chỉ thị phân tử, nhiều tổ hợp gen kháng hữu hiệu đã được tích hợp vào giống chủ lực của nhiều quốc gia, ví dụ như dòng NH56 mang 4 gen *Xa4-xa5-Xa7-Xa21* (Ấn Độ), giống lúa Minghui63 mang 2 gen *Xa7-Xa21* (Trung Quốc) [116, 145]. Tuy nhiên, phương pháp chọn giống dựa trên gen kháng tốn khá nhiều thời gian và phải thực hiện trên một quần thể phân ly lớn, đòi hỏi cán bộ nghiên cứu phải có kinh nghiệm để thực hiện lai trở lại và chọn lọc dòng gần giống nhất với giống gốc.

Ở Việt Nam, nghiên cứu ứng dụng các kỹ thuật phân tử như kỹ thuật chuyển gen, lập bản đồ gen, kỹ thuật chọn giống kết hợp với chỉ thị phân tử MAS cũng đã được triển khai nghiên cứu và thực sự phát triển, được áp dụng rộng rãi tại các cơ sở nghiên cứu như Học viện Nông nghiệp Việt Nam, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long, đặc biệt là ở Viện Di truyền Nông nghiệp [10]. Bằng công nghệ chỉ thị phân tử, cho tới nay, một số dòng/giống lúa mang các gen kháng *Xa4*, *xa5*, *Xa7* và *Xa21* đã được tạo ra và được đánh giá có khả năng kháng khá tốt với một số nòi vi khuẩn bạc lá của Việt Nam. Đây là những gen kháng làm tiền đề cho công tác chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá ở miền Bắc Việt Nam [11,22]. Gen *xa5* và *xa13* đã xác định được có khả năng tạo tính kháng phổ rộng cho các giống lúa ở Đồng bằng sông Cửu Long. Các dòng lúa đẳng gen IRBB5 (*xa5*), IRBB7 (*Xa7*) và IRBB21 (*Xa21*) cũng đã được các nhà khoa học của Học viện Nông nghiệp Việt Nam xác định kháng hiệu quả với đa số các chủng

vi khuẩn *Xoo* gây bệnh bạc lá ở miền Bắc. Một số các giống lúa kháng bạc lá được chọn tạo dựa trên gen kháng đã được trồng thử nghiệm trên một số vùng sinh thái khác nhau, như các giống lúa DT45, DT57, DL6, DL8, N46... [17, 22]. Đối với giống lúa Bắc thơm 7, các nhà khoa học cũng đã tạo được một số dòng mang hợp gen kháng *Xa21* hay *Xa7* từ tổ hợp lai Bắc thơm số 7 với dòng lúa đấng gen mang gen kháng [21].

1.3.2 Nghiên cứu chọn tạo giống lúa kháng bạc lá dựa trên đột biến gen “nhiễm”

Gần đây, với sự ra đời và phát triển mạnh mẽ của công nghệ chỉnh sửa hệ gen, các nhà khoa học đã có thể can thiệp và biến đổi trình tự bám của các protein TAL (do *Xoo* tiết ra) trên vùng promoter của các gen “nhiễm” ở lúa, từ đó ngăn cản quá trình xâm nhiễm và phát triển của *Xoo* trong tế bào lúa, dẫn tới tăng cường tính kháng bệnh bạc lá cho cây lúa. Nhóm nghiên cứu ở Đại học Corell (Mỹ) đã ứng dụng công nghệ TALEN để chỉnh sửa promoter *OsSWEET14* của giống lúa Kitake (mẫn cảm với chủng vi khuẩn *Xoo* châu Á). Tất các cây đột biến thu được đều có hình thái tương tự như cây không chuyển gen, chứng tỏ chức năng của gen *OsSWEET14* không bị biến đổi trong điều kiện sinh trưởng bình thường. Kết quả đánh giá tính kháng cho thấy cây lúa Kitakee chỉnh sửa gen T₂ có kiểu gen đột biến mất 4 - 15 Nu có khả năng kháng với các chủng vi khuẩn tấn công EBE *AvrXa7* và *PthXo3*, và không kháng với chủng vi khuẩn tấn công EBE *PthXo1* [88]. Bằng phương pháp tương tự, nhóm nghiên cứu của Blanvillain–Baufumé (2017) cũng đã tạo thành công dòng lúa chỉnh sửa promoter *OsSWEET14* có khả năng kháng cả hai nhóm vi khuẩn *Xoo* châu Á và châu Phi [34]. Nhóm nghiên cứu đã tạo thư viện alen đột biến của promoter *OsSWEET14* thông qua việc sử dụng các dTALEN. Kết quả đánh giá trên các dòng lúa đột biến khác nhau cho thấy cây lúa chỉnh sửa *TalF/AvrXa7* nhưng không chỉnh sửa *TalC* có tính kháng các chủng vi khuẩn *Xoo* được nghiên cứu. Tuy nhiên, dòng đột biến EBE *TalC* lại không kháng bệnh bạc lá; điều này chứng tỏ *TalC* có thể có các gen đích bổ sung khác trong hệ gen. Các nghiên cứu này cho thấy rằng thực vật mẫn cảm với bệnh thông qua các tương tác với protein TAL và có thể chỉ với một gen đơn [34].

Bằng công nghệ CRISPR/Cas9, năm 2019, hai nghiên cứu chỉnh sửa EBE trên gen nhằm tạo giống lúa kháng bạc lá cũng đã được công bố [107, 144]. Thí nghiệm chuyển gen được tiến hành trên 3 giống lúa Kitaake (japonica) IR64 và Ciherang-Sub1 (indica) bằng cả phương pháp chuyển gen sử dụng IE và phiê trưởng thành [57, 124]. Nhóm tác giả đã tập trung chỉnh sửa 2 gen *OsSWEET11* và *OsSWEET14* của giống lúa Kitaake (có vòng đời ngắn và chứa alen *R* của gen *OsSWEET13/xa25*); kết quả đã tạo được dòng MS14K mang đột biến ở các vị trí mong muốn. Khi lây nhiễm MS14K với *Xoo*, kết quả cho thấy MS14K có khả năng kháng 121/131 chủng và miễn cảm với 10/131 chủng (được dự đoán có thể mang các TALE hoạt hóa gen *S* khác ngoài *OsSWEET11* và *OsSWEET14*). Sau đó, MS14K được tiếp tục sử dụng làm vật liệu cho nghiên cứu chỉnh sửa *OsSWEET13*. Kết quả sàng lọc đã thu được các dòng lúa chỉnh sửa cả 3 gen *OsSWEET11*, *OsSWEET13* và *OsSWEET14* và kháng bạc lá phổ rộng với tất cả các chủng *Xoo* nghiên cứu.

Basmati là giống lúa thơm ngon, hạt dài (indica) nổi tiếng thế giới, đặc biệt ở khu vực Châu Á. Để tạo dòng lúa Basmati kháng bệnh bạc lá, công nghệ CRISPR/Cas9 đã được áp dụng để chỉnh sửa 4 EBE trên *OsSWEET14* [151]. Hệ thống vector biểu hiện ba gRNA (chỉnh sửa *PthXo3*, *AvrXa7*, *TalC* và *Tal5/TalF*) được biến nạp vào tế bào lúa bằng phương pháp bắn gen. Kết quả nghiên cứu đã thu được 2 dòng lúa chỉnh sửa *PthXo3/AvrXa7* (SB-E1 và SB-E2); 1 dòng lúa (SB-E4) đột biến mất đoạn trên *Tal5/TalF*. Dòng SB-E1 thể hiện tính kháng với một chủng *Xoo* Pakistan (tỉ lệ diện tích lá nhiễm bệnh đạt 10,12%) và không có sự khác biệt đáng kể về các chỉ tiêu đánh giá về sinh trưởng và phát triển so với cây đối chứng [151].

Ngoài các nghiên cứu chỉnh sửa promoter *SWEET14* ở một số giống lúa, một số nghiên cứu bất hoạt hoàn toàn gen “nhiễm” cũng đã được thực hiện, ví dụ như nghiên cứu tạo đột biến dịch khung trên vùng Exon của *SWEET14* ở giống lúa Zhonghua11 bằng công nghệ CRISPR/Cas9. Dòng lúa CR-S14 mang đột biến bất hoạt *OsSWEET14* có chiều cao tăng cao hơn so với đối chứng nhưng không làm

giảm năng suất và đã được chứng minh có khả năng kháng hoàn toàn với chủng *Xoo* AXO1947 (Châu Phi) và chủng PXO86 (Châu Á) [141].

Ở Việt Nam, chưa có nghiên cứu chọn tạo giống lúa kháng bạc lá dựa trên protein TAL hay gen *S* nào được thực hiện. Luận án này được coi là nội dung nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam về chọn tạo giống lúa kháng bạc lá dựa trên tương tác protein TAL-gen “nhiễm”, thuộc Đề tài cấp Quốc gia: Nghiên cứu ứng dụng công nghệ chỉnh sửa hệ gen để cải tạo tình trạng mùi thơm và kháng bạc lá trên một số giống lúa chủ lực của Việt Nam (2017-2020).

1.4 Giống lúa BT7 và các nghiên cứu cải tiến giống lúa BT7

1.4.1 Giới thiệu chung về giống lúa BT7

Giống lúa BT7 là giống lúa thuần nhập nội từ Trung Quốc, được chọn lọc và làm thuần bởi Công ty cổ phần Tập đoàn ThaiBinh, được công nhận là giống được phép sản xuất kinh doanh theo Quyết định số 74/2004/QĐ-BNN ngày 16/12/2004. Đây là giống lúa thuộc nhóm giống lúa ngắn ngày loài phụ *indica*, với thời gian sinh trưởng 125-130 ngày vụ Xuân và 105-110 ngày vụ mùa. Chiều cao cây trung bình đạt 100 - 105 cm, với 4-5 nhánh/cây, năng suất trung bình từ 50 – 55 tạ/ha. Hạt thóc thon nhỏ, màu vàng sẫm, trọng lượng 1000 hạt từ 18,5 – 19,5 gram. Hàm lượng amylose trong hạt gạo BT7 dao động từ 13-19%; chất lượng gạo ngon, hạt gạo trong, cơm mềm, thơm.

Khi năng suất lúa hầu như đạt ngưỡng thì việc chuyển đổi cơ cấu giống lúa để vừa đảm bảo an ninh lương thực, vừa đảm bảo định hướng sản xuất hàng hóa giá trị hướng tới xuất khẩu đã trở thành mục tiêu nhiệm vụ hết sức quan trọng. Chọn lựa, sử dụng các giống lúa chất lượng cao đang được coi là xu thế tất yếu trong sản xuất lúa gạo, bởi vậy diện tích trồng các lúa chất lượng cao nói chung và giống lúa BT7 nói riêng ngày một gia tăng. Ở một số địa phương phía Bắc, diện tích gieo cấy BT7 lên tới > 50% tổng diện tích trồng lúa, đặc biệt là ở Nam Định (địa phương có truyền thống sản xuất lúa chất lượng cao). Theo số liệu của Cục thống kê, tỉnh Nam Định có diện tích gieo trồng lúa Bắc thơm 7 là 45.250,5 ha, chiếm 63,03% diện tích năm 2021.

1.4.2 Bệnh bạc lá trên giống lúa BT7

Mặc dù là giống lúa chất lượng cao, được người tiêu dùng ưa chuộng và mang lại lợi nhuận cao cho người nông dân ở những năm được mùa. Song những năm gần đây, diện tích trồng BT7 bị thiệt hại nặng nề bởi bệnh bạc lá. Để giảm bớt những thiệt hại, UBND một số tỉnh gieo trồng diện tích lớn giống lúa BT7 đã khuyến cáo hạn chế diện tích sản xuất đối với giống lúa BT7, chỉ cho sản xuất ở vùng có trình độ thâm canh cao và áp dụng đồng bộ các biện pháp canh tác tổng hợp để hạn chế thiệt hại do bệnh bạc lá gây ra (UBND tỉnh Thái Bình, 2016).

Nghiên cứu của Nguyễn Huy Mạnh và cs. (2009) đã chứng minh bệnh bạc lá tấn công chủ yếu ở các tỉnh miền Bắc; trong số 59 isolate vi khuẩn *Xoo* thu thập được, có đến 17 isolate được phân lập từ giống lúa BT7 (chiếm 28,81%). Nhóm tác giả cũng đã ghi nhận các giống lúa thuần có nguồn gốc Trung Quốc dễ bị nhiễm bệnh bạc lá [9]. Kết quả đánh giá chất lượng giống lúa trong vụ Xuân tại cánh đồng Mường Thanh, huyện Điện Biên đã cho thấy giống lúa BT7 cũng bị nhiễm bệnh bạc lá điểm 3 và điểm 5 trên thang điểm 9 trong 2 năm 2011 và năm 2012 [10] và điểm 7 ở các tỉnh đồng bằng sông Hồng [7]. Bên cạnh các thông tin bệnh tự nhiễm trong sản xuất thực tiễn, giống lúa BT7 cũng đã được khẳng định là dễ mắc cảm với các chủng vi khuẩn *Xoo* thông qua các thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo. Kết quả nghiên cứu ở vụ mùa năm 2011 cho thấy cây lúa BT7 đạt điểm nhiễm bệnh 5 - 7 với các chủng *Xoo* 996.HAU.10147, 14981. HAU 10146 và 1035 HAU 10153 [8]; và đạt mức điểm 9 khi lây nhiễm bệnh nhân tạo với các chủng vi khuẩn *Xoo* khác [7, 19].

1.4.3 Nghiên cứu cải tiến di truyền giống lúa BT7

Với những ưu điểm vượt trội về mặt chất lượng và năng suất, giống lúa BT7 đã trở thành giống lúa chủ lực của các tỉnh phía Bắc và là đối tượng được đặc biệt quan tâm trong các chương trình nghiên cứu chọn tạo giống. Năm 2019, Chu Đức Hà và cs đã tích hợp thành công 2 locus gen *Sub1* và *Saltol* nhằm cải thiện khả năng chịu ngập và mặn của giống lúa BT7. Bằng chỉ thị phân tử kết hợp với lai trở lại (MABC), nhóm nghiên cứu đã quy tụ thành công locus gen *Sub1* từ giống lúa IR64-*Sub1* vào BT7 và đã chọn được 10 cá thể có khả năng chịu ngập giai đoạn

mạ trong điều kiện nhân tạo ở trạng thái đồng hợp tử và có nền di truyền giống với BT7 nhất. Song song với đó, cũng bằng phương pháp MABC, cá thể mang locus gen *Saltol* có khả năng chịu mặn ở trạng thái đồng hợp tử nền di truyền BT7 đã được chọn lọc từ quần thể BC₃F₂. Kết quả lai tạo và tự thụ các cá thể mang gen *Sub1* và *Saltol* đã xác định được F_{3.3} và F_{3.6} mang cả locus gen *Sub1* và *Saltol* đồng hợp tử, nền di truyền giống với BT7 và có khả năng chịu ngập và chịu mặn [3].

Đối với bệnh bạc, một vài nghiên cứu gần đây đã cố gắng tích hợp các gen kháng vào BT7 nhằm nâng cao giá trị thương mại cho giống lúa này. Ứng dụng chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng *xa5*, qua 5 thế hệ lai trở lại và chọn lọc các dòng tự thụ, nhóm nghiên cứu của Phạm Thiên Thành đã chọn được dòng lúa triển vọng BT7KBL-02 ở thế hệ BC₅F₅ mang gen kháng [19]. Cũng với phương pháp tương tự, giống lúa BT7 được tiến hành lai với dòng đấng gen IRBB21 mang gen kháng *Xa21* để tạo ra giống lúa BT7 cải tiến kháng bệnh bạc lá (BT7KBL). Giống BT7KBL đã được khảo nghiệm và được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận giống chính thức và cho mở rộng sản xuất ở các tỉnh phía Bắc [8].

1.5 Chuyển gen vào lúa thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

1.5.1 Vai trò của kỹ thuật chuyển gen nhờ *A. tumefaciens* đối với hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9

Khó khăn lớn nhất của công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 là việc đưa hệ thống chỉnh sửa gen (ở dạng trực tiếp là phức hệ Cas9/gRNA hay ở dạng gián tiếp là cấu trúc DNA biểu hiện phức hệ Cas9/gRNA) vào trong tế bào chủ. Ở thực vật, hệ thống Cas9/gRNA có thể được chuyển vào nhân tế bào cây chủ theo 2 cách: (1) biến nạp ổn định T-DNA vào hệ gen cây chủ thông qua kỹ thuật chuyển gen sử dụng *A. tumefaciens* hay súng bắn gen; (2) biểu hiện tạm thời phức hệ Cas9/gRNA (vi tiêm hoặc dung hợp tế bào trần) [65]. Cho đến nay, kỹ thuật chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* vẫn là phương pháp hiệu quả và phổ biến nhất được sử dụng cho các nghiên cứu chuyển gen thực vật do hiệu quả cao, cấu trúc DNA tồn tại và biểu hiện ổn định, số lượng bản sao thấp. Hơn nữa, các nhà khoa học có thể sử dụng nhiều loại vật liệu khác nhau để chuyển gen nhờ *A. tumefaciens*, ví dụ như

hoa (*Arabidopsis*), mô sẹo hoặc IE (lúa, ngô...), mô lá (thuốc lá), rễ tơ (đậu tương, khoai tây). Chính vì vậy, rất nhiều nghiên cứu chỉnh sửa gen ở thực vật bằng CRISPR/Cas9 đã áp dụng phương thức chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* này [29, 44, 45].

Hiệu suất chỉnh sửa gen ở thực vật phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố, trong đó bao gồm cả hiệu quả của bước chuyển gen. Ở cùng một loài thực vật, loại vật liệu khác nhau hay gen đích khác nhau sẽ cho hiệu quả chỉnh sửa gen khác nhau. Chẳng hạn như ở ngô, khi chuyển cấu trúc chứa Cas9/sgRNA thông qua *A. tumefaciens* vào IE, hiệu suất chỉnh sửa gen tổng hợp phytoene nội bào là 13%, chỉnh sửa gen *Zmzb* là 2% [44]. Ở cao lương, hiệu suất chỉnh sửa gen *SbFT* đạt 33,3%, chỉnh sửa *SbGA2ox5* suất 83,3% [45]. Nhìn chung, cây tái sinh từ mô sẹo được chuyển cấu trúc biểu hiện CRISPR/Cas9 thường có tỉ lệ đồng hợp các indel gen đích ở ngay thế hệ đầu cao hơn so với khi sử dụng vật liệu là hoa, lá hay rễ tơ [126]. Đặc biệt ở lúa, khi chuyển hệ thống CRISPR/Cas9 qua *A. tumefaciens*, cây con thu được phần lớn chỉ mang một bản sao. Điều này sẽ thuận lợi cho việc xác định đột biến trong hệ gen và phân tích di truyền ở thế hệ con cháu cũng trở nên dễ dàng hơn. Bằng cách phân tích vị trí mục tiêu trên cây chuyển gen tương ứng, các đột biến dễ dàng được xác định. Hiệu suất gây đột biến ở lúc dao động từ 2% - 16% [143].

Để biểu hiện trong thực vật, hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 cần phải được thiết kế bằng các mô đun phiên mã gen được tối ưu cho thực vật và phải được chèn vào vùng T-DNA của một vector nhị phân. Mặc dù cấu trúc biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 được đưa vào hoạt động rất hiệu quả nhưng đôi khi vẫn xuất hiện các thể khảm (cơ thể mang nhiều bộ NST khác nhau) ở thế hệ T_1 , trừ khi quá trình chỉnh sửa gen tạo ra đột biến ở thể đồng hợp. Chính vì vậy, để tạo ra các đột biến có thể di truyền ổn định trong hệ gen, cấu trúc cấu trúc CRISPR/Cas9 cần phải được biểu hiện ở tế bào mầm hay tế bào mô phân sinh. Thông thường, các promoter hoạt động mạnh trong tế bào mô phân sinh thường được sử dụng để tạo ra những đột biến gen có tính di truyền ổn định ngay trong thế hệ cây chuyển gen T_1 [146]. Hơn nữa, để sgRNA biểu hiện khi chuyển gen đơn cần sự có mặt của promoter mang RNA polymerase III. Promoter *U3* và *U6* là hai

loại thường được sử dụng phổ biến nhất để điều khiển quá trình biểu hiện sgRNA trong tế bào thực vật. Quá trình phiên mã sgRNA bắt đầu từ adenin (A) đối với promoter *U3* hoặc bắt đầu từ guanin (G) đối với *U6*. Tuy nhiên, đầu 5' của trình tự đích nằm trong hệ gen không cần bắt đầu bằng G hay A, miễn là các Nu này có trong cấu trúc biểu hiện sgRNA [98]. Các kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy khi sử dụng promoter *U6*, sgRNA được biểu hiện tốt hơn và thích hợp để chỉnh sửa được ở nhiều loại thực vật [126].

1.5.2 Hiệu quả chuyển gen lúa nhờ *A. tumefaciens*

Đối với cây lúa, chuyển gen thông qua vi khuẩn đất *A. tumefaciens* được cho là hiệu quả hơn cả, do số bản sao của gen biến nạp được chèn vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ ít và bền vững. Đặc biệt, phương pháp này cho hiệu quả chuyển gen cao, khả năng chuyển được đoạn DNA có kích thước lớn và chi phí thấp. Chính vì vậy, cho đến nay hơn 80% các công bố về nghiên cứu chuyển gen lúa đã sử dụng phương pháp này [57]. Nguyên lý của phương pháp này dựa trên đặc tính tự nhiên của *A. tumefaciens* mang các plasmid sinh khối u ở thực vật (Ti-plasmid) chứa các gen *vir* và vùng gen chuyển (T-DNA). Các tế bào thực vật khi bị tổn thương sẽ tiết ra hợp chất bảo vệ có tác dụng kích thích sự biểu hiện gen *vir* ở *A. tumefaciens*. Protein Vir tạo ra T-strand từ vùng T-DNA trên Ti-plasmid. Sau đó, vi khuẩn bám vào tế bào thực vật, T-strand và một số protein Vir được chuyển vào tế bào thực vật qua kênh vận chuyển xuyên màng. Trong tế bào thực vật, các protein Vir tương tác với T-strand tạo ra phức hệ T-complex. Phức hệ này đi vào nhân tế bào thực vật; T-DNA được chèn vào hệ gen thực vật và biểu hiện gen chuyển [57].

Hiệu suất chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* vào các giống lúa *indica* so với *japonica* khá thấp, do khó tái sinh hơn. Gần đây, với nhiều cải tiến đáng kể, phương pháp chuyển gen nhờ *A. tumefaciens* đã đạt hiệu suất cao ở hầu hết các giống lúa, bao gồm cả nhóm *indica* (Bảng 1.3) [114, 115, 158]. Các nhân tố quan trọng được xác định là có ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen nhờ *A. tumefaciens* ở lúa gồm: vật liệu lây nhiễm (mô sẹo/IE/đỉnh chồi) và khả năng tái sinh *in vitro* của từng giống sau lây nhiễm. Đặc biệt, khả năng tái sinh sau quá trình sàng lọc có

vai trò quyết định sự thành công của thí nghiệm. Bản chất di truyền và kiểu gen của từng giống lúa là yếu tố quyết định chính của khả năng hình thành mô sẹo và tái sinh cây hoàn chỉnh trong quá trình nuôi cấy *in vitro* [114]. Sử dụng IE làm vật liệu khởi đầu cho quá trình chuyển gen đã được chứng minh là hiệu quả hơn nhiều so với các loại vật liệu khác (như phôi trưởng thành), do khả năng tạo mô sẹo và khả năng tái sinh cây từ vật liệu IE tốt hơn [135, 136].

Bảng 1.3. Hiệu quả chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* (2010 – 2017)

Giống lúa	Loài phụ	Chủng <i>A. tumefaciens</i>	Hiệu quả biến nạp (%)
Kasalath	Indica	EHA 105	66,9
Pusa Basmati	Indica	EHA 105	26
MR219	Indica	LBA4404	35
Handao 297	Japonica	ALG1	20
Zhenshan 97	Indica	EHA 105	85,2
IR64	Indica	LBA4404	12
IR36	Indica	EHA105	99,05
Zhonghua 11	Japonica	EHA 105	66,7
Samba Mahsuri	Indica	LBA4404	30
JK1044R	Indica	EHA 105	30
Nipponbare	Japonica	EHA 105	41,2
Zhonghua 11	Japonica	EHA 105	67,4
Chành Trụi	Japonica	EHA 105	25
Taichung 65	Japonica	EHA 105	90

Ở Việt Nam, định hướng chuyển gen vào lúa thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* đã bắt đầu hình thành từ những năm 1995. Tuy nhiên, các công bố chuyển gen lúa còn ít và hiệu quả chuyển gen đạt được chưa cao. Kết quả nghiên cứu của Cao Lệ Quyên (2016) cho thấy trong số tập đoàn 47 giống lúa nương đã khả sát khảo năng tạo mô sẹo, chỉ có 26 giống có tỉ lệ tạo mô sẹo trên 50%, trong đó chỉ có 5 giống có tỉ lệ tạo mô sẹo trên 75%, gồm: LP5M; IR80416-B-152-4; YUNLU103-1B và Nếp Khau Đẻ Dồn. Đặc biệt duy nhất giống lúa Chành Trụi có khả năng tạo mô sẹo lớn hơn 80%. Quy trình chuyển gen cho giống lúa Chành Trụi – giống lúa nương bản địa của Việt Nam đã được nghiên cứu và đây cũng là kết

quả chuyển gen thành công đầu tiên cho một giống lúa bản địa của Việt Nam đã được công bố. Hiệu suất chuyển gen vào giống lúa Chành Trụi dao động từ 9% đến 15%, trung bình là 10% [14]. Việc sử dụng đĩa petri gờ cao 15 mm kết hợp với phơi mẫu lúc lây nhiễm và giảm mật độ OD_{600nm} của vi khuẩn từ 1,0 xuống 0,1 đã được khảo sát để cải tiến hiệu quả chuyển gen vào giống lúa Taichung 65. Kết quả, hơn 90% số cây tái sinh mang cấu trúc gen chuyển đã được ghi nhận, trong khi các nghiên cứu trước đó chỉ cho hiệu quả chuyển gen là 4,6% hoặc 7,59% hoặc ở các giống japonica khác chỉ đạt tối đa 23%. Kết quả nghiên cứu này đã góp phần giảm thiểu khối lượng công việc cần thao tác trong mỗi thí nghiệm chuyển gen [2]. Ngoài yếu tố di truyền (giống), các yếu tố môi trường như thành phần khoáng, chất điều hoà sinh trưởng, chất kháng sinh cũng có ảnh hưởng đến tỉ lệ tạo mô sẹo, tỉ lệ tái sinh cây sau nuôi cấy chọn lọc và sức sống cây ở điều kiện *ex vitro* [2, 5].

1.5.3 Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* vào IE lúa

Hiệu quả của quá trình chuyển T-DNA vi khuẩn vào tế bào thực vật thường bị tác động bởi tuổi mô hoặc cây, dạng tế bào, giai đoạn chu trình tế bào và các chỉ tiêu sinh lý khác. Phôi có kích thước lớn có khả năng sống sót trong môi trường khuẩn *A. tumefaciens* cao hơn, tuy nhiên khả năng tái sinh lại kém hơn [25]. Thông thường, tuổi phôi được tính từ thời điểm thụ phấn đến 30 ngày sau đó (DAP - ngày sau thụ phấn), có liên quan đến kích thước phôi và đặc điểm sinh lý sinh hóa tương ứng của phôi lúa. Mười ngày đầu (0 - 10 DAP) là giai đoạn biệt hóa cơ quan, 10 ngày tiếp theo (10 DAP - 20 DAP) là giai đoạn trưởng thành của phôi và giai đoạn 20 DAP - 30 DAP là giai đoạn ngủ nghỉ của phôi lúa [64].

Bên cạnh đó, mật độ vi khuẩn và thời gian đồng nuôi cấy là những yếu tố ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả của quá trình chuyển gen. Sự tăng sinh của vi khuẩn tỉ lệ thuận với thời gian [124]. Vì vậy, thời gian đồng nuôi cấy dài hay ngắn quá đều không tốt. Nếu thời gian đồng nuôi cấy dài, vi khuẩn *A. tumefaciens* sinh sản nhiều phủ lên toàn bộ mẫu cấy, cạnh tranh dinh dưỡng, hoặc tiết ra nhiều độc tố làm chết tế bào mặc dù quá trình nhiễm chuyển có cao hơn. Ngược lại, nếu thời gian đồng nuôi cấy ngắn quá, số lượng vi khuẩn *A. tumefaciens* ít, chưa đủ tạo ra

tần số nhiễm chuyển cao, mặc dù tế bào có thể sống sót nhiều. Quá trình cắt T-DNA sợi đơn, bao bọc T-DNA bằng các protein D2, E và B, chuyển phức hợp này ra khỏi tế bào *A. tumefaciens* vào tế bào chất tế bào cây, phá bỏ lớp vỏ protein, tái bản T-DNA sợi đơn để tổng hợp thành sợi kép và chèn ngẫu nhiên vào nhiễm sắc thể cây ký chủ đều xảy ra ở khâu này [25]. Do vậy, xác định thời gian đồng nuôi cây thích hợp cũng là nhân tố có ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen.

Quy trình chuyển gen IE ở giống lúa IR64 của Hiei (2008) đạt hiệu suất trên 90% khi sử dụng chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4440 để biến nạp cấu trúc chuyển gen. Tổng thời gian của quy trình chuyển gen từ khi đồng nuôi cây đến khi đưa cây ra vườn ươm là 74 ngày (Phụ lục 3) [57]. Năm 2014, Slamet cũng đã công bố một quy trình chuyển gen IE cải tiến vào giống lúa IR64. Quy trình này có thời gian thực hiện tương đương quy trình của Hiei (2008) 76-80 ngày, tuy nhiên, hiệu suất chuyển gen chỉ đạt 25-40% [124].

1.5.4 Nghiên cứu chuyển gen vào giống lúa BT7 nhờ *A. tumefaciens*

Các giống lúa chủ lực trong sản xuất của Việt Nam hiện nay phần lớn là các giống *indica* – là những giống khó chuyển gen, bao gồm cả giống BT7. Đây là một rào cản lớn khi triển khai các nghiên cứu cải tạo di truyền giống lúa bằng các công nghệ chuyển gen hay chỉnh sửa gen. Cho đến nay, trong tất cả các nghiên cứu cải tạo di truyền của giống lúa BT7 (mục 1.4.3), gen/QTL mục tiêu đều được chuyển vào BT7 bằng phương pháp lai truyền thống; chưa có nghiên cứu nào sử dụng phương pháp chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*. Chính vì vậy việc nghiên cứu xây dựng chuyển gen vào giống lúa BT7 là điều cần thiết để phục vụ các nghiên cứu cải tiến giống lúa BT7 bằng các công nghệ gen tiên tiến.

Trước đây, trong nghiên cứu thăm dò tổng thể về khả năng tái sinh của tập đoàn 59 các giống lúa của Việt Nam, nhóm nghiên cứu của Cao Lệ Quên (2008) đã ghi nhận cả giống *japonica* và *indica*, bao gồm cả BT7, đều không có khả năng hình thành mô sẹo trên môi trường N6-D. Các tác giả đã xác định được môi trường tối ưu tạo mô sẹo cho giống lúa BT7 trên cơ sở môi trường nền MS, thu được hiệu suất 81% [12]. Ở nghiên cứu sau này, các tác giả đã tiếp tục hoàn thiện quy trình nuôi cấy *in vitro* cho giống lúa BT7 và đã tái sinh thành công cây lúa BT7 từ mô

sạo tạo thành từ phôi trưởng thành [13]. Năm 2019, quy trình chuyển gen vào lúa BT7 sử dụng phôi trưởng thành đã được công bố với hiệu suất chuyển gen đạt 22,53% [16]. Tuy nhiên, cho đến nay, chưa có công bố nào ở Việt Nam về nghiên cứu quy trình chuyển gen vào lúa, bao gồm cả giống lúa BT7, sử dụng IE làm vật liệu khởi đầu.

Tóm lại, từ tổng quan trên đây, có thể thấy việc nghiên cứu ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa các EBE trên vùng promoter của gen nhiễm *OsSWEET14* nhằm cải tiến tính kháng bệnh bạc lá cho giống lúa BT7 là một hướng nghiên cứu hiện đại và có tiềm năng và tính khả thi cao ở Việt Nam, bắt kịp xu hướng nghiên cứu chọn giống chính xác với thế giới.

Chương 2. NGUYÊN VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

2.1.1 Đối tượng nghiên cứu

Promoter *OsSWEET14* của giống lúa BT7.

2.1.2 Vật liệu nghiên cứu

2.1.2.1. Mẫu thực vật

Hạt giống lúa BT7 và IR24 được cung cấp bởi Công ty cổ phần Tập đoàn ThaiBinh Seed.

2.1.2.2. Chủng vi sinh vật

Vi khuẩn *E. coli* DH5 α do công ty Thermo Fisher Scientific cung cấp; vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng EHA105 khả biến được cung cấp bởi Công ty Clontech Laboratories; chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 mang vector pCAMBIA1301 và 20 chủng vi khuẩn *Xoo* được phân lập và được lưu giữ tại Bộ môn Bệnh học phân tử, Viện Di truyền nông nghiệp (Phụ lục 2).

2.1.2.3. Vector và oligonucleotide

Vector pCas9 và pENTR4-gRNA do nhóm nghiên cứu của Tiến sĩ Sebastien Cunnac (Viện Nghiên cứu vì sự phát triển, Montpellier, Pháp) cung cấp. Vector pGEM-T đóng gói trong bộ kit pGEM[®]-T Easy Vector Systems được cung cấp từ hãng Promega.

Các oligonucleotide (Phụ lục 4) sử dụng trong nghiên cứu được thiết kế dựa trên các trình tự đã được công bố trên GenBank và được cung cấp từ hãng Invitrogen (Hoa Kỳ) và Sigma (Hoa Kỳ).

2.1.3 Hoá chất

Các loại enzyme cắt giới hạn, T4 DNA ligase, *Taq* DNA polymerase, *Pfu* DNA polymerase, thang chuẩn DNA 1 kb và bộ kit tinh sạch DNA plasmid *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* của hãng Thermo Scientific. Bộ kit sinh tổng hợp cDNA và Real-time PCR từ hãng Thermo Scientific. Các hóa chất sử dụng để tinh sạch RNA (Trizol), protein và các loại kháng sinh được cung cấp bởi Invitrogen.

Các hóa chất cơ bản sử dụng cho sinh học phân tử do công ty Sigma và Merk (Mỹ) cung cấp đều đạt độ tinh khiết cần thiết.

2.1.4 Thiết bị

Thiết bị chính gồm Máy PCR 9700 hãng Perkin Elmer; hệ thống điện di DNA và protein hãng Biorad (Mỹ); máy ly tâm Universal 30RF hãng Hettich (Đức), Biofuge 28RS của hãng Heraeus (Đức); máy chụp ảnh huỳnh quang Firereader của hãng UVItec (Anh quốc) và tủ cấy an toàn sinh học, máy đo pH, nồi hấp tiệt trùng đảm bảo tiêu chuẩn kỹ thuật cho thí nghiệm.

2.2 Nội dung nghiên cứu

Luận án được thực hiện với 4 nội dung nghiên cứu chính (Hình 2.1), cụ thể:

Nội dung 1: Nghiên cứu xây dựng quy trình chuyển gen vào IE giống lúa BT7

- Tối ưu hệ thống tái sinh *in vitro* giống lúa BT7 từ IE.
- Tối ưu điều kiện chuyển gen vào IE giống lúa BT7 thông qua *A. tumefaciens*
- Quy trình chuyển gen vào IE giống lúa BT7 thông qua *A. tumefaciens*

Nội dung 2 – Thiết kế cấu trúc T-DNA chỉnh sửa promoter gen *OsSWEET14* ở giống lúa BT7 (*SW14-BT*)

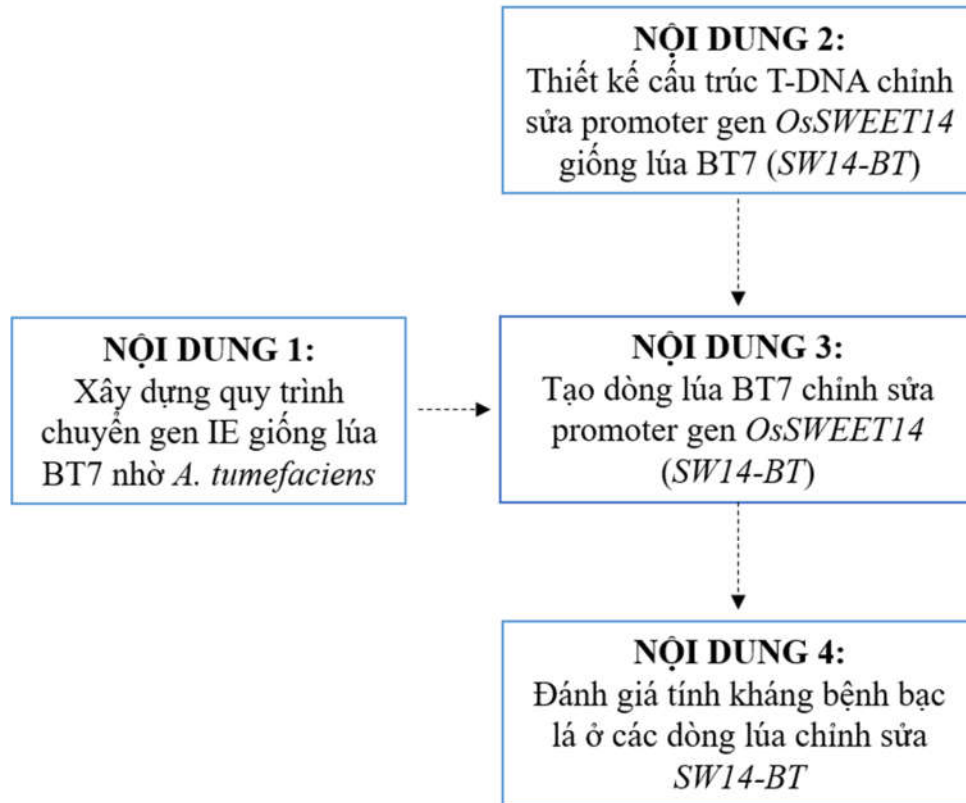
- Nghiên cứu xác định cơ chế phân tử lây nhiễm của *Xoo* ở giống lúa BT7
- Thiết kế cấu trúc T-DNA chỉnh sửa *SW14-BT*

Nội dung 3 - Tạo dòng lúa BT7 chỉnh sửa promoter *SW14-BT*

- Tạo chủng *A. tumefaciens* mang cấu trúc T-DNA chỉnh sửa *SW14-BT*
- Chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa *SW14-BT* vào giống lúa BT7
- Sàng lọc kiểu gen và kiểu hình các dòng lúa BT7 tái sinh
- Sàng lọc kiểu gen và kiểu hình các dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen T₁

Nội dung 4 - Đánh giá tính kháng bệnh bạc lá của các dòng lúa BT7 chỉnh sửa promoter *OsSWEET14*

- Đánh giá đặc điểm nông sinh học dòng lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT*
- Nghiên cứu biểu hiện của *OsSWEET14* trong các dòng lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT*
- Đánh giá khả năng kháng bệnh bạc lá của các dòng BT7 đột biến *SW14-BT* ở thế hệ T₂



Hình 2.1 Sơ đồ thực hiện các nội dung nghiên cứu chính của luận án

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Các kỹ thuật chung trong nghiên cứu sinh học phân tử

2.3.1.1. Tách chiết DNA tổng số ở lúa

DNA tổng số của thực vật được tách chiết theo phương pháp của Doyle & Doyle [51], sử dụng dung dịch CTAB (Cetyl threemetyl ammonium bromide) 2%. Mẫu lá lúa được nghiền với nito lỏng cho tới khi thành dạng bột mịn, sau đó được chuyển vào ống eppendorf 2 mL; một mL đệm CTAB được bổ sung vào ống; hỗn hợp được ủ ở 56°C trong 20 phút. Ống được ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút

trong 5 phút ở 4°C, sau đó phần dịch nổi được chuyển sang ống mới. Hai mươi mL dung dịch chloroform-isoamylalcohol (tỉ lệ 24:1) được bổ sung vào ống, hỗn hợp được lắc đều và ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Phần dịch nổi được chuyển sang ống mới; isopropanol được bổ sung vào ống theo tỉ lệ 1:1 cùng với 5,0 mL NaCl 1,0 M. Hỗn hợp được đảo đều trong 5-7 phút và ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 15 phút để thu tủa. Kết tủa được hòa lại trong ethanol 70%, và ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút để thu tủa DNA. Bước này được lặp lại một lần nữa. Kết tủa DNA được thu lại, làm khô trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Năm mươi μ L H₂O được bổ sung cùng với 2 μ L RNase 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.

2.3.1.2. Tách chiết RNA tổng số ở lúa

RNA tổng số được tách chiết từ lá lúa non theo quy trình hướng dẫn của hãng Invitrogen (Hoa Kỳ). Mẫu thực vật tươi được thu và bảo quản trong N₂ lỏng cho tới khi tách chiết. Một trăm miligam mẫu mô thực vật được nghiền thành bột mịn trong N₂ 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 μ L chloroform được bổ sung vào hỗn hợp; ống 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. Năm trăm μ L isopropanol được bổ sung vào dung dịch; 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 trong 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 60 phút. Kết tủa RNA cuối cùng được hòa tan lại trong 50 μ L dung dịch DEPC 0,2% và bảo quản ở nhiệt độ -80°C.

2.3.1.3. Tách chiết DNA plasmid từ vi khuẩn

DNA tái tổ hợp được tinh sạch từ tế bào vi khuẩn *E. coli* bằng bộ kit *GenJETTM Plasmid Miniprep* (Thermo Scientific, Hoa Kỳ). Một khuẩn lạc được nuôi lắc trong 5 mL 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 đệm P1 (Resuspension solution) đã bổ sung RNase A. Hai trăm năm mươi µL đệm P2 (Lysis solution) được bổ sung vào dung dịch tế bào. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, sau đó được trung hòa bởi 350 µL đệm P3 (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. Năm trăm µL đệm rửa (Wash buffer) được bổ sung vào cột; cột được ly tâm 30 – 60 giây. Bước này được lặp lại một lần nữa. Năm mươi µL đệm đẩy (Elution buffer) được bổ sung vào chính giữa màng silica; cột được ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 phút. Plasmid được thu bằng cách ly tâm cột với vận tốc 10.000 vòng/phút trong 60 giây. Mẫu DNA plasmid tinh sạch được bảo quản ở -20°C.

2.3.1.4. Tách chiết DNA tổng số từ vi khuẩn

DNA tổng số được tách chiết từ vi khuẩn *Xoo* bằng bộ kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Hoa Kỳ). Một khuẩn lạc được cấy ria trên môi trường PSA ở 28°C trong 48h. Vi khuẩn được hoà tan trong 600 µL dung dịch Nucleic Lysis Solution. Hỗn hợp được ủ 80° C trong 5 phút, sau đó làm mát về nhiệt độ phòng. 3 µL dung dịch RNase Solution được bổ sung vào ống và trộn đều; hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 15-60 phút. Hai trăm µL dung dịch Protein Precipitation Solution được bổ sung vào ống; ống được trộn đều và ủ trên đá trong 5 phút. Ống được ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút. 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 tiếp 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 12.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C; kết tủa DNA được thu lại (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 qua đêm ở 4°C và bảo quản ở -20°C.

2.3.1.5. 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) [115].

Điện di DNA: Một gam agarose được đun nóng trong 100 mL đệm TAE và đúc vào khuôn. Hỗn hợp mẫu gồm 5 μL mẫu DNA được trộn với 1,0 μL đệm mẫu có chứa bromophenol xanh, xylene cyanol và EtBr (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 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.

Điện di RNA: 1,8 g agarose được đun nóng để hòa tan trong 170 mL H_2O , sau đó làm mát về 65°C . Mười mL formaldehyde (37%) và 20 mL đệm MOPS 10 X 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 100V trong 10 phút và 65V 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.

2.3.1.6. Tinh sạch DNA từ gel agarose

DNA được tinh sạch từ gel agarose bằng bộ kit *GenJETTM Gel Extraction* (Thermo Scientifics, 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. Đệm bám (Binding buffer) được bổ sung vào ống (1,0 μL đệm \sim 1,0 mg gel); ống được ủ ở 60°C trong khoảng 10 phút đến khi gel tan hoàn toàn. Dung dịch gel agarose đã hòa tan được chuyển lên cột tinh sạch và ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong một phút. Năm trăm μL đệm rửa (Wash buffer) được bổ sung vào cột và ly tâm trong một phút ở vận tốc 10.000 vòng/phút. Bước rửa cột được lặp lại một lần

nữa. Một trăm μL đệm đẩy (Elution buffer) được bổ sung vào chính giữa lớp màng silica của cột. DNA được thu bằng cách ly tâm cột trong một phút ở tốc độ 10.000 vòng/phút. Mẫu DNA tinh sạch được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose và được bảo quản ở -20°C .

2.3.1.7. Định lượng DNA

Hàm lượng DNA được xác định bằng phương pháp đo quang phổ hấp thụ ở bước sóng 260 nm ($\text{OD}_{260\text{nm}}$ – Optical Density $_{260\text{nm}}$) theo công thức:

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

$\text{OD}_{260\text{nm}}$: độ hấp thụ của dung dịch DNA ở 260 nm;

n : hệ số pha loãng.

2.3.1.8. Nhân bản DNA bằng PCR

Đoạn DNA đích được nhân dòng bằng phản ứng chuỗi trùng hợp PCR theo phương pháp của Sambrook và Russel, 2001 [115]. Phản ứng PCR gồm các thành phần chính: DNA khuôn (50 pg); dNTPs 0,2 mM; mồi (primer) 0,4 pmol/ μL ; *Taq* DNA polymerase 1,0 U; MgCl_2 2 mM; dung dịch đệm (buffer) và nước cất khử trùng khử ion. Phản ứng được thực hiện bằng máy gia nhiệt tự động (PCR) theo ba giai đoạn cơ bản. Giai đoạn biến tính (denaturation): DNA mạch kép được tách thành dạng mạch đơn ở nhiệt độ cao ($94 - 95^{\circ}\text{C}$) trong vòng 30 – 60 giây. Giai đoạn lai – gắn mồi (hybridization): nhiệt độ được hạ thấp xuống $40 - 70^{\circ}\text{C}$, các đoạn mồi đặc hiệu sẽ bắt cặp bổ sung vào hai đầu đoạn DNA đích; giai đoạn này kéo dài 30 – 60 giây. Giai đoạn kéo dài chuỗi (elongation): nhiệt độ được tăng lên 72°C giúp cho DNA polymerase lắp ráp dNTPs tạo thành mạch đơn DNA mới bổ sung với mạch DNA khuôn bắt đầu từ đoạn mồi. Thời gian kéo dài chuỗi phụ thuộc vào kích thước đoạn DNA đích, thường từ 30 giây đến nhiều phút. Phản ứng kết thúc sau khi ủ ở 72°C trong vòng 10 phút và giữ sản phẩm ở 4°C cho đến khi phân tích. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose (mục 2.3.1.5).

2.3.1.9. Tổng hợp cDNA từ RNA

Một μg mẫu RNA tinh sạch được dùng cho phản ứng tổng hợp cDNA bằng bộ kit *Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis* theo quy trình hướng dẫn của hãng Thermo Scientifics (Hoa Kỳ), sử dụng mồi oligo dT. Hỗn hợp phản ứng

bao gồm: 2,5 μg RNA; 0,8 μL dNTPs 10 mM; 1,0 μL oligo dT 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 2,0 μL đệm 10 X; 0,5 μL chất ức chế RNase; 2,0 μL DDT 100 mM; 1,0 μL reverse transcriptase 5 U/ μL và ddH₂O đến tổng thể tích 20,0 μL . Ống phản ứng được ủ ở 42°C for 60 min. Sản phẩm phản ứng được bảo quản ở -80°C. Chất lượng cDNA được kiểm tra bằng PCR (mục 2.3.1.8) với cặp mồi Actin-F/Actin-R .

2.3.1.10. Biến nạp DNA plasmid vào vi khuẩn

Biến nạp DNA plasmid vào vi khuẩn *E. coli*: DNA plasmid được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt [115]. Tế bào *E. coli* khả biến (bảo quản trong tủ lạnh sâu -80°C) được làm tan trên đá trong 10 phút. Tiếp đó, 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 μL LB lỏng được bổ sung vào hỗn hợp biến nạp; 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 chất kháng sinh thích hợp và được ủ ở 37°C qua đêm.

Biến nạp DNA plasmid vào vi khuẩn *A. tumefaciens*: DNA plasmid được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* theo phương pháp của Wang (2006) [138]. Tế bào *A. tumefaciens* chủng EHA105 khả biến (bảo quản trong tủ lạnh sâu -80°C) được làm tan trên đá trong 10 phút. Tiếp đó, một μg DNA plasmid được bổ sung vào dung dịch tế bào đã rã đông và ủ trên đá 15 phút để tạo điều kiện cho vector bám vào thành tế bào, sau đó được chuyển sang ủ trong N₂ lỏng trong 5 phút. Tế bào được sốc nhiệt bằng cách chuyển sang bể ổn nhiệt 37°C trong 5 phút. Ống tế bào được ly tâm trong 30 giây; phần dịch nổi được loại bỏ hoàn toàn. Năm trăm μL LB được bổ sung vào ống để hòa tan toàn bộ tế bào, sau đó tiếp tục được ly tâm 30 giây; phần dịch nổi được loại bỏ. Tiếp theo, 500 μL 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°C. Hỗn hợp tế bào biến nạp được cấy trải trên môi trường LB đặc có bổ sung kanamycin 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, streptomycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, rifampicin 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ và ủ ở 28°C trong 2 - 3 ngày. Sự có mặt của cấu trúc biểu hiện gen trong khuẩn lạc xuất hiện

trên môi trường chọn lọc được kiểm tra bằng phương pháp PCR trực tiếp khuẩn lạc, sử dụng cặp mồi đặc hiệu của từng cấu trúc.

2.3.1.11. *Cắt/nối DNA*

Phản ứng cắt DNA được thực hiện bằng enzyme cắt giới hạn [115]. Thành phần phản ứng bao gồm: 17 μ L DNA, 2 μ L đệm phản ứng 10 X, 1,0 μ L enzyme (5 U). Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C trong 30 phút – 4 giờ.

Phản ứng ghép nối hai đoạn DNA được thực hiện bằng T4 ligase của hãng Invitrogen [115]. Thành phần phản ứng bao gồm: 4,0 μ L mỗi đoạn DNA, 1,0 μ L đệm T4 DNA ligase 10 X, 1,0 μ L T4 DNA ligase (5 U). Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 16°C trong 4 giờ hoặc 4°C qua đêm.

2.3.1.12. *Giải trình tự DNA*

Sản phẩm PCR được giải trình tự Nu theo của phương pháp Smith và đồng tác giả (1986) [125] bởi công ty Macrogen (Hàn Quốc). Kết quả giải trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit 4.0. Trình tự gen sau khi xử lý được so sánh với cơ sở dữ liệu trên Gene Bank và phân tích bằng phần mềm BioEdit v2.0 và CRISPR ID v1.1.

2.3.2 *Tối ưu quy trình chuyển gen vào giống lúa BT7 sử dụng IE*

2.3.2.1. *Tối ưu hệ thống nuôi cấy in vitro phôi hạt non giống lúa BT7*

a) *Tối ưu thời gian xử lý phôi hạt non bằng NaOCl*

Hạt lúa non (sau thụ phấn 8-10 ngày, giai đoạn còn sữa trong hạt) được bóc vỏ và khử trùng bằng dung dịch NaOCl 1,0%, lần lượt trong các khoảng thời gian: 3 phút, 5 phút, 8 phút và 10 phút. Hạt được rửa lại 5-6 lần bằng nước cất khử trùng và thấm khô. Sau đó, IE được tách ra khỏi hạt và đặt trên môi trường nuôi cấy N6 (muối cơ bản N6; 2,4-D 2,0 mg/L; NAA 1,0 mg/L; BAP 0,2 mg/L; sucrose 20 g/L; glucose 10g/L; agar 7 g/L; pH 5,2). Đĩa nuôi cấy được ủ trong tối ở 28°C. Tỷ lệ IE sống, nhiễm và chết được ghi lại sau 10 ngày nuôi cấy. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, 20 IE/công thức/lần lặp lại.

b) *Tối ưu điều kiện ánh sáng cho nuôi cấy tạo mô sẹo từ IE*

Hạt lúa non (sau thụ phấn 8-10 ngày, giai đoạn còn sữa trong hạt) được bóc vỏ và được khử trùng bằng NaOCl 1% với thời gian 5 phút, sau đó, IE được tách

khô hạt và được nuôi cấy trên môi trường N6 (muối cơ bản N6; 2,4-D 2,0 mg/L; NAA 1,0 mg/L; BAP 0,2 mg/L; sucrose 20 g/L; glucose 10g/L; agar 6 g/L; pH 5,8) trong cùng điều kiện tối hoàn toàn ở 25°C trong 7 ngày. Sau đó, mẫu được cấy chuyển sang môi trường mới có cùng thành phần và được nuôi ở hai điều kiện chiếu sáng: (A) - chiếu sáng liên tục với cường độ 3000 lux, ở 25°C) và (B) - tối hoàn toàn, ở 25°C. Tỷ lệ mô sẹo tăng sinh được ghi nhận sau 30 ngày nuôi cấy.

Mô sẹo thu được (sau 3 lần cấy chuyển từ mỗi công thức ánh sáng) tiếp tục được cấy chuyển sang môi trường nuôi cấy MS (muối MS cơ bản; kinetin 2 mg/L; NAA 0,2 mg/L; sucrose 20 g/L; glucose 10g/L; agar 6 g/L; pH 5,8). Mô sẹo được nuôi cấy với điều kiện chiếu sáng 16h/ngày, cường độ chiếu sáng 3000 lux ở 25°C. Tỷ lệ mô sẹo tái sinh chồi được ghi nhận lại sau 30 ngày nuôi cấy. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, 20 IE/công thức/lần lặp lại. Tỷ lệ mô sẹo tăng sinh = Số mô sẹo phát sinh từ IE tăng sinh / số IE cấy x 100%.

c) Tối ưu thành phần môi trường tái sinh chồi từ mô sẹo

Hạt lúa non được khử trùng bằng NaOCl 1% trong 5 phút, sau đó, IE được nuôi cấy (muối cơ bản N6; 2,4-D 2,0 mg/L; NAA 1,0 mg/L; BAP 0,2 mg/L; sucrose 20 g/L; glucose 10g/L; agar 6 g/L; pH 5,8) trong tối hoàn toàn ở 25°C. Sau 30 ngày, mô sẹo hình thành được cấy chuyển sang môi trường nuôi cấy MS (muối MS cơ bản, sucrose 20 g/L, glucose 10g/L, agar 6 g/L, pH 5,8) được bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) lần lượt theo 4 công thức: RW1 (kinetin 2,0 mg/L; NAA 0,2 mg/L; nước dừa 10%), RW2 (kinetin 2,0 mg/L; NAA 0,4 mg/L; nước dừa 10%), RW3 (kinetin 2,0 mg/L; NAA 0,2 mg/L; nước dừa 20%), RW4 (kinetin 2,0 mg/L; NAA 0,4 mg/L; nước dừa 20%). Mô sẹo được nuôi cấy với điều kiện chiếu sáng 16h/ngày, cường độ chiếu sáng 3000 lux ở 25°C. Tỷ lệ mô sẹo tái sinh chồi và số chồi/mô sẹo tái sinh được ghi nhận lại sau 30 ngày nuôi cấy. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, 20 mô sẹo/công thức/lần lặp lại.

2.3.2.2. Tối ưu quy trình biến nạp gen vào IE giống lúa BT7

a) Chuyển gen vào IE thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

T-DNA được chuyển vào giống lúa BT7 bằng phương pháp chuyển gen IE thông qua *A. tumefaciens* dựa trên quy trình chuyển gen IE của Hiei (2008) và Slamet [57, 124], với một số cải tiến (mục 2.3.2).

Chuẩn bị nguyên liệu thực vật: Hạt lúa non được bóc vỏ và khử trùng bằng dung dịch NaOCl 1% trong 5 phút để tách IE (mục 2.3.2a).

Chuẩn bị vi khuẩn: Một khuẩn lạc *A. tumefaciens* EHA105 mang vector pCAMBIA1301 đã được trẻ hóa và được cấy trên môi trường LB đặc chứa kanamycin 50 mg/L và rifamycin 15 mg/L nuôi trong tối 3 ngày ở 28°C. Sau đó, vi khuẩn được thu lại bằng cách ly tâm ở 3.000 vòng/phút ở 4°C và được hoà tan trở lại trong dung dịch môi trường N6 lỏng (muối cơ bản N6; 2,4-D 2,0 mg/L; NAA 1,0 mg/L; BAP 0,2 mg/L; sucrose 20 g/L; glucose 10g/L; acetosyringone 100 µM, pH 5,2) đến giá trị OD_{600nm} tùy theo công thức của thí nghiệm tối ưu mật độ vi khuẩn và thời gian đồng nuôi cấy (mục 2.3.2.2b), và đạt 0,3 ở các thí nghiệm còn lại.

Kỹ thuật thực hiện: IE được đặt trên môi trường nuôi cấy N6 (mục 2.3.2a) có bổ sung acetosyringone. Năm µL dung dịch vi khuẩn được nhỏ trực tiếp lên mỗi IE và được đồng nuôi cấy trong tối ở 25°C. Sau đó, mầm trắng được cắt bỏ và phần IE được chuyển sang môi trường phục hồi (muối N6 cơ bản; 2,4-D 2,0 mg/L; NAA 1,0 mg/L; BAP 0,2 mg/L; phytigel 6,5 g/L, pH 5,8) nuôi 10 ngày trong tối ở 25°C. Phần mô sẹo tạo thành được chuyển sang nuôi cấy trên môi trường chọn lọc (muối N6 cơ bản; 2,4-D 2,0 mg/L; NAA 1,0 mg/L; BAP 0,2 mg/L; chất kháng sinh thích hợp; phytigel 6,5 g/L, pH 5,8) ở 28°C trong điều kiện tối hoàn toàn, sau mỗi 10 ngày cấy chuyển sang đĩa môi trường mới có cùng thành phần. Phần mô sẹo sống sót (trắng, sáng) sau 3 lần cấy chuyển được nuôi cấy trên môi trường tiền tái sinh (môi trường MS có bổ sung BAP 2,0 mg/L, NAA 0,2 mg/L, nước dừa 20%, cefotaxime 100 mg/L, hygromycine 50 mg/L, phytigel 6,5 g/L, pH 5,8) 7 ngày trong tối ở 28°C, trước khi chuyển sang môi trường tái sinh (môi trường MS có bổ sung kinetin 0,2 mg/L, NAA 0,2 mg/L, nước dừa 20%, hygromycin 30 mg/L, agar 6,0 g/L, pH 5,8) nuôi ở 28°C với quang chu kỳ 16 giờ sáng/8 giờ tối tới khi xuất hiện chồi. Chồi tái sinh được tách khỏi cụm và được cấy chuyển sang bình môi trường mới cùng thành phần, nuôi tiếp đến khi chồi đạt chiều cao từ 3 – 5 cm. Khi đó, chồi được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ (môi trường MS cơ bản) và nuôi cấy ở điều kiện 28°C với quang chu kỳ 16 giờ sáng/8 giờ tối tới khi cây có

đầy đủ bộ rễ. Cây lúa con sau khi được nhấc ra khỏi bình, được rửa sạch môi trường bám ở rễ dưới vòi nước chảy, được ngâm tiếp phần rễ 5 ngày trong ống thủy tinh chứa nước. Cuối cùng, cây lúa con được trồng vào chậu nhựa chứa giá thể TN1 nuôi trong điều kiện nhà lưới.

DNA tổng số được tách chiết từ mô lá của cây tái sinh (mục 2.2) và sử dụng làm khuôn cho PCR (mục 2.3.1.8) với cặp mồi đặc hiệu Actin-F/Actin-R (Phụ lục 4) và cấu trúc T-DNA.

b) Tối ưu mật độ và thời gian đồng nuôi cây vi khuẩn *A. tumefaciens* với IE

Thí nghiệm chuyển gen được thực hiện như đã trình bày ở trên (mục 2.3.2.2a), với các yếu tố đã được tối ưu (mục 2.3.2), sử dụng lần lượt dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* có OD_{600nm} 0,1; 0,3 và 0,5 và thời gian đồng nuôi cấy lần lượt là 5 và 7 ngày. Cụ thể, IE 8 - 10 DAP sau khi lây nhiễm vi khuẩn được đồng nuôi cấy trên môi trường N6 (mục 2.3.2.2a) có bổ sung acetosyringone 100 µM; chọn lọc trên môi trường có bổ sung cefotaxime 200 mg/L, vancomycin 100 mg/L, hygromycin 50 mg/L. Số mô sẹo sống sót/phát triển sau mỗi giai đoạn và số cây tái sinh có kết quả PCR dương tính với cặp mồi HPT-F/HPT-R (Phụ lục 4) được ghi lại. Mỗi công thức thí nghiệm sử dụng 60 IE, được lặp lại 3 lần/công thức.

c) Đánh giá ảnh hưởng của tuổi phơi đến hiệu quả chuyển gen

Thí nghiệm chuyển gen sử dụng IE được thực hiện như đã trình bày ở trên (mục 2.3.2.2a), với các yếu tố đã được tối ưu (mục 2.3.2.2b, 2.3.2.2c), sử dụng lần lượt IE 8 - 10 DAP, 11-13 DAP và 14 - 16 DAP. Cụ thể, IE được lây nhiễm bằng dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* có OD_{600nm} là 0,3; đồng nuôi cấy trên môi trường N6 (mục 2.3.2.2a) có bổ sung acetosyringone 100 µM trong thời gian 5 ngày; chọn lọc trên môi trường có bổ sung cefotaxime 200 mg/L, vancomycin 100 mg/L, hygromycin 50 mg/L. Số mô sẹo sống sót/phát triển sau mỗi giai đoạn và số cây tái sinh có kết quả PCR dương tính với cặp mồi HPT-F/HPT-R (Phụ lục 4) được ghi lại. Mỗi công thức thí nghiệm sử dụng 60 IE, được lặp lại 3 lần/công thức.

d) Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ acetosyringone đến hiệu quả chuyển gen

Thí nghiệm chuyển gen được thực hiện như đã trình bày ở trên (mục 2.3.2.2a), với các yếu tố đã được tối ưu (mục 2.3.2), sử dụng acetosyringone (AS) cho bước đồng nuôi cấy với nồng độ lần lượt 0 μM , 100 μM , 150 μM và 200 μM . Cụ thể, IE 11-13 DAP được lây nhiễm bằng dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* có OD_{600nm} là 0,3; đồng nuôi cấy trên môi trường N6 (mục 2.3.2.2a) trong thời gian 5 ngày; chọn lọc trên môi trường có bổ sung cefotaxime 200 mg/L, vancomycin 100 mg/L, hygromycin 50 mg/L. Số mô sẹo sống sót/phát triển sau mỗi giai đoạn và số cây tái sinh có kết quả PCR dương tính với cặp môi HPT-F/HPT-R (Phụ lục 4) được ghi lại. Mỗi công thức thí nghiệm sử dụng 60 IE, được lặp lại 3 lần/công thức.

Hiệu suất chuyển gen của các thí nghiệm chuyển gen được tính theo công thức:

$$\text{Hiệu suất chuyển gen (\%)} = \frac{\text{Số cây mang gen chuyển}}{\text{Số IE dùng nuôi cấy}} \times 100$$

2.3.3 Đánh giá sự tương tác giữa vi khuẩn *Xoo* và *OsSWEET14* trên lúa BT7

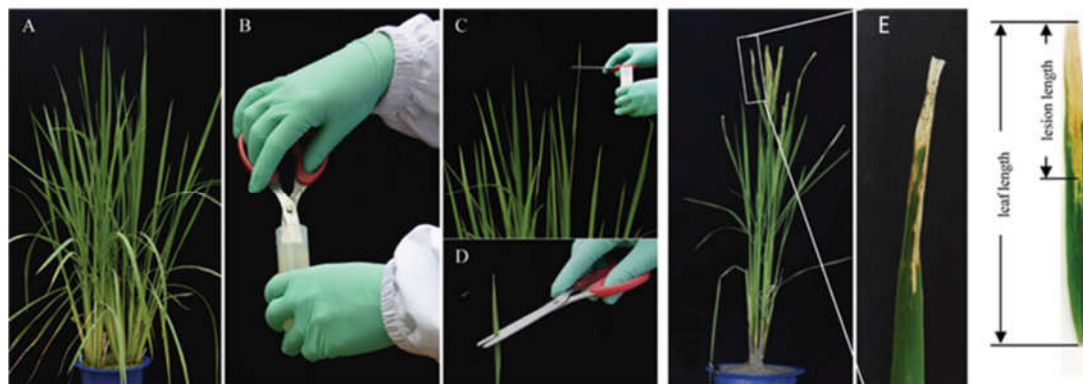
2.3.3.1. Nuôi cấy vi khuẩn *Xoo*

Mỗi chủng vi khuẩn *Xoo* (lưu trữ ở -80°C) được cấy trải trên đĩa môi trường PSA và được nuôi ở 28°C trong 3 ngày. Khuẩn lạc của mỗi chủng được kiểm tra lại bằng kỹ thuật PCR đa môi [80] (mục 2.3.1.8) như sau: một khuẩn lạc đơn được hoà tan trong 50 μL nước cất khử trùng khử ion và ủ ở 96°C trong 5 phút, sau đó được sử dụng trực tiếp làm khuôn cho PCR. Phản ứng PCR sử dụng lần lượt các cặp môi Xo3756F/Xo3756R, Xoo80F/Xoo80R và Xoc3866F/Xoc3866R (Phụ lục 4). Phản ứng được thực hiện 35 chu kỳ: biến tính DNA ở 95°C – 30 giây, gắn môi ở 55°C – 30 giây và kéo dài chuỗi ở 72°C – 30 giây. Sản phẩm PCR sau đó được điện di kiểm tra trên gel agarose theo quy trình đã trình bày (mục 2.3.1.5). Khuẩn lạc có kết quả PCR dương tính được cấy trải trên môi trường PSA đặc và tiếp tục được ủ ở 28°C trong 2 ngày.

2.3.3.2. Lây nhiễm nhân tạo vi khuẩn *Xoo* trên lúa

Sinh khối vi khuẩn *Xoo* trên bề mặt môi trường nuôi cấy được thu lại và pha loãng trong dung dịch MgCl_2 10 mM đến giá trị OD₆₀₀ đạt 0,5 cho thí nghiệm đánh

giá độc tính *Xoo*, hay trong thí nghiệm đánh giá tính kháng *Xoo* của lúa BT7 và đạt 0,4 cho thí nghiệm đánh giá biểu hiện *O_sSWEET14*.



Hình 2.2. Lây nhiễm vi khuẩn *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 hòa loãng vi khuẩn ($MgCl_2$ 10 mM); (C–D) Sử dụng kéo cắt bỏ phần đầu phiến lá lúa [76]; (E) Xác định chiều dài vết bệnh.

Thí nghiệm lây nhiễm vi khuẩn *Xoo* trên lúa được thực hiện theo phương pháp cắt lá cải tiến của Ke *et al.* (2017) [76]. Cây lúa trong giai đoạn đẻ nhánh (khoảng 45 ngày sau khi cấy) sinh trưởng trong điều kiện nhà lưới được sử dụng cho thí nghiệm lây nhiễm *Xoo*. Đầu phiến lá (3 – 4cm) của cây lúa được cắt bằng kéo đã được nhúng trong dung dịch vi khuẩn *Xoo*. Mỗi thí nghiệm lây nhiễm thực hiện trên tối thiểu 3 cây, mỗi cây cắt 3 - 5 lá.

Thí nghiệm lây nhiễm *Xoo* phục vụ phân tích biểu hiện gen được thực hiện theo mô tả trước đây của Li *et al.* (2013) [89]. Cây lúa được gieo trồng trong điều kiện nhà lưới. Lá cây lúa 4 tuần tuổi được lây nhiễm nhân tạo với vi khuẩn *Xoo* bằng kỹ thuật tiêm lá. Sau 48 giờ lây nhiễm, vùng lá được tiêm dung dịch vi khuẩn được cắt và bảo quản trong N_2 lỏng đến khi tách chiết RNA. Mỗi thí nghiệm lây nhiễm thực hiện trên 3 cây, mỗi cây tiêm 1 lá.

2.3.3.3. Đánh giá độc tính vi khuẩn *Xoo* trên giống lúa BT7

Cây lúa BT7 được lây nhiễm với các chủng *Xoo* bằng kỹ thuật cắt lá như đã mô tả ở trên (mục 2.3.3). Thí nghiệm đối chứng âm sử dụng dung dịch $MgCl_2$ 10 mM không chứa vi khuẩn *Xoo*. Giống IR24 được dùng 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 (lá thứ nhất và lá thứ hai của mỗi nhánh/cây).

2.3.3.4. Đánh giá biểu hiện gen *OsSWEET 14*

Cây lúa BT7 được lây nhiễm với các chủng *Xoo* bằng kỹ thuật tiêm lá như đã mô tả ở trên (mục 2.3.3). Thí nghiệm phân tích biểu hiện gen được thực hiện theo mô tả trước đây của Li *et al.* (2013) bằng phương pháp RT-PCR. Lá cây lúa sau khi lây nhiễm với vi khuẩn *Xoo* được sử dụng để tách chiết RNA tổng số (mục 2.3.1.2) và điện di kiểm tra trên gel agarose (mục 2.3.1.5). Một μg RNA được sử dụng cho phản ứng tổng hợp cDNA (mục 2.3.1.9). Một μL sản phẩm phản ứng tổng hợp cDNA được sử dụng trực tiếp làm khuôn cho PCR (mục 2.3.1.8) với cặp mồi SW14-qPCR-F/ SW14-qPCR-R (Phụ lục 4). Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose (mục 2.3.1.5) và phân tích bằng phần mềm ImageJ v1.48. Thí nghiệm đối chứng âm sử dụng dung dịch MgCl_2 10 mM không chứa vi khuẩn *Xoo*. *OsEF1 α* được sử dụng làm gen nội chuẩn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.3.3.5. Nhân dòng promoter *OsSWEET14* của lúa BT7

Cây lúa BT7 3 tuần tuổi được cắt lá để tách chiết DNA tổng số (mục 2.2) *SW14-BT* được phân lập bằng kỹ thuật PCR (mục 2.3.1.8) với cặp mồi SW14-F/SW14-R (Phụ lục 4) từ DNA tổng số của lúa. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose (mục 2.3.1.5) và tinh sạch (mục 2.3.1.6) để phục vụ bước thí nghiệm tiếp theo.

Sản phẩm PCR tinh sạch được nhân dòng bằng bộ kit *pGEM-T Easy* theo quy trình đi kèm của hãng Promega (Hoa Kỳ). Sản phẩm ghép nối DNA được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α (mục 2.3.1.10); thể biến nạp được sàng lọc bằng phương pháp PCR trực tiếp khuẩn lạc (mục 2.3.1.8) với cặp mồi T7/SP6 (Phụ lục 4, Phụ lục 5). Plasmid được tách chiết từ khuẩn lạc dương tính (mục 2.3.1.3) và được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR (mục 2.3.1.8) với 3 cặp mồi SW14-F/SW14-R, SW14-t-F/SW14-t-R, T7/SP6 và bằng enzyme cắt giới hạn *NdeI*, *NdeI/BglII*, *EcoRI* (mục 2.3.1.11).



Hình 2.3. Sơ đồ vector pGEM/OsSWEET14

Ghi chú: Mũi tên (→) thể hiện vị trí của các mồi; đường kẻ (---) thể hiện đoạn DNA được nhân bản và kích thước (bp).

Trình tự DNA được xác định bằng thiết bị giải trình tự nucleotide tự động ABI3100 theo phương pháp của Smith *et al.* (1986) bởi công ty Macrogen (Hàn Quốc), sử dụng lần lượt hai mồi T7 và SP6 (Phụ lục 4, Phụ lục 5) cho PCR giải trình tự. Kết quả giải trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit 4.0 và so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank.

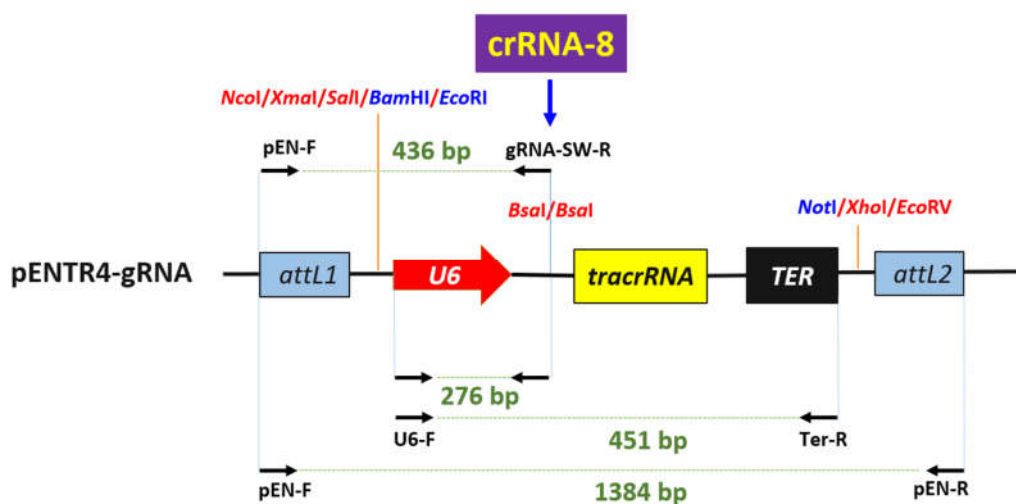
2.3.4 Thiết kế cấu trúc T-DNA chỉnh sửa SW14-BT

2.3.4.1. Thiết kế trình tự sgRNA định hướng SW14-BT

Trình tự sgRNA nhận biết đặc hiệu vị trí EBE *AvrXa7*, *PthXo3* và *Tal5* trên *SW14-BT* được xác định bằng phần mềm CRISPR-P v2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>). Hàm lượng GC của các crRNA được phân tích bằng phần mềm Genetyx 4.0. Cấu trúc bậc II của các sgRNA được phân tích bằng phần mềm Mfold 2.3 (<http://www.unafold.org/>) và CRISPR-P v2.0. Tính đặc hiệu của các trình tự crRNA (on/off-target) của phức hệ Cas9/sgRNA được phân tích bằng phần mềm CRISPR-P v2.0. Các trình tự DNA trong hệ gen lúa tương đồng với crRNA đã thiết kế được xác định bằng phần mềm CCTop (<https://cctop.cos.uni-heidelberg.de:8043/>). Trình tự hệ gen lúa được tham chiếu từ cơ sở dữ liệu trên ngân hàng gen Ensembl Plants. sgRNA đặc hiệu được lựa chọn dựa trên hàm lượng GC trong vùng crRNA, khả năng hình thành và duy trì cấu trúc bậc II, số lượng, vị trí và đặc điểm trình tự nucleotide của đoạn DNA tương đồng với crRNA xuất hiện trong hệ gen lúa tham chiếu [91].

2.3.4.2. Thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA nhận biết đặc hiệu SW-BT

Hai đoạn oligonucleotide gRNA-SW14-F và gRNA-SW14-R (Phụ lục 4) được liên kết với nhau bằng phản ứng biến tính/phục hồi DNA. Hỗn hợp phản ứng gồm 4,0 μL trình tự xuôi 10 pmoL/ μL và 4,0 μL trình tự ngược 10 pmoL/ μL ; hỗn hợp được ủ trong bể ổn nhiệt ở 95°C trong 5 phút và được tiếp tục giữ đến khi nước nguội về nhiệt độ phòng để tạo đoạn crRNA sợi đôi hoàn chỉnh (gọi tắt là gRNA-SW14). Đoạn DNA gRNA-SW14 được gắn nhóm PO_4^- bằng enzyme PNK. Hỗn hợp phản ứng bao gồm: 8,0 μL DNA; 1,5 μL đệm T4 PNK 10 X; 1,0 μL ATP 10 mM; 3,5 μL nước cất khử ion; 1,0 μL enzyme T4 PNK. Ống hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 30 phút. Sản phẩm phản ứng được sử dụng trực tiếp cho thí nghiệm ghép nối DNA tiếp theo.



Hình 2.4. Sơ đồ thiết kế vector pENTR4/gRNA-SW14

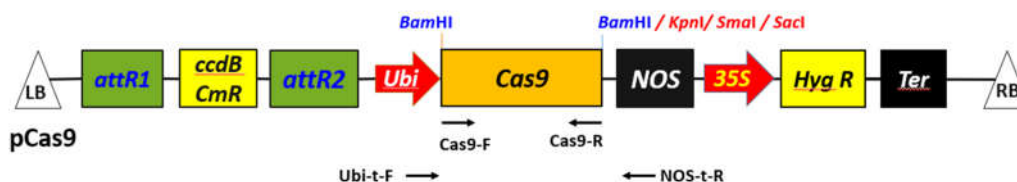
Ghi chú: crRNA-8 được ghép nối vào vị trí BsaI trên pENTR4-gRNA. (attR1, attR2) Vị trí nhận biết của clonase LR; (U6) promoter U6; (TER) vùng kết thúc phiên mã. Mũi tên (\rightarrow) thể hiện vị trí của các môi; đường kẻ (----) thể hiện đoạn DNA được nhân bản và kích thước (bp).

Đoạn DNA gRNA-SW14 được chèn vào vị trí BsaI nằm giữa trình tự promoter U6 và tracrRNA trên vector pENTR4-gRNA (Hình 2.5). Vector pENTR4-gRNA được xử lý với enzyme BsaI (mục 2.3.1.11). Sản phẩm cắt giới hạn được điện di trên gel agarose (mục 2.3.1.5); băng DNA 3,2 kb được tinh sạch từ gel agarose (mục 2.3.1.6) và ghép nối với gRNA-SW14 (đã gắn nhóm PO_4^-) ở trên

bằng T4 DNA ligase (mục 2.3.1.11). Sản phẩm ghép nối DNA được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α (mục 2.3.1.10); thể biến nạp được sàng lọc bằng phương pháp PCR trực tiếp khuẩn lạc (mục 2.3.1.8) với cặp mồi pEN-F/gRNA-SW14-R (Phụ lục 4, Hình 2.4). Plasmid được tách chiết từ khuẩn lạc dương tính (mục 2.3.1.3) và được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR (mục 2.3.1.8) với 2 cặp mồi pEN-F/pEN-R (1,4 kb) và U6-F/gRNA-SW14-R (276 bp). Vector tái tổ hợp (gọi tắt là pENTR4/gRNA-SW14) được giải trình tự Nu (mục 2.3.1.12) lần lượt bằng mồi pEN-F và pEN-R bởi công ty Marcorgen.

2.3.4.3. Thiết kế cấu trúc T-DNA chỉnh sửa SW-BT

Cấu trúc biểu hiện sgRNA nhận biết đặc hiệu *SW-BT* (gọi tắt là *[U6:gRNA-SW14]*) dài 451 bp trên vector pENTR4/gRNA-SW14 được ghép nối vào vector nhị phân pCas9 bằng bộ kit Gateway Cloning (Invitrogen) (Hình 2.5).



Hình 2.5. Sơ đồ vector pCas9

Ghi chú: (LB) Biên trái; (RB) biên phải; (*ccdB*) gen chọn lọc gây độc tế bào; (*CmR*) gen chọn lọc kháng chloramfenicol; (*attR1*, *attR2*) vị trí nhận biết của clonase LR; (*Ubi*) promoter Ubiquitin; (*35S*) promoter 35S; (*Hyg R*) gen chọn lọc HPT kháng hygromycin; (*Ter*) vùng kết thúc phiên mã; (*NOS*) vùng kết thúc phiên mã Nopaline synthase. Mũi tên (\rightarrow) thể hiện vị trí của các mồi.

Một trăm nanogram vector pCas9 và 150 ng vector pENTR4/gRNA-SW14 được trộn đều với 7 μ L đệm TE và 0,5 μ L LR clonase; hỗn hợp được ủ ở 25 $^{\circ}$ C trong một giờ, sau đó được bổ sung thêm 0,5 μ L Proteinase K và ủ ở 37 $^{\circ}$ C trong 10 phút. Sản phẩm phản ứng tái tổ hợp DNA được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α (mục 2.3.1.10); thể biến nạp được sàng lọc bằng phương pháp PCR trực tiếp khuẩn lạc (mục 2.3.1.8) với cặp mồi U6-F/gRNA-SW14-R (Phụ lục 4). Plasmid được tách chiết từ khuẩn lạc dương tính (mục 2.3.1.3) và được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR (mục 2.3.1.8) với cặp mồi Ubi-t-F/NOS-R (4,3 kb); Cas9-F/Cas9-R (4,1 kb), U6-F/Ter-R (451 bp), U6-F/gRNA-SW14-R (276 bp). Vector tái tổ hợp (gọi

tất là pCas9/gRNA-SW14) được giải trình tự Nu (mục 2.3.1.12) bằng môi Ubi-t-R bởi công ty Marcorgen.

2.3.5 Tạo dòng lúa BT7 chỉnh sửa SW14-BT

2.3.5.1. Tạo chủng *A. tumefaciens* mang vector pCas9/gRNA-SW14

Vector pCas9/gRNA-SW14 được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 bằng phương pháp sốc nhiệt (mục 2.3.1.10b). Thể biến nạp được sàng lọc bằng PCR trực tiếp khuẩn lạc (mục 2.3.1.8), sử dụng cặp môi U6-F/Ter-R (Phụ lục 4, Hình 2.4). Khuẩn lạc mang pCas9/gRNA-SW14 được nuôi cấy và bảo quản ở -80°C để sử dụng cho các nghiên cứu chuyển gen tiếp theo.

2.3.5.2. Chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa SW14-BT vào giống lúa BT7

Chuẩn bị nguyên liệu thực vật và nguyên liệu vi khuẩn (Khuẩn lạc dương tính được bảo quản ở -80°C ở trên) sử dụng cho thí nghiệm chuyển gen vào lúa BT7 theo quy trình chuyển gen IE (mục 2.3.2.2a) với các điều kiện nuôi cấy và thành phần môi trường đã tối ưu (mục 2.3.2.2b-d; Phụ lục 3). Số mẫu sống sót/phát triển sau mỗi giai đoạn chuyển gen được ghi lại. Thí nghiệm chuyển gen được thực hiện với 3 lô, mỗi lô sử dụng 300 IE. Các cây lúa tái sinh có bộ rễ hoàn chỉnh được huấn luyện thích nghi theo kỹ thuật mô tả ở mục 2.3.2a) được trồng trong điều kiện nhà lưới để tiếp tục sử dụng cho thí nghiệm phân tích kiểu gen.

2.3.5.3. Sàng lọc dòng lúa BT7 chỉnh sửa SW14-BT thế hệ T₀

a) Xác định kiểu gen của các dòng lúa BT7 tái sinh thế hệ T₀

Cây lúa BT7 tái sinh sinh trưởng bình thường trong điều kiện nhà lưới được tách chiết DNA tổng số (mục 2.2). Mẫu DNA được sử dụng cho PCR (mục 2.3.1.8) với chu trình nhiệt (94°C – 30 giây, 56°C – 30 giây, 72°C - 30 giây) x 35 chu kỳ, sử dụng các cặp môi Actin-F/Actin-R, HPT-F/HPT-R, Cas9-F/Cas9-t-R và Ubi-F/gRNA-SW14-R (Phụ lục 4, Hình 2.4). Số bản sao của gen chuyển được xác định bằng Realtime PCR theo phương pháp của Zhang *et al.* (2003). Phản ứng qPCR được thực hiện với chu trình nhiệt (94°C – 15 giây, 60°C – 30 giây, 72°C - 30 giây) x 40 chu kỳ, sử dụng cặp môi HPT-F/HPT-R với tham chiếu là dòng lúa chuyển gen *OsDREB1A* mang một bản sao cấu trúc T-DNA. Các cây lúa tái sinh có kết

quả PCR dương tính với cả 4 cặp mồi và có một bản sao của T-DNA được sử dụng cho phân tích tiếp theo.

Đột biến trên *SW14-BT* của các dòng lúa chuyển gen được xác định bằng T7 endonuclease I [162]. Một phần *SW14-BT* (711 bp) của các dòng lúa chuyển gen và không chuyển gen được nhân bản bằng PCR (mục 2.3.1.8) với cặp mồi SW14-t-F/SW14-t-R (Phụ lục 4). Sản phẩm PCR từ cây lúa chuyển gen và cây lúa không chuyển gen được điện di trên gel agarose (mục 2.3.1.5) và tinh sạch (mục 2.3.1.6). Sản phẩm PCR tinh sạch từ cây lúa BT7 không chuyển gen được lần lượt trộn lẫn với sản phẩm PCR tinh sạch từ các dòng lúa chuyển gen theo tỉ lệ 1:1. Hỗn hợp được xử lý với T7 endonuclease I (T7E1) ở 37°C trong 30 phút; sản phẩm cắt giới hạn được điện di kiểm tra trên gel agarose (mục 2.3.1.5). Các cây lúa mang đột biến sẽ cho kết quả PCR dương tính, với sự xuất hiện của 3 băng ở kích thước mong đợi là (711 bp, 410 bp và 301 bp), được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Sử dụng đối chứng (+) là sản phẩm PCR của vector pCas9/gRNA-SW14 với cặp mồi SW14-t-F/SW14-t-R (711 bp) trộn với sản phẩm PCR của vector pENTR4/gRNA-SW14 với cặp mồi U6-F/Ter-R (451 pb); Đối chứng (-) là sản phẩm PCR của pCas9/gRNA-SW14 với cặp mồi SW14-t-F/SW14-t-R (711 bp).

Sản phẩm PCR (711 bp) tinh sạch từ các dòng lúa BT7 mang đột biến trên *SW14-BT* được giải trình tự Nu (mục 2.3.1.12) bằng hai mồi SW14-t-F và SW14-t-R. Kết quả giải trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit 4.0 được phân tích bằng phần mềm CRISPR ID v1.1.

b) Đánh giá kiểu hình các dòng lúa chỉnh sửa gen thế hệ T₀

Các dòng lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT* được trồng trong chậu (đường kính 20 cm) trong điều kiện nhà lưới (nhiệt độ trung bình 28°C, độ ẩm 70%, ánh sáng tự nhiên) và đánh giá sinh trưởng thông qua các chỉ tiêu: số nhánh/khóm, chiều cao cây và số hạt chắc theo Hệ thống đánh giá chuẩn cho lúa (IRRI, 2013). Cây lúa BT7 tái sinh không chuyển gen T-DNA và cây lúa BT7 trồng từ hạt nguyên bản được sử dụng làm đối chứng. Hạt từ các dòng lúa chỉnh sửa *SW14-BT* được thu lại và bảo quản ở 4°C (thế hệ T₁).

2.3.5.4. Sàng lọc dòng lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT* thế hệ T_1

a) Xác định kiểu gen dòng lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT* thế hệ T_1

Hạt lúa T_1 được rửa bằng nước và khử trùng bằng Javen 2% trong 20 phút và rửa lại bằng nước cất, sau đó được ngâm trong nước và ủ ở 37°C trong 3 ngày. Hạt nảy mầm được trồng trên khay đất trong điều kiện nhà lưới. Lá cây con (14 ngày tuổi) được sử dụng để tách chiết DNA tổng số (mục 2.2) và kiểm tra bằng PCR như đã mô tả ở trên (mục 2.3.5.3a). Các dòng lúa có kết quả PCR dương tính với cặp mồi Actin-F/Actin-R và âm tính với cả ba cặp mồi HPT-F/HPT-R, Cas9-F/Cas9-t-R và U6-F/gRNA-SW-R được lựa chọn cho thí nghiệm tiếp theo.

Một phần *SW14-BT* (711 bp) được nhân bản bằng PCR từ các dòng lúa BT7 T_1 và giải trình tự Nu để xác định đột biến tương tự như ở đã thực hiện thế hệ T_0 (mục 2.3.5.3a).

Sự phân ly kiểu gen (cấu trúc T-DNA và đột biến trên *SW14-BT*) trong các dòng lúa BT7 được phân tích bằng kiểm định χ^2 . Trong đó, kiểm định χ^2 được đánh giá với tỷ lệ phân ly mong đợi là 3:1 của Số dòng có kết quả PCR dương tính : Số dòng có kết quả âm tính với 3 cặp mồi đặc hiệu với gen *HPT*, *sgRNA*, và *Cas9* để phân tích sự phân ly của cấu trúc T-DNA; và kiểm định χ^2 được đánh giá với tỷ lệ phân ly mong đợi là 1:2: 1 của tỷ lệ giữa Số cây T_1 kiểu gen 1: Số cây T_1 kiểu gen 2: Số cây T_1 kiểu gen 3 từ cùng một dòng cây T_0 để phân tích sự phân ly của đột biến trên *SW14-BT*.

b) Đánh giá kiểu hình các dòng lúa chỉnh sửa gen thế hệ T_1

Các dòng lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT* T_1 được trồng trong điều kiện nhà lưới để đánh giá sinh trưởng theo Hệ thống đánh giá chuẩn cho lúa (IRRI, 2013) thông qua các chỉ tiêu: số nhánh/khóm, chiều cao cây và số hạt chắc (mục 2.3.5.3b). Cây lúa BT7 trồng từ hạt nguyên bản được sử dụng làm đối chứng. Hạt của các dòng lúa BT7 không chứa cấu trúc T-DNA và mang đột biến *SW14-BT* ở dạng đồng hợp được thu lại và bảo quản ở 4°C cho thí nghiệm tiếp theo (thế hệ T_2).

2.3.6 Đánh giá đặc điểm nông học và tính kháng bệnh bạc lá của dòng lúa BT7 chỉnh sửa SW14-BT

2.3.6.1. Đánh giá đặc điểm nông học của các dòng lúa BT7 chỉnh sửa SW14-BT T₂

Hạt của các dòng lúa BT7 đột biến *SW14-BT* (thế hệ T₁) được cho nảy mầm và gieo trồng trong điều kiện nhà lưới như mục 2.3.5.4a. Năm cây từ mỗi dòng lúa được chọn ngẫu nhiên để đánh giá các chỉ tiêu nông học, bao gồm thời gian sinh trưởng, chiều cao, số nhánh, số hạt chắc/bông, năng suất cá thể và hàm lượng amylose theo Hệ thống đánh giá chuẩn cho lúa (IRRI, 2013). Hàm lượng amylose trong hạt được đánh giá theo phương pháp của Juliano *et al.* (1971) [72]. Cụ thể, hạt lúa được bóc vỏ, làm trắng, nghiền nhỏ. Một trăm mg bột được bổ sung thêm 1,0 mL ethanol 95% và 9 mL NaOH 1,0 N. Hỗn hợp được đun sôi ở 100°C trong 10 phút và bổ sung thêm nước cất đến thể tích 100 mL. Năm mL dung dịch được trộn đều với 1,0 mL CH₃COOH 1 N và 2 mL dung dịch i-ốt. Nước cất được bổ sung vào hỗn hợp đến tổng thể tích 100 mL; hỗn hợp được ủ ở 30°C trong 20 phút và đo OD_{620nm} trên máy đo quang phổ và đối chiếu giá trị với bảng qui đổi để xác định ra hàm lượng amylose.

2.3.6.2. Nghiên cứu biểu hiện của *OsSWEET14* trong các dòng lúa BT7 chỉnh sửa SW14-BT T₂

Các cây lúa BT7 đột biến *SW14-BT* được lấy nhiễm lần lượt với 3 chủng VXO_11, VXO_60 và VXO_96 bằng phương pháp tiêm lá và phân tích biểu hiện *OsSWEET14* theo mô tả ở trên (mục 2.3.3.4 và 2.3.3). Ba cây lúa từ mỗi dòng được lựa chọn ngẫu nhiên cho thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo. Cây lúa BT7 trồng từ hạt nguyên bản (không chỉnh sửa gen) được sử dụng làm đối chứng âm. Thí nghiệm RT-PCR được lặp lại 3 lần trên mỗi cây.

2.3.6.3. Đánh giá khả năng kháng bệnh bạc lá của dòng lúa BT7 chỉnh sửa SW14-BT T₂

Các cây lúa BT7 đột biến *SW14-BT* được lấy nhiễm lần lượt với 3 chủng VXO_11, VXO_60 và VXO_96 bằng phương pháp cắt lá và phân tích biểu hiện *OsSWEET14* theo mô tả ở trên (mục 2.3.3 và 2.3.3.3). Cây lúa BT7 không chỉnh

sửa gen được sử dụng làm đối chứng. Khả năng kháng bạc lá được đánh giá theo thang điểm của Mishra (2013) [102] trong điều kiện nhà lưới (Bảng 2.1).

Bảng 2.1 Thang điểm đánh giá tính kháng bệnh bạc lá

Chiều dài vết bệnh (cm)	Mô tả
0 – 5	R – Kháng
5 – 10	MR – Kháng nhẹ
>10	S – Mẫn cảm

2.4 Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và phân tích phương sai một nhân tố (One-way ANOVA). Các giá trị trung bình của các công thức trong cùng thí nghiệm được so sánh sự sai khác theo kiểm định Duncan's multi range test ($\alpha = 0,05$). Bảng số liệu trình bày giá trị Mean (SD-Standard deviation) của mỗi công thức trong từng thí nghiệm. Phân tích kiểu gen Phân ly kiểu gen được thực hiện phân tích mô tả bằng kiểm định χ^2 (Crosstabs). Số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS 20.

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1 Nghiên cứu xây dựng quy trình chuyển gen vào IE giống lúa BT7

Một quy trình chuyển gen hiệu quả (thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*) là điều kiện tiên quyết để ứng dụng được công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 trên cây lúa. Do bản chất di truyền và đặc điểm riêng của từng giống, quá trình nuôi cấy *in vitro* của mỗi giống lúa sẽ có những đặc thù khác nhau, đặc biệt đối với các giống lúa *indica* như BT7. Mặc dù quy trình chuyển gen vào IE lúa thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* của Hiei (2008) đã được áp dụng thành công ở một vài giống lúa *indica* [57] nhưng hiệu quả khi áp dụng trên giống BT7 lại rất thấp (số liệu không trình bày). Bên cạnh đó, quy trình chuyển gen vào lúa BT7 sử dụng phôi trưởng thành của Cao Lê Quyên và cộng sự (2019) đạt hiệu suất khá cao [16] nhưng do khó kiểm soát được sự đồng nhất của vật liệu ban đầu (hạt lúa/phôi trưởng thành) nên cũng có một vài khó khăn nhất định khi áp dụng. Vì vậy, để tạo điều kiện thuận lợi cho việc ứng dụng công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 trên giống lúa BT7, nghiên cứu tối ưu quy trình chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* vào giống lúa BT7 sử dụng IE từ hạt non giống lúa BT7 đã được thực hiện dựa trên nền quy trình chuyển gen vào các giống lúa *indica* của Hiei (2008) [57] và quy trình chuyển gen IE vào giống lúa IR64 của Slamet (2014) [124].

3.1.1 Tối ưu hệ thống tái sinh *in vitro* từ IE cho giống lúa BT7

Hệ thống tái sinh *in vitro* tối ưu là một trong những điều kiện quan trọng để chuyển gen thành công ở thực vật [4]. IE của các giống lúa khác nhau có đặc điểm (kích thước, sức sống, khả năng hình thành mô sẹo) khác nhau. Vì vậy, trên cơ sở các quy trình đã công bố trước đây [16, 57, 124], một số yếu tố quan trọng của quy trình nuôi cấy IE *in vitro*, bao gồm thời gian khử trùng hạt lúa non, chế độ ánh sáng và thành phần chất điều hòa sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy, đã được khảo sát nhằm xác định những điều kiện nuôi cấy phù hợp nhất cho giống lúa BT7.

3.1.1.1. Đánh giá ảnh hưởng của thời gian xử lý NaOCl đến khả năng sống sót của IE giống lúa BT7

Để đánh giá ảnh hưởng của thời gian khử trùng mẫu bằng NaOCl 1,0% đối với sự phát triển của IE, hạt non lúa BT7 ở giai đoạn 8 – 10 ngày sau thụ phấn được khảo sát với các khoảng thời gian xử lý khác nhau. Tỷ lệ IE sống sót (phát triển bình thường, không bị nhiễm vi sinh vật), chết và nhiễm vi sinh vật được xác định sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng.

Bảng 3.1 Hiệu quả khử trùng NaOCl 1,0% đối với hạt non giống lúa BT7

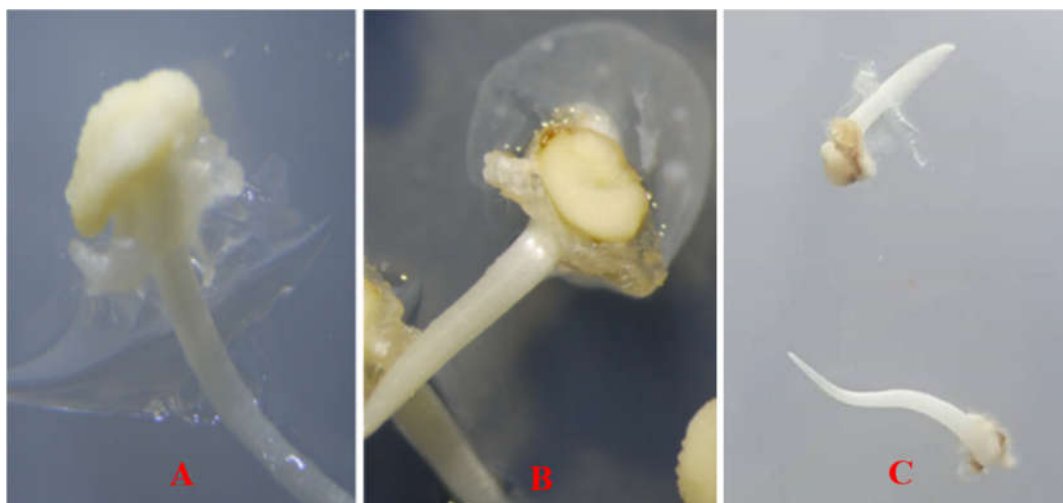
Chỉ tiêu theo dõi	Thời gian xử lý (phút)			
	3	5	8	10
Tỷ lệ IE sống sót (%)	70,0(8,7) ^{ab}	85,0(5,0) ^a	63,3(2,9) ^c	40,0(13,2) ^d
Tỷ lệ IE chết (%)	3,3(2,9) ^c	3,3(2,9) ^c	28,3(5,8) ^b	55,0(13,2) ^a
Tỷ lệ IE nhiễm (%)	26,7(11,5) ^a	11,7(5,8) ^b	8,3(7,6) ^b	5,0(5,0) ^b

Ghi chú: Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm; giá trị trong ngoặc thể hiện độ lệch chuẩn. Các chữ cái khác nhau trong cùng hàng thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ($\alpha=0,05$).

Kết quả ở Bảng 3.1 cho thấy công thức thời gian xử lý 5 phút cho tỷ lệ IE sống sót cao nhất (85%) và sai khác có ý nghĩa với các công thức còn lại trong thí nghiệm. Theo kết quả phân hạng Duncan's test, tỷ lệ nhiễm nấm/vi khuẩn của các IE chỉ phân thành 2 hạng. Tỷ lệ nhiễm nặng nhất ở công thức thời gian xử lý 3 phút, trung bình 26,67% mẫu bị nhiễm vi sinh vật (nấm trắng và vi khuẩn hồng). Mặc dù, việc tăng thời gian xử lý NaOCl 1% giúp giảm đáng kể tỷ lệ IE nhiễm vi sinh vật, tuy nhiên tỷ lệ mẫu chết cũng tăng rõ rệt. IE bị đen và nảy mầm kém đi khi xử lý NaOCl 1% với thời gian trên 8 phút. Hơn 50% IE đã chết ở khi xử lý hạt non BT7 với NaOCl 1% trong thời gian 10 phút.

NaOCl là chất khử trùng mẫu khá phổ biến trong nuôi cấy *in vitro* thực vật. Tuy nhiên, mỗi loài thực vật khác nhau, vật liệu nuôi cấy khác nhau thích hợp với mức nồng độ NaOCl xử lý khác nhau. Trong thí nghiệm này, tỷ lệ IE chết khá cao khi tăng thời gian xử lý NaOCl 1% đối với hạt lúa non giống BT7. Điều này cho thấy IE giống BT7 khá mẫn cảm với các tác động bên ngoài, đặc biệt là chất

khử trùng NaOCl 1%. Tuy nhiên, ngoài ảnh hưởng bởi thời gian xử lý khử trùng, khả năng sống sót và phát triển của IE trong thí nghiệm này cũng có thể bị ảnh hưởng các tác động cơ học trong quá trình thao tác với IE. Vì vậy, trình độ kỹ thuật của người làm thí nghiệm cũng là một yếu tố cần lưu ý khi thực hiện nuôi cấy *in vitro* IE lúa BT7.



Hình 3.1 Sự phát triển của IE BT7 sau khi khử trùng bằng NaOCl 1%

Ghi chú: IE của giống lúa BT7 sau 7 ngày nuôi cấy *in vitro* trên môi trường N6. (A) Phôi non sống, (B) Phôi non bị nhiễm; (C) Phôi non chết sau khi được xử lý NaOCl 1%.

Tóm lại, kết quả khảo sát trong thí nghiệm này cho thấy 5 phút là khoảng thời gian thích hợp nhất để xử lý hạt non (thu vào thời điểm 8-10 ngày sau thụ phấn) giống BT7 bằng NaOCl 1%, cho tỉ lệ IE sống cao nhất, đạt 85% (Hình 3.1).

3.1.1.2. Đánh giá ảnh hưởng của ánh sáng đến mô sẹo phát sinh từ IE của giống lúa BT7

Để đánh giá ảnh hưởng của ánh sáng đối với khả năng hình thành mô sẹo từ IE của lúa BT7, IE đã được nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo theo 2 điều kiện: (1) nuôi cấy trong tối hoàn toàn và (2) nuôi cấy dưới ánh sáng gián đoạn ở phòng nuôi. Kết quả quan sát sau 30 ngày nuôi cấy (Hình 3.2), tỉ lệ mô sẹo tăng sinh ở mẫu cấy nuôi trong tối đạt 86,7%, cao hơn rõ rệt so với mẫu cấy nuôi dưới gián đoạn (65%) (Bảng 3.3).

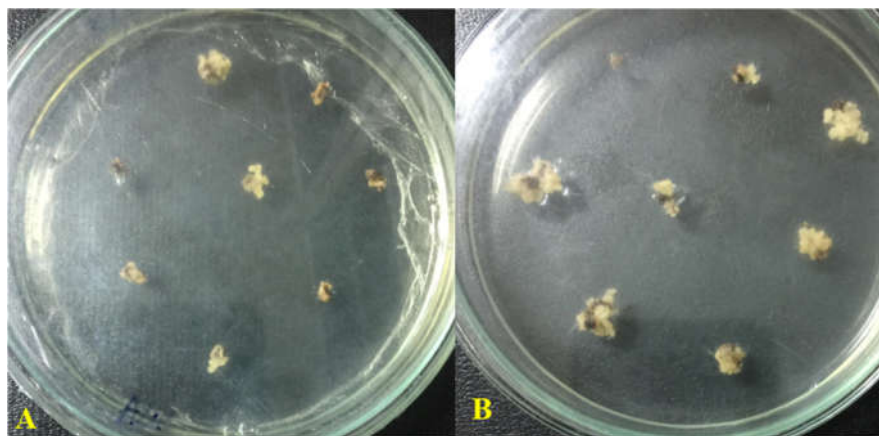
Bảng 3.2 Ảnh hưởng của ánh sáng đến tỉ lệ tăng sinh của mô sẹo

Chỉ tiêu theo dõi	Nuôi cấy mô sẹo phát sinh từ IE	
	Ngoài sáng	Trong tối
Tỉ lệ mô sẹo tăng sinh (%)	65,0(5,0) ^b	86,7(2,9) ^a

Ghi chú: Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm; giá trị trong ngoặc thể hiện độ lệch chuẩn. Các chữ cái khác nhau trong cùng hàng thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ($\alpha=0,05$).

Như vậy, sau bước tiền nuôi cấy IE (7 ngày) trong điều kiện tối hoàn toàn, mẫu tiếp tục được nuôi cấy ở trong tối đã cho thấy khả năng tăng sinh mạnh hơn đáng kể so với mẫu được chuyển ra nuôi ngoài sáng (Hình 3.2). Điều này chứng tỏ ánh sáng có tác động tiêu cực đến khả năng tạo và tăng sinh của mô sẹo.

Trong các quy trình nuôi cấy IE của một số giống lúa *indica* đã công bố trước đây, mẫu IE được chuyển ra nuôi cấy ở điều kiện ánh sáng 5000 lux để tạo mô sẹo (sau 7 ngày đầu tiên đồng nuôi cấy IE với khuẩn trong điều kiện tối) [57, 124]. Tuy nhiên, kết quả khảo sát trong nghiên cứu này đã cho thấy việc nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn giúp IE của giống lúa BT7 tạo mô sẹo tốt hơn so với khi nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng. Đây là điểm khác biệt đáng kể so với các quy trình đã công bố của các tác giả khác.

**Hình 3.2 Tạo mô sẹo từ IE giống lúa BT7**

Ghi chú: Mô sẹo tạo thành từ IE giống lúa BT7 sau 30 ngày nuôi cấy ở các điều kiện ánh sáng khác nhau. (A) IE được nuôi cấy dưới ánh sáng 3000 lux; (B) IE được nuôi cấy trong tối hoàn toàn.

Tiếp theo, để đánh giá rõ hơn tác động của ánh sáng đến chất lượng mô sẹo tạo thành từ IE giống lúa BT7, mẫu mô sẹo thu được từ hai công thức thí nghiệm (nuôi cấy trong tối và nuôi cấy dưới ánh sáng 3000 lux) được chuyển sang môi trường tái sinh và cùng nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng 16h/ngày. Kết quả cho thấy tỉ lệ mô sẹo tái sinh chồi sau 30 ngày nuôi cấy của mẫu cấy nuôi trong tối đạt 75% với tỉ lệ 2,9 chồi/mô sẹo. Đối với mẫu mô sẹo nuôi cấy dưới ánh sáng, tỉ lệ mô sẹo tái sinh thu được thấp hơn (61,7% so với 75%), nhưng có tỉ lệ chồi tái sinh/mô sẹo cao hơn (3,6 so với 2,9) (Bảng 3.3).

Bảng 3.3 Ảnh hưởng của ánh sáng đến chất lượng mô sẹo

Chỉ tiêu theo dõi	Nuôi cấy mô sẹo phát sinh từ IE	
	Ngoài sáng	Trong tối
Tỉ lệ mô sẹo tạo chồi* (%)	61,7(2,9) ^b	75,0(5,0) ^a
Số chồi/mô sẹo	3,6 (0,4) ^a	2,9 (0,1) ^b

Ghi chú: Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm; giá trị trong ngoặc thể hiện độ lệch chuẩn. Các chữ cái khác nhau trong cùng hàng thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ($\alpha=0,05$). *Tỉ lệ mô sẹo tạo chồi = (Số mô sẹo phát sinh chồi/ số mô sẹo tăng sinh thu được) x 100%.

Kết quả thu được cho thấy, rõ ràng việc nuôi cấy mô sẹo của IE giống BT7 hoàn toàn trong tối hiệu quả hơn so với việc chuyển nuôi cấy mô sẹo ra nuôi cấy dưới ánh sáng gián đoạn 3000 lux. Nhiều kết quả nghiên cứu trước đây đã cho thấy nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn là điều kiện bắt buộc để tạo mô sẹo đối với hầu hết các đối tượng thực vật một lá mầm như lúa mạch [56], lúa mì [63], ngô [105], cũng như cho giai đoạn chọn lọc mô sẹo ở lúa khi thực hiện chuyển gen [4, 15]. Tuy nhiên, theo quy trình của Slamet *et al.* (2014) và Hiei (2008), chỉ giai đoạn đồng nuôi cấy IE với *A. tumefaciens* (tạo mô sẹo) được thực hiện trong tối; sau 7 ngày đồng nuôi cấy, mô sẹo tạo thành từ IE được chuyển nuôi cấy ở điều kiện chiếu sáng tương ứng của 2 quy trình là 3000 lux và 5000 lux để nuôi cấy phục hồi và chọn lọc mô sẹo mang gen kháng (tổng thời gian là 40 ngày) [57, 124]. Ở một số đối tượng cây trồng khác, tỉ lệ mẫu cảm ứng tạo mô sẹo, tỉ lệ chồi tái sinh và số chồi/mô sẹo của mẫu cấy thu được khi nuôi cấy mẫu trong điều kiện chiếu ánh sáng trắng cũng đều vượt trội (gấp từ 1 – 2 lần) hơn so với nuôi cấy

trong tối [122]. Kết quả thu được của chúng tôi trong nghiên cứu này lại cho thấy nuôi cấy IE giống lúa BT7 trong điều kiện tối thích hợp hơn so với trong điều kiện chiếu sáng. Điều này có thể giải thích rằng hàm lượng hormone ABA nội sinh của giống lúa BT7 đã tăng sinh hoặc phát huy tác dụng khi mẫu cấy được nuôi dưới ánh sáng gián đoạn, gây hạn chế sự cảm ứng và tăng trưởng của mô sẹo [113].

Từ kết quả thu được của thí nghiệm, chúng tôi kết luận để IE giống lúa BT7 cảm ứng tạo mô sẹo và tăng sinh tốt, nuôi cấy trong tối thích hợp hơn so với nuôi cấy dưới ánh sáng gián đoạn. Như vậy, đây là một cải tiến kỹ thuật quan trọng cho quy trình nuôi cấy IE lúa BT7 so với quy trình chuyển gen vào IE lúa *indica* trước đây.

3.1.1.3. *Đánh giá ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo tạo thành từ IE của giống lúa BT7*

Để tối ưu thành phần môi trường (hormone kết hợp với nước dừa) phục vụ nuôi cấy tái sinh chồi từ mô sẹo tạo thành từ IE của giống BT7, bốn công thức (RW1-RW4) đã được lần lượt khảo sát. Kết quả thu được cho thấy, tỉ lệ mô sẹo tái sinh chồi ở tất cả các công thức đều đạt trên 60% (Bảng 3.4). Điều này cho thấy, việc sử dụng môi trường có tỉ lệ cytokinine ngoại sinh/auxin ngoại sinh > 1,0 đảm bảo tính hiệu quả để tái sinh chồi từ mô sẹo đối với giống lúa BT7. Tuy nhiên, số mô sẹo tái sinh chồi và số chồi/mô sẹo tăng lên đáng kể khi tỉ lệ giữa 2 loại hormone này giảm xuống (RW1 so với RW2; RW3 so với RW4). Hơn nữa, việc bổ sung thêm thành phần nước dừa cũng ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tái sinh chồi của mô sẹo. Cụ thể, khi so sánh giữa 2 cặp công thức RW1 với RW3 và RW2 với RW4, tỉ lệ mô sẹo tái sinh chồi và/hoặc số chồi trung bình thu được trên mỗi mô sẹo đều cao hơn ở công thức (RW3 và RW4) có sử dụng nhiều nước dừa hơn (20%). Tỉ lệ mô sẹo tái sinh chồi cao nhất và số chồi/mô sẹo cao nhất quan sát được ở thí nghiệm sử dụng công thức RW3, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 3 công thức còn lại.

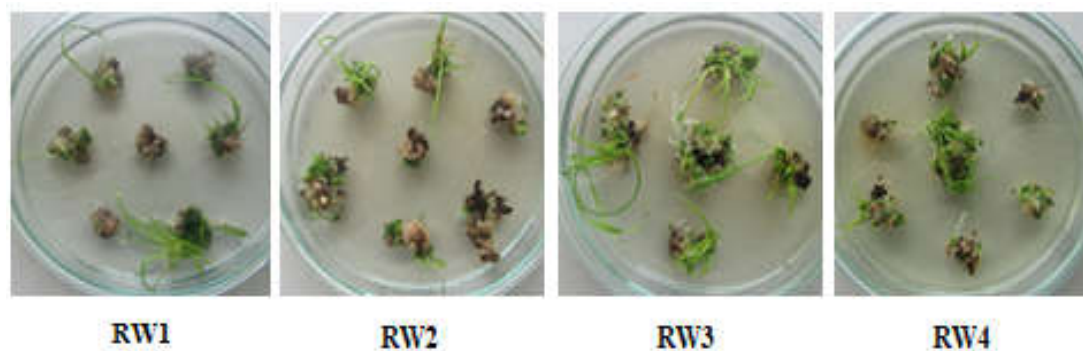
Bảng 3.4 Ảnh hưởng của CĐHST và nước dừa đến khả năng tái sinh chồi

Công thức	BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	CW (%)	Tỉ lệ mô sẹo tái sinh chồi (%)	Số chồi/mô sẹo
RW1	2,0	0,2	10	73,3 (2,9) ^b	2,0 (0,4) ^d
RW2	2,0	0,4	10	70,0 (5,0) ^{bc}	2,3 (0,1) ^c
RW3	2,0	0,2	20	85,0 (5,0) ^a	3,2 (0,2) ^a
RW4	2,0	0,4	20	63,3 (5,8) ^c	3,0 (0,2) ^b

Ghi chú: Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm; giá trị trong ngoặc thể hiện độ lệch chuẩn. Các chữ cái khác nhau trong cùng cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ($\alpha=0,05$). *Tỉ lệ mô sẹo tạo chồi = (Số mô sẹo phát sinh chồi/số mô sẹo nuôi cấy) x 100%. (CW) nước dừa.

Trong nghiên cứu của Slamet (2014), môi trường tái sinh từ mô sẹo IE của giống lúa IR64 sử dụng 5 mg/L NAA và 2 mg/L Kinetin [124]. Tuy nhiên, BAP đã được chứng minh là loại hormone ngoại sinh thuộc nhóm cytokinin thích hợp hơn cả khi nuôi cấy tái sinh chồi từ mô sẹo phôi trưởng thành ở giống lúa BT7 [15]. Hơn nữa, tỉ lệ cytokinin/auxin >1 và có bổ sung nước dừa là những yếu tố có ảnh hưởng đáng kể đến tỉ lệ mẫu tái sinh chồi từ phôi hạt trưởng thành ở giống lúa BT7 [15]. Kết quả thu được trong nghiên cứu này đã củng cố thêm cho những phát hiện này, với tỉ lệ mô sẹo tái sinh đạt >60% và số chồi/mô sẹo đạt > 1,95.

Theo George *et al.* (2008), nước dừa được xác định là rất giàu các hợp chất hữu cơ, chất khoáng và chất kích thích sinh trưởng [54]. Do vậy, thành phần này thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để kích thích phân hóa và nhân nhanh chồi ở nhiều loài cây. Đây cũng là thành phần không được đề cập đến trong quy trình chuyển gen vào IE của giống lúa IR64 đã được công bố [57, 124]. Tuy nhiên, nghiên cứu này đã chứng tỏ việc bổ sung nước dừa vào thành phần môi trường có hiệu quả rất tốt, giúp tăng đáng kể khả năng tái sinh chồi của những mô sẹo được tạo thành từ IE giống lúa BT7.



Hình 3.3 Tái sinh chồi từ mô sẹo tạo thành từ IE của giống lúa BT7

Ghi chú: Mô sẹo tạo thành từ IE của giống lúa BT7 được nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi với các thành phần môi trường khác nhau (RW1 – RW4). Hình ảnh được ghi lại sau 30 ngày nuôi cấy mô sẹo trên môi trường tái sinh.

Như vậy, chất ĐHST và hàm lượng nước dừa cho tỉ lệ tái sinh chồi cao từ mô sẹo IE của giống lúa BT7 đã được xác định. Công thức RW3 có chứa BAP 2 mg/L, NAA 0,2 mg/L và nước dừa 20% (v/v) cho hiệu quả tái sinh chồi cao nhất, được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.1.2 Tối ưu quy trình chuyển gen vào IE của giống lúa BT7 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

3.1.2.1. Đánh giá ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn và thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen vào IE giống lúa BT7

Mật độ vi khuẩn *A. tumefaciens*, vật liệu thực vật và thời gian đồng nuôi cấy là những yếu tố ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả của quá trình chuyển gen. Sự tăng sinh của vi khuẩn thường tỉ lệ thuận với mật độ vi khuẩn dùng để lây nhiễm và thời gian đồng nuôi cấy. Để tối ưu bước lây nhiễm thời gian đồng nuôi cấy IE giống lúa BT7 với vi khuẩn *A. tumefaciens*, các mật độ vi khuẩn *A. tumefaciens* (OD_{600nm}) và thời gian đồng nuôi cấy IE khác nhau đã được khảo sát trong thí nghiệm này.

Kết quả khảo sát (Bảng 3.5) cho thấy mật độ vi khuẩn *A. tumefaciens* và thời gian đồng nuôi cấy có tác động đáng kể đến hiệu quả chuyển gen vào IE giống lúa BT7. Số IE tạo mô sẹo có xu hướng giảm dần khi mật độ vi khuẩn (giá trị OD_{600}) và thời gian đồng nuôi cấy tăng.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn và thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen vào IE giống lúa BT7

Công thức1	Số IE tạo mô sẹo	Số mô sẹo sống sót sau chọn lọc			Số mô sẹo tái sinh	Số cây mang gen chuyển ²
		Chọn lọc 1	Chọn lọc 2	Chọn lọc 3		
AD1	47,7 (0,6) ^a	22,0 (2,7) ^a	7,3 (3,1) ^b	0	-	-
AD2	43,0 (1,0) ^b	17,0 (1,0) ^b	6,3 (0,6) ^{bc}	0,3 (0,6) ^b	0	-
AD3	39,3 (1,2) ^c	15,0 (1,0) ^b	11,3 (2,1) ^a	8,3 (1,7) ^a	8,3(4,2)	3,3(1,5)
AD4	34,3 (1,5) ^d	9,3 (1,5) ^c	3,0 (3,5) ^{cd}	0	-	-
AD5	24,7 (1,5) ^e	2,0 (1,0) ^d	0	-	-	-
AD6	17,7 (2,5) ^f	0	-	-	-	-

Ghi chú: ¹Mật độ khuẩn *A. tumefaciens* OD_{600nm} ở công thức AD1 & AD2, AD3 & AD4 và AD5 & AD6 lần lượt là 0,1, 0,3 và 0,5; thời gian đồng nuôi cấy ở công thức AD1, 3 & 7 là 5 ngày, AD2, 4 & 6 là 7 ngày. ²Số cây tái sinh có kết quả PCR dương tính với cặp mồi đặc hiệu cho gen chọn lọc HPT. Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm; giá trị trong ngoặc thể hiện độ lệch chuẩn. Các chữ cái khác nhau trong cùng cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ($\alpha=0,05$).

Đồng thời, sau giai đoạn đồng nuôi cấy, tỉ lệ IE nhiễm vi khuẩn *A. tumefaciens* tăng dần theo thứ tự các công thức từ AD1-AD6. Quan sát trạng thái biểu hiện cho thấy trong khi IE có vết khuẩn bám nhẹ ở bề mặt dưới IE ở các công thức AD1 và AD2 (OD₆₀₀ đạt 0,1); mức độ khuẩn tăng dày ở công thức AD3 và AD4 (OD₆₀₀ đạt 0,3) và dần bao trùm kín bề mặt IE ở công thức AD5 và AD6 (OD₆₀₀ đạt 0,5) (Hình 3.4A & B). Bên cạnh đó, ở các công thức thời gian đồng nuôi cấy 5 ngày (AD1, AD3, AD5), mô sẹo có màu vàng nhạt. Ngược lại, ở các công thức thời gian đồng nuôi cấy 7 ngày (AD2, AD4, AD6), mô sẹo hình thành từ các IE có biểu hiện dần bị hóa nâu đen ở bề mặt ngoài (Hình 3.4C).

Với kỹ thuật lây nhiễm IE theo quy trình chuyển gen lúa áp dụng trong nghiên cứu này, việc quản lý mức độ nhiễm là hết sức cần thiết do IE là loại vật liệu có sức sống kém khi gặp điều kiện bất lợi. Tuy nhiên, việc kiểm soát quá mức sự phát triển của vi khuẩn *A. tumefaciens* có thể gây tác dụng ngược, làm giảm hiệu quả chuyển gen. Chính vì vậy, các mẫu mô sẹo sau khi lây nhiễm và đồng nuôi cấy với các công thức khác nhau đã tiếp tục được theo dõi biểu hiện ở giai đoạn nuôi cấy trên môi trường chọn lọc (Bảng 3.5), kết quả cho thấy theo thời gian

số mô sẹo nhiễm ngày càng giảm, số mô sẹo chết ngày càng tăng. Ở lần chọn lọc đầu tiên, số lượng mô sẹo thu được khác biệt và giảm dần theo thứ tự các công thức từ AD1 đến AD5 và không thu được mô sẹo sống sót ở công thức AD6.



Hình 3.4. Đồng nuôi cấy IEs giống lúa BT7 với *A. tumefaciens*

Ghi chú: IE được lây nhiễm *A. tumefaciens* và đồng nuôi cấy trên môi trường N6 với các công thức khác nhau về mật độ vi khuẩn OD_{600} và thời gian đồng nuôi cấy: (A) Công thức AD3 (OD_{600} 0,3 - 5 ngày); (B) Công thức AD5 (OD_{600} 0,5 - 5 ngày); (C) Công thức (OD_{600} 0,3 - 7 ngày). Hình ảnh được ghi lại sau giai đoạn đồng nuôi cấy.

Tiếp theo, sau bước chọn lọc 2, số lượng mô sẹo ở các công thức AD1, AD2, AD4 giảm đáng kể và không thu được mô sẹo sống sót ở công thức AD5. Số lượng mô sẹo sống sót sau bước chọn lọc 2 ở thí nghiệm sử dụng công thức AD3 tuy có giảm so với chọn lọc 1 nhưng số lượng giảm không đáng kể. Đây cũng là công thức duy nhất thu được mô sẹo sống sót sau chọn lọc lần 3 (đạt trung bình 8,0 mô sẹo) và tái sinh. Tỷ lệ cây tái sinh mang cấu trúc T-DNA thu được ở công thức này khá cao (> 40% cây tái sinh có kết quả PCR dương tính với cặp mồi đặc hiệu của *HPT*); đạt hiệu suất chuyển gen trung bình 5,6% (Bảng 3.5).

Mật độ vi khuẩn *A. tumefaciens* sử dụng để chuyển gen vào IE ở các loài thực vật khác nhau hay các giống lúa khác nhau trong các công bố trước đây khá khác biệt, tùy thuộc vào kiểu gen và phương thức lây nhiễm. Cùng trên đối tượng IE giống IR64, Hiei *et al.* (2008) lây nhiễm IE trong dung dịch vi khuẩn có giá trị OD_{600nm} 1,0 trong thời gian 15 phút và đồng nuôi cấy trong 7 ngày [57]; trong khi Slamet *et al.* (2014) nhỏ trực tiếp dung dịch vi khuẩn có giá trị OD_{600nm} 0,3 vào IE và đồng nuôi cấy trong 7 ngày [124]. Trong nghiên cứu này, mặc dù sử dụng cùng phương thức lây nhiễm như Slamet *et al.* (2014) (nhỏ trực tiếp dung dịch vi khuẩn lên IE và đồng nuôi cấy), kết quả thu được ở công thức AD4 (OD_{600nm} 0,3

và đồng nuôi cấy trong 7 ngày) không thu được mô sẹo sống sót sau 3 lần chọn lọc. Điều này có thể là do kích thước IE lúa BT7 nhỏ và yếu hơn so với IE của lúa IR64.

Như vậy, lây nhiễm IE lúa giống BT7 với dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* có giá trị OD_{600nm} là 0,3 và đồng nuôi cấy trong thời gian 5 ngày là phù hợp nhất với IE của giống lúa BT7, cho hiệu quả chuyển gen trung bình đạt 5,55%.

3.1.2.2. Đánh giá ảnh hưởng của tuổi phôi non đến hiệu quả chuyển gen vào IE giống lúa BT7

Quá trình biến nạp cấu trúc T-DNA của vi khuẩn *A. tumefaciens* vào tế bào thực vật thường bị tác động bởi tuổi mô/cây, dạng tế bào, giai đoạn chu trình tế bào và các chỉ tiêu sinh lý khác nhau. Phôi có kích thước lớn có khả năng sống sót trong môi trường có vi khuẩn *A. tumefaciens* cao hơn nhưng khả năng tái sinh lại kém hơn [25, 135]. Thông thường, tuổi phôi được tính từ thời điểm thụ phấn đến 30 ngày sau đó (DAP - ngày sau thụ phấn), có liên quan đến kích thước phôi và đặc điểm sinh lý sinh hóa tương ứng của phôi lúa. Mười ngày đầu (0 - 10 DAP) là giai đoạn biệt hóa cơ quan, 10 ngày tiếp theo (10 DAP - 20 DAP) là giai đoạn trưởng thành của phôi và giai đoạn 20 DAP - 30 DAP là giai đoạn ngủ nghỉ của phôi lúa [64]. Để nâng cao hiệu quả của cả quá trình chuyển gen vào giống lúa BT7, thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của tuổi phôi đến hiệu quả tái sinh và hiệu suất chuyển gen đã được thiết lập.

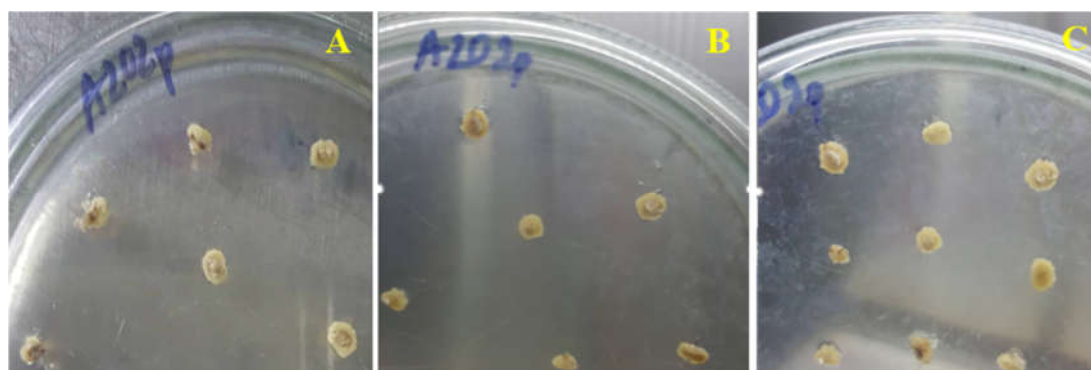
Kết quả nghiên cứu (Bảng 3.6) cho thấy, tuổi phôi có tác động rõ rệt đến sự tạo thành mô sẹo sau giai đoạn đồng nuôi cấy và số mô sẹo thu được sau quá trình chọn lọc trên môi trường chứa kháng sinh. Theo số liệu quan sát được, các chỉ số này ở công thức tuổi phôi 8-10 DAP thấp hơn rõ rệt so với mức tuổi 11-13 DAP và 14-16DAP. Điều này có thể giải thích do kích thước và trọng lượng phôi thời điểm 11-16 DAP lớn hơn so với phôi ở thời điểm 8-10 DAP nên khả năng tạo mô sẹo và sức sống tốt hơn.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của tuổi IE đến hiệu quả chuyển gen vào lúa BT7

Tuổi phôi (DAP ¹)	Số IE tạo mô sẹo	Số mô sẹo sống sót sau chọn lọc	Số mô sẹo tái sinh	Số cây tái sinh	Số cây mang gen chuyển ²
8 – 10	42,0 (1,0) ^b	6,7 (1,2) ^b	4,3 (2,1) ^{ab}	6,7 (2,3) ^b	3,3 (1,5) ^b
11 – 13	48,3 (2,5) ^a	11,7 (1,5) ^a	6,7 (0,6) ^a	14,0 (2,0) ^a	8,3 (1,5) ^a
14 – 16	51,0 (1,7) ^a	13,3 (1,5) ^a	3,0 (2,0) ^b	3,7 (1,5) ^b	0,7 (0,6) ^c

Ghi chú: ¹Ngày sau thụ phấn; ²Số cây tái sinh có kết quả PCR dương tính với cặp mồi đặc hiệu cho gen chọn lọc HPT. Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm; giá trị trong ngoặc thể hiện độ lệch chuẩn. Các chữ cái khác nhau trong cùng cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ($\alpha=0,05$).

Theo Slamet *et al.* (2014), tuổi phôi thích hợp để chuyển gen là 8 - 12 DAP đối với giống IR64. Thực tế, kích thước hạt và trọng lượng 1000 hạt của giống IR64 lớn hơn so với hạt giống BT7. Hơn nữa, thời gian sinh trưởng của IR64 (105 - 110 ngày) cũng ngắn hơn so với BT7 (> 115 ngày). Qua quan sát thực tế cho thấy, mô sẹo phát sinh từ IE ở công thức IE 8-10 DAP khô xốp và trắng đục, trong khi mô sẹo ở 2 công thức IE 11-13 DAP và IE ở 14-16DAP chắc bóng, màu vàng sáng và có sức sống hơn (Hình 3.5). Điều này chứng tỏ kích thước hay DAP có tác động đến quá trình tạo mô sẹo và khả năng sống sót của IE BT7 qua quá trình chọn lọc trên môi trường có bổ sung kháng sinh.



Hình 3.5 Chuyển gen vào mô sẹo tạo thành từ IE giống lúa BT7 có DAP khác nhau

Ghi chú: IE với các tuổi phôi khác nhau được đồng nuôi cấy với *A. tumefaciens* và cấy chuyển sang môi trường N6 chọn lọc. (A) Công thức IE ở 8-10 DAP; (B) Công thức IE ở 11-13 DAP; (C) Công thức IE ở 14-16DAP. Hình ảnh được ghi lại sau 8 ngày nuôi cấy.

Khi tiếp tục theo dõi các chỉ tiêu về số mô sẹo tái sinh, số cây con tạo thành và số cây mang gen chuyển thu được ở 3 công thức đã thu được những kết quả khá khác biệt (Bảng 3.6). Kết quả xử lý thống kê của 3 lần lặp lại thí nghiệm cho thấy tỉ lệ mô sẹo có khả năng tái sinh tỉ lệ nghịch với DAP của IE. Điều này cũng phù hợp với công bố trước đây của Visarada *et al.* (2002) và Aananthi *et al.* (2018), trong đó đã chứng minh kích thước phôi càng lớn thì khả năng tái sinh càng giảm [25, 135].

Hơn nữa, tất cả các công thức thí nghiệm đều thu được hiệu suất tiếp nhận gen khá cao (tỉ lệ cây tái sinh có kết quả PCR dương tính với mỗi đặc hiệu của *HPT* > 24%). Số cây con tạo thành cao nhất (14 cây/lần nhắc lại) và tỉ lệ cây mang gen chuyển cao nhất (~ 60%) thu được ở nghiệm thức IE ở 11-13 DAP và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại (IE ở 8-10 DAP và IE ở 14-16 DAP). Tuy nhiên, giá trị trung bình và độ lệch chuẩn ở công thức IE ở 14-16 DAP (chỉ số tỉ lệ cây tái sinh mang gen chuyển) tương đương nhau cho thấy có sự khác biệt khá lớn giữa các lần lặp lại thí nghiệm.

Như vậy, tuổi phôi thích hợp nhất để chuyển gen vào IE giống lúa BT7 là 11-13 DAP. Đây là giai đoạn đầu của quá trình phôi trưởng thành, hiệu suất chuyển gen đạt 13,9%.

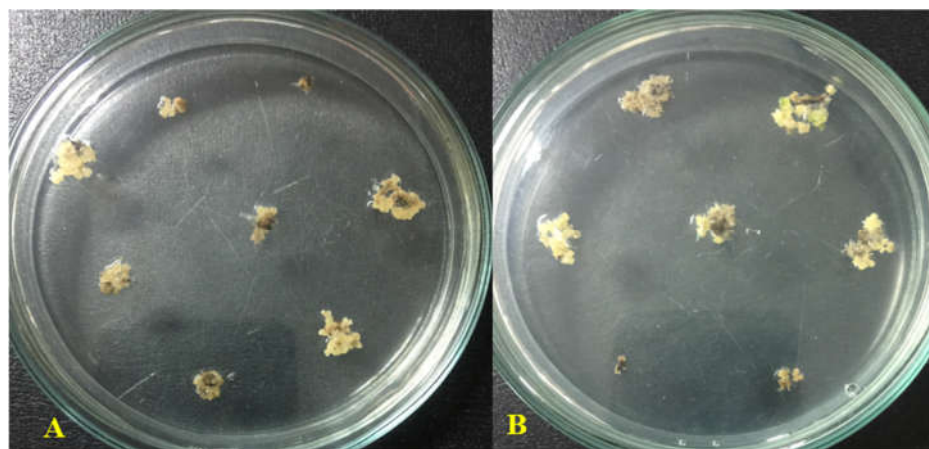
3.1.2.3. Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ Acetosyringone đến hiệu quả chuyển gen vào IE giống lúa BT7

Trong quá trình chuyển gen vào cây một lá mầm, bao gồm cả lúa, bước đồng nuôi cấy mẫu thực vật với vi khuẩn *A. tumefaciens* thường sử dụng Acetosyringone với các mức nồng độ khác nhau từ 0 - 400 μ M [117, 135]. Trong nghiên cứu này, 4 công thức nồng độ AS (0, 100, 150 và 200 μ M) đã được khảo sát để xác định nồng độ thích hợp nhất cho việc chuyển DNA ngoại lai vào IE giống BT7.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của nồng độ AS đến quá trình chuyển gen vào IE giống lúa BT7

Nồng độ AS (μM)	Số IE tạo mô sẹo	Số mô sẹo sống sót sau chọn lọc	Số mô sẹo tái sinh chồi	Số cây hoàn chỉnh	Số cây mang gen chuyển *
0	46,3 (1,5) ^a	15,7 (2,9) ^a	9,7 (2,2) ^a	36,3 (4,0) ^a	0
100	41,7 (1,5) ^b	11,0 (1,0) ^b	6,3 (1,5) ^b	15,7 (1,2) ^b	8,3 (2,5) ^b
150	38,0 (2,0) ^b	10,0 (1,0) ^b	6,0 (1,0) ^b	13,3 (3,1) ^b	12,3 (2,2) ^a
200	26,7 (3,2) ^c	2,7 (2,3) ^c	0	-	-

Ghi chú: *Số cây tái sinh có kết quả PCR dương tính với cặp mồi đặc hiệu cho gen chọn lọc HPT. Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm; giá trị trong ngoặc thể hiện độ lệch chuẩn. Các chữ cái khác nhau trong cùng cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ($\alpha=0,05$).



Hình 3.6: Chuyển gen vào lúa BT7 sử dụng AS có nồng độ khác nhau.

Ghi chú: IE của giống lúa BT7 được đồng nuôi cấy với *A. tumefaciens* trên môi trường đồng nuôi cấy bổ sung AS 100 μM (A) và 150 μM (B). Hình ảnh mô sẹo được chụp ở giai đoạn sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường tiền tái sinh.

Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Bảng 3.7 cho thấy số mẫu thu được ở tất cả các giai đoạn đều có xu hướng giảm khi nồng độ AS tăng. Đối với công thức môi trường có bổ sung 200 μM , số mô sẹo thu được sau mỗi giai đoạn đồng nuôi cấy và chọn lọc giảm rõ rệt, thậm chí làm mất khả năng tái sinh của mô sẹo. Ở công thức đối chứng (không bổ sung AS) số cây tách ra được từ một cụm mô sẹo (~ 4 chồi/cụm mô sẹo) cao vượt trội so với các công thức còn lại trong thí nghiệm. Điều này chứng tỏ rằng nồng độ AS cao đã gây độc đối với mô sẹo giống lúa BT7.

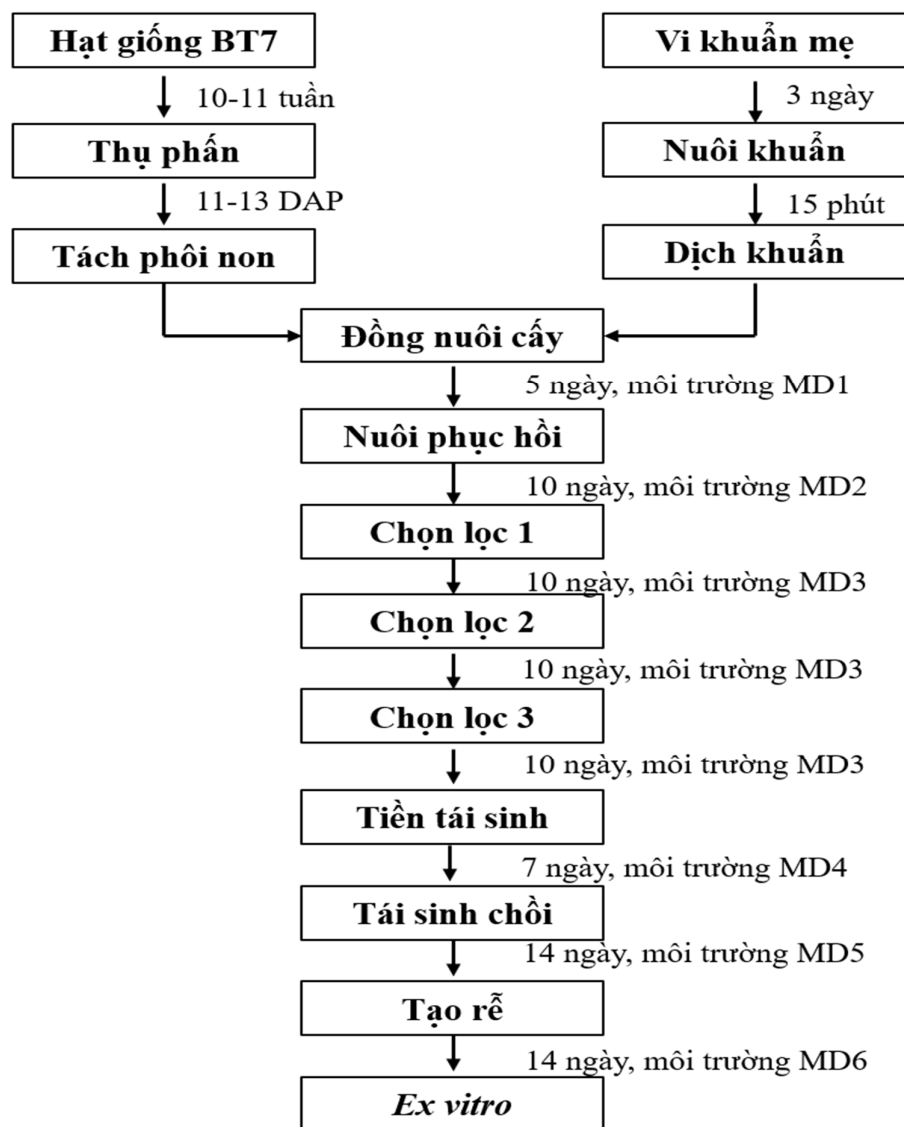
Mặc dù, số mô sẹo tái sinh ở công thức không bổ sung AS đạt cao nhất nhưng không thu được cây nào mang gen chọn lọc *HPT*. Kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy sự khác biệt về số mẫu thu được ở các giai đoạn nuôi cấy giữa 2 công thức nồng độ AS 100 μM và 150 μM không có ý nghĩa thống kê ($\alpha = 0,05$). Tuy nhiên, số cây mang gen chuyển ở nghiệm thức 150 μM vượt trội hơn so với nghiệm thức 100 μM (12,3 cây ~ hiệu suất chuyển gen đạt 20,6% so với 8,3 cây ~ hiệu suất chuyển gen đạt 13,8%).

Như vậy, AS 150 μM là ngưỡng nồng độ thích hợp để chuyển gen vào IE giống lúa BT7, cho hiệu suất chuyển gen cao nhất, đạt 20,6%. Hiệu suất chuyển gen thu được từ quy trình chuyển gen sử dụng IE đã tối ưu trong nghiên cứu này tương tự kết quả nghiên cứu trước đây của Aananthi *et al.* (2018) khi thực hiện chuyển gen vào giống lúa Pusa Basmati 1 (lúa indica), trong đó sử dụng kỹ thuật nhỏ giọt dung dịch khuẩn OD_{600nm} 1,0 lên bề mặt [25]. Cũng với phương pháp nhỏ giọt dịch khuẩn lên bề mặt IE ở giai đoạn đồng nuôi cấy, Luu *et al.* (2020) đã đạt được hiệu suất chuyển gen 48%, khi sử dụng IE 8-12 DAP của giống lúa Komboka (indica), với dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* khi lây nhiễm có OD_{600nm} 0,3 [97].

Như vậy, mặc dù thuộc nhóm giống indica – vốn được xem là khó tiếp nhận gen ngoại hơn so với nhóm giống japonica, BT7 vẫn có khả năng tiếp nhận DNA ngoại lai khá tốt nếu áp dụng quy trình chuyển gen thích hợp. Kết quả nghiên cứu này mở ra nhiều triển vọng nghiên cứu cải tạo và nâng cao năng suất và chất lượng giống lúa chủ lực BT7 của Việt Nam bằng công nghệ gen trong tương lai.

3.1.3 Quy trình chuyển gen vào IE giống lúa BT7 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Trên cơ sở các kết quả nghiên cứu tối ưu các bước nuôi cấy *in vitro* và chuyển gen vào IE giống lúa BT7 đã thu được (mục 3.1.1 và 3.1.2), quy trình chuyển gen vào IE giống lúa BT7 hoàn thiện đã được thiết lập (Hình 3.7, mục 2.3.5.2, Phụ lục 3).



Hình 3.7. Quy trình chuyển gen vào IE giống lúa BT7 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Hiệu suất của quy trình chuyển gen vào IE BT7 của nghiên cứu này đạt 20,6% (**Error! Reference source not found.**), gần tương đương với hiệu suất quy trình chuyển gen vào phôi trưởng thành BT7 của tác giả Cao Lê Quyên (22,53%) [16]. So với việc sử dụng phôi trưởng thành, quy trình chuyển gen sử dụng IE làm vật liệu khởi đầu có một vài hạn chế như: yêu cầu có giai đoạn nuôi cấy phục hồi sau bước đồng nuôi cấy, cần 3 lần chọn lọc (so với 2 lần chọn lọc của quy trình sử dụng phôi trưởng thành) để mô sẹo tăng sinh đầy đủ, bước chuẩn bị nguyên liệu (tách phôi) để chuyển gen phức tạp và mất thời gian hơn. Mặc dù vậy, quy trình

chuyển gen vào IE BT7 cũng có những ưu điểm so với quy trình chuyển gen vào phôi trưởng thành BT7 đã công bố, ví dụ như không yêu cầu bước nuôi cấy tạo mô sẹo trước khi đồng nuôi cấy. Đặc biệt, việc sử dụng IE giúp kiểm soát được chất lượng của vật liệu chuyển gen và đảm bảo sự đồng nhất của tất cả các mẫu nên giảm được tác động của yếu tố khách quan đến thí nghiệm. Ngược lại, quy trình chuyển gen lúa sử dụng phôi trưởng thành thường có sự ổn định thấp hơn do bị ảnh hưởng bởi chất lượng và độ đồng đều của vật liệu khởi đầu (phôi/hạt lúa phải trải qua quá trình phơi, sấy, bảo quản nên giữ được tính đồng đều về mặt chất lượng).

Như vậy, quy trình chuyển gen vào IE giống lúa BT7 đã tối ưu đảm bảo hiệu suất cần thiết phục vụ nghiên cứu chỉnh sửa gen trên BT7, được sử dụng cho toàn bộ thí nghiệm tạo dòng lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT* tiếp theo.

3.2 Thiết kế cấu trúc T- DNA chỉnh sửa *SW14-BT*

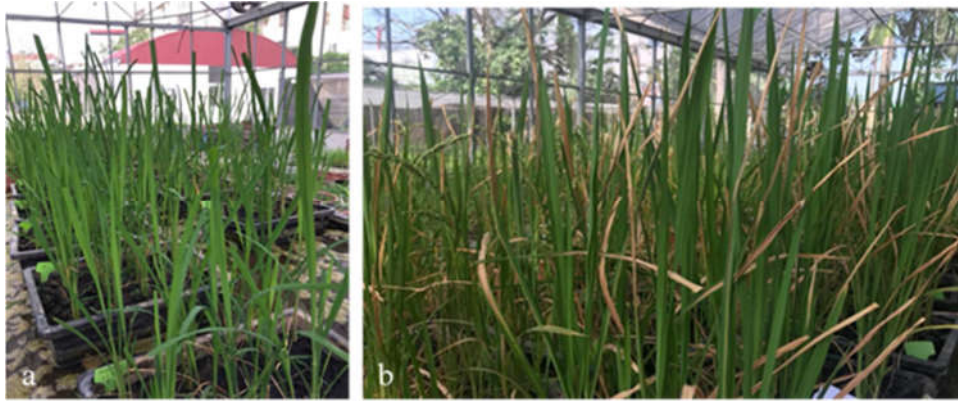
3.2.1 Nghiên cứu sự tương tác giữa *VXO* và *OsSWEET14* ở giống lúa BT7

3.2.1.1. Đánh giá độc tính *Xoo* ở miền Bắc Việt Nam trên giống lúa BT7

BT7 là một giống lúa ở miền Bắc rất mẫn cảm với bệnh bạc lá nhưng hầu như chưa có nghiên cứu nào đánh giá toàn diện tính mẫn cảm của BT7 với quần thể *Xoo* của Việt Nam. Vì vậy, với phạm vi nghiên cứu của luận án, cùng với nguồn vật liệu sẵn có (Phụ lục 2), độc tính của các "isolate" ("chủng phân lập" – gọi tắt là "chủng") *Xoo* đại diện cho một số tỉnh miền Bắc Việt Nam theo các giai đoạn từ 2013 - 2017 trên giống lúa BT7 đã được đánh giá bằng phương pháp cắt lá ở giai đoạn đẻ nhánh (45 ngày sau cấy). Hình ảnh quan sát sau 2 tuần lây nhiễm (Hình 3.8) cho thấy các chủng *Xoo* đều gây triệu chứng bệnh bạc lá điển hình trên mẫu lúa lây nhiễm, tuy nhiên mức độ nhiễm bệnh khác nhau.

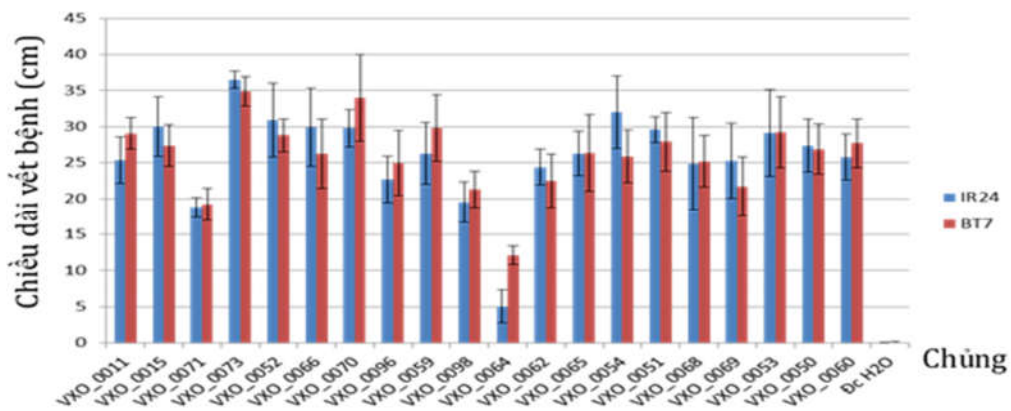
Kết quả đo chiều dài vết bệnh (Hình 3.9) cho thấy mức độ nhiễm ở cả 2 giống (BT7 và IR24) là tương đương nhau, hầu hết các chủng (19/20 chủng) được nghiên cứu đều có độc tính mạnh, với chiều dài vết bệnh trung bình > 15 cm (Được đánh giá là nhiễm bệnh theo thang điểm của IRRI ở điều kiện nhà kính (Bảng 2.1). Đặc biệt, chủng *VXO_73* (phân lập tại Gia Lâm, Hà Nội) thể hiện độc tính mạnh nhất; chiều dài vết bệnh trung bình đạt lần lượt 36,5 cm và 34,9 cm trên IR24 và

BT7. Ngược lại, chiều dài vết bệnh trên giống lúa BT7 và giống chuẩn nhiễm IR24 thấp nhất được lây nhiễm với chủng VXO_64; vết bệnh xuất hiện trên lá sau 14 ngày lây nhiễm có chiều dài trung bình đạt lần lượt là 12,1 cm (nhiễm nhẹ - MS) và 5,06 cm (kháng nhẹ - MR), chứng tỏ giống lúa BT7 rất miễn cảm với vi khuẩn *Xoo*.



Hình 3.8 Lây nhiễm nhân tạo *Xoo* trên giống lúa BT7

Ghi chú: Cây lúa non (45 ngày tuổi) được lây nhiễm nhân tạo *Xoo* bằng phương pháp cắt lá. (a) cây lúa trước khi lây nhiễm; (b) cây lúa sau khi lây nhiễm 14 ngày.



Hình 3.9 Độ tính của VXO trên lúa BT7

Ghi chú: Cây lúa BT7 được lây nhiễm với 20 chủng VXO. (ĐC): đối chứng âm (cây lúa BT7 được lây nhiễm bằng dung dịch không chứa vi khuẩn *Xoo*). Đồ thị thể hiện chiều dài vết bệnh trên lá lúa sau 14 ngày lây nhiễm *Xoo*. Số liệu trên đồ thị là kết quả trung bình của 3 lần thí nghiệm và độ lệch chuẩn.

Phương pháp lây nhiễm nhân tạo bằng kỹ thuật cắt lá là phương pháp phổ biến trong các nghiên cứu đánh giá độc tính vi khuẩn *Xoo*. Lê Thị Thu Trang

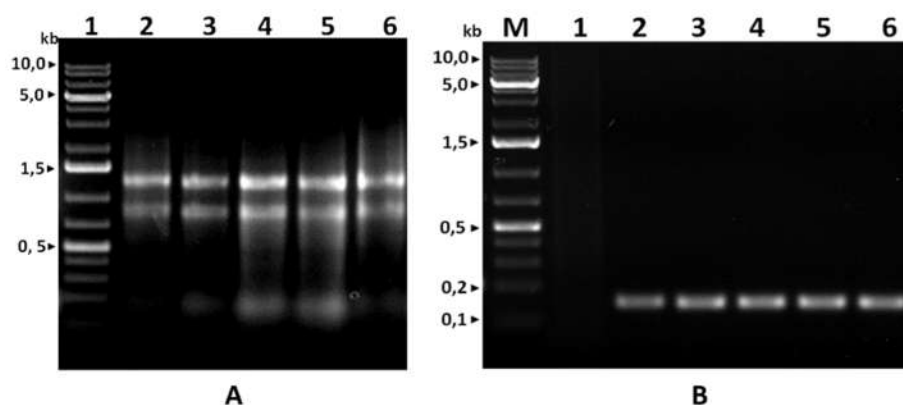
(2016) đã sử dụng phương pháp này để đánh giá khả năng kháng 2 chủng *Xoo* Is.5 và Is.6 của 113 giống lúa địa phương thu thập ở miền Bắc Việt Nam [23]. Vì vậy, trong nghiên cứu này, phương pháp cắt lá cũng đã được sử dụng để đánh giá độc tính của 20 chủng *Xoo* (Phụ lục 2) trên giống lúa BT7 và giống lúa chuẩn nhiễm IR24 (Hình 3.9). Ở Việt Nam hầu như chưa có nghiên cứu chuyên sâu về phân loại vi khuẩn *Xoo*, chưa có cây phân loại chung để phân nhóm *Xoo*. Furuya và cs. (2012) có sử dụng chỉ thị phân tử RFLP để xác định đa dạng di truyền và phân nhóm quần thể *Xoo* Việt Nam [53]. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu gần đây đều chỉ sử dụng các chủng thu thập riêng lẻ (ở dạng chủng phân lập - isolate) để phục vụ phạm vi nghiên cứu nhỏ. Trong nghiên cứu trước đây, Nguyễn Thị Lệ đã sử dụng BT7 như một mẫu đối chứng để chứng minh khả năng kháng 3 "chủng phân lập" *Xoo* 981.HUA10146, 996.HUA10147 và 1035.HUA10153 của giống lúa kháng BT7KBL [8]. Trong nghiên cứu này, 20 "chủng phân lập" *Xoo* mang tính đại diện về mặt địa lý (9 tỉnh trồng lúa phía Bắc) và thời gian (2013 – 2017) đã được sử dụng để chứng minh tính miễn cảm của BT7 với bệnh bạc lá.

3.2.1.2. Nghiên cứu biểu hiện *OsSWEET14* trên cây lúa BT7 nhiễm *Xoo*

Họ gen *OsSWEET* đã được xác định là đích tác động của *Xoo* khi xâm nhiễm vào cây lúa với mục đích tăng tiết đường vào gian bào để cho vi khuẩn sinh trưởng và phát triển trong cây chủ [127]. Tuy nhiên, mỗi chủng *Xoo* khác nhau tấn công vào một (hay một vài) gen *OsSWEET* khác nhau, tùy thuộc vào đặc trưng của vùng gen *tal* trong hệ gen vi khuẩn [107]. Nhiều nghiên cứu trước đây đã nhận định *OsSWEET14* là gen nhiễm của đa số các chủng *Xoo* châu Á [107]. Trong nghiên cứu này, để xác định vai trò *OsSWEET14* trong quá trình vi khuẩn *Xoo* xâm nhiễm vào cây lúa BT7, 7 chủng VXO (VXO_11, VXO_15, VXO_59, VXO_60, VXO_62, VXO_69 và VXO_96) có độc tính cao đối với BT7 (có chiều dài vết bệnh > 20 cm, Hình 3.9) đại diện cho 6 tỉnh có vị trí địa lý khác nhau trong khu vực miền Bắc được lựa chọn cho thí nghiệm.

Sau 2 ngày lây nhiễm *Xoo* nhân tạo, toàn bộ các mẫu lá lúa BT7 được tách chiết RNA tổng số để làm vật liệu cho thí nghiệm đánh giá biểu hiện gen bằng RT-PCR. Hàm lượng RNA và độ tinh sạch của mẫu tách chiết được xác định bằng

phương pháp đo quang phổ và điện di trên gel agarose 1%. Tất cả các mẫu tách chiết đều có xuất hiện các băng RNA trên bản điện di (Hình 3.10A); đạt nồng độ ~ 200 ng/ μ L và tỉ số OD_{268}/OD_{280} trung bình nằm trong khoảng 1,85 – 2,03 (số liệu không trình bày). Kết quả kiểm tra chất lượng các mẫu RNA bằng RT-PCR một bước với cặp mồi đặc hiệu của gen *Actin* đều thu được một băng DNA có kích thước đúng với tính toán lý thuyết, khoảng 150 bp (Hình 3.10B). Kết quả thu được này chứng tỏ các mẫu RNA tách chiết đảm bảo yêu cầu cho các thí nghiệm đánh giá biểu hiện gen tiếp theo.

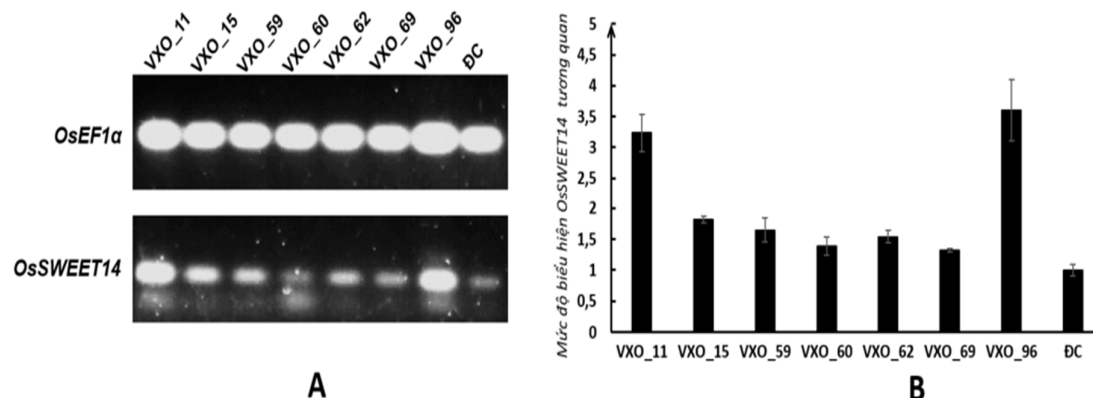


Hình 3.10 Tách chiết RNA từ mẫu lá BT7 lây nhiễm nhân tạo VXO

Ghi chú: (A) Mẫu RNA được điện di trên gel agarose biến tính; giếng 1: thang chuẩn DNA 1,0 kb; giếng 2-6: các mẫu RNA tổng số tách chiết từ lá lúa. (B) Sản phẩm RT-PCR với cặp mồi *Actin-F/Actin-R* được điện di trên gel agarose 1%; giếng M: thang chuẩn DNA 1,0 kb, giếng 1: đối chứng âm (không có RNA khuôn); giếng 2-6: khuôn là mẫu RNA tách chiết từ lá lúa.

Để đánh giá sự biểu hiện của *OsSWEET14* khi bị nhiễm *Xoo*, thí nghiệm RT-PCR đã được thực hiện nhằm so sánh tương quan mức độ biểu hiện của gen đích giữa các cây lúa BT7 không lây nhiễm và lây nhiễm với 7 chủng VXO. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR trên gel agarose cho thấy tất cả các thí nghiệm sử dụng cặp mồi nội chuẩn (*EF1 α -F/EF1 α -R*) đều cho một băng DNA đặc hiệu có độ sáng khá đồng đều giữa các mẫu phân tích (Hình 3.11A-*OsEF1 α*). Đối với thí nghiệm sử dụng cặp mồi SW14-qPCR-F/SW14-qPCR-R, mặc dù tất cả các mẫu phân tích cũng đều cho một băng DNA kích thước tương tự sau nhưng độ sáng của băng DNA thu được có sự khác nhau giữa các thí nghiệm (Hình 3.11A-*OsSWEET14*). Kết quả phân tích bằng phần mềm ImageJ đã chứng tỏ sự khác biệt rõ rệt về mức độ biểu hiện của *OsSWEET14* giữa các mẫu lúa được lây nhiễm

VXO và mẫu đối chứng (tiêm H₂O) (Hình 3.11B). Tất cả các thí nghiệm sử dụng mẫu RNA tách chiết từ cây lúa được lây nhiễm VXO đều cho thấy mức độ biểu hiện *OsSWEET14* cao hơn so với cây lúa không lây nhiễm vi khuẩn, tuy nhiên mức độ tăng cường biểu hiện gen đích của VXO khác nhau giữa các chủng được nghiên cứu. Cụ thể, hàm lượng mRNA *OsSWEET14* cao nhất được phát hiện ở mẫu lúa được tiêm lá với chủng VXO_11 và VXO_96. Trong khi đó, mẫu lúa lây nhiễm các chủng khác có sự tăng nhẹ biểu hiện của *OsSWEET14* so với mẫu đối chứng không lây nhiễm vi khuẩn. Điều này chứng tỏ *OsSWEET14* đã được hoạt hóa khi cây lúa BT7 nhiễm *Xoo* và sự biểu hiện của *OsSWEET14* có liên quan tới quá trình xâm nhiễm của các chủng VXO.



Hình 3.11 Biểu hiện của *OsSWEET14* trong cây lúa BT7 nhiễm *Xoo*

Ghi chú: (A) RT-PCR nhân bản đoạn gen đích *OsSWEET14* và gen nội chuẩn (*OsEF1α*); các giếng VXO_11, VXO_15, VXO_59, VXO_60, VXO_62, VXO_69, VXO_96): khuôn là mẫu RNA tách chiết từ mẫu lúa BT7 tiêm vi khuẩn *Xoo* tương ứng vào lá; giếng ĐC: khuôn là mẫu RNA tách chiết từ mẫu lúa BT7 tiêm nước vào lá; (B) Mức độ biểu hiện của *OsSWEET14* tương quan giữa các mẫu lá lây nhiễm các chủng VXO_11, VXO_15, VXO_59, VXO_60, VXO_62, VXO_69, VXO_96 và lá cây đối chứng (tiêm H₂O).

Gen nội chuẩn là những gen có cấu trúc điển hình, được phiên mã ở một mức độ tương đối liên tục. Sự biểu hiện của nhóm gen này thường độc lập với các kiểu gen di truyền của cây và không bị ảnh hưởng bởi những điều kiện thí nghiệm [62]. Vì vậy, việc đánh giá sự biểu hiện của các gen nội chuẩn đi kèm với nghiên cứu biểu hiện của các gen đích là điều kiện tiên quyết để hạn chế những sai sót trong việc định lượng dẫn đến những hiểu lầm về dữ liệu, đặc biệt trong phân tích

RT-PCR. Ở lúa, một số gen như *Actin*, *18S rRNA*, *25S rRNA*, *UBC*, *UBQ5*, *UBQ10*, *ACT11*, *GAPDH*, *eEF-1 α* , *eIF-4 α* , và *β -TUB* có mức độ biểu hiện ổn định và thường được sử dụng làm gen tham chiếu cho các thí nghiệm đánh giá biểu hiện gen bằng RT-PCR [66, 111]. Các nghiên cứu đánh giá biểu hiện gen ở lúa trong điều kiện lây nhiễm *Xoo* trước đây thường sử dụng *OsActin* hay *OsEF1 α* làm gen nội chuẩn [34, 99]. Hai gen này đã được chứng minh biểu hiện liên tục và ổn định trên mọi cơ quan của cây lúa kháng bệnh bạc lá, không bị phụ thuộc vào thời điểm thu mẫu trong ngày hay từ các giống khác nhau [90] và đặc biệt không bị tác động bởi sự xâm nhiễm của *Xoo* [34]. Trong nghiên cứu này, *OsEF1 α* cũng đã được lựa chọn làm gen tham chiếu cho thí nghiệm RT-PCR bán định lượng nhằm so sánh mức độ biểu hiện tương quan của *OsSWEET14* giữa các mẫu lúa lây nhiễm VXO và không lây nhiễm.

Trong nghiên cứu trước đây của Huang *et al.* (2016), 27/34 chủng *Xoo* châu Á được phân tích đã hoạt hóa biểu hiện của *OsSWEET14* khi xâm nhiễm vào giống lúa IR24 [60]. Tương tự, bằng các phân tích trình vùng gen *tal*, Oliva *et al.* (2019) đã chứng minh 22/31 chủng *Xoo* châu Á mang các TALE có khả năng hoạt hóa *OsSWEET14*. Ở đây, phân tích biểu hiện gen bằng kỹ thuật RT-PCR bán định lượng cũng đã cho thấy *OsSWEET14* của lúa BT7 tăng cường biểu hiện rõ rệt khi lây nhiễm với 7/7 chủng VXO nghiên cứu. Như vậy, kết quả thu được trong nghiên cứu này đã củng cố cho các phát hiện trước đây của các tác giả trước đây khi cho rằng hầu hết các chủng *Xoo* châu Á hoạt hoá *OsSWEET14* [60, 107].

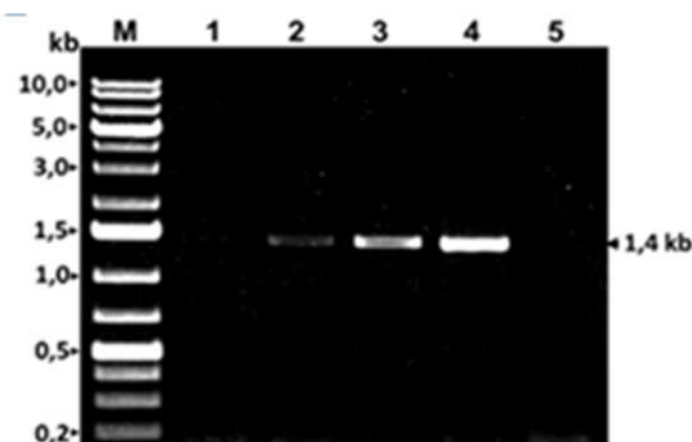
Với kết quả đánh giá biểu hiện gen (7/7 chủng hoạt hoá *OsSWEET14*), kết hợp với số liệu phân tích độc tính của VXO trên BT7 (19/20 chủng có độc tính mạnh) đã cho phép dự đoán *OsSWEET14* có thể là một (trong những) gen “nhiễm” chính, có vai trò quan trọng đối với độc tính của các chủng VXO. Tuy nhiên, giả thuyết này vẫn cần được tiếp tục chứng minh rõ hơn trong các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.1.3. Phân lập SW14-BT từ DNA hệ gen lúa BT7

Một gen "nhiễm" được hoạt hóa bởi *Xoo* do có mang các EBE trong vùng promoter được nhận biết bởi protein TAL do vi khuẩn tiết ra. Hơn nữa, các nghiên cứu ở trên đã cho thấy các chủng VXO khi xâm nhiễm vào cây lúa BT7 đã tăng

cường biểu hiện *OsSWEET14* và gây ra triệu chứng bệnh bạc lá điển hình. Chính vì vậy, để chứng minh *OsSWEET14* là một gen "nhiễm" của các chủng VXO, vùng promoter của *OsSWEET14* (*SW14-BT*) đã được phân lập và giải trình tự để xác định sự có mặt của các EBE đặc trưng.

Dựa vào trình tự promoter *OsSWEET14* ở các giống lúa khác đã được công bố [31, 34, 61, 88, 107] và trình tự nucleotide của *OsSWEET14* được công bố trên Ngân hàng gen (AP014967.1), trong thí nghiệm này, cặp mồi đặc hiệu (SW14-F/SW14-R, Phụ lục 4) đã được thiết kế cho nhân bản đoạn DNA nằm ở từ vị trí [-1343] đến [+52] của gen *OsSWEET14* bằng phản ứng PCR từ DNA hệ gen cây lúa BT7. Kết quả điện di trên gel agarose 1% sản phẩm PCR sử dụng khuôn là DNA tách chiết từ cây lúa BT7 (pha loãng tỉ lệ 10^{-4} , 10^{-3} và 10^{-2}) đã cho một băng DNA duy nhất có kích thước xấp xỉ 1,4 kb tương ứng với kích thước lý thuyết của đoạn DNA được nhân bản (1395 bp) (Hình 3.12, giếng 2- 4).



Hình 3.12 Phân lập đoạn promoter *SW14-BT* của lúa BT7

Ghi chú: Phân lập đoạn promoter *SW14-BT* từ DNA tổng số lúa BT7; giếng 1-4: khuôn là mẫu DNA tách chiết từ lá lúa BT7 pha loãng 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} và 10^{-2} lần; giếng 5: đối chứng âm (không có DNA khuôn). Giếng M: thang chuẩn DNA 1,0 kb (*iNtRon*).

Trong hầu hết các nghiên cứu về promoter đã công bố trước đây, đoạn DNA quan tâm được phân lập thường dài khoảng 500 - 2000 bp và nằm phía trước vị trí của bộ ba mã mở đầu. Đối với các gen "nhiễm" của *Xoo*, các EBE nhận biết bởi protein TAL thường nằm gần hộp TATA (TATA box) trên promoter của gen đích hoặc khu vực cận biên của promoter [31, 55, 60]. Bên cạnh đó, trong hầu hết các

nghiên cứu về promoter đã công bố trước đây, đoạn DNA quan tâm được phân lập thường dài khoảng 500 - 2000 bp và nằm phía trước vị trí của bộ ba mã mở đầu. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, vùng trình tự dài ~1,4 kb chứa hộp TATA box đã được lựa chọn để phân lập. Trong nghiên cứu trước đây về vai trò của gen *OsSWEET14* đối với cơ chế xâm nhiễm của *Xoo*, vùng promoter *OsSWEET14* 341 bp nằm phía trước mã mở đầu ATG đã được phân lập để nghiên cứu chức năng ở giống lúa IRBB13 [127]. Đoạn DNA này cũng có mặt trong đoạn DNA (1395 bp) được phân lập từ giống lúa BT7 (dữ liệu không trình bày).

Như vậy, kết quả thu được cho phép kết luận đã bước đầu phân lập thành công đoạn DNA mong muốn từ DNA tổng số của lúa BT7. Các sản phẩm PCR sau đó đã được tinh sạch theo mục 2.3.1.6 và sử dụng cho các thí nghiệm nhân dòng tiếp theo.

3.2.1.4. Nhân dòng *SW14-BT* vào vector *pGEM-T*

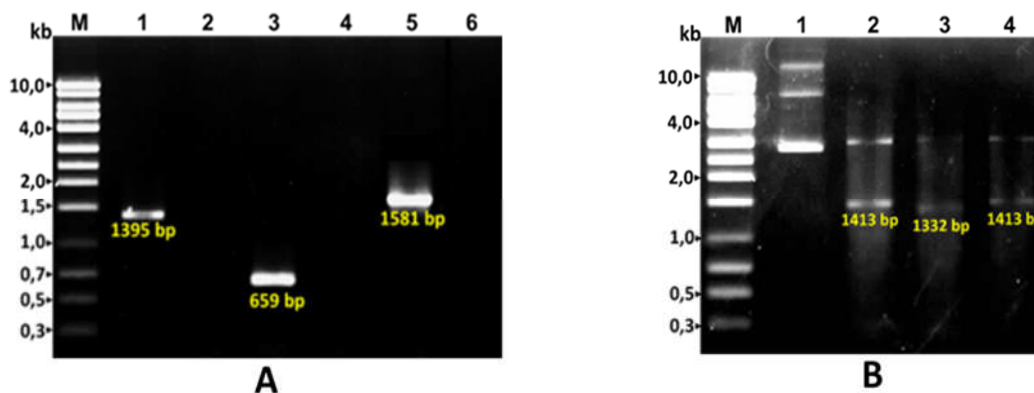
Sản phẩm PCR promoter *SW14-BT* sau khi tinh sạch được nhân dòng trực tiếp vào pGEM-T. Đoạn promoter *SW14-BT* được phân lập bằng phản ứng PCR có sử dụng *Taq* DNA polymerase nên sản phẩm PCR sau khi tinh sạch là các đoạn DNA có một đầu A, do đó có thể nhân dòng trực tiếp vào vector nhân dòng pGEM-T mạch thẳng (Phụ lục 5) có đầu T theo quy trình được cung cấp trong bộ kit *pGEM®-T Vector System II* của hãng Promega để tạo ra vector tái tổ hợp pGEM/SW14-BT.

Trong nghiên cứu này, sản phẩm của phản ứng ghép nối được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt và được nuôi cấy trên môi trường LB (mục 2.3.1.10). Khuẩn lạc màu trắng là các khuẩn lạc được dự đoán là có chứa plasmid tái tổ hợp. Vì vậy, để xác định chính xác khuẩn lạc mang *SW14-BT*, chúng tôi đã tiến hành PCR trực tiếp các khuẩn lạc này với cặp mồi SW14-F/SW14-R, khuẩn lạc dương tính được tiếp tục nuôi cấy để tách chiết plasmid. Sự có mặt của đoạn *SW14-BT* trong plasmid tái tổ hợp được kiểm tra bằng phương pháp PCR và cắt bằng enzyme cắt giới hạn (Hình 3.13B).

Thí nghiệm PCR kiểm tra plasmid tái tổ hợp được thực hiện với ba cặp mồi: cặp mồi nhân bản promoter *OsSWEET14* với kích thước đầy đủ và một phần lần

lượt là SW14-Fw/SW14-Rv (1395 bp) và SW14-t-Fw/SW14-t-Rv (659 bp), và cặp mồi đặc hiệu của vector pGEM-T (T7-Pro/SP6-Pro) nhân bản đoạn trình tự chứa vị trí chèn DNA đích (Hình 2.3).

Kết quả kiểm tra pGEM/SW14-BT bằng PCR (Hình 3.13A) thu được các băng DNA đặc hiệu có kích thước lần lượt khoảng 1,4 kb (kích thước đầy đủ của *SW14-BT*), 0,66 kb (một phần trình tự *SW14-BT*) và 1,6 kb (phần trình tự từ vị trí T7 đến SP6 trên vector pGEM-T sau khi đã có *SW14-BT* được chèn vào) (Hình 3.13A, giếng 1, 3 và 5). Các sản phẩm PCR này đều có kích thước phù hợp với kích thước tính toán lý thuyết của đoạn DNA cần nhân bản.



Hình 3.13 Kiểm tra vector pGEM/SW14-BT

Ghi chú: Sản phẩm PCR và cắt giới hạn được điện di trên gel agarose 1%. (A) PCR pGEM/SW14-BT; giếng 1, 3 và 5: khuôn là pGEM/SW14-BT; giếng 2, 4 và 6: đối chứng âm (không có DNA khuôn); giếng 1 và 2: PCR với cặp mồi SW14-Fw/SW14-Rv; giếng 3 và 4: PCR với cặp mồi SW14-t-Fw/SW14-t-Rv; giếng 5 và 6: PCR với cặp mồi T7-Pro/SP6-Pro. (B) Cắt giới hạn pGEM/SW14-BT; giếng 1: pGEM/SW14-BT nguyên bản, giếng 2: sản phẩm cắt bằng *NdeI*, giếng 3: sản phẩm cắt bằng *NdeI/BglII*, giếng 4: sản phẩm cắt bằng *EcoRI*. Giếng M: thang chuẩn DNA 1 kb (*iNtRoN*).

Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn plasmid tái tổ hợp bằng *NdeI* (có 1 vị trí nhận biết ở Nu thứ 6-11 trên promoter *SW14-BT* và 1 vị trí khác trên vector pGEM-T) hay *EcoRI* (đoạn DNA được chèn vào giữa hai vị trí nhận biết của *EcoRI* trên vector pGEM-T) đều cho hai băng DNA có kích thước lần lượt khoảng 3,0 kb tương ứng với bộ khung vector pGEM-T và 1,4 kb tương ứng với đoạn promoter *SW14-BT* đúng như tính toán lý thuyết (Hình 3.13B, giếng 2 và 4). Ngoài ra, sản

phẩm cắt giới hạn đồng thời bằng *NdeI* và *BglIII* (có 1 vị trí nhận biết ở Nu thứ 1331-1336 trên *SW14-BT*) cũng thu được các băng DNA đúng với tính toán theo lý thuyết, trong đó đoạn *SW14-BT* bị cắt thành 2 mảnh có kích thước khoảng 1,3 kb và 0,1 kb (Hình 3.13B, giếng 3). Các kết quả thu được này cho phép khẳng định chắc chắn hơn việc nhân dòng thành công *OsSWEET14* vào pGEM-T.

Như vậy, trong nghiên cứu này, đoạn DNA nằm từ vị trí [-1343] đến [+52] so với bộ ba mã mở đầu (ATG) của *OsSWEET14* đã được nhân bản từ DNA tổng số của giống lúa BT7 và dòng hóa vào vector pGEM-T. Sản phẩm nhân dòng là nguồn nguyên liệu cho toàn bộ các thí nghiệm phân tích đặc điểm chức năng của *SW14-BT* nhằm xác định vai trò của gen *OsSWEET14* đối với tính miễn cảm bệnh bạc lá của giống lúa BT7.

3.2.1.5. Giải trình tự *SW14-BT*

Để khẳng định đoạn DNA đã phân lập và nhân dòng chính là *SW14-BT*, vector tái tổ hợp pGEM/SW14-BT đã được giải trình tự đầy đủ bằng thiết bị giải trình tự nucleotide tự động ABI3100 và phân tích bằng phần mềm BioEdit. Đối chiếu với các trình tự của promoter đã được công bố trên ngân hàng gen, kết quả cho thấy trình tự Nu của đoạn DNA đã nhân dòng (Phụ lục 6) giống 99,4% so với trình tự DNA tương đồng (*OsSWEET14*) trong hệ gen của lúa Japonica (giống Niponbare, mã số AP014967.1) và giống 99,9% so với trình tự DNA tương đồng (*OsSWEET14*) trong hệ gen của lúa Indica (giống RP Bio-226, mã số CP012619.1) (Hình 3.14).

Phân tích chi tiết trình tự đoạn DNA đích trong vector tái tổ hợp pGEM/SW14-BT cho thấy đoạn DNA *SW14-BT* phân lập được từ giống lúa BT7 là có chiều dài 1395 bp (đúng với dự kiến ban đầu khi thiết kế môi), bao gồm vùng promoter của *OsSWEET14* dài 1343 bp và đoạn exon I của *OsSWEET14* dài 52 bp. Trên đoạn promoter phân lập được có sự xuất hiện của trình tự hộp TATA ở vị trí Nu thứ 1084 của đoạn DNA (cách vị trí mã khởi đầu ATG 259 bp), đặc trưng cho vùng khởi động của gen. Đặc biệt, trên *SW14-BT* có chứa 4 trình tự DNA, bao gồm bao gồm CATGCATGTCAGCAGCTGGTCAT (nằm ở vị trí nucleotide 1025 - 1047, phía trước hộp TATA);

ATATAAACCCCTCCAACCAGGTGCTAAG (nằm từ nucleotide 1084-1112, chứa hộp TATA); TATAAACCCCTCCAACCAGGTGCTA (từ vị trí 1085-1110, chứa hộp TATA) và TAAGCTCATCAAGCCTTCA (từ vị trí 1109 – 1127, phía sau hộp TATA) (Hình 3.15), giống 100% so với trình tự của các EBE có trên promoter *SWEET14* ở các giống lúa khác đã được công bố, lần lượt là *TalC*, *AvrXa7*, *PthXo3* và *Tal5/TalF* [34]. Nhiều nghiên cứu trước đây đã chứng minh 4 EBE này được nhận biết bởi 4 protein TAL *AvrXa7*, *PthXo3*, *Tal5* và *TalC* của vi khuẩn *Xoo*, thông qua đó hoạt hóa sự biểu hiện của *OsSWEET14* [31, 107, 150]. Vì vậy, những trình tự này cũng có thể là đích tác động của hệ protein TAL do các chủng VXO hoạt hóa *SW14-BT* và gây ra bệnh bạc lá trên giống lúa BT7.

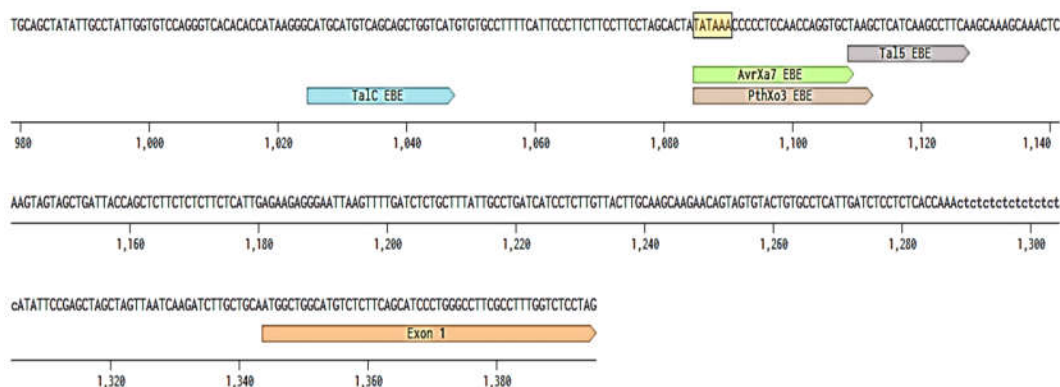
```

SW14-BT7      781: CCAACTCTAGATCCCTTAACTAGGACAACCTGGAGTACACAACAATGTTACTAATCCCAT 840
SW14-Indica   781: CCAACTCTAGATCCCTTAACTAGGACAACCTGGAGTACACAACAATGTTACTAATCCCAT 840
SW14-Japonica 781: CCAACTCTAGATCCCTTAACTAGGACAACCTGGAGTACACAACAATGTTACTAATCCCAT 840
      *****
SW14-BT7      841: GCATTGAGGACAGAGTTGTGAAGGAAACAAAAAAGCTAGCAGATTGGCACTTTCTGTGTC 900
SW14-Indica   841: GCATTGAGGACAGAGTTGTGAAGGAAACAAAAAAGCTAGCAGATTGGCACTTTCTGTGTC 900
SW14-Japonica 841: GCATTGAGGACAGAGTTATGAAGGAAACAAAAAAGCTAGCAGATTGGCACTTTCTGTGTC 900
      *****
SW14-BT7      901: ATGCATGGGTGCTGATGATTATCTTGTATCTAATTTAATCAATCCCATGGCTGTGATTGA 960
SW14-Indica   901: ATGCATGGGTGCTGATGATTATCTTGTATCTAATTTAATCAATCCCATGGCTGTGATTGA 960
SW14-Japonica 901: ATGCATGGGTGCTGATGATTATCTTGTATCTAATTTAATCAATCCCATGGCTGTGATTGA 960
      *****
SW14-BT7      961: TCAGGAATAGTTTGTGTGTGCAGCTATATTGCCTATTGGTGTCAGGGTACACACCATA 1020
SW14-Indica   961: TCAGGAATAGTTTGTGTGTGCAGCTATATTGCCTATTGGTGTCAGGGTACACACCATA 1020
SW14-Japonica 961: TCAGGAATAGTTTGTGTGTGCAGCTATATTGCCTATTGGTGTCAGGGTACACACCATA 1020
      *****
SW14-BT7      1021: AGGCATGCATGTCAGCAGCTGGTCATGTGTGCCTTTTCATTCCTTCTTCCTTCTTAGC 1080
SW14-Indica   1021: AGGCATGCATGTCAGCAGCTGGTCATGTGTGCCTTTTCATTCCTTCTTCCTTCTTAGC 1080
SW14-Japonica 1021: AGGCATGCATGTCAGCAGCTGGTCATGTGTGCCTTTTCATTCCTTCTTCCTTCTTAGC 1080
      *****
SW14-BT7      1081: ACTATATAAACCCCTCCAACCAGGTGCTAAGCTCATCAA-GCCTTCAAGCAAAGCAAAC 1139
SW14-Indica   1081: ACTATATAAACCCCTCCAACCAGGTGCTAAGCTCATCAA-GCCTTCAAGCAAAGCAAAC 1140
SW14-Japonica 1081: ACTATATAAACCCCTCCAACCAGGTGCTAAGCTCATCAA-GCCTTCAAGCAAAGCAAAC 1139
      *****
SW14-BT7      1140: TCAAGTAGTAGCTGATTACCAGCTCTTCTCTTCTCATTGAGAAGAGGGAATTAAGTTT 1199
SW14-Indica   1141: TCAAGTAGTAGCTGATTACCAGCTCTTCTCTTCTCATTGAGAAGAGGGAATTAAGTTT 1200
SW14-Japonica 1140: TCAAGTAGTAGCTGATTACCAGCTCTTCTCTTCTCATTGAGAAGAGGGAATTAAGTTT 1199
      *****

```

Hình 3.14 So sánh trình tự nucleotide promoter *OsSWEET14*

Ghi chú: Trình tự nucleotide promoter *OsSWEET14* của giống lúa BT7 được so sánh với giống lúa Japonica Niponbare (*SW14-Japonica*) (AP014967.1) và giống lúa Indica RP Bio-226 (*SW14-Indica*) (CP012619.1). Dấu sao (*) thể hiện vị trí nucleotide giống nhau; dấu chấm (.) thể hiện vị trí nucleotide khác nhau.



Hình 3.15 Phân tích trình tự *SW14-BT*

Ghi chú: Hộp TATA (TATA box) được đóng khung. Vị trí các EBE (*AvrXa7*, *Tal5*, *PthXo3* và *TalC*) và Exon I được đánh dấu bằng mũi tên.

Cho đến nay, các gen thuộc nhóm III của họ gen *SWEET* (*OsSWEET11*, *OsSWEET13* và *OsSWEET14*) đã được xác định là các gen “nhiễm” đối với bệnh bạc lá lúa [107]. Trên vùng promoter của các gen này đều được chứng minh có chứa vị trí nhận biết của một số protein TAL do *Xoo* tiết ra. Ở giống lúa Kitake và IR24, *OsSWEET11* và *OsSWEET13* được hoạt hoá lần lượt bởi protein TAL *PthXo1* và *PthXo2* [147], trong khi *OsSWEET14* có thể cảm ứng biểu hiện với sự xâm nhiễm của chủng *Xoo* mang gen mã hoá protein TAL *AvrXa7* hay *PthXo3* [31]. Hơn nữa Yu *et al.* đã chứng minh trên vùng promoter *OsSWEET14* của lúa Niponbare còn mang vị trí nhận biết của 2 protein TAL khác là *Tal5* và *TalC* [150]. Trong nghiên cứu này, *SW14-BT* của giống lúa BT7 đã được phát hiện có chứa đồng thời cả 4 yếu tố *cis* (EBE - effector binding element) liên kết đặc hiệu với 4 protein TAL *AvrXa7*, *PthXo3*, *Tal5* và *TalC*. Tuy nhiên, theo các công bố về phân tích hệ gen của các quần thể *Xoo* khác nhau trên thế giới cho thấy quần thể *Xoo* châu Á chủ yếu mang gen mã hóa *AvrXa7* và *PthXo3*, trong khi quần thể *Xoo* châu Phi có xu hướng mang gen mã hóa *TalC* và *Tal5* [31, 61, 107]. Chính vì vậy, hai EBE *AvrXa7* và *PthXo3* được dự đoán là đích tác động chính, có vai trò quan trọng đối với quá trình hoạt hóa *OsSWEET14* của các chủng VXO khi xâm nhiễm vào giống lúa BT7.

Như vậy, với thực tế các chủng VXO có độc tính mạnh (gây bệnh bạc lá) trên lúa BT7 (mục 3.2), có khả năng hoạt hóa sự biểu hiện *OsSWEET14* khi xâm

nhiễm vào lúa BT7 (mục 3.2.1.2) và *SW14-BT* có chứa 4 EBE (*AvrXa7*, *PthXo3*, *Tal5* và *TalC*), trong đó 2 EBE được nhận biết bởi 2 protein TAL *AvrXa7*, *PthXo3* đặc trưng ở các chủng *Xoo* châu Á (Hình 3.15), đã chỉ ra rằng *OsSWEET14* có thể là một gen “nhiễm” quan trọng đối với độc tính của các chủng VXO trên lúa BT7. Hơn nữa, trên cơ sở các công bố trước đây về đa dạng vùng gen *tal* của vi khuẩn *Xoo*, cùng với các nghiên cứu chỉnh sửa gen kháng bệnh bạc lá lúa của các tác giả khác [107], vị trí của hai EBE *AvrXa7* và *PthXo3* (chồng lấp nhau) được xác định là mục tiêu chính cần chỉnh sửa trên *SW14-BT* để cải tiến khả năng kháng bệnh bạc lá cho giống lúa chủ lực BT7 bằng công cụ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9..

3.2.2 Thiết kế cấu trúc T-DNA chỉnh sửa SW14-BT

3.2.2.1. Xác định trình tự sgRNA chỉnh sửa SW14-BT

Theo các kết quả nghiên cứu cơ chế phân tử quá trình xâm nhiễm của VXO ở trên, EBE *AvrXa7* và *PthXo3* đã được xác định là mục tiêu chính để chỉnh sửa trên *SW14-BT*. Tuy nhiên, do 3 EBE *AvrXa7*, *PthXo3* và *Tal5* có phần trình tự nằm chồng lấp lên nhau (Hình 3.15) nên để tăng hiệu quả chỉnh sửa gen cải tiến tính kháng bạc lá cho giống lúa BT7, vùng trình tự DNA trên *SW14-BT* có chứa cả 3 EBE (*AvrXa7*, *PthXo3* và *Tal5*) đã được lựa chọn để thiết kế sgRNA cho phức hệ CRISPR/Cas9.

Tính đặc hiệu của phức hệ CRISPR/Cas9 được quyết định bởi đoạn trình tự dài ~20 nucleotide (crRNA) trên phân tử sgRNA [38]. Việc thiết kế trình tự crRNA sẽ quyết định hiệu quả hoạt động của phức hệ CRISPR/Cas9. Cho đến nay, rất nhiều công cụ tin sinh khác nhau, bao gồm cả CRISPR-P 2.0, có thể sử dụng để thiết kế trình tự sgRNA có khả năng hoạt động hiệu quả và đặc hiệu phục vụ các nghiên cứu chỉnh sửa gen bằng CRISPR/Cas9. Công cụ này đã được cập nhật hệ gen chất lượng cao của hơn 50 loài thực vật, chủ yếu là các loại cây nông nghiệp chính như lúa, ngô, lúa mì, bông...), cho kết quả phân tích đánh giá các sgRNA ứng viên dựa trên tỉ lệ GC, khả năng hình thành cấu trúc bậc II thích hợp, hiệu quả hoạt động và tính đặc hiệu của cấu trúc chỉnh sửa [93]. Sự thành công của nhiều nghiên cứu chỉnh sửa gen thực vật trước đây đã chứng minh tính hiệu quả của công cụ này [93, 94]. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, công cụ CRISPR-P 2.0 cũng

đã được lựa chọn để thiết kế trình tự crRNA trong phân tử sgRNA của phức hệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa *SW14-BT*.

Bảng công cụ CRISPR-P 2.0, 9 trình tự crRNA đã được xác định để tạo đột biến định hướng trên *SW14-BT*, trong đó 8 trình tự crRNA (crRNA-2 → crRNA-9) có thể tạo điểm cắt tác động đến cả ba trình tự EBE *AvrXa7*, *PthXo3* và *Tal5*, và 1 trình tự (crRNA-1) có thể tạo điểm cắt trên 2 EBE *AvrXa7* và *PthXo3* (Bảng 3.8).

Bảng 3.8 Trình tự và đặc điểm các sgRNA ứng viên chỉnh sửa *SW14-BT*

Tên	Trình tự crRNA (5'-3')	% GC	TBP	CBP	IBP	DSL	Đích tác động
crRNA-1	AGGGGGTTTATATAGTGCT	45	9	7	0	SL1	<i>AvrXa7</i> , <i>PthXo3</i>
crRNA-2	TATATAAACCCCTCCAACC	45	0	0	0	*	<i>AvrXa7</i> , <i>PthXo3</i> , <i>Tal5</i>
crRNA-3	GCTTAGCACCTGGTTGGAGG	60	8	6	2	SL1	<i>AvrXa7</i> , <i>PthXo3</i> , <i>Tal5</i>
crRNA-4	AGCTTAGCACCTGGTTGGAG	55	8	6	2	SL1	<i>AvrXa7</i> , <i>PthXo3</i> , <i>Tal5</i>
crRNA-5	GAGCTTAGCACCTGGTTGGA	55	8	6	2	SL1	<i>AvrXa7</i> , <i>PthXo3</i> , <i>Tal5</i>
crRNA-6	TGAGCTTAGCACCTGGTTGG	55	8	6	2	SL1	<i>AvrXa7</i> , <i>PthXo3</i> , <i>Tal5</i>
crRNA-7	TGATGAGCTTAGCACCTGGT	50	12	6	0	SL1	<i>AvrXa7</i> , <i>PthXo3</i> , <i>Tal5</i>
crRNA-8	GGCTTGATGAGCTTAGCACC	55	9	4	5	SL1	<i>AvrXa7</i> , <i>PthXo3</i> , <i>Tal5</i>
crRNA-9	CTTGAGTTTGCTTTGCTTGA	40	7	4	0	SL1	<i>AvrXa7</i> , <i>PthXo3</i> , <i>Tal5</i>

Ghi chú: TBP) tổng số cặp Nu; (CBP) số cặp Nu liên tục; (IBP) số cặp Nu trong cấu trúc của crRNA; (DSL) vòng loop bị phá vỡ cấu trúc; (RAR) Stem loop Repeat and Anti-repeat Region, (SL1, 2, 3) Stem loop 1, 2, 3; (*) không ảnh hưởng đến cấu trúc vòng loop; (*TalC*, *AvrXa7*, *PthXo3*, *Tal5*)

Phức hệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 muốn hoạt động hiệu quả và đặc hiệu trong nhân tế bào, phân tử sgRNA phải đảm bảo các đặc điểm sau: có số lượng GC trong vùng crRNA từ 30-80%, có cấu trúc bậc II ổn định (vòng loop RAR, SL2 và SL3 được duy trì), tổng số cặp Nu (TBP-total base pairs) < 13, số cặp Nu liên tục (CBP-consecutive base pairs) < 8 và số cặp Nu bên trong cấu trúc crRNA (IBP-internal base pairs) < 7 [91]. Kết quả phân tích bằng phần mềm Mfold 2.3 cho thấy

chỉ có sgRNA chứa crRNA-2 có thể duy trì được tất cả các cấu trúc vòng loop đặc trưng (RAR, SL1, SL2 và SL3), trong khi các phân tử sgRNA chứa các trình tự crRNA ứng viên còn lại đều bị phá vỡ 1 vòng loop (SL1) (Hình 3.16, Bảng 3.8). Tuy nhiên, Liang G. *et al.* (2016) đã chứng minh việc mất cấu trúc vòng loop SL1 trong cấu trúc bậc II của phân tử sgRNA không gây ảnh hưởng tới khả năng hoạt động của phức hệ CRISPR/Cas9 [91]. Vì vậy, tất cả các trình tự crRNA thu được đều có thể sử dụng cho phức hệ CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa 3 trình tự EBE (*AvrXa7*, *PthXo3* và *Tal5*) trên *SW14-BT* ở giống lúa BT7.

Để đồng thời đảm bảo hiệu quả hoạt động cao và giảm thiểu khả năng xảy ra hiện tượng chỉnh sửa sai vị trí của phức hệ CRISPR/Cas9 sau này, 9 crRNA tiếp tục được phân tích chỉ số “on-target” (khả năng hoạt động hiệu quả) và “off-target” (khả năng gây đột biến sai vị trí) bằng công cụ CRISPR trong phần mềm Benchling (Bảng 3.9). Ba crRNA có tổng điểm “on-target” và “off-target” cao nhất (> 100 điểm), bao gồm crRNA-2, crRNA-4 và crRNA-8 đã được lựa chọn cho bước phân tích tiếp theo.

Bảng 3.9 Phân tích hiệu quả hoạt động của sgRNA mang các crRNA ứng viên chỉnh sửa *SW14-BT*

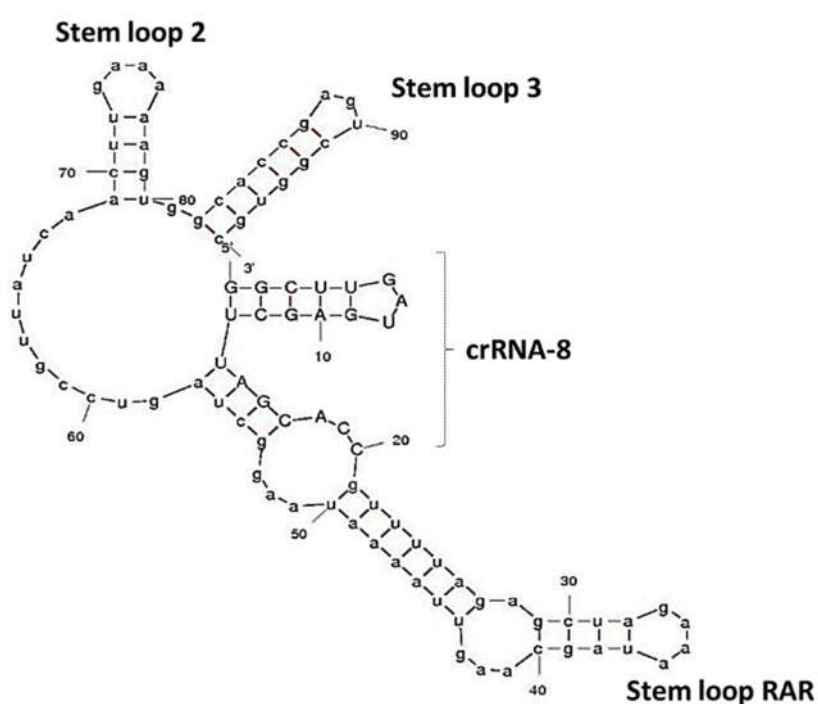
Tên	Đích tác động	On-target ¹	Off-target ²	Tổng
crRNA-1	<i>AvrXa7</i> , <i>PthXo3</i>	51,5	39,8	91,3
crRNA-2	<i>AvrXa7</i> , <i>PthXo3</i> , <i>Tal5</i>	57,1	49,2	106,3
crRNA-3	<i>AvrXa7</i> , <i>PthXo3</i> , <i>Tal5</i>	50,6	48,1	98,7
crRNA-4	<i>AvrXa7</i> , <i>PthXo3</i> , <i>Tal5</i>	51,9	48,7	100,6
crRNA-5	<i>AvrXa7</i> , <i>PthXo3</i> , <i>Tal5</i>	50,3	49	99,3
crRNA-6	<i>AvrXa7</i> , <i>PthXo3</i> , <i>Tal5</i>	40,3	48,6	88,9
crRNA-7	<i>AvrXa7</i> , <i>PthXo3</i> , <i>Tal5</i>	48,4	49,6	98
crRNA-8	<i>AvrXa7</i> , <i>PthXo3</i> , <i>Tal5</i>	57,9	48,4	106,3
crRNA-9	<i>AvrXa7</i> , <i>PthXo3</i> , <i>Tal5</i>	27,8	46,1	73,9

Ghi chú: ¹Điểm dự đoán khả năng hoạt động hiệu quả của sgRNA (từ 0 – 100); ²(Off target) Điểm dự đoán tính đặc hiệu của sgRNA (từ 0 – 100).

Bảng 3.10 Trình tự DNA trong hệ gen lúa tương đồng với crRNA

Tên	Trình tự DNA tương đồng	Vị trí	Khoảng cách (Nu)*	Mã số
crRNA-2	AATATTTA[CTCCCTCCAACC]	-	5059	EPIOSAG00000012214
crRNA-4	TGGTTAGT[ACCTGGGTGGAG]	E	0	Os11g0140300
crRNA-8	GCGACGAT[GAGCTTAGCACC]	-	990	Os07g0298900

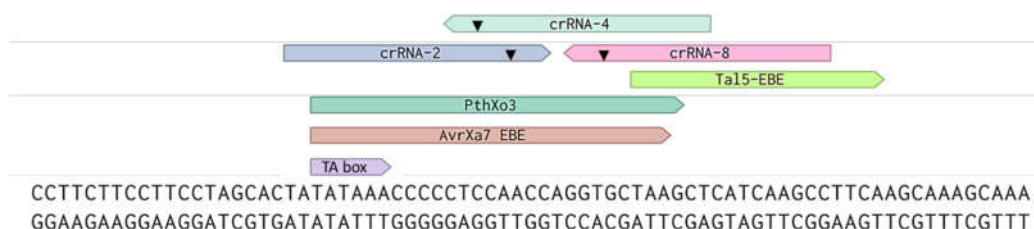
Ghi chú: Chữ trong ngoặc thể hiện trình tự tương đồng với vùng lõi (12 Nu) của crRNA; chữ in đậm thể hiện vị trí sai khác so với vị trí Nu tương ứng trên crRNA. *Khoảng cách từ trình tự DNA tương đồng với crRNA đến vùng mang trình tự mã hóa (coding sequence) gần nhất trong hệ gen.

**Hình 3.16 Cấu trúc bậc II của sgRNA chứa crRNA-8**

Ghi chú: Mô hình cấu trúc bậc II được dự đoán bằng phần mềm Mfold 2.3 mang trình tự crRNA-8 và các cấu trúc vòng loop: Stem loop RAR (repeat and anti-repeat region), Stem loop 2 và Stem loop 3.

Tiếp theo, trình tự và vị trí chính xác của các đoạn DNA tương đồng với 3 crRNA (crRNA-2, crRNA-4 và crRNA-8) có trong hệ gen lúa tiếp tục được xác định bằng phần mềm CCTop (Bảng 3.10). Kết quả phân tích cho thấy, crRNA-2 và crRNA-8 có một trình tự DNA tương đồng trong hệ gen lúa không nằm trên vùng gen mã hóa; trong khi crRNA-4 có trình tự DNA tương đồng nằm trên vùng

mã hóa (exon) của một gen mã hóa protein chưa biết chức năng - được dự đoán là có khả năng gây ảnh hưởng đến hoạt động chức năng của tế bào nếu xảy ra đột biến sai vị trí mong muốn. Hơn nữa, khi so sánh tương quan vị trí tạo DSB, phức hệ CRISPR/Cas9 chứa crRNA-2 tạo DSB cách xa *Tal5* hơn so với phức hệ CRISPR/Cas9 chứa crRNA-8, nên được dự đoán là ít có khả năng gây đột biến đồng thời 3 EBE *AvrXa7*, *PthXo3* và *Tal5* (Hình 3.17). Do đó, crRNA-8 đã được lựa chọn để thiết kế cấu trúc CRISPR/Cas9 chỉnh sửa gen mục tiêu.



Hình 3.17 Vị trí nhận biết của crRNA trên *SW14-BT*

Ghi chú: Mũi tên thể hiện vị trí tạo DSB của phức hệ CRISPR/Cas9 chứa crRNA ứng viên.

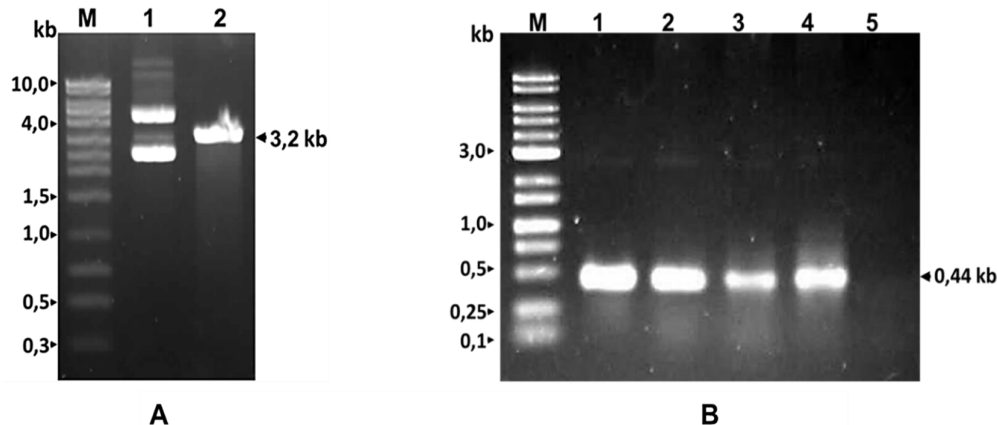
Như vậy, tổng hợp các kết quả phân tích dự đoán đặc điểm cấu trúc bậc II khả năng hoạt động hiệu quả, tính đặc hiệu và khả năng gây đột biến chính xác trên đồng thời 3 EBE *AvrXa7*, *PthXo3* và *Tal5* của các sgRNA, trình tự crRNA-8 (Hình 3.16, Hình 3.17, Bảng 3.9, Bảng 3.10) đã được lựa chọn cho thí nghiệm thiết kế cấu trúc vector CRISPR/Cas9 gây đột biến *SW14-BT* theo cơ chế NHEJ.

3.2.2.2. Thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa *SW14-BT*

Trong nghiên cứu này, vector pENTR4-gRNA mang cấu trúc biểu hiện RNA đã được sử dụng cho mục đích thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa *SW14-BT*. Vector pENTR4-gRNA được tạo ra từ khung vector thương mại pENTR4 (Invitrogen, Phụ lục 5) đã được thay thế vùng gen chọn lọc (*ccdB* và *ChlR*) bằng cấu trúc chứa promoter *U6*, spacer mang 2 vị trí nhận biết của *BsaI* (để chèn crRNA), trình tự mã hóa tracrRNA và vùng kết thúc phiên mã (terminator) (Hình 2.4).

Để thuận tiện cho việc ghép nối trình tự crRNA vào cấu trúc biểu hiện sgRNA, trình tự nucleotide sợi đôi của crRNA-8 (Bảng 3.8) đã được bổ sung thêm 4 nucleotide GTGT và AAAC lần lượt vào 2 đầu 5' của trình tự gốc để tạo mảnh

DNA có đầu dính bổ sung với trình tự của promoter *U6* và *tracRNA* trên vector pENTR4-gRNA (đặt tên là *gRNA-SW14*). Vector pENTR4-gRNA được xử lý với *BsaI*; kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn trên gel agarose 1% thu được một băng DNA 3,2 kb duy nhất tương ứng với kích thước vector mạch thẳng (Hình 3.18A, giếng 2). Mảnh DNA 3,2 kb sau khi tinh sạch và được tiếp tục ghép nối với *gRNA-SW14* bằng T4-DNA ligase và biến nạp vào vi khuẩn *E. coli*. Bằng phương pháp PCR trực tiếp khuẩn lạc với cặp mồi pEN-F/gRNA-SW14-R (Hình 2.4, Phụ lục 4), các khuẩn lạc dương tính có kết quả PCR xuất hiện băng DNA xấp xỉ 0,44 kb đã được xác định (Hình 3.18B, giếng 1 - 4); điều này chứng tỏ các thể biến nạp có thể đã mang vector pENTR4-gRNA tái tổ hợp.



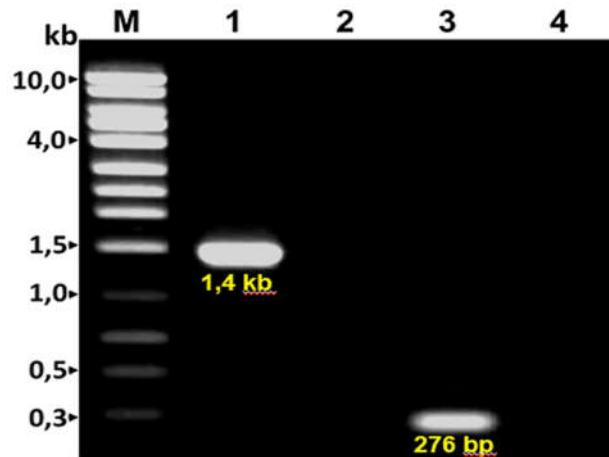
Hình 3.18 Ghép nối *gRNA-SW14* vào vector pENTR4-gRNA

Ghi chú: Sản phẩm PCR và cắt giới hạn được điện di trên gel agarose 1%. (A) Cắt giới hạn pENTR4-gRNA bằng *BsaI*; giếng 1: vector nguyên bản, giếng 2: sản phẩm cắt giới hạn. (B) PCR kiểm tra khuẩn lạc bằng cặp mồi pEN-F/gRNA-SW14-R; giếng 1 – 4: khuẩn lạc được biến nạp sản phẩm ghép nối DNA; giếng 5: đối chứng âm (khuôn là khuẩn lạc không được biến nạp DNA).

Plasmid được tách chiết từ một khuẩn lạc dương tính và đã được kiểm tra bằng PCR với hai cặp mồi pEN-F/pEN-R và U6-F/gRNA-SW14-R (Hình 2.4, Phụ lục 4). Kết quả điện di trên gel agarose 1% cho thấy sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu cho vector pENTR4-gRNA (pEN-F/pEN-R) và cặp mồi đặc hiệu cho cấu trúc biểu hiện *gRNA-SW14* (U6-F/gRNA-SW14-R) thu được các băng DNA có kích thước lần lượt khoảng 1,4 kb (Hình 3.19, giếng 1) và 0,28 kb (Hình 3.19, giếng 3) phù hợp với kích thước lý thuyết. Ngược lại, các thí nghiệm đối chứng

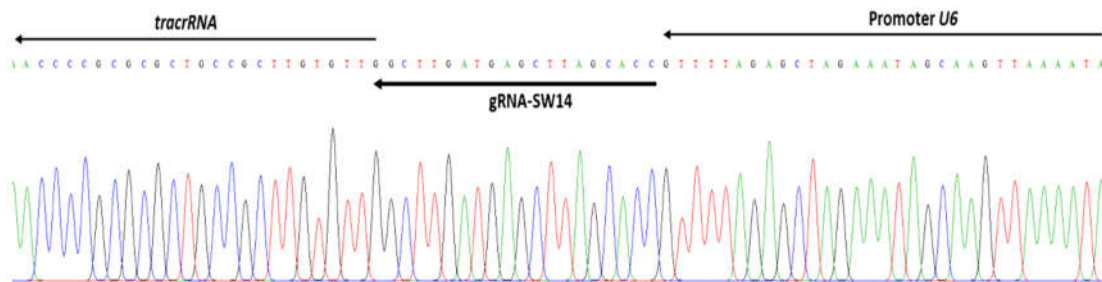
âm không thu được các băng DNA này (Hình 3.19, giếng 2 và 4). Như vậy, plasmid tái tổ hợp thu được đúng là vector pENTR4/gRNA có mang trình tự *gRNA-SW14* (đặt tên là pENTR4/gRNA-SW14) mục tiêu.

Để khẳng định chính xác sự có mặt của trình tự crRNA đích trong pENTR4-gRNA, vector tái tổ hợp đã được giải trình tự nucleotide bằng môi đặc hiệu của vector pENTR4-gRNA. Kết quả phân tích trình tự (Hình 3.20) chứng tỏ trình tự crRNA đích (*gRNA-SW14*) đã được chèn chính xác vào giữa *tracrRNA* và promoter *U6* trong cấu trúc biểu hiện sgRNA trên pENTR4-gRNA và không xảy ra đột biến không mong muốn.



Hình 3.19 Kiểm tra vector tái tổ hợp pENTR4/gRNA-SW14

Ghi chú: Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%; giếng 1 và 3: khuôn là vector tái tổ hợp; giếng 2 và 4: đối chứng âm (không có DNA khuôn); giếng 1 và 2: PCR với cặp môi pEN-F/pEN-R; giếng 3 và 4: PCR với cặp môi U6-F/gRNA-SW14-R.



Hình 3.20 Giải trình trình tự pENTR4/gRNA-SW14

Ghi chú: Một phần vector pENTR4/gRNA-SW14 được giải trình tự nucleotide bằng môi Ter-R.

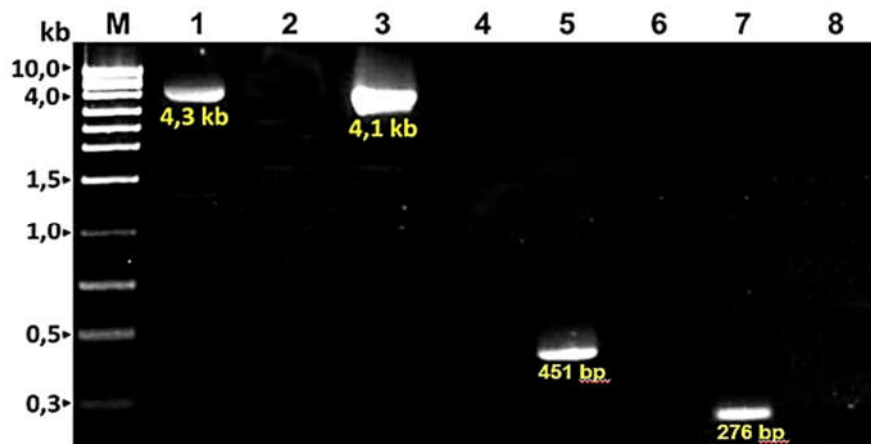
Như vậy, vector mang cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa *SW14-BT* đã được thiết kế thành công và được bảo quản để phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.2.3. Thiết kế cấu trúc T-DNA chỉnh sửa *SW14-BT*

Kỹ thuật nhân dòng Gateway được sử dụng phổ biến trong các thí nghiệm thiết kế vector biểu hiện do có khả năng chuyển các đoạn DNA kích thước lớn giữa các vector nhân dòng khác nhau. Hơn nữa, promoter *Ubiquitin* của ngô đã được chứng minh là có khả năng hoạt động cao gấp nhiều lần các loại promoter hoạt động liên tục khác trong tế bào thực vật, đặc biệt là lúa [108]. Vì vậy, trong nghiên cứu này cấu trúc biểu hiện sgRNA (đã thiết kế ở trên) đã được ghép nối vào vector nhị phân pCas9 có chứa cấu trúc biểu hiện protein Cas9 được điều khiển bởi promoter *Ubiquitin* (có nguồn gốc từ ngô) thông qua hệ thống "Gateway" (Hình 2.5).

Để tạo cấu trúc T-DNA hoàn chỉnh biểu hiện phức hệ Cas9/sgRNA chỉnh sửa *SW14-BT*, cấu trúc [*U6::gRNA-SW14*] trên vector pENTR4/gRNA-SW14 (nằm giữa 2 trình tự nhận biết *attL1* và *attL2* của clonase LR) (Hình 2.3) đã được ghép nối tiếp với cấu trúc [*Ubiquitin:Cas9:Nos*] trên pCas9 (mang 2 trình tự nhận biết *attR1* và *attR2* của clonase LR ở hai phía của gen chọn lọc *ccdB/CmR*) (Hình 2.5). Sản phẩm phản ứng Gateway được biến nạp vào *E. coli* và sàng lọc bằng phương pháp PCR trực tiếp khuẩn lạc. Plasmid tái tổ hợp sau đó được tách chiết từ một khuẩn lạc dương tính và được kiểm tra bằng PCR với các cặp mồi khác nhau: cặp mồi đặc hiệu cho cấu trúc biểu hiện protein [*Ubiquitin::Nos*] (Ubi-F/NOS-R), cặp mồi đặc hiệu cho *Cas9* (Cas9-F/Cas9-R), cặp mồi đặc hiệu cho cấu trúc biểu hiện sgRNA (U6-F/Ter-R) và cặp mồi đặc hiệu cho *gRNA-SW14* (U6-F/gRNA-SW14R) (Hình 2.3, Hình 2.5, Phụ lục 4).

Kết quả điện di trên gel agarose 1% cho thấy tất cả sản phẩm PCR từ khuôn là plasmid tái tổ hợp đều cho một băng DNA duy nhất, có kích thước lần lượt khoảng 4,3 kb, 4,1 kb, 0,45 kb và 0,28 kb (Hình 3.21, giếng 1, 3, 5 và 7); các kích thước này là phù hợp với kích thước tính toán lý thuyết của các đoạn DNA được nhân bản.



Hình 3.21 Kiểm tra vector pCas9/gRNA-SW14

Ghi chú: Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%; giếng 1, 3, 5, 5 và 7: khuôn là pCas9/gRNA-SW14; giếng 2, 4, 6 và 8: đối chứng âm (không có DNA khuôn); giếng 1 và 2: PCR với cặp mồi Ubi-F/NOS-R; giếng 3 và 4: PCR với cặp mồi Cas9-F/Cas9-R; giếng 5 và 6: PCR với cặp mồi U6-F/Ter-R; giếng 7 và 8: PCR với cặp mồi U6-F/gRNA-SW14-R; giếng M: thang chuẩn DNA 1,0 kb (iNtRoN).

Các kết quả này chứng tỏ plasmid tái tổ hợp pCas9/gRNA-SW14 thu được có mang đồng thời cấu trúc biểu hiện gen *Cas9* (điều khiển bởi promoter *Ubiquitin*) và cấu trúc biểu hiện *gRNA-SW14* (được điều khiển bởi promoter *U6*). Vector tái tổ hợp sau đó đã được giải trình tự nucleotide (2.3.1.12) để chứng minh quá trình tái tổ hợp chính xác của các cấu trúc DNA (Hình 3.22).



Hình 3.22 Cấu trúc vector pCas9/gRNA-SW14

Ghi chú: (LB) Biên trái; (RB) biên phải; (Ubi) promoter *Ubiquitin*; (35S) promoter 35S; (OsU6) promoter *OsU6*; (Hyg R) gen chọn lọc HPT kháng Hygromycin; (Ter) vùng kết thúc phiên mã; (NOS) vùng kết thúc phiên mã *Nopaline synthase*.

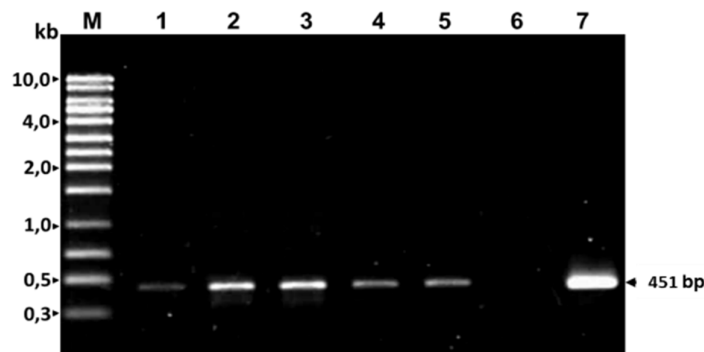
Trong các nghiên cứu tương tự, cấu trúc biểu hiện sgRNA có thể được thiết kế bằng nhiều phương thức khác nhau, trong đó phổ biến nhất là sử dụng kỹ thuật overlapping-PCR. Để biểu hiện phức hệ Cas9-sgRNA trong tế bào lúa, các tác giả thường thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA điều khiển bởi promoter *U3* hoặc *U6* và cấu trúc biểu hiện *Cas9* điều khiển bởi promoter *Ubiquitin* nằm trên cùng một hệ vector nhị phân nhằm thuận tiện cho bước biến nạp vào tế bào chủ. 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 [92, 95]. Trong nghiên cứu này, cấu trúc biểu hiện sgRNA điều khiển bởi promoter *U6* nhận biết đồng thời vị trí của 3 EBE (*Tal5*, *AvrXa7* và *PthXo3*) trên *SW14-BT7* đã được tạo ra bằng kỹ thuật ghép nối DNA sử dụng enzyme *BsaI* và clonase LR. Cấu trúc [*U6:gRNA-SW14*] đã được ghép nối vào pCas9 mang cấu trúc [*Ubiquitin:Cas9:NOS*] (biểu hiện protein Cas9) để tạo ra vector chuyển gen thực vật mang cấu trúc biểu hiện phức hệ protein-RNA chỉnh sửa *SW14-BT7* (Hình 3.22).

3.3 Tạo dòng lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT*

3.3.1 Tạo chủng *A. tumefaciens* mang cấu trúc T-DNA chỉnh sửa *SW14-BT*

Để tạo vật liệu phục vụ thí nghiệm chuyển gen vào lúa BT7, vector pCas9/gRNA-SW14 được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 bằng phương pháp sốc nhiệt. Thể biến nạp được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR trực tiếp khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu U6-F/Ter-R (Hình 2.3, Phụ lục 4). Kết quả điện di sản phẩm PCR từ 5 khuẩn lạc ngẫu nhiên trong số các khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường chọn lọc có bổ sung rifampicin 15 µg/mL và spectinomycin 50 µg/mL đều cho một băng DNA duy nhất (Hình 3.23, giếng 1 - 5) có kích thước khoảng 0,45 kb tương tự kết quả thí nghiệm PCR từ khuôn là pCas9/gRNA-SW14 (Hình 3.23, giếng 7). Điều này chứng tỏ cả 5 khuẩn lạc đều đã mang cấu trúc pCas9/gRNA-SW14.



Hình 3.23 PCR trực tiếp khuẩn lạc *A. tumefaciens* được biến nạp pCas9/gRNA-SW14

Ghi chú: Sản phẩm PCR trực tiếp khuẩn lạc *A. tumefaciens* với cặp mồi U6-F/Ter-R được điện di trên gel agarose 1%. Giếng M: thang chuẩn DNA 1 kb; giếng 1 - 5: khuôn là khuẩn lạc được biến nạp pCas9/gRNA-SW14; giếng 6: đối chứng âm (khuẩn lạc không được biến nạp DNA); giếng 7: đối chứng dương (khuôn là pCas9/gRNA-SW14).

Như vậy, kết quả nghiên cứu đã tạo được chủng *A. tumefaciens* mang cấu trúc T-DNA pCas9/gRNA-SW14 chỉnh sửa *SW14-BT*. Các khuẩn lạc mang pCas9/gRNA-SW14 được nuôi cấy và bảo quản ở -80°C. Một khuẩn lạc (thể biến nạp có kết quả PCR dương tính) được sử dụng cho thí nghiệm chuyển gen vào giống lúa BT7.

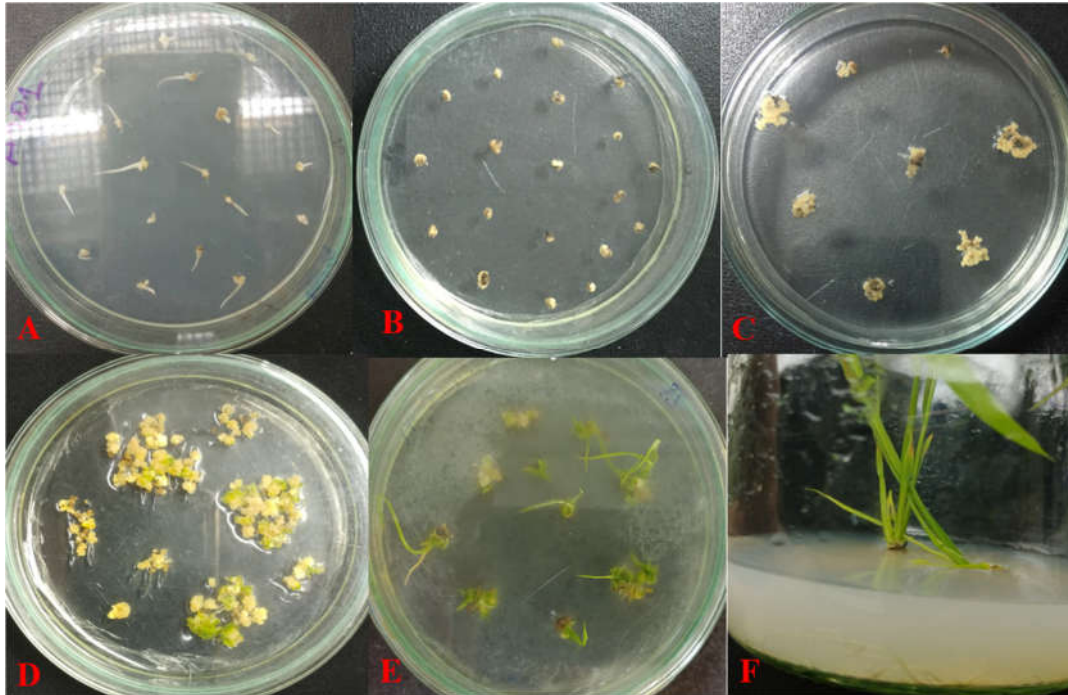
3.3.2 Chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa *SW14-BT* vào lúa BT7

Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang cấu trúc biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa *SW14-BT* được đồng nuôi cấy với IE (11-13 DAP) của lúa BT7 trên môi trường *in vitro* có bổ sung chất dẫn dụ Acetosyrigone 150 µg/L theo quy trình đã tối ưu (Hình 3.7). Thí nghiệm chuyển cấu trúc T-DNA chỉnh sửa *SW14-BT* vào lúa BT7 sử dụng mẫu IE được thực hiện theo 3 lô (Lô 3 trong Luận án là Lô 5 trong bài báo), mỗi lô sử dụng 300 IE, mỗi giai đoạn thực hiện của quy trình được đánh giá hiệu quả bằng tỉ lệ phần trăm so với giai đoạn nuôi cấy trước đó.

Bảng 3.11 Kết quả biến nạp cấu trúc pCas9/gRNA-SW14 vào lúa BT7

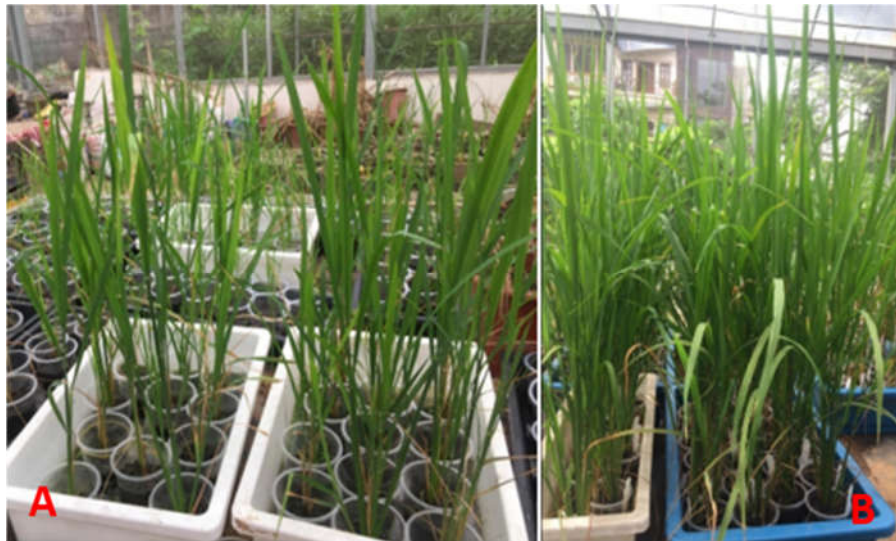
Giai đoạn (Đơn vị tính)	Số mẫu sống sót/phát triển ¹			Tổng số mẫu	Tỉ lệ mẫu sống ² (%)
	Lô I	Lô II	Lô III		
Số IE (phôi)	300	300	300	900	-
Đồng nuôi cấy (phôi)	269	230	275	774	86,00
Phục hồi (phôi)	250	220	246	716	92,51
Chọn lọc I (mô sẹo)	200	150	190	540	75,42
Chọn lọc II (mô sẹo)	150	120	150	420	77,78
Chọn lọc III (mô sẹo)	80	78	110	268	63,81
Tiền tái sinh (mô sẹo)	70	70	85	225	83,96
Tái sinh (cây)	38	30	47	115	51,11
Nhà lưới (cây)	30	23	35	88	76,52

Ghi chú: ¹Thí nghiệm chuyển gen được thực hiện 3 lô (I, II và III); ²Tỉ lệ mẫu sống (%) = Số mẫu sống sót ở giai đoạn quan sát/số mẫu sống sót ở giai đoạn trước liền kề) x 100%.



Hình 3.24 Chuyển cấu trúc chỉnh sửa *SW14-BT* vào lúa *BT7*

Ghi chú: (A) Giai đoạn đồng nuôi cấy; (B) Giai đoạn phục hồi; (C) Giai đoạn chọn lọc 3; (D) Giai đoạn tiền tái sinh; (E) Giai đoạn tái sinh; (F) Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh.



Hình 3.25: Cây lúa *BT7* chuyển gen.

Ghi chú: Cây lúa *BT7* tái sinh mang cấu trúc *T-DNA* được chăm sóc trong điều kiện nhà lưới. Hình ảnh được ghi lại sau 40 ngày (A) và 70 ngày (B) trồng giá thể đất.

cả các mẫu DNA tách chiết từ cây lúa tái sinh và cây lúa WT, chứng tỏ các mẫu DNA tách chiết đều đạt yêu cầu cho thí nghiệm PCR tiếp theo.

Để xác định sự có mặt của cấu trúc chuyển gen pCas9/gRNA-SW14 trong các dòng lúa BT7 tái sinh, 3 cặp mồi đặc hiệu cho gen chọn lọc *HPT*, *Cas9* và cặp cấu trúc [*U6:gRNA-SW14*] đã được sử dụng cho PCR. Kết quả phân tích đã xác định được 78/88 cây lúa tái sinh (đạt tỉ lệ 88,63%) có kết quả PCR dương tính với mồi đặc hiệu của gen chọn lọc *HPT*, cho băng DNA kích thước khoảng 0,6 kb. Tuy nhiên, trong số này, chỉ có 76/78 mẫu cho kết quả PCR dương tính với cặp mồi đặc hiệu của *Cas9* (0,15 kb) và cấu trúc [*U6:gRNA-SW14*] (1,4 kb) (Phụ lục 8). Điều này có thể giải thích là do trong quá trình T-DNA chèn vào nhiễm sắc thể của cây chủ đã xảy ra hiện tượng “sắp xếp lại” vị trí các trình tự trong cấu trúc T-DNA, dẫn tới cặp mồi (dùng để kiểm tra) không thể liên kết với vị trí của gen đích trong NST (cho kết quả PCR âm tính), trong khi vẫn có thể liên kết với vị trí của gen chọn lọc (cho kết quả PCR dương tính) [148]; hoặc có thể là hiện tượng PCR dương tính giả. Mặc dù vậy, kết quả sàng lọc bằng PCR đã cho phép kết luận đã thu được các dòng lúa chuyển gen T₀ mang cấu trúc T-DNA biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa *SW14-BT*.

Trong các nghiên cứu chuyển gen thực vật, để đảm bảo khả năng hoạt động của các cấu trúc biểu hiện gen chuyển, các dòng cây chuyển gen có nhiều hơn 1 bản sao của gen chuyển thường được loại bỏ [148]. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, các dòng lúa T₀ có kết quả PCR dương tính với cả 4 cặp mồi đặc hiệu được tiếp tục phân tích bằng qPCR để xác định số bản sao của cấu trúc chuyển gen (thông qua định lượng số bản sao của gen *HPT*) trong hệ gen. Phân tích qPCR cho thấy 37/76 dòng lúa T₀ có giá trị 2^{ΔCt} từ 0,4 – 0,57 tương ứng với một bản sao trong hệ gen (Bảng 3.12; Phụ lục 9).

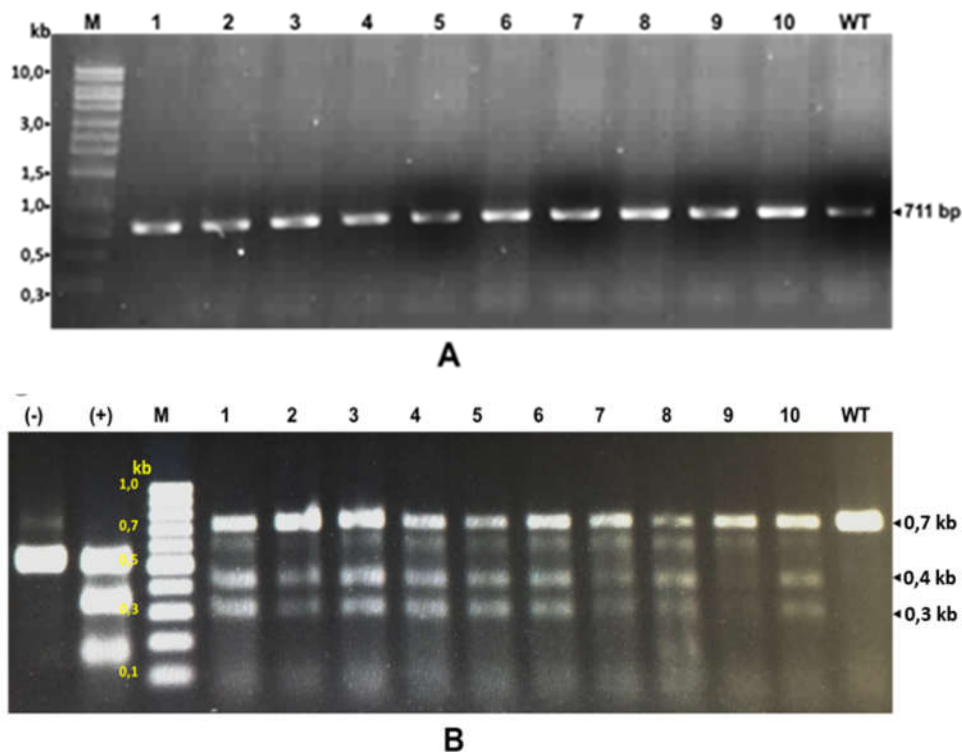
Như vậy, cấu trúc biểu hiện protein Cas9 và sgRNA (mang *gRNA-SW14*) đã được chuyển thành công vào lúa BT7; hiệu suất chuyển gen trung bình của toàn bộ quy trình đạt 8,44% (76 cây mang cấu trúc biểu hiện gen/900 IE lây nhiễm). Tuy nhiên, chỉ các dòng lúa có mang một bản sao của cấu trúc T-DNA chứa đầy

đu gen *HPT*, *Cas9* và cấu trúc [*U6:gRNA-SW14*] (37 cây) được chọn cho phân tích sàng lọc đột biến tiếp theo.

3.3.3.2. Xác định đột biến *SW14-BT* ở các dòng lúa *BT7* chuyển gen T_0

T7E1 endonuclease là enzyme có nguồn gốc từ thực khuẩn thể T7, có khả năng nhận biết và cắt tại các điểm bắt cặp sai giữa 2 sợi đơn của phân tử DNA sợi đôi, được sử dụng rất phổ biến trong các thí nghiệm sàng lọc đột biến tạo ra bởi các hệ thống chỉnh sửa gen. Vì vậy, trong nghiên cứu này, các dòng lúa *BT7* mang một bản sao của cấu trúc chuyển gen cũng được xử lý với enzyme T7E1 để xác định hiệu quả gây đột biến trình tự đích (*SW14-BT*) của cấu trúc CRISPR/Cas9 đã thiết kế. Trong các thí nghiệm chỉnh sửa gen bằng hệ thống CRISPR/Cas9 theo cơ chế sửa chữa không tương đồng (NHEJ), CRISPR/Cas9 có thể tạo ra đột biến gen đích ở cả dạng đồng hợp, dị hợp và bi-alen (2 đột biến khác nhau trên 2 cặp NST tương đồng). Để các dạng đột biến đồng hợp không bị bỏ sót, sản phẩm PCR nhân bản trình tự gen đích của cây lúa *BT7* không chuyển gen (Hình 3.26A, giếng WT) được lần lượt trộn lẫn với sản phẩm PCR từ các dòng lúa chuyển gen T_0 (Hình 3.26A, giếng 1-10) theo tỉ lệ 1:1, sau đó được xử lý với T7E1 để xác định đột biến (Hình 3.26B).

Kết quả điện di sản phẩm PCR sau khi xử lý với enzyme T7E1 cho thấy 30/37 dòng lúa T_0 (trong đó, 12 dòng thuộc lô chuyển gen 1; 8 dòng thuộc lô 2 và 10 dòng thuộc lô 3) xuất hiện 3 băng DNA có kích thước khoảng 0,7 kb, 0,4 kb và 0,3 kb, trong khi cây WT và các cây còn lại chỉ xuất hiện 1 băng DNA kích thước 0,7 kb, tương đương với kích thước lý thuyết của đoạn gen đích được nhân bản (711 bp). Kết quả này bước đầu cho thấy cấu trúc pCas9/gRNA-SW14 đã được biểu hiện trong tế bào cây chủ, tổng hợp ra phức hệ Cas9-sgRNA gây đột biến trên vùng promoter *OsSWEET14* của cây lúa chuyển gen. Hiệu suất chỉnh sửa của cấu trúc đã thiết kế tính trên số cây mang một bản sao của gen chuyển đạt 78,38% (29/37 dòng) và đạt 3,2% (29 dòng/900 phôi) tính trên toàn bộ quy trình. Hiệu suất này cũng tương đương với hiệu suất chỉnh sửa gen *OsBADHI* ở giống lúa ASD16 bằng công nghệ CRISPR/Cas9 đã được công bố trước đây [32]. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã thu được 10 cây mang đột biến từ tổng số 400 IE được lây nhiễm ban đầu.



Hình 3.26 Xác định đột biến trên *SW14-BT* bằng T7E1

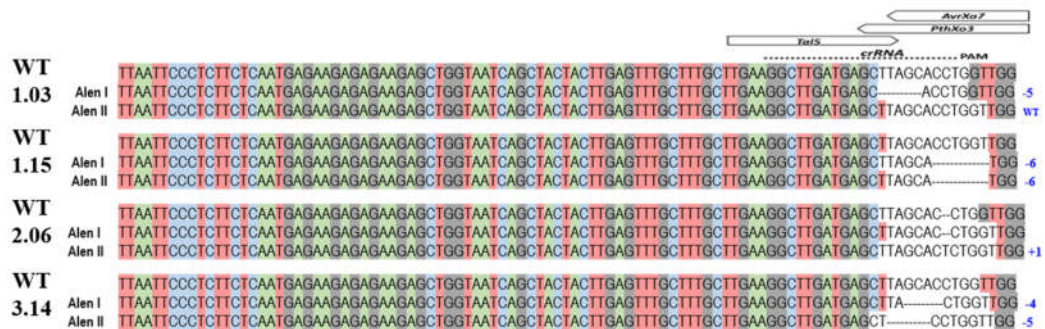
Ghi chú: (A) Sản phẩm PCR nhân bản *SW14-BT* bằng cặp mồi *SW14-t-F/SW14-t-R*. (B) Sản phẩm PCR nhân bản *SW14-BT* từ mẫu kiểm tra được trộn với đoạn *SW14-BT* nguyên bản và xử lý bằng T7E1. Giếng 1-10: mẫu lúa BT7 chuyển gen; giếng WT: mẫu lúa BT7 không chuyển gen; giếng (-) đối chứng âm; giếng (+) đối chứng dương; giếng M: thang chuẩn DNA 1,0 kb (A) và 100 bp (B).

Bảng 3.13 Kiểu gen *SW14-BT* của các dòng lúa chuyển gen T₀

Kiểu gen	Tên dòng/Loại đột biến	Số dòng
Dị hợp ^a	1.01(-5), 1.03(-5), 1.09(+2), 1.10(-3), 1.12(+3), 1.18(-1), 1.24(-2), 1.26(+1), 2.06(+1), 2.13(-2), 2.18(-2), 3.02(+3), 3.04(-3), 3.06(-2), 3.10(-4), 3.11(-6), 3.13(-1), 3.19(+3), 3.21(-1), 3.25(-1)	20
Đồng hợp ^b	1.15(-6), 1.23(+1), 2.08(+3), 2.17(+1)	04
Bi-alen ^c	1.05(-3/-2), 1.07(-5/-1), 2.02(-3/-5), 2.04(-3/+1), 2.12(-1/-4), 3.14(-4/-5), 3.27(-1/-5), 3.45(+1/-3)	08
Không đột biến	1.14, 1.20, 2.11, 3.07, 3.15	05

Ghi chú: ^aDị hợp: Đột biến trên một alen; ^bĐồng hợp: Đột biến giống nhau trên cả 2 alen; ^cBi-alen: Đột biến khác nhau trên cả 2 alen; Kí tự trong ngoặc nằm sau tên dòng lúa thể hiện số Nu đột biến thêm (+)/mất (-) trên *SW14-BT*.

Để xác định chính xác kiểu gen *SW14-BT*, 37 dòng lúa mang một bản sao cấu trúc T-DNA (Phụ lục 9) tiếp tục được giải trình tự vùng promoter *OsSWEET14*. Kết quả phân tích trình tự Nu của các dòng lúa chuyển gen T₀ bằng phần mềm BioEdit và CRISPR ID đã xác định được 32/37 dòng có mang đột biến trên vùng trình tự đích *SW14-BT* (Bảng 3.13). Điều này cũng cho thấy phương pháp sàng lọc đột biến bằng T7EI có kết quả khá chính xác [119], mặc dù vẫn có hiện tượng âm tính giả (2/32 cây không phát hiện được đột biến). Hơn nữa, tỉ lệ cây chuyển gen mang đột biến 86,48% trong nghiên cứu này tương tự với kết quả của nghiên cứu đã công bố trước đây, khi sử dụng cùng bộ khung vector biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 [159].



Hình 3.27 Giải trình tự *SW14-BT7* của các dòng lúa BT7 chuyển gen T₀

Ghi chú: Cột kí tự bên trái thể hiện tên dòng lúa chuyển gen (1.03, 1.15, 2.06, 3.14) và không chuyển gen (WT). Cột kí tự bên phải thể hiện loại đột biến; kí tự số thể hiện số Nu đột biến thêm (+) hoặc mất (-) trên *SW14-BT*, (WT) không đột biến. Vị trí các EBE *Tal5*, *PthXo3* và *AvrXa7* được đánh dấu bằng mũi tên, đường nét đứt (---) thể hiện trình tự *crRNA-8*.

Kết quả phân tích chi tiết trình tự *SW14-BT* của 37 dòng lúa chuyển gen thế hệ T₀ (Hình 3.27; Bảng 3.13) cho thấy các đột biến được phát hiện đều là các đột biến nhỏ thêm hoặc mất từ 1 – 6 Nu; không có đột biến thay thế Nu nào được xuất hiện trong các dòng lúa BT7 chuyển gen T₀. Các đột biến này đều xảy ra xung quanh vị trí DSB (theo tính toán lý thuyết) do phức hệ Cas9/gRNA tạo ra trên *SW14-BT* (cách 3 Nu phía trước trình tự bảo thủ PAM) (Hình 3.27), phù hợp với các nghiên cứu về CRISPR/Cas9 đã công bố [112]. Bên cạnh đó, kiểu gen đột biến *SW14-BT* của các dòng lúa chuyển gen thu được bao gồm cả 3 dạng, trong đó chủ yếu là đột biến dị hợp (đột biến trên một alen) chiếm 62,5%; đột biến đồng hợp

(đột biến giống nhau trên cả 2 alen) và đột biến “bi-alen” (đột biến khác nhau trên 2 alen) chiếm tỉ lệ lần lượt 12,5% và 25,0%.

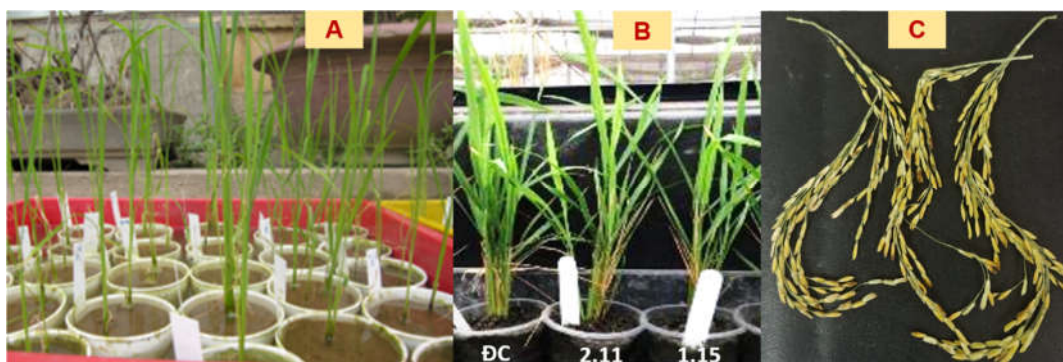
Trong nghiên cứu chỉnh sửa *OsSWEET14* trước đây, mặc dù cũng thu được hai dạng đột biến thêm và mất Nu tại chính xác vị trí gen đích và không có đột biến thay thế Nu nào xuất hiện [34, 88] tương tự như nghiên cứu này; số Nu đột biến trên gen đích rất khác nhau. Ở nghiên cứu chỉnh sửa *OsSWEET14* trên giống lúa Basmati bằng công nghệ CRISPR/Cas9, các tác giả đã thu được 2 dòng đột biến mất 4 Nu và mất 24 Nu ở cách 3 Nu phía trước vị trí của PAM [151]. Trong khi đó, số Nu đột biến ở vị trí gen đích được chỉnh sửa bằng công nghệ TALEN ở giống lúa Kitaake có giao động lớn hơn, từ 1 đến 58 Nu [34, 88]. Như vậy, rõ ràng có sự khác nhau về số Nu thêm vào hoặc mất đi ở các dòng lúa chỉnh sửa gen giữa các giống lúa khác nhau (Kitaake, Basmati, BT7) và công nghệ chỉnh sửa gen khác nhau được sử dụng (TALEN và CRISPR/Cas9) khi cùng chỉnh sửa gen đích *EBe AvrXa7* theo con đường NHEJ.

Tóm lại, bằng phương pháp chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*, cấu trúc biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa *SW14-BT* đã được chuyển thành công vào IE giống lúa BT7 và tạo ra một số dòng lúa đột biến trên vùng trình tự đích (gọi tắt là dòng lúa chỉnh sửa gen). Các dòng lúa chỉnh sửa gen này được tiếp tục được trồng trong điều kiện nhà lưới để phục vụ các phân tích tiếp theo.

3.3.3.3. Đánh giá khả năng sinh trưởng của dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen T_0

Để bước đầu xác định quá trình nuôi cấy *in vitro* và chuyển gen có ảnh hưởng tới kiểu hình của các dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen hay không, khả năng sinh trưởng và phát triển của các dòng lúa T_0 đã được theo dõi và đánh giá dưới điều kiện chăm sóc trong nhà lưới. Kết quả quan sát cho thấy tất cả các cây lúa đều có sức sống kém hơn so với các cây lúa được gieo trồng trực tiếp từ hạt, trong đó có 8 dòng (1.09; 1.24; 2.12; 2.17; 3.06; 3.11; 3.25; 3.45) không thể sống sót đến khi thu hạt và 4 dòng (1.05; 1.26; 3.04; 3.13) hoàn toàn không thu được hạt chắc (Phụ lục 10). Các chỉ tiêu sinh trưởng khác của các dòng lúa chỉnh sửa gen *OsSWEET14* sai khác không đáng kể so với dòng lúa đối chứng tái sinh từ mô sẹo không chuyển gen (Hình 3.28). Kết quả này gợi ý rằng việc chuyển cấu trúc T-DNA và đột biến

tạo ra bởi phức hệ CRISPR/Cas trên *OsSWEET14* có thể không gây ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng của cây lúa BT7. Việc cây mất sức sống hoặc không tạo hạt chắc ở một số dòng có thể do ảnh hưởng tồn dư từ quá trình tái sinh *in vitro*. Tuy nhiên, các giả thuyết này cần được phân tích sâu hơn ở các thế hệ sau, khi số lượng mẫu phân tích đủ lớn.



Hình 3.28 Cây lúa BT7 chỉnh sửa gen T₀ trồng trong nhà lưới

Ghi chú: Cây lúa BT7 mang đột biến SW14-BT được chăm sóc trong điều kiện nhà lưới. Hình ảnh được ghi lại sau 15 ngày (A) và 35 ngày (B) trồng trên giá thể đất; (C) Hạt lúa BT7 chỉnh sửa gen.

Mặc dù các dòng lúa chỉnh sửa gen T₀ không có sự khác biệt đáng kể về kiểu hình (hình thái, màu sắc lá, hình dáng và chiều dài hạt) và các chỉ tiêu sinh trưởng phát triển (chiều cao cây, số lá, số nhánh, thời gian trở bông) nhưng hầu hết các dòng chỉnh sửa gen đều có tỉ lệ hạt lép cao gấp nhiều lần so với cây đối chứng không chuyển gen ở cùng điều kiện nuôi trồng. Hơn nữa, khả năng tạo hạt chắc của các dòng lúa chỉnh sửa gen cũng không đồng đều (Bảng 3.14). Về mặt lý thuyết, các gen *OsSWEET* có chức năng vận chuyển đường trong tế bào và tham gia vào quá trình làm đầy hạt [47, 127]. Tuy nhiên, để đánh giá chính xác các đột biến (Indel) trên *SW14-BT* có làm ảnh hưởng đến chức năng làm đầy hạt của giống BT7 hay không, các phân tích ở các thế hệ tiếp cần được thực hiện với số lượng mẫu lớn hơn.

Số hạt chắc thu được của các dòng lúa BT7 T₀ chỉnh sửa gen được lưu giữ và bảo quản để phục vụ các thí nghiệm phân tích tiếp theo.

Bảng 3.14 Khả năng tạo hạt của dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen T₀

Tên dòng lúa T ₀	Số hạt chắc	Tên dòng lúa T ₀	Số hạt chắc
1.01	53	2.06	5
1.03	32	2.08	14
1.07	08	2.11	10
1.10	61	2.18	7
1.12	58	3.02	11
1.15	44	3.10	8
1.18	11	3.14	55
1.23	29	3.19	6
2.02	68	3.21	18
2.04	37	3.27	16

3.3.4 Sàng lọc kiểu gen và kiểu hình của dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen T₁

3.3.4.1. Xác định kiểu gen của các dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen T₁

Để đánh giá sự phân ly về kiểu gen của các dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen ở thế hệ T₁, các cây lúa T₁ thu được từ 9 dòng lúa T₀ (thu được nhiều hạt, bao gồm 1.01, 1.03, 1.10, 1.12, 1.15, 1.23, 2.02, 2.04, 3.14) được gieo trồng và tiếp tục phân tích và sàng lọc. Kết quả gieo trồng trong điều kiện nhà lưới đã thu được 294 cây lúa T₁ sống sót, sinh trưởng, phát triển tốt.

DNA tổng số của các dòng lúa T₁ được tách chiết và lần lượt kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gen nội chuẩn *Actin* và cấu trúc T-DNA để xác định sự có mặt của cấu trúc chuyển gen trong hệ gen (Bảng 3.15). Kết quả thu được cho thấy tất cả 294 dòng lúa T₁ từ 9 dòng lúa T₀ đều cho kết quả PCR dương tính với cặp mồi *Actin-F/Actin-R*, chứng tỏ các mẫu DNA tách chiết đều đạt tiêu chuẩn để sàng lọc cây chuyển gen bằng PCR. Đối với 3 cặp mồi đặc hiệu cho cấu trúc T-DNA, bao gồm *HPT*, *Cas9* và cấu trúc [*U6:gRNA-SW14*], kết quả PCR thu được tương tự nhau, 217/294 dòng lúa T₁ có mang gen chuyển (kết quả PCR dương tính).

Các dòng lúa T₀ được phân tích đều mang 1 bản sao của cấu trúc T-DNA. Do đó, theo lý thuyết, sự phân ly của cấu trúc biểu hiện T-DNA, bao gồm cả cấu trúc biểu hiện *Cas9*, gRNA và gen chọn lọc *HPT* ở tất cả các dòng lúa phân tích

sẽ tuân theo định luật Mendel (3:1). Kết quả phân tích tỉ lệ phân ly cấu trúc T-DNA ở thế hệ T₁ của từng dòng lúa T₀ bằng kiểm định χ^2 đều thu được giá trị $\chi^2 < 3,84$ ($\alpha = 0,05$) (Bảng 3.15), cho thấy sự phân ly phù hợp với tỉ lệ phân ly di truyền mong đợi 3:1 theo định luật Mendel. Điều này chứng tỏ cấu trúc T-DNA đã được di truyền chính xác từ thế hệ cây T₀ sang thế hệ T₁.

Bảng 3.15 Phân ly di truyền cấu trúc T-DNA của dòng lúa BT7 T₁

Tên dòng T ₀	Số cây T ₁ kiểm tra	Di truyền cấu trúc T-DNA ở thế hệ T ₁				
		<i>Actin_a</i>	<i>HPT_b</i>	<i>sgRNA_b</i>	<i>Cas9_b</i>	χ^2 (3:1)*
1.01(-5/WT)	40	40	5	5	5	3,333
1.03(-5/WT)	25	25	4	4	4	1,080
1.10(-3/WT)	36	36	12	12	12	1,333
1.12(+3/WT)	40	40	15	15	15	3,333
1.15(-6/-6)	31	31	9	9	9	0,269
1.23(+1/+1)	17	17	4	4	4	0,020
2.02(-3/-5)	49	49	10	10	10	0,551
2.04(-3/+1)	23	23	8	8	8	1,174
3.14(-4/-5)	33	33	10	10	10	0,495
Tổng cộng	294	294	77	77	77	

Ghi chú: ^aSố cây có kết quả PCR dương tính; ^bSố cây có kết quả PCR âm tính; * $\chi^2_{0,05;1} = 3,84$.

Tiếp theo, một phần *SW14-BT* (711 bp) được nhân bản bằng PCR với cặp mồi SW14-t-F/ SW14-t-R từ DNA tổng số của 294 cây T₁ và giải trình tự Nu để đánh giá sự phân ly di truyền của các đột biến tạo ra bởi hệ thống CRISPR/Cas9. Kết quả phân tích trình tự *SW14-BT* đã chỉ ra rằng tất cả các đột biến quan sát được ở thế hệ T₀ đều di truyền chính xác sang thế hệ T₁; các cây lúa T₁ thuộc cùng một dòng T₀ đều mang các đột biến đã có ở thế hệ bố mẹ và không xảy ra hiện tượng xuất hiện đột biến mới (Bảng 3.16). Bên cạnh đó, tất cả đột biến tạo ra bởi cấu trúc CRISPR/Cas9 trên các dòng lúa chỉnh sửa gen T₀ mang đột biến dị hợp hay bi-alen đều phân ly theo tỉ lệ Mendel 1:2:1 ở thế hệ T₁ đúng như dự đoán ($\chi^2 < 5,99$, $\alpha = 0,05$). Quan sát này cũng tương tự như các nghiên cứu chỉnh sửa gen bằng hệ thống CRISPR/Cas9 trước đây, trong đó đã chứng minh đột biến được tạo ra có

thể di truyền ổn định qua các thế hệ, đặc biệt là trong các dòng lúa chỉnh sửa gen không chứa cấu trúc T-DNA [139, 157].

Bảng 3.16 Phân ly di truyền đột biến *SW14-BT* ở dòng lúa chỉnh sửa gen T_1

Tên dòng T_0	Số cây T_1 kiểm tra	Phân ly đột biến ^a	χ^2 (1:2:1) ^b
1.01(-5/WT)	40	12(-5), 18(-5/WT), 10(WT)	0,600
1.03(-5/WT)	25	4(-5), 16(-5/WT), 5(WT)	2,040
1.10(-3/WT)	36	8(-3), 13(-3/WT), 15(WT)	5,500
1.12(+3/WT)	40	6(+3), 18(+3/WT), 16(WT)	5,400
1.15(-6/-6)	31	9 (-6/-6)	-
1.23(+1/+1)	17	4 (+1/+1)	-
2.02(-3/-5)	49	18(-3), 22(-3/-5), 9(-5)	3,816
2.04(-3/+1)	23	7(-3), 7(-3/+1), 9(+1)	3,870
3.14(-4/-5)	33	13(-4), 14(-4/-5), 6(-5)	3,727

Ghi chú: ^aPhân ly di truyền đột biến *SW14-BT* của cây T_1 sinh ra từ cùng một dòng T_0 . Kí tự trong ngoặc thể hiện số Nu đột biến thêm (+) hoặc mất (-) trên *SW14-BT*; (WT) không đột biến; ^b $\chi^2_{0,05; 2} = 5,99$. (-) Không đánh giá.

Bảng 3.17 Kiểu gen *SW14-BT* của các dòng lúa BT7 T_1 mang đột biến đồng hợp và không chứa T-DNA

STT	Tên dòng T_1	Loại đột biến ¹	Vị trí đột biến ²
1	1.01.28	-5 (GCTAA)	22
2	1.10.15	-3 (GGT)	19
3	1.12.07	+3 (GCA)	15
4	1.15.21	-6 (CCAGGT)	16
5	1.23.04	+1 (T)	20
6	2.02.01	-3 (TGC)	21
7	3.14.13	-5 (TGCTA)	21
8	3.14.21	-4 (GTGC)	20

Ghi chú: ¹Số Nu thay đổi trên *SW14-BT*; (+/-) thêm/mất Nu; kí tự trong ngoặc thể hiện Nu thay đổi trên *SW14-BT*; ²Vị trí của đột biến tính từ đầu 5' của *EBE AvrXa7*.

Các công bố trước đây đã phát hiện rằng các biến thể khác nhau của trình tự EBE trong tự nhiên cũng như các đột biến nhân tạo trên các vị trí khác nhau của gen *S* trong các dòng lúa chỉnh sửa gen tạo ra ảnh hưởng khác nhau đến tính kháng

bạc lá của cây lúa [34, 61, 88, 151, 152]. Ví dụ, việc mất 1 Nu đầu tiên ở đầu 5' của EBE *Tal5/TalF* là đủ để tạo ra tính kháng cho cây lúa Kitakee chỉnh sửa gen đối với chủng *Xoo* BAI3 (châu Phi) và PXO86 (châu Á) biểu hiện protein Tal5 [34, 61]. Tương tự, cây lúa mang các đột biến mất Nu trên EBE *AvrXa7*, đặc biệt ở vị trí Nu phía đầu 5' gần với vị trí của hộp TATA cũng có khả năng kháng với các chủng *Xoo* mang gen mã hóa *AvrXa7* [88, 151, 152]. Ở nghiên cứu này, kết quả giải trình tự Nu đã xác định được đột biến xuất hiện trên *SW14-BT* của các dòng lúa chỉnh sửa gen T₁ chủ yếu nằm rải rác từ vị trí 15 – 22 tính từ đầu 5' của EBE *AvrXa7*, trong đó một vài đột biến mất Nu chống lấp lên đầu 5' của EBE *Tal5* (Hình 3.27).

Với mục tiêu tạo dòng lúa chỉnh sửa gen kháng bạc lá không mang DNA cấu trúc T-DNA chỉnh sửa gen, 8 dòng lúa T₁ có kiểu gen đột biến *SW14-BT* đồng hợp đại diện cho mỗi dạng đột biến, không chứa cấu trúc T-DNA (có kết quả sàng lọc PCR âm tính với 3 cặp mồi đặc hiệu cho *HPT*, *Cas9* và cấu trúc biểu hiện sgRNA), đã được lựa chọn (Bảng 3.17) để tiếp tục phân tích và đánh giá ở các thí nghiệm tiếp theo.

3.3.4.2. Đánh giá kiểu hình của các dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen T₁

Tám dòng lúa T₁ mang đột biến *SW14-BT* đồng hợp và không chứa cấu trúc T-DNA trong hệ gen (Bảng 3.17) được chăm sóc trong điều kiện nhà lưới và đánh giá một số chỉ tiêu nông học chính để đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển. Kết quả so sánh kiểu hình (Bảng 3.18) cho thấy 8 dòng lúa chỉnh sửa gen T₁ có khả năng sinh trưởng phát triển không khác biệt rõ rệt so với dòng đối chứng không chuyển gen về tất cả các chỉ tiêu được đánh giá, bao gồm thời gian sinh trưởng (102-105 ngày), chiều cao (100-110 cm), số bông/cây (7-8 bông). Đặc biệt, cả 8 dòng lúa chỉnh sửa gen đều thu được số hạt chắc trên bông (đạt trung bình từ 73 đến 86 hạt) gần tương đương với dòng đối chứng (đạt trung bình 86 hạt).

Bảng 3.18 Kết quả đánh giá kiểu hình dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen T₁

Tên dòng	Thời gian sinh trưởng (Ngày)	Chiều cao (cm)	Số bông/cây	Số hạt chắc trên bông
ĐC	105	104,05	8	86,24 ± 1,6
1.01.28	102	107,3	8	83,05 ± 1,40
1.10.15	104	103,5	7	79,34 ± 1,29
1.12.07	105	100,4	7	82,38 ± 1,51
1.15.21	103	101,8	7	81,50 ± 1,50
1.23.04	104	100,1	7	77,71 ± 1,16
2.02.01	105	101,3	7	79,08 ± 1,39
3.14.13	105	101,7	8	86,71 ± 1,52
3.14.21	104	100,8	8	73,01 ± 1,50

Ghi chú: (ĐC) Cây lúa BT7 không chuyển gen.

Các quan sát bước đầu đã chỉ ra rằng các đột biến trên promoter *OsSWEET14* tạo ra bởi phức hệ CRISPR/Cas9 có thể không gây ảnh hưởng tiêu cực đến năng suất của lúa BT7. Tuy nhiên, để có thể đánh giá được chính xác hơn, các phân tích cần được thực hiện ở thế hệ tiếp theo (với số lượng mẫu phân tích lớn hơn). Vì vậy, các dòng lúa T₁ chỉnh sửa *SW14-BT* này đã được gieo trồng trong điều kiện nhà lưới để thu số lượng hạt lớn nhằm phục vụ các thí nghiệm phân tích đánh giá tính kháng bạc lá.

3.4 Đánh giá đặc điểm nông sinh học và tính kháng bạc lá của lúa BT 7 chỉnh sửa *SW14-BT*

3.4.1 Đánh giá đặc điểm nông sinh học của dòng lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT*

Để xác định đột biến trên *SW14* có gây ảnh hưởng tới đặc điểm nông học của cây lúa BT7 hay không, hạt của 08 dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen thu được ở trên đã được gieo trồng trong nhà lưới và phân tích, đánh giá một số chỉ tiêu nông sinh học chính, bao gồm thời gian sinh trưởng, chiều cao cây, số nhánh, số hạt chắc trên bông và năng suất cá thể (Bảng 3.19).

Bảng 3.19 Một số đặc điểm nông học chính của các dòng lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT*

Tên dòng	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Chiều cao (cm)	Số hạt chắc/bông	Trọng lượng 1000 hạt (gr)	Hàm lượng amylose (%)
WT	105,2 (4,5)	104,1 (4,6)	82,4 (1,0)	18,0 (0,5)	14,2 (1,0)
1.01.28	102,4 (3,0)	107,4 (6,0)	81,3 (1,4)	18,2 (0,3)	14,3 (1,4)
1.10.15	104,5 (6,3)	106,9 (2,9)	81,3 (1,4)	18,4 (0,2)	14,2 (1,4)
1.12.07	105,4 (3,2)	103,6 (6,6)	89,2 (1,1)	19,3 (0,4)	14,9 (1,1)
1.15.21	103,8 (4,3)	101,7 (4,1)	82,3 (1,0)	18,8 (1,5)	15,2 (1,1)
1.23.04	104,2 (2,6)	100,8 (2,9)	83,2 (1,2)	18,1 (1,2)	15,2 (1,0)
2.02.01	105,4 (2,8)	103,1 (3,7)	82,2 (0,8)	18,3 (1,1)	14,2 (0,9)
3.14.13	104,2 (4,9)	103,2 (3,9)	81,9 (0,9)	18,9 (0,5)	14,9 (0,9)
3.14.21	105,5 (4,3)	102,5 (1,9)	82,1 (0,7)	18,0 (0,9)	14,8 (0,7)

Ghi chú: Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình của 3-5 cây của mỗi dòng; giá trị trong ngoặc thể hiện độ lệch chuẩn; $P > 0,05$.



Hình 3.29 Hình thái cây lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT*

Ghi chú: Cây lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT* T_2 (dòng 1.12.07) (A) và cây lúa BT7 đối chứng (không chuyển gen) (B) ở giai đoạn đẻ nhánh.

Kết quả phân tích số liệu đánh giá các chỉ số nông sinh học bằng kiểm định ANOVA và Duncan's test cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các dòng lúa đột biến và dòng lúa đối chứng không đột biến gen về tất cả các tính trạng được quan sát (Bảng 3.19). Cụ thể, thời gian sinh trưởng của 8 dòng lúa chỉnh sửa gen đạt trung bình 104 ngày và chiều cao cây trung bình đạt 103,7 cm; so với cây lúa đối chứng có thời gian sinh trưởng 105 ngày và chiều cao cây 104,1 cm (Hình 3.29, Bảng 3.19). Các dòng lúa chỉnh sửa gen cũng không cho thấy sự khác biệt đáng kể so với đối chứng về các chỉ tiêu liên quan tới năng suất cá thể và chất lượng gạo, bao gồm số hạt chắc/bông (82,9 so với 82,4), trọng lượng 1000 hạt (18,5 gr so với 18,0 gr) và hàm lượng amylose nội nhũ (14,7% so với 14,2%) (Bảng 3.19). Các phân tích thu được ở trên đã chứng tỏ các đột biến trên promoter *OsSWEET14* tạo ra bởi hệ thống CRISPR/Cas9 không gây ra những ảnh hưởng tiêu cực đến các đặc điểm nông học chính của cây lúa.

Nhiều nghiên cứu trước đây đã chứng minh việc gây đột biến các gen không liên quan tới năng suất cây lúa bằng hệ thống CRISPR/Cas9 không gây ra các tác động tiêu cực tới các đặc tính nông sinh học của cây. Ví dụ, Tang *et al.* (2017) đã tạo ra dòng lúa đột biến bất hoạt gen *OsNRAMP5* có hàm lượng Cd thấp bằng hệ thống CRISPR/Cas9 mà không bị ảnh hưởng đến năng suất [134]. Tuy nhiên, họ gen *SWEET* không chỉ liên quan tới con đường cung cấp chất dinh dưỡng của các vi sinh vật gây bệnh mà có vai trò quan trọng đối với quá trình phát triển phấn hoa và tạo hạt của thực vật mà còn [48, 147]. Các đột biến đơn lẻ trên *OsSWEET11* hay đột biến đồng thời trên *OsSWEET11* và *OsSWEET15* (tạo ra bằng hệ thống chỉnh sửa gen TALEN) đều cho thấy có thể gây ảnh hưởng tới quá trình phát triển nội nhũ và làm đầy hạt ở giống lúa Kitaake [147]. Bên cạnh đó, dòng lúa Kitaake kháng bạc lá tạo ra thông qua bất hoạt *Os11N3/OsSWEET14* hay *OsN83/OsSWEET11* bằng công nghệ iRNA cũng gây giảm năng suất hạt [31]. Tương tự, việc chèn T-DNA vào vùng promoter *OsSWEET14* đã khiến cho cây lúa chuyển gen có hạt giảm kích thước hơn so với cây không chuyển gen [31]. Dòng lúa Basmati đột biến mất 24 Nu trên EBE *AvrXa7* tạo ra bằng công nghệ CRISPR/Cas9 thậm chí không tạo được hạt chắc [151].

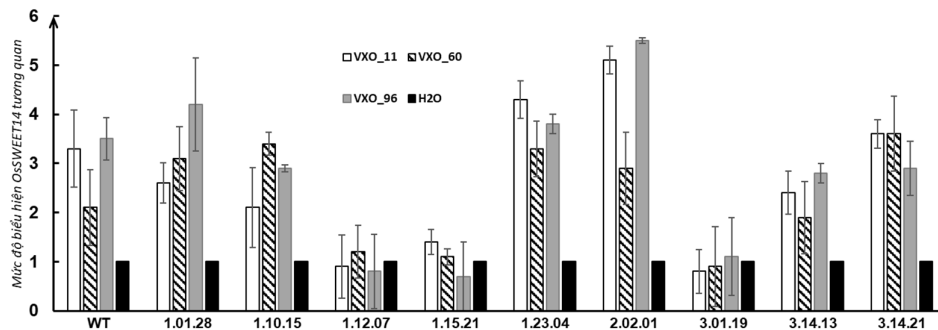
Ngược lại, trong nghiên cứu này, tất cả các tính trạng nông học (được đánh giá) của các dòng lúa BT7 mang đột biến đồng hợp trên EBE *AvrXa7* của *SW14-BT* không có sự khác biệt đáng kể so với dòng lúa đối chứng trong điều kiện nhà lưới. Điều này có thể giải thích do những đột biến nhỏ trên vùng promoter đã không làm ảnh hưởng tới hoạt động của *OsSWEET14* trong điều kiện bình thường. Giả thiết này cũng được củng cố bởi một vài nghiên cứu gần đây, trong đó đã chứng minh các đột biến nhỏ trên vùng promoter của các gen *OsSWEET* không làm ảnh hưởng tới sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây lúa. Ví dụ, trong nghiên cứu của Zafar *et al.* (2020), các dòng lúa chỉnh sửa gen mang các đột biến nhỏ trên promoter *OsSWEET14* (mất 4 Nu trên *AvrXa7*, mất 4 Nu hay 18 Nu trên *Tal5*) có hình dạng và chiều dài rễ, khả năng thụ phấn, tỉ lệ nảy mầm của hạt và tỉ lệ hạt chắc tương tự như cây đối chứng; trong đó tỉ lệ hạt chắc của các dòng này cao hơn rõ rệt so với dòng lúa mang đột biến lớn (mất 24 Nu trên *AvrXa7*) [151]. Tương tự, kết quả gây đột biến trên EBE của *OsSWEET14* giống lúa Kitaake cũng đã thu được những dòng lúa chỉnh sửa gen sinh trưởng phát triển bình thường như cây đối chứng [88]; hay các tổ hợp đột biến nhỏ khác nhau tại vị trí EBE trên promoter *OsSWEET11*, *OsSWEET13* và *OsSWEET14* cũng không gây ra ảnh hưởng tiêu cực đối với khả năng sinh trưởng, phát triển và sinh sản của cây lúa Kitaake [107]. Mặc dù vẫn có một số giả thuyết khác có thể giải thích cho hiện tượng này, ví dụ do sự biểu hiện dư thừa hay hiện tượng bù đắp di truyền (genetic compensation) của các gen trong họ *OsSWEET* trong hệ gen lúa; kết quả thu được ở đây đã chứng tỏ rằng việc tạo ra các đột biến nhỏ trên vùng promoter của *OsSWEET14* bằng công cụ CRISPR/Cas9 không tạo ra bất kì bất thường nào về sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây lúa BT7.

3.4.2 Nghiên cứu biểu hiện của *OsSWEET14* trong các dòng lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT*

Để xác định chính xác hiệu quả của các đột biến tạo ra bằng hệ thống CRISPR/Cas9 trên *SW14-BT* đối với sự hoạt động của gen đích, tám dòng lúa chỉnh sửa *SW14-BT* được lây nhiễm nhân tạo với vi khuẩn VXO và phân tích mức độ biểu hiện của *OsSWEET14* bằng RT-PCR. Ở thí nghiệm này, 3 chủng VXO đại

diện cho 3 khu vực địa lý (Hà Nội, Nghệ An và Hải Phòng), có độc tính mạnh với BT7 (mục 3.2.1.1) và hoạt biểu hiện của *OsSWEET14* (mục 3.2.1.2), bao gồm VXO_11, VXO_60, VXO_96, đã được lựa chọn để lây nhiễm nhân tạo trên 8 dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen.

Kết quả phân tích ảnh điện di sản phẩm RT-PCR từ các mẫu lúa lây nhiễm *Xoo* nhân tạo bằng phần mềm ImageJ (Hình 3.30) cho thấy mức độ biểu hiện *OsSWEET14* khác nhau ở các thí nghiệm lây nhiễm khác nhau. Đối với thí nghiệm đối chứng (tiêm nước vào lá) các cây lúa đều không có sự thay đổi biểu hiện của gen đích. Đối với thí nghiệm tiêm dung dịch vi khuẩn, sự biểu hiện của *OsSWEET14* trong các dòng lúa chỉnh sửa *SW14-BT* được chia thành 2 nhóm rõ rệt. Nhóm thứ nhất bao gồm 6 dòng lúa 1.01.28, 1.10.15, 1.23.4, 2.02.01, 3.14.13, 3.14.21, với mức độ biểu hiện *OsSWEET14* tăng đáng kể khi được lây nhiễm với cả 3 chủng VXO đại diện, tương tự như dòng lúa BT7 đối chứng không chỉnh sửa gen (WT). Nhóm thứ hai bao gồm 2 dòng lúa 1.12.07 và 1.15.21, 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 mẫu đối chứng lây được lây nhiễm bằng H₂O.



Hình 3.30 Biểu hiện của *OsSWEET14* ở dòng lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT*

Ghi chú: Biểu hiện của *OsSWEET14* trên cây lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT* sau khi lây nhiễm với *Xoo* được phân tích bằng RT-PCR. Đồ thị thể hiện mức độ biểu hiện gen tương quan giữa các mẫu lúa được lây nhiễm VXO (VXO_11, 60 và 96) so với mẫu đối chứng không lây nhiễm vi khuẩn (H₂O); mức độ biểu hiện *OsSWEET14* của mẫu lúa không lây nhiễm *Xoo* (H₂O) có giá trị bằng 1; *OsEF1a* được sử dụng làm gen nội chuẩn. Trục hoành thể hiện tên các dòng lúa; (WT) cây lúa BT7 không chỉnh sửa *SW14-BT*. Giá trị thể hiện trên đồ thị là kết quả trung bình của 3 lần thí nghiệm và độ lệch chuẩn.

Trong nghiên cứu của Blanvillain-Baufumé *et al.* (2017), phân tích biểu hiện gen trên 2 dòng lúa Kitaake chỉnh sửa vị trí EBE *AvrXa7* đã cho thấy sự biểu hiện của *OsSWEET14* hầu như không thay đổi ở 2 thời điểm trước và sau khi lây nhiễm các chủng vi khuẩn PXO86 mang gen *tal* mã hóa *AvrXa7*. Tuy nhiên, sự biểu hiện của *OsSWEET14* ở 2 dòng lúa chỉnh sửa gen này khi lây nhiễm với chủng BAI3 mang gen mã hóa TalC tăng rất mạnh giống như ở cây lúa không chỉnh sửa gen [34]. Tương tự, ở giống lúa Basmati, sự biểu hiện của *OsSWEET14* ở dòng lúa chỉnh sửa EBE *AvrXa7* khi lây nhiễm với chủng *Xoo* mang gen mã hóa *AvrXa7* không khác biệt so với thí nghiệm đối chứng (không lây nhiễm *Xoo*); trong khi sự biểu hiện của *OsSWEET14* ở cây lúa không chỉnh sửa gen và ở cây lúa chỉnh sửa EBE *Tal5* cao hơn gấp nhiều lần so với ở cây lúa chỉnh sửa EBE *AvrXa7* [151]. Ở nghiên cứu này, 6/8 dòng lúa đột biến EBE *AvrXa7* tăng cường biểu hiện *OsSWEET14* và 2/8 dòng lúa không tăng cường biểu hiện gen đích khi cùng được lây nhiễm với 3 chủng VXO (Hình 3.30). Điều này chứng tỏ sự biểu hiện của *OsSWEET14* phụ thuộc vào khả năng tương tác của protein TAL do *Xoo* tiết ra với EBE tương ứng trên vùng promoter; đột biến tại vị trí EBE đích chỉ có hiệu quả ngăn cản hoạt hóa gen cây chủ của *Xoo* nếu phá vỡ được tương tác giữa protein TAL và EBE. Vì vậy, kết quả thu được cho phép bước đầu nhận định đột biến trên vùng EBE *AvrXa7* của *OsSWEET14* ở 2 dòng lúa 1.12.07 và 1.15.21 đã phá vỡ sự liên kết giữa protein TAL của các chủng VXO_11, VXO_60 và VXO_96 với *OsSWEET14*, từ đó ngăn cản các chủng vi khuẩn này hoạt hóa sự biểu hiện *OsSWEET14*.

Phân tích sâu hơn về loại đột biến *SW14-BT* trong mỗi dòng lúa chỉnh sửa gen cho thấy không có điểm chung giữa các dòng lúa trong mỗi nhóm ở trên; cả hai nhóm đều bao gồm các dòng lúa mang đột biến thêm và mất Nu trên vùng EBE *AvrXa7*. Tuy nhiên, vị trí của các đột biến trong các dòng lúa thuộc hai nhóm có sự khác biệt nhau rõ rệt. Trong khi tất cả các dòng lúa thuộc nhóm thứ nhất đều mang đột biến nằm phía sau vị trí Nu thứ 17 (tính từ đầu 5') của EBE *AvrXa7*; 3 dòng lúa thuộc nhóm thứ hai mang đột biến phía trước vị trí này (lần lượt là 14 và 15). Kết quả này chứng tỏ vị trí đột biến khác nhau trên EBE có thể ảnh hưởng

khác nhau tới khả năng liên kết với trình tự EBE của protein TAL do *Xoo* tiết ra. Giả thiết này cũng đã được Blanvillain–Baufumé *et al.* (2017) đề cập đến trong công bố trước đây, khi nghiên cứu đột biến EBE *Tal5/TalF* trên promoter *OsSWEET14* của lúa Kitaake [34]. Nghiên cứu của Zaka *et al.* (2018) cũng kết luận vị trí đột biến trên EBE *AvrXa7* cũng tác động đến khả năng kháng bạc lá ở các giống lúa IR24, Ejali, Khama1183 và SB [152].

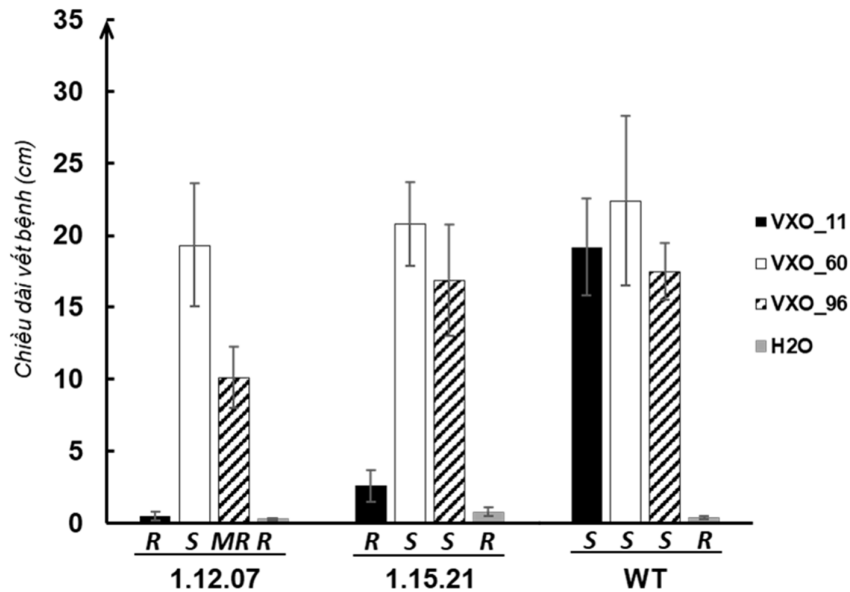
Như vậy, ở thí nghiệm này, hai dòng lúa BT7 mang đột biến *SW14-BT* được tạo ra bằng công cụ CRISPR/Cas9, bao gồm 1.12.07, 1.15.21, đã được xác định có mức độ biểu hiện gen đích không thay đổi khi được lây nhiễm với chủng *Xoo* đại diện của Việt Nam so với cây đối chứng.

3.4.3 Đánh giá khả năng kháng bệnh bạc lá của lúa BT7 chỉnh sửa SW14-BT

Để xác định vai trò của việc chỉnh sửa *SW14-BT* đối với tính kháng bệnh bạc lá của giống lúa BT7, hai dòng lúa đột biến 1.12.07 và 1.15.21 (có mức độ biểu hiện *OsSWEET14* không thay đổi khi lây nhiễm với VXO) được lây nhiễm với 3 chủng VXO đại diện (VXO_11, VXO_60 và VXO_96) bằng phương pháp cắt lá và so sánh mức độ biểu hiện bệnh với cây BT7 đối chứng không chỉnh sửa gen (WT) trong điều kiện nhà lưới.

Sau 2 tuần lây nhiễm *Xoo* nhân tạo, các dòng lúa được kiểm tra đã thể hiện triệu chứng bệnh ở các mức độ khác nhau với các chủng vi khuẩn khác nhau (Hình 3.31 và Hình 3.32). Đối với thí nghiệm lây nhiễm bằng chủng VXO_60, triệu chứng bệnh thể hiện rõ rệt (mức S) trên cả 2 dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen tương tự như dòng lúa đối chứng không chỉnh sửa gen; chiều dài vết bệnh trung bình từ 19 – 23 cm). Ngược lại, các dòng lúa biểu hiện mức độ bệnh khác nhau khi được lây nhiễm với chủng VXO_96. Chiều dài vết bệnh bạc lá trung bình quan sát được ở dòng lúa 1.15.21 và dòng đối chứng đều trên 17 cm (mức S); trong khi dòng 1.12.07 chỉ có vết bệnh khoảng 10 cm, cho thấy tính kháng nhẹ (mức MR) với chủng vi khuẩn này. Đặc biệt, sự khác biệt về triệu chứng bệnh giữa 2 dòng lúa chỉnh sửa gen so với cây đối chứng thể hiện rất rõ trong thí nghiệm lây nhiễm với chủng vi khuẩn VXO_11 (Hình 3.31 và Hình 3.32A); chiều dài vết bệnh trung bình 0,5 – 2,9 cm (dòng lúa chỉnh sửa gen - mức R) so với 19,2 cm (cây đối chứng -

mức S), chứng tỏ cả 2 dòng lúa chỉnh sửa gen có khả năng kháng hoàn toàn với chủng VXO_11.



Hình 3.31 Đánh giá tính kháng *Xoo* của dòng lúa BT7 đột biến *SW14-BT*

Ghi chú: Dòng lúa chỉnh sửa *SW14-BT* (1.12.07 và 1.15.21) và không chỉnh sửa *SW14-BT* (WT) được lây nhiễm nhân tạo các chủng *VXO* đại diện (*VXO_11*, *VXO_60* và *VXO_96*). (*H₂O*) Thí nghiệm đối chứng âm không lây nhiễm vi khuẩn *Xoo*. (*R*) Kháng hoàn toàn *Xoo*; (*MR*) kháng nhẹ *Xoo*; (*S*) không kháng *Xoo*. Đồ thị thể hiện chiều dài vết bệnh trên lá lúa sau 14 ngày lây nhiễm *Xoo*. Số liệu trên đồ thị là kết quả trung bình của 3 lần thí nghiệm và độ lệch chuẩn.

Các kết quả thu được ở trên gợi ý rằng *OsSWEET14* là gen “nhiễm” của cây lúa BT7 đối với chủng *VXO_11*; trong khi hai chủng *VXO_60* và *VXO_96* có thể có các đích tấn công khác trong hệ gen của BT7. Bên cạnh đó, tính kháng nhẹ của dòng lúa đột biến *SW14* 1.12.07 đối với chủng *VXO_96* cũng chỉ ra so với chủng *VXO_60*, độc tính của *VXO_96* đối với cây lúa BT7 phụ thuộc nhiều vào protein TAL hoạt hóa *OsSWEET14* hơn là protein TAL hoạt hóa gen đích khác.

Một số thành viên thuộc họ *OsSWEET* là đích tấn công của protein TAL do *Xoo* tiết ra khi xâm nhiễm vào cây lúa và hoạt động như những gen “nhiễm” đối với bệnh bạc lá [97]. Các dòng lúa Kitaake mang đột biến promoter *OsSWEET14* tạo ra bởi công nghệ TALEN [34] hay đột biến promoter *OsSWEET11* tạo bởi công nghệ CRISPR/Cas9 [97] thể hiện tính kháng với các chủng *Xoo* biểu hiện protein TAL AvrXa7/PthXo3 hay PthXo1. Tuy nhiên, tính kháng bạc lá của cây lúa

Kitaake mang đồng thời hai đột biến trên EBE *AvrXa7/PthXo3* (*OsSWEET14*) and *PthXo1* (*OsSWEET11*) lại không được thể hiện khi tiếp xúc với chủng *Xoo* biểu hiện đồng thời *AvrXa7/PthXo3* và *PthXo2* [97]. Điều này chứng tỏ tính kháng bệnh bạc lá phụ thuộc vào sự có mặt của các EBE liên quan tới gen “nhiễm” được nhận biết bởi protein TAL tương ứng của quần thể *Xoo*.



Hình 3.32 Lây nhiễm *Xoo* nhân tạo trên dòng lúa BT7 đột biến *SW14-BT*

Ghi chú: Dòng lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT7* (1.12.07 và 1.15.21) và không chỉnh sửa *SW14-BT* (WT) được lây nhiễm với chủng vi khuẩn *VXO_11*, *VXO_60* và *VXO_96*. Hình ảnh được ghi lại sau 14 ngày lây nhiễm. Mũi tên thể hiện vị trí kết thúc vết bệnh trên lá.

Trong nghiên cứu này, hai dòng lúa 1.12.07, 1.15.21 mang đột biến đồng hợp trên EBE *AvrXa7* biểu hiện tính kháng được tăng cường rõ rệt với chủng *VXO_11* so với dòng lúa BT7 đối chứng. Tính kháng không hoàn toàn/không kháng với hai chủng *VXO_60* và *VXO_96* có thể giải thích do sự có mặt của một/một vài EBE khác cũng được nhận biết bởi protein TAL của hai chủng này. Điều này cũng cho thấy quần thể *Xoo* ở Việt Nam có thể chia thành ít nhất 2 nhóm dựa trên tính đa dạng của protein TAL. Nhóm thứ nhất (đại diện bởi chủng

VXO_60 và VXO_96) biểu hiện đồng thời nhiều gen *TAL* độc, trong đó có *AvrXa7*, giống như đa số các chủng *Xoo* châu Á đã được nghiên cứu trước đây [97]. Nhóm thứ hai (đại diện bởi chủng VXO_11) chỉ biểu hiện một loại protein độc *AvrXa7*.

Như vậy, các kết quả nghiên cứu thu được ở trên không chỉ cho thấy triển vọng cải tiến tính kháng bạc lá cho các giống lúa ưu tú như BT7 thông qua đột biến gen đích bằng công nghệ CRISPR/Cas9, mà còn chứng minh sự đa dạng về protein TAL của quần thể *Xoo* Việt Nam. Do đó, để tạo ra tính kháng bạc lá phổ rộng cho các giống lúa chủ lực trong sản xuất, cần phải có các nghiên cứu đầy đủ và sâu hơn về TALome của các chủng VXO.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

1. Đã tối ưu được quy trình nuôi cấy *in vitro* và chuyển gen vào IE lúa BT7 thông qua *A. tumefaciens*. Quy trình sử dụng dung dịch *A. tumefaciens* có OD₆₀₀ đạt 0,3 để lây nhiễm vào IE 11-13 DAP, AS 150 μ M cho bước đồng nuôi cấy trong 5 ngày, kháng sinh cefotaxime 200 mg/L, vancomycin 100 mg/L và hygromycin 50 mg/L cho bước chọn lọc mô sẹo; hooc môn BAP 2 mg/L, NAA 0,2 mg/L và nước dừa 20% cho bước tái sinh chồi; hiệu suất chuyển gen đạt 20,67%.
2. Giống lúa BT7 mẫn cảm với 19/20 chủng VXO nghiên cứu, biểu hiện *OsSWEET14* bị xâm nhiễm bởi 6 chủng VXO và chứa 4 EBE *AvrXa7*, *PthXo3*, *Tal5* và *TalC* trên promoter *OsSWEET14* trong hệ gen. Trình tự crRNA tác động vào 3 EBE *AvrXa7*, *PthXo3* và *Tal5* đã được ghép nối vào vector chuyển gen thực vật biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9. Vector tái tổ hợp đã được kiểm tra bằng PCR, cắt giới hạn và giải trình tự Nu.
3. Đã tạo được 8 dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen mang đột biến đồng hợp *SW14-BT* tại vị trí EBE *AvrXa7*, không chứa cấu trúc T-DNA trong hệ gen. Kiểu gen của các dòng lúa chỉnh sửa gen đã được khẳng định bằng PCR và giải trình tự *SW14-BT*.
4. Đột biến *SW14-BT* trong các dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen không gây ảnh hưởng tới một số đặc điểm nông sinh học chính của cây lúa, bao gồm thời gian sinh trưởng, chiều cao cây, số nhánh, số hạt chắc trên bông, hàm lượng amylose. Hai dòng lúa BT7 mang đột biến thêm 3 Nu và mất 6 Nu tại vị trí 15 và 16 trên EBE *AvrXa7* không tăng cường biểu hiện *OsSWEET14* khi lây nhiễm với 3 chủng VXO_11, 60 và 96, thể hiện tính kháng hoàn toàn với chủng VXO_11, kháng nhẹ với chủng VXO_96 và không kháng VXO_60.

Đề nghị

Trên cơ sở các kết luận rút ra từ kết quả nghiên cứu, chúng tôi đưa ra một số hướng nghiên cứu tiếp theo như sau:

- Tiếp tục phân tích tính ổn định di truyền và khả năng kháng bệnh bạc lá của các dòng lúa BT7 chỉnh sửa *SW14-BT*.
- Tiếp tục nghiên cứu cơ chế gây bệnh của quần thể VXO để xác định thêm các gen *S*/trình tự EBE mục tiêu phục vụ cho nghiên cứu tạo giống lúa BT7 chỉnh sửa gen kháng bệnh bạc lá phổ rộng.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ ĐÃ CÔNG BỐ
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. **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 nhập của vi khuẩn gây bệnh bạc lá trên lúa Bắc thơm 7”, *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn*, 353(2), tr. 13-19.
2. **Vũ Hoài Sâm**, Phạm Thị Vân, Cao Lê Quyên, Phạm Xuân Hội, Nguyễn Duy Phương (2020), “Ảnh hưởng của một số yếu tố đến hiệu quả chuyển gen vào phôi hạt non giống lúa Bắc thơm số 7 nhờ *Agrobacterium tumefaciens*”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 116(7), tr. 99-104.
3. **Vũ Hoài Sâm**, Phạm Thị Vân, Nguyễn Thanh Hà, Nguyễn Thị Thu Hà, Phùng Thị Thu Hương, Phạm Xuân Hội, Nguyễn Duy Phương, Cao Lê Quyên (2021), “Design and transfer of *OsSWEET14*- editing T-DNA construct to Bắc thơm 7 rice cultivar”, *Academia Journal of Biology*, 43(1), tr. 99-108.
4. Cao Lê 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*, 417(18), tr. 74-81.
5. Cao Lê 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*, 433(10), tr. 3-9.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Nguyễn Tiến Chinh (2013), Thái Bình: Bàn thêm về giống lúa BT7, *Trung tâm Khảo nghiệm khuyến nông khuyến ngư Thái Bình*, ngày truy cập 05/06/2013, Địa chỉ: http://khuyennongthaibinh.vn/Tin-Tuc/Left1/190_Ban-them-ve-giong-lua-BT7.
2. Hoàng Thị Giang, Mai Đức Chung, Nguyễn Thị Huệ, Jérémy Lavarenne, Mathieu Gonin, Nguyễn Thanh Hải, Đỗ Năng Vịnh, Pascal Gantet (2015), “Hoàn thiện Quy trình chuyển gen cho giống lúa Taichung 65 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13(5), tr. 764-773.
3. Chu Đức Hà, Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Phạm Thị Lý Thu, Khuất Thị Mai Lương, Lê Huy Hàm, Lê Hùng Lĩnh (2019), “Cải tiến giống lúa Bắc thơm 7 bằng quy trình tích hợp đa gen chịu mặn và chịu ngập”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 106(9), tr. 3-9.
4. Lê Huy Hàm, Phạm Thị Lý Thu (2015), *Giáo trình Chọn tạo giống cây trồng bằng kỹ thuật chuyển gen*, NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
5. Phan Thu Hiền (2012), “Khả năng tạo callus và tái sinh cây của tập đoàn 31 giống lúa nương miền Bắc Việt Nam phục vụ công tác chuyển gen”, *Tạp chí khoa học và Phát triển*, 10(4), tr. 567-575.
6. Phạm Xuân Hội (2020), “Chọn giống tiên tiến và công nghệ CRISPR/Cas9 trong nông nghiệp và chọn tạo giống cây trồng”, *Hội thảo Quốc tế "Chinh sừa gen: Bối cảnh toàn cầu và tiềm năng cho Việt Nam"*, VAAS and U.S. Grain Council, Hà Nội.
7. Nguyễn Trọng Khanh và Nguyễn Văn Hoan (2014), “Xác định sở thích về gạo chất lượng cao của người tiêu dùng vùng Đồng bằng sông Hồng”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 12(8), tr. 1192-1201.
8. Nguyễn Thị Lệ, Vũ Hồng Quảng, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Thị Huệ, Nguyễn Văn Hoan, Nguyễn Chí Dũng (2014), “Kết quả chọn tập giống lúa Bắc thơm số 7 kháng bạc lá”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 12(2), tr. 131-138.
9. Nguyễn Huy Mạnh (2009), Xác định một số chủng vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh bạc lá lúa ở một số tỉnh vùng đồng bằng sông Hồng và đánh giá tính chống chịu của một số giống lúa địa phương, Luận văn thạc sĩ, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 97 tr.

10. Hoàng Công Mệnh, Hoàng Tuấn Hiệp, Phạm Tiến Dũng (2013), “So sánh một số giống lúa chất lượng trong vụ xuân tại cánh đồng Mường Thanh huyện Điện Biên”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 11(2), tr. 161-167.
11. Vũ Hồng Quảng, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Thị Thuý, Phạm Thị Thu Hằng, Nguyễn Văn Hoan (2011), “Phát hiện gen kháng bệnh bạc lá lúa *Xa7*, *Xa21* ở các dòng bố bằng chỉ thị phân tử”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 9(2), tr. 204-210.
12. Cao Lê Quyên, Lê Kim Hoàn, Lê Huy Hàm, Phạm Xuân Hội (2008), “Nghiên cứu khả năng tái sinh cây lúa từ phôi của tập đoàn các giống lúa Việt Nam nhằm phục vụ cho công tác chuyển gen”, *Tạp chí Sinh học*, 30(3), tr. 141-147.
13. Cao Lê Quyên, Phạm Thu Hằng, Chu Thị Linh, Nguyễn Thị Lê Thu, Lê Huy Hàm, Phạm Xuân Hội (2017), “Xây dựng hệ thống tái sinh *in vitro* ở một số giống lúa chủ lực trong sản xuất ở Việt Nam”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 1(118), tr. 36-41.
14. Cao Lê Quyên (2016), “Nghiên cứu phân lập và chuyển gen liên quan đến tính chịu hạn vào giống lúa ở Việt Nam”, Luận án Tiến sĩ Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Hà Nội.
15. Cao Lê Quyên (2017), “Báo cáo khoa học: Nghiên cứu phân lập và chuyển gen liên quan đến tính chịu hạn vào giống lúa Việt Nam”, Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Hà Nội, tháng 3-2017.
16. Cao Lê Quyên, Phạm Thị Vân, Trần Tuấn Tú, Phạm Xuân Hội (2019), “Xây dựng qui trình chuyển gen vào giống lúa Bắc thơm số 7 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 5, tr. 25 – 30.
17. Lưu Văn Quyết, Nguyễn Thị Mai Hương, Nguyễn Thị Minh, Nguyễn Thị Phương Nga, Đỗ Thị Hương, Trương Thị Thuý (2016), “Xác định gen kháng bệnh bạc lá hữu hiệu phục vụ chọn tạo giống lúa cho các tỉnh phía Bắc”, *Hội thảo Quốc gia về Khoa học Cây trồng lần thứ hai*, tr. 325-330.
18. Tạ Minh Sơn (1987), “Bệnh bạc lá lúa vi khuẩn (*Xanthomonas campestris* P.V. *oryzae*) và tạo giống chống bệnh”, Luận án Tiến sĩ Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam, Hà Nội.
19. 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 DNA chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 116(7), tr. 29-35.

20. Nguyễn Thị Thơ, 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 – Số chuyên đề dành cho Đoàn thanh niên*, 133, tr. 56-60.
21. Bùi Trọng Thủy, Phan Hữu Tôn (2004), “Khả năng kháng bệnh bạc lá của các dòng lúa chỉ thị (Tester) chứa đa gen kháng với một số chủng vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh bạc lá lúa phổ biến ở miền Bắc Việt nam”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật nông nghiệp*, 2(2), tr. 109.
22. 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 pùde, blechâu và khẩu đao”, *Tạp chí Khoa học nông nghiệp Việt Nam*, 14(4), tr. 551–559.
23. Lê Thị Thu Trang, Đàm Thị Thu Hà, Lã Tuấn Nghĩa (2016), “Nghiên cứu khả năng khả năng kháng bệnh bạc lá của một số giống lúa địa phương ở miền Bắc Việt Nam”, *Hội thảo Quốc gia về Khoa học cây trồng lần thứ hai*, tr. 929-934
24. Trần Tuấn (2017), Hải Dương: Lúa mùa bị thiệt hại nặng, nhiều nơi mất mùa, *Báo Tài nguyên và Môi trường*, ngày truy cập 15/07/2020. Địa chỉ: <https://baotainguyenmoitruong.vn/hai-duong-lua-mua-bi-thiet-hai-nang-nhieu-noi-mat-mua-286423.html>

Tiếng Anh

25. Aananthi N. and Anandakumar C.R. (2018), “Genetic transformation in Aromatic Indica rices mediated by *Agrobacterium tumefaciens*”, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 7(12), pp 3458-3487.
26. Adhikari T.B. and Basnyat R.C. (1999), “Virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on rice lines containing single resistance genes and gene combinations”, *Plant Dis.*, 83, pp 46-50.
27. Agarwal P.K., Sidu G.S., Gosal S.S. (2005), “Induction of bacterial blight resistance in elite Indian rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars using gamma irradiation and ethyl methane sulfonate”, *Mutation breeding newsletter and reviews*, 1, pp 17-18.
28. Ali Z., Shami A., Sedeek K., Kamel R., Alhabsi A., Tehseen M., Hassan N., Butt H., Kababji A., Hamdan S.M., Mahfouz M.M. (2020), “Fusion of the Cas9 endonuclease and the VirD2 relaxase facilitates homology-directed repair for precise genome engineering in rice”, *Commun. Biol.*, 3(1), pp 44.

29. Ali Z., Abul-faraj A., Li L. (2015), “Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system”, *Mol. Plant*, 8(8), pp 1288–1291.
30. Amanda N.M., Philip B., Adam J.B., Barry L.S (2013), “TAL effectors: function, structure, engineering and applications”, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 23(1), pp 93-99.
31. 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 *OsIIN3*”, *Plant Cell*, 22(11), pp 3864-76.
32. Ashokkumar S., Jaganathan D., Ramanathan V., Rahman H., Palaniswamy R., Kambale R. (2020), "Creation of novel alleles of fragrance gene *OsBADH2* in rice through CRISPR/Cas9 mediated gene editing", *PLoS One*, 15(8), e0237018.
33. Ashwarya L.T. and Chaliganjewar S.D (2016), “Strategies for management of bacterial blight disease of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (small oryzae): an overview”, *Int. J. Adv. Res.*, 4(7), pp 150-162.
34. Blanvillain-Baufumé S., Reschke M., Solé M., Auguy F., Doucoure H., Szurek B., Maynard 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 effector”, *Plant Biotechnol. J.*, 15(3), pp 306-317.
35. Boch J. and Bonas U. (2010), “*Xanthomonas AvrBs3* family–type III effectors: discovery and function”, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 48, pp 419–36.
36. Boglioli E. and Richard M. (2015), “*A new era in precision gene editing*”, The Boston consulting Group, Boston.
37. Borkar S.G. and Yumlembam R.A. (2016), “*A bacterial disease of crop plants*”, Florida: CRC Press, Florida.
38. Bortesi L. and Fisher R. (2015), “The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond”, *Biotechnol. Adv.*, 33(1), pp 41-52.
39. Butt H., Eid A., Momin A.A., Bazin J., Crespi M., Arold A.T., Mahfouz M.M. (2019), “CRISPR directed evolution of the spliceosome for resistance to splicing inhibitors”, *Genome Biol.*, 20, pp 73.
40. Butt H., Jamil M., Wang J.Y., Al-Babili S., Mahfouz M. (2018), “Engineering plant architecture via CRISPR/Cas9-mediated alternation of strigolactone biosynthesis”, *BMC Plant Biol.*, 18(1), pp 174.

41. CABI/EPPO. (2016), “*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*”, Center for Agriculture and Bioscience International.
42. Cai L., Cao Y., Xu Z., Ma W., Zakria M., Zou L., Cheng Z., Chen G. (2017), “A transcription activator-like effector Tal7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* activates rice gene Os09g29100 to suppress rice immunity”, *Sci. Rep.*, 7, pp 5089.
43. Cernadas R.A., Doyle E.L., Niño–Liu D. O., Wilkins K.E., Bancroft T., Wang L., Schmidt C.L., Caldo R., Yang B., White F.F., Nettleton D., Wise R.P., Bogdanove A.J. (2014), “Code–assisted discovery of TAL effector targets in bacterial leaf streak of rice reveals contrast with bacterial blight and a novel susceptibility gene”, *PLoS Patho.*, 10(4), e1004126.
44. Char S.N., Neelakandan A.K., Nahampun H., Frame B., Main M., Spalding M. H., Becraft P. W., Meyers B. C., Walbot V., Wang K., Yang B. (2017), “An Agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize”, *Plant Biotechnol. J.*, 15, pp 257-268.
45. Char S.N., Wei J., Mu Q., Li X., Zhang Z.J., Yu J., Yan B. (2020), “An Agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for targeted mutagenesis in sorghum”, *Plant Biotech. J.*, 18, pp 319-321.
46. Chen K., Wang Y., Zhang R., Zhang H., Gao C. (2019), “CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture”, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 70(28), pp 1–31.
47. Chen L.Q., Hou B.H., Lalonde S., Takanaga H., Hartung M.L., Qu X.Q., Guo W.J., Kim J.G., Underwood W., Chaudhuri B., Chermak D., Antony G., White F.F., Somerville S.C., Mudgett M.B., Frommer W.B (2010), “Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens”, *Nature*, 468(7323), pp 527–532.
48. Chen L.Q., Qu X.Q., Hou B.H., Sosso D., Osorio S., Fernie A.R., Frommer W.B. (2012), “Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport”, *Science*, 335, pp 207-211.
49. David O.L., Pamela C. R., Adam J. B. (2006), “*Xanthomona oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop”, *Mol. Plant Pathol.*, 7(5), pp 303-324.
50. Dong O.X., Yu S., Jain R., Zhang N., Duong P.Q., Butler C., Li Y., Lipzen A., Martin J.A., Barry K.W., Schmutz J., Tian L., Ronald P.C. (2020), “Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9”, *Nat. Commun.*, 11, pp 1178.

51. Doyle J. and Doyle L. (1990), "Isolation of plant DNA from fresh tissue", *Biology*, 12, pp 13-15.
52. Endo A., Saika H., Takemura M., Misawa N., Toki S. (2019), "A novel approach to carotenoid accumulation in rice callus by mimicking the cauliflower Orange mutation via genome editing", *Rice*, 12, pp 1-5.
53. Furuya N., Taura S., Goto T., Trong Thuy B., Huu Ton P., Tsuchiya K., Yoshimura A. (2012), "Diversity in virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* from Northern Vietnam", *Japan Agric. Res. Q.*, 46(4), pp 329-338.
54. George E.F., Hall M.A., Klerk G. J. (2008), "*Plant propagation by tissue culture 3rd Edition*", Springer, The Netherlands.
55. Grau J., Wolf A., Reschke M., Bonas U., Posch S., Boch J. (2013), "Computational predictions provide insights into the biology of TAL effector target sites", *PloS Comput. Biol.*, 9(3), e1002962
56. Haque M. and Islam S. M. S. (2014), "Application of cold pretreatment and optimization of media for enhancement of anther culture response in two barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes derived from Bangladesh", *Asia Pacific J. Mol. Biol. & Biotech.*, 22(1), pp 127-136.
57. Hiei T. and Komari Y. (2008), "*Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed", *Nat. Protoc.*, 3(5), pp 824-834.
58. 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", *Proc. Natil. Acad. Sci. U. S. A.*, 111, pp 521-529.
59. Hua K., Tao X., Zhu J.K. (2019), "Expanding the base editing scope in rice by using Cas9 variants", *Plant Biotechnol. J.*, 17, pp 499-504.
60. Huang S., Antony G., Li T., Liu B., Obasa K., Yang B., White F. (2016), "The broadly effective recessive resistance gene *Xa5* of rice is a virulence effector-dependent quantitative trait for bacterial blight", *Plant J.*, 86(2), pp 186-194.
61. Hutin M., Sabot F., Ghesquière A., Koebnik R., Szurek B. (2015), "A knowledge-based molecular screen uncovers a broad spectrum *OsSWEET14* resistance allele to bacterial blight from wild rice", *Plant J.*, 84(4), pp 694-703.

62. Isaiah M., Naoki Y., Jennylyn L., Toshisangba L. (2016), “Validation of reference genes for gene expression analysis in switchgrass (*Panicum virgatum*) using quantitative real-time RT-PCR”, *PLoS One*, 9(3), e91474.
63. Islam S.M.S. (2010), “The role of drought stress on anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.)”, *Plant Tissue Cult. Biotech.*, 20(1), pp 55-61.
64. Itoh J.I., Nonomura K.I., Ikeda K., Yamaki S., Inukai Y., Yamagishi H., Kitano H., Nagato Y. (2005), “Rice plant development: from Zygote to Spikelet”, *Plant Cell Physiol.*, 46(1), pp 23-47.
65. Jaganathan D., Ramasamy K., Sellamuthu G., Jayabalan S., Venkataraman G. (2018), “CRISPR for crop improvement: An update review”, *Front. Plant Sci.*, 9, pp 985.
66. 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 real-time PCR”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345(2), pp 646-51.
67. Jiang N., Yan J., Liang Y., Shi Y., He Z., Wu Y., Zeng Q., Liu A., 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 11-12.
68. Jinek M., Chylinsky K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012), “A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity”, *Science*, 337(6096), pp 816-821.
69. Jones H.D. (2015), “Regulatory uncertainty over genome editing”, *Nat. Plants*, 1, pp 14011.
70. Jones J.D.G. and Dang J.L. (2006), “The plant immune system”, *Nature*, 444, pp 323–329.
71. Joshi J.B., Arul L., Ramalingam J., Uthandi S. (2020), “Advances in the Xoo-rice pathosystem interaction and its exploitation in disease management”, *J. Biosci.*, 45, pp 112.
72. Juliano B.O. (1971), “A simplified assay for milled rice amylose”, *Cereal Sci. Today*, 16(11), pp 334-338.
73. 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.

74. Jung Y.J., Nogoy F.M., Lee S.K., Cho Y.G., Kang K.K. (2018), “Application of ZFN for site directed mutagenesis of rice *SSIVa* gene”, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 23, pp 108-115.
75. Kanchiswamy C.N., Sargent D.J., Velasco R., Maffei M.E., Malnoy M. (2015), “Looking forward to genetically edited fruit crops”, *Trends Biotechnol.*, 33, pp 62-64.
76. Ke Y., Hui S. and Yuan M. (2017), “*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* inoculation and growth rate on rice by clipping method”, *Bio Protoc.*, 7(19), e2568.
77. Kesh H. and Kaushik P. (2020), “Impact of marker assisted breeding for bacterial blight resistance in rice: A review”, *Plant Pathol. J.*, 19, pp 1511-1565.
78. Khan M.S.S, Basnet R., Islam S.A., Shu Q. (2019), “Mutational analysis of *OsPLDα1* reveals its involvement in phytic acid biosynthesis in rice grains”, *J. Agric. Food Chem.*, 41, pp 11436 - 11443.
79. Kumar V.V.S., Verma R.K., Yadav R.K., Yadav V., Watts A., Rao M.V., Chinsusamy V. (2020), “CRISPR-Cas9 mediated genome editing of drought and salt tolerance (*OsDST*) gene in indica mega rice cultivar MTU1010”, *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 26, pp 1099-1110.
80. Lang J. M., Hamilton J. P., Diaz M. G. Q., Sluys M. A. V., Burgos M. R. G., Cruz C. M. V., Buell C. R., Tisserat N. A., Leach J. E. (2010), “Genomic-based diagnostic marker development for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola*”, *Plant Dis.*, 94(3), pp 311-319.
81. Le H, guyen N.H., Ta D.T., Le T.N.T., Bui T.P., Le N.T., Nguyen C.X., Rolletchek H., Stacey G., Stacey M.G., Pham N.B., Do P.T., Chu H. H. (2020), “CRISPR/Cas9-mediated knockout of galactinol synthase-encoding gene reduces raffinose family oligosaccharide levels in soybean seeds”, *Front. Plant Sci.*, 11, pp 612942.
82. Lee S. W., Han S.W., Sririyanyum M., Park C.J. Seo Y.S., Ronald P.C. (2009), “A type I-secreted, sulfated peptide triggers *XA21*-mediated innate immunity”, *Science*, 326(5954), pp 850–853.
83. Li J., Manghwar H., Sun L., Wang P., Wang G., Sheng H., Zhang J., Liu H., Qin L., Rui H., Li B., Lindsey K., Daniell H., Jin S., Zhang X. (2019), “Whole genome sequencing reveals rare off-target mutations and considerable inherent

- genetic or/and somaclonal variations in CRISPR/Cas9-edited cotton plants”, *Plant Biotechnol.*, 17, pp 858-868.
84. Li J., Mang X., Zong Y., Chen K., Zhang H., Liu J., Li J., Gao C. (2016), “Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9”, *Nat. Plants.*, 2, pp16193.
 85. Li J., Sun Y., Du J., Zhao Y., Xia L. (2017), “Generation of targeted point mutations in rice by a modified CRISPR/Cas9 system”, *Mol. Plant*, 10(3), pp 526-529.
 86. Li M., Li X., Zhou Z., Wu P., Fang M., Pan X., Lin Q., Luo W., Wu G., Li H. (2016), “Reassessment of the four yield-related gene *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPAI* in rice using a CRISPR/Cas9 system”, *Front. Plant Sci.*, 7, pp 377.
 87. Li Q., Zhang D., Chen M., Liang W., Wei J., Qi Y., Yuan Z. (2016), “Development of japonica photo-sensitive genic male sterile rice lines by editing carbon starved anther using CRISPR/Cas9”, *J. Genet. Genomics.*, 43(6), pp 415-419.
 88. Li T., Liu B., Spalding M., Weeks D., Yang B. (2012), “High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistance rice”, *Nat. Bio.*, 30, pp 390-392.
 89. Li T., Huang S., Zhou J., Yang B. (2013), “Designer TAL effectors induce disease susceptibility and resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice”, *Mol. Plant*, 6(3), pp 781-789.
 90. Li X., Bai H., Wang X., Li L., Cao Y., Wei J., Liu Y., Liu L., Gong X., Wu L., Liu S., Liu G. (2011), “Identification and validation of rice reference proteins for western blotting”, *J. Exp. Bot.*, 62(14), pp 4763-4772 .
 91. Liang G., Zhang H., Lou D., Yu D. (2016), “Selection of highly efficient scrRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing”, *Sci. Rep.*, 6, pp 21451.
 92. Liao S, Qin X, Luo L, Han Y, Wang X, Usman B, Nawaz G, Zhao N, Liu Y, Li R. (2019), “CRISPR/Cas9-induced mutagenesis of *semi-rolled leaf1,2* confers curled leaf phenotype and drought tolerance by influencing protein expression patterns and ROS scavenging in rice (*Oryza sativa* L.)”, *Agronomy*, 9, pp 728.

93. Liu H., Ding Y, Zhou Y, Jin W, Xie K, Chen L. (2017), “CRISPR-P 2.0: an improved CRISPR-Cas9 tool for genome editing in plants”, *Mol. Plant*, 10(3), pp 530-532.
94. Liu X., Wu S., Xu J., Sui C., Wei J. (2017), “Application of CRISPR/Cas9 in plant biology”, *Acta. Pharm. Sin. B*, 7(3), pp 292-302.
95. Liu Y., Wang Y., Xu S., Tang X., Zhao J., Yu C., He G., Xu H., Wang S., Tang Y., Fu C., Ma Y. Zhou G. (2019), "Efficient genetic transformation and CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Lemma aequinoctialis*", *Plant Biotechnol. J.*, 17, pp 2143-2152.
96. Lu H., Patil P., Sluys M.V., White F.F., Ryan R.P., Maxwell D.J., Rabinowicz P., Salzberg S.L., Leach J.E., Sonti R., Brendel V., Bogdanove A.J. (2008), “Acquisition and evolution of plant pathogenesis–associated gene clusters and candidate determinants of tissue–specificity in *Xanthomonas*”, *PLoS One*, 3(11), e3828.
97. Luu V.T., Stiebner M., Maldonado P.E., Valdes S., Marin D., Delgado G., Laluz V., Wu L.B., Chaverriage P., Tohme J., Slamet I.H.L., Frommer W.B. (2020), “Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the elite-indica rice variety Komboka”, *Bio Protoc.*, 10(17), e3739.
98. Ma L., Zhu F., Li Z., Zhang J., Li X., Dong J. (2015), “TALEN based mutagenesis of lipoxygenase LOX3 enhances the storage tolerance of rice (*Oryza sativa*) seeds”, *PLoS One* , 10, e0143877.
99. Ma W., Zou L., Zhiyuan J.I., Xiameng X.U., Zhengyin X.U., Yang Y., Alfano J.R., Chen G. (2018), “*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* TALE proteins recruit *OsTFIIAγ1* to compensate for the absence of *OsTFIIAγ5* in bacterial blight in rice”, *Mol. Plant Pathol.*, 19(10), pp 2248-2262.
100. Mew T.W., Alvarez A.M., Leach J.E., Swings J. (1993), “Focus on bacterial blight of rice”, *Plant Dis*, 77(1), pp 1-12.
101. Miao C., Xiao L., Hua K., Zou C., Zhao Y., Bressan R.A., Zhu J.K. (2018), “Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity”, *Nat. Acad. Sci.*, 115(23), pp 6058-6063.
102. Mishra D., Vishnupriya M.R., Anil M.G., Konda K., Raj Y., Sonti R.V. (2013), “Pathotype and genetic diversity amongst Indian isolates of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*”, *PLoS One*, 8(11), e81996.

103. Mishra R., Joshi R.K., Zhao K. (2018), "Genome editing in rice: Recent advances, challenges and future implication", *Front. Plant Sci.*, 9, pp 1361.
104. Mizukami T. and Wakimoto S. (1969), "Epidemiology and control of bacterial blight of rice", *Annu. Rev. Phytopathol.*, 7, pp 51-72.
105. Morshed S., Siddique A.B., Islam S.M.S. (2014), "Efficient plant regeneration using mature and immature embryos of maize (*Zea mays* L.)", *Int. J. Agr. Inno. Res.*, 3(3), pp 895-904.
106. Nino-Liu D.O., Damielle L., Bogdanove A.J. (2006), "*Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop", *Mol. Plant Pathol.*, 7(5), pp 303-324.
107. Oliva R., Ji C., Atienza-Grande G., Huguet-Tapia J.C., Perez Q.A. (2019), "Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing", *Nat. Biotechnol.*, 37, pp 1344-1350.
108. Park S.H., Yi N., Kim Y.S., Jeong M.H., Bang S.W., Choi Y.D., Kim J.K. (2010), "Analysis of five novel putative constitutive gene promoters in transgenic rice plants", *J. Exp. Bot.*, 61(9), pp 2459-67.
109. Praveen N.M., Monisha S., Ramanathan S. (2019), "Studies on interaction of rice and bacterial leaf blight causing *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*", *Biosci. Biotech. Res. Comm.*, 12, pp 4464 - 4455.
110. Qin L., Li J., Wang Q., Xu Z., Sun L., Alariqi M., Manghwar H., Wang G., Li B., Ding X., Rui H., Huang H., Lu T., Lindsey K., Daniell H., Zhang X., Jin S. (2020), "High-efficient and precise base editing of C*G to T*A in the allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) genome using a modified CRISPR/Cas9 system", *Plant Biotech. J.*, 18, pp 45-56.
111. Rahman S., Zhao Z., Sial M.U., Zhang Y., Jiang H. (2021), "Case study using recommended reference genes actin and 18S for reverse-transcription quantitative real-time PCR analysis in *Myzus persicae*", *PLoS One*, 16(10), e0258201.
112. Razzaq A., Saleem F., Kanwa, M., Mustafa G., Yousaf S., Imran A.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", *Int. J. Mol. Sci.*, 20(16), pp 4045.

113. Rikiishi K., Matsuura T., Ikeda Y., Maekawa M. (2015), "Light inhibition of shoot regeneration is regulated by endogenous Abscisic acid level in calli derived from immature barley embryos", *PLoS One*, 10(12), e0145242.
114. Sahoo K.K., Tripathi 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.
115. Sambrook J. and Russel D.W. (2001), "*Molecular cloning: A laboratory Manual II*, 3rd ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
116. Sanchez C.A., Brar D.S., Huang N., Li Z., Khush G.S. (2000), "Sequence tagged site marker-assisted selection for three bacterial blight resistance genes in rice", *Crop Sci.*, 40, pp 792-797.
117. Sawant G.B., Sawardekar S.V., Bhave S.G., Kshirsagar J.K. (2018), "Effect of acetosyringone and age of callus on *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.) calli", *Int. J. Chem. Stud.*, 6(3), pp 82-88.
118. Schubert I. (2021), "Boon and bane of DNA double-strand breaks", *Int. J. Mol. Sci.*, 22, pp 5171.
119. Sentmanat M.F., Peters S.T., Florian C.P., Connelly J. P., Miller S.M.P. (2018), "A survey of validation strategies for CRISPR-Cas9 editing", *Sci. Rep.*, 8, pp 888.
120. Shan Q., Zhang Y., Chen K., Zhang K., Gao C. (2015), "Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBADH2* gene using TALEN technology", *Plant Biotechnol. J.*, 6(13), pp 791-800.
121. Shao G., Xie L., Jiao G., Wei X., Sheng Z., Tang S., Hu P. (2017), "CRISPR/Cas9-mediated editing of the fragrant gene *BADH2* in rice", *Chinese J. Rice Sci.*, 31(2), pp 216-222.
122. Siddique A.B. and Islam S.M.S. (2015), "Effect of light and dark on callus induction and regeneration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)", *Bangladesh J. Bot.*, 44(4), pp 643-651.
123. Singh A.K., Singh P., Singh R. P., Singh H. B., Samantroy S., Singh O. N. (2014), "Bacterial leaf blight disease of rice: Its occurrence and biological control", *Hand. Nanobiotechnology, India*, pp. 157-161.
124. Slamet I.H., Chadha P.M., Torrizo L. (2014), "*Agrobacterium*-mediated transformation: Rice transformation", *Methods Mol. Biol.*, 1099, pp 261-271.

125. 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), "Flourescence detection in qutomated DNA sequence analysis", *Nature*, 321(6071), pp 674-679.
126. Soyars C.L., Peterson B.A., Burr C.A., Nimchuk Z.L. (2018), "Cutting edge genetic: CRISPR/Cas9 editing of plant genomes", *Plant Cell Physiol.* , 59(8), pp 1608-1620.
127. Streubel J., Pesce C., Hutin M., Koebnik R., Boch J., Szurak B. (2013), "Five phynogenetically close rice *SWEET* genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*", *New Phytol.*, 200(3), pp 808-819.
128. Sugio A., Yang B., Zhu T., White F. F. (2007), "Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes *OsTFIIA* gamma1 and *OsTFXI* during bacterial blight of rice", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104, pp10720-10725.
129. Sun Y., Jiao G., Liu Z., Zhang X., Li J., Guo X., Du W., Du J., Francis F., Zhao Y., Xia L. (2017), "Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes", *Frontier Plant Sci.*, 8, pp 298.
130. Sun Y., Zhang X., Wu C., He Y., Ma Y., Hou H., Guo X., Du W., Zhao Y., Xia L. (2016), "Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of *Acetolactate synthase*", *Mol. Plants*, 9(4), pp 628-31.
131. Suryadi Y., Samudra I.M., Priyatno T.P., Susilowati D.N., Lestari P., Fatimah F., Kadir T.S. (2016), "Determination of pathotypes from indonesian *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* population causing bacterial leaf blight and their reactions on differential rice", *Makara J. Sci.*, 20(3), pp 109-118.
132. Swings J., Van D.M.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*", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40, pp 309–311.
133. Talbot N. J. (2010), "Raiding the sweet shop", *Nature*, 468(7323), pp 510-511
134. Tang L., Mao B., Li Y., Lv Q., Zhang L., Chen C., He H., Wang W., Zeng X., Shao Y., Pan Y., Hu Y., Peng Y., Fu X., Li H., Xia S., Zhao B. (2017),

- “Knockout of *OsNramp5* using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating indica rice without compromising yield”, *Sci. Rep.*, 7(1), pp 14438.
135. Visarada K.B, Sailaja M., Sarma N.P (2002), “Effect of callus induction media on morphology of embryogenic calli in rice genotypes”, *Bio. Planta.*, 45, pp 495-502.
136. 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(3), pp 407-415.
137. Wang C., Wang G., Gao Y., Lu G., Habben JE, Mao G, Chen G, Wang J., Yang F., Zhao X., Zhang J., Mo H., Qu P., Liu J., Green T.W. (2020), “A cytokinin-activation enzyme-like gene improves grain yield under various field conditions in rice”, *Plant Mol. Biol.*, 102(4-5), pp 373-388.
138. Wang K. (2006), “*Agrobacterium Protocols, 2nd ed*”, *Methods Mol. Biol.*, 343, pp 409.
139. Wang S., Yang Y., Guo M., Zhong C., Yan C., Sun S. (2020), “Targeted mutagenesis of amino acid transporter genes for rice quality improvement using the CRISPR/Cas9 system”, *Crop J.*, 8(3), pp 457-464.
140. White F.F., Potnis N., Jones J.B., Koebnik R. (2009), “The type III effectors of *Xanthomonas*”, *Mol. Plant Pathol.*, 10(6), pp 749–766.
141. Xeng 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 Biol.*, 20(1), pp 313.
142. Xu R., Li H., Qin R., Wang L., Li L., Wei P., Yang J. (2014), “Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice”, *Rice (N Y)*, 7(1), pp 5.
143. Xu R., Yang Y., Qin R., Li H., Qiu C., Li L., Wei P., Yang J. (2016), “Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice”, *J. Genet Genomics*, 43(8), pp 529-532.
144. Xu Z., Xu X., Gong Q., Li Z., Li Y. Wang S., Yang Y., Ma W.. (2019), “Engineering broad-spectrum bacterial blight resistance by simultaneously disrupting variable TALE-binding elements of multiple susceptibility genes in rice”, *Mol. Plant.*, 12, pp 1434-1446.

145. Yan C., Shou W., Cheng L., Shuang W., De-zheng W., Shi-yun D. (2004), "Improvement of resistance to bacterial blight by marker-assisted selection in a wide compatibility restorer line of hybrid rice", *Anhui Acad. Agri. Sci.*, 11(5-6), pp 231-237.
146. Yang B., Sugio A., White F.F. (2006), "*Os8N3* is host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(27), pp 10503-10508.
147. 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 Phytol.*, 218(2), pp 604-615.
148. 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 Rep.*, 23(10-11), pp 759-63.
149. Yin X., Biswal A.K., Dinora J., Perdigon K.M., Balahadia C.P., Mazumdar S., Chater C., Lin H.C., Coe R.A., Kretschmar T., Gray J.E., Quick P.W., Bandyopadhyay A. (2017), "CRISPR-Cas9 and CRISPR-Cpf1 mediated targeting of a stomatal developmental gene *EPFL9* in rice", *Plant Cell Rep.*, 36(5), pp 745-757.
150. Yu Y., Streubel J., Balzergue S., Champion A., Boch J., Koebnik R., Feng J., Verdie V. and Szurek B. (2011), "Colonization of rice leaf blades by an African strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* depends on new TAL effector that induces the rice nodulin-3 *Os1IN3* gene", *Mol. Plant Microbe. Interact.*, 24, pp 1102-1113.
151. 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", *Fron. Plant Sci.*, 11(575), pp. 1-11.
152. Zaka A., Grande G. Coronejo T., Quibod I., 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(9), e0203711.
153. Zeng D., Liu T., Ma X., Wang B., Zheng Z., Zhang Y., Xie X., Yang B., Zhao Z., Zhu Q., Liu Y.G. (2020), "Quantitative regulation of Waxy expression by CRISPR/Cas9-based promoter and 5'UTR-intron editing improves grain quality in rice", *Plant Biotechnol. J.*, 18, pp 2385-2387.

154. Zeng X., Tian D., Gu K., Zhou Z., Yang X., Luo Y., White F.F., Yin Z. (2015), “Genetic engineering of the *Xa10* promoter for broad-spectrum and durable resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*”, *Plant Biotechnol. J.*, 13, pp 993–1001.
155. Zeng Y., Wen J., Zhao W., Wang Q., Huang W. (2019), “Rational improvement of rice yield and cold tolerance by editing the three genes *OsPIN5b*, *GS3*, and *OsMYB30* with the CRISPR-Cas9 system”, *Front. Plant Sci.*, 10, pp 1663.
156. Zhang A., Liu Y., Wang F., Li T., Chen Z., Kong D., Bi J., Zhang F., Luo X., Wang J., Tang J., Yu X., Liu G., Luo L. (2019), “Enhanced rice salinity tolerance via CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *OsRR22* gene”, *Mol. Breed.*, 39, pp 47.
157. Zhang A., Liu Y., Wang F., Li T., Chen Z., Kong D., Bi J., Zhang F., Luo X., Wang J., Tang J., Yu X., Liu G., Luo L. (2019), “Enhanced rice salinity tolerance via CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *OsRP22* gene”, *Mol. Breeding*, 39, pp 47.
158. Zhou H, Liu B., Weeks D.P., Spalding M.H., Yang B. (2014), “Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice”, *Nucleic Acids Res.*, 42(17), pp 10903-10914.
159. Zhou J., Peng Z., Long J., Sosso D., Liu Bo., Eom J.S., Huang S., Liu S., Cruz C.V., Frommer W.B., White F.F., Yang B. (2015), “Gene targeting by TAL effector *PthXo2* reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice”, *Plant J.*, 83(4), pp 632-643.
160. Zhou J., Xin X., He Y., Chen H., Li Q., Tang X., Zhong Z., Deng K., Zheng X., Akher S.A., Cai G., Qi Y., Zhang Y. (2019), “Multiplex QTL editing of gene-related genes improves yield in elite rice varieties”, *Plant Cell. Rep.*, 38, pp 475-485.
161. Zhu Y., Lin Y., Chen S., Liu H., Chen Z., Fan M. (2019), “CRISPR/Cas9-mediated functional recovery of the recessive *rc* allele to develop red rice”, *Plant Biotechnol. J.*, 17(11), pp 2096-2105.
162. Zong Y., Wang Y., Li C., Chen K., Ran Y., Qiu J.L., Wang D., Gao C. (2017), “Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion”, *Nat. Biotechnol.*, 35(5), pp 438-440.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Tổng hợp một số nghiên cứu chỉnh sửa gen ở lúa.

Tính trạng của cây lúa	Gen đích	Công nghệ sử dụng	Chức năng phân tử	Tài liệu tham khảo
Cải thiện chất lượng và năng suất	<i>LOX3</i>	TALENs	Tăng cường khả năng dự trữ	[98]
	<i>GW2, GW5, TGW6</i>	CRISPR/Cas9	Cải thiện trọng lượng hạt	[143]
	<i>Hd2, Hd4, Hd5</i>	CRISPR/Cas9	Khả năng sinh trưởng nhanh, cây ra hoa sớm	[85]
	<i>CSA</i>	CRISPR/Cas9	Tạo dòng bất dục đực dựa vào quang kỳ	[87]
	<i>Gn1a, DEPI, GS3, IPA1</i>	CRISPR/Cas9	Cải thiện số lượng hạt, cấu trúc bông, kích thước hạt và cấu trúc cây	[86]
	<i>SPL14, SPL17, SPL16, SPL18</i>	Base editing	Cải thiện cấu trúc cây và năng suất hạt	[59]
	<i>CCD7</i>	CRISPR/Cas9	Gia tăng số nhánh (Nipponbare)	[40]
	<i>PYLs</i>	CRISPR/Cas9	Tăng cường khả năng sinh trưởng và sinh sản	[101]
	<i>OsBADH2</i>	TALENs	Tăng cường hương thơm	[120]
	<i>BADH2</i>	CRISPR/Cas9	Tăng cường hương thơm	[121]
Chống chịu stress sinh học	<i>OsSWEET14</i>	TALENs	Tăng cường tính kháng bạc lá	[88]
	<i>OsSWEET13</i>	TALENs	Tăng cường tính kháng bạc lá	[159]
	<i>OsSWEET14</i>	TALENs	Tăng cường tính kháng bạc lá	[34]
	<i>Os09g29100</i>	TALENs	Tăng cường tính kháng đốm sọc lá	[42]
	<i>OsERF</i>	CRISPR/Cas9	Tăng cường tính kháng bệnh đạo ôn	[137]
	<i>BEL</i>	CRISPR/Cas9	Kháng thuốc diệt cỏ	[142]

Chống chịu stress phi sinh học	<i>OsEPSPS</i>	CRISPR/Cas9	Kháng gluphosat	[84]
	<i>ALS</i>	CRISPR/Cas9	Kháng thuốc diệt cỏ	[130]
	<i>OsSAPK2</i>	CRISPR/Cas9	Chịu hạn	[95]
	<i>SF3B1</i>	Chỉnh sửa nuclease	Thích ứng biến đổi khí hậu	[39]
	<i>OsPIN5b, GS3, MYB30</i>	CRISPR/Cas9	Chịu lạnh	[153]
	<i>OsRP22</i>	CRISPR/Cas9	Chịu mặn	[156]
Cải thiện chất lượng Dinh dưỡng	<i>OsNRAMP5</i>	CRISPR/Cas9	Hàm lượng cadmium (Cd) thấp	[133]
	<i>SBEIb và SBEI</i>	CRISPR/Cas9	Hàm lượng amylose cao	[129]
	<i>OsPDS, OsSBEIb</i>	Chỉnh sửa nuclease	Cải thiện chất lượng dinh dưỡng	[85]
	<i>Osor</i>	CRISPR/Cas9	Tăng cường tích lũy β -caroten	[52]
	<i>Rc và Rd</i>	CRISPR/Cas9	Gạo đỏ	[161]
Mật độ khí khổng	<i>OsEPFL9</i>	CRISPR/Cas9	Mật độ khí khổng phân bố đều trên lá	[149]
Sức sống của cây	<i>OsCDC28</i>	Chỉnh sửa nuclease	Tăng cường sức sống, độ cứng của cây	[25]

Phụ lục 2. Các chủng *Xoo* sử dụng trong nghiên cứu.

STT	Tên chủng	Địa điểm	Giống lúa	Năm
1	VXO_11	Gia Lâm, Hà Nội	Bắc Thơm 7	2013
2	VXO_15	Gia Lâm, Hà Nội	T10	2013
3	VXO_71	Gia Lâm, Hà Nội	Bắc Thơm 7	2016
4	VXO_73	Gia Lâm, Hà Nội	Bắc Thơm 7	2016
5	VXO_52	Thanh Oai, Hà Nội	Bắc Thơm 7	2017
6	VXO_66	Thanh Oai, Hà Nội	T10	2017
7	VXO_70	Thường Tín, Hà Nội	Bắc Thơm 7	2016
8	VXO_96	An Lão, Hải Phòng	Bắc Thơm 7	2016
9	VXO_59	Hiệp Hòa, Bắc Giang	Bắc Thơm 7	2016
10	VXO_98	Nho Quan, Ninh Bình	Bắc Thơm 7	2016
11	VXO_64	Đông Hưng, Thái Bình	TBR225	2017
12	VXO_62	Đông Hưng, Thái Bình	TBR225	2016
13	VXO_65	Đông Hưng, Thái Bình	Bắc Thơm 7	2017
14	VXO_54	TP. Nam Định, Nam Định	Bắc Thơm 7	2017
15	VXO_51	TP. Nam Định, Nam Định	Thiên Ưu	2015
16	VXO_68	TP. Nam Định, Nam Định	Bắc Thơm 7	2017
17	VXO_69	TP. Nam Định, Nam Định	Bắc Thơm 7	2017
18	VXO_53	Thanh Liêm, Hà Nam	Bắc Thơm 7	2017
19	VXO_50	Quảng Xương, Thanh Hóa	TBR225	2015
20	VXO_60	Diễn Châu, Nghệ An	Bắc Thơm 7	2017

Phụ lục 3. Thành phần môi trường chuyển gen.

Ký hiệu	Thành phần môi trường chuyển gen
1	Giống lúa Bắc thơm 7, sử dụng vật liệu IE
	Trái khuẩn: AB + 50 mg/L kanamycin + 15 mg/L rifamycin
	Hoà loãng khuẩn: AA + 100 µM acetosyringone, pH 5,2
MD1	N6 + 2,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BAP + 8 g/L agar, pH 5,2
MD2	N6 + 1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BAP + 8 g/L agar, pH 5,8
MD3	N6 + 1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BAP + 6,5 g/L phytigel + 200 mg/L cefotaxime + 100 mg/L vancomycine + 50 mg/L Hygromycine, pH 5,8
MD4	MS + 2 mg/L BAP + 0,2 mg/L NAA + 200 ml/L nước dừa 6,5 g/L phytigel + 100 mg/L cefotaxim + 50 mg/L Hygromycin, pH 5,8
MD5	MS + 2 mg/L Kin + 0,2 mg/L NAA + 200 ml/L nước dừa + 6,5 g/L phytigel, pH 5,8
2	Thành phần môi trường chuyển gen theo quy trình Hiei et al. (2008)
AA-inf	Hòa loãng khuẩn: Đa lượng và amino acid AA, vi lượng và vitamin B5, 100 µM acetosyringone, 20 g sucrose, 10 g glucose
NB-As	N6 + 2,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA, 100 µM acetosyringone, 8 g agarose Type I, pH 5,2
CCMC	CC + 2,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA + 250 mg/L cefotaxime + 100 mg/L carbenicillin, 5 g/L gelrite, pH 5,8
CCMCH75	CC + 2,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA + 250 mg/L cefotaxime + 100 mg/L carbenicillin + 75 mg/L Hygromycin + 8 g/L gelrite, pH 5,8
NBPRCH40	N6 + 2,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA + 300 mg/L Gin + 250 mg/L cefotaxime + 40 mg/L Hygromycin + 5 g/L gelrite, pH 5,8
RNMH30	N6 + 2,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA + 300 mg/L Gin + 30 mg/L Hygromycin + 4 g/L agar, pH 5,8
MSIH30	MS + 0,2 mg/L IBA + 15 g/L sucrose + 30 mg/L Hygromycin + 3 g/L gelrite, pH 5,8
3	Môi trường Quy trình chuyển gen IE của Slamet (2014)
A200	Hòa khuẩn: AA + 100 µM acetosyringone, pH 5,2
A201	N6 + 2,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BAP + 100 µM acetosyringone + 5,5 g/L agar, pH 5,2

A202	N6 + 1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BAP + 100 mg/L cefotaxime + 100 mg/L carbenicillin + 5,0 g/L gelrit, pH 5,8
A203	N6 + 1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BAP + 100 mg/L cefotaxime + 100 mg/L carbenicillin + 60 mg/L Hygromycin + 5,0 g/L gelrit, pH 5,8
A204	MS + 5,0 mg/L NAA + 2,0 mg/L Kinetin + 100 mg/L cefotaxime + 50 mg/L Hygromycin + 10,0 g/L agar, pH 5,8
A205	MS + 1,0 mg/L NAA + 2,0 mg/L Kinetin + 100 mg/L cefotaxime + 50 mg/L Hygromycin + 3,0 g/L gelrit, pH 5,8
MS0	MS + 30 g/L sucrose + 2 g/l Gelrit, pH 5,8

Kỹ thuật chuyển gen IE theo quy trình của Hiei (2008)

Quy trình chuyển gen IE ở giống lúa IR64 của Hiei (2008) đạt hiệu suất trên 90% khi sử dụng chủng vi khuẩn LBA4440 để biến nạp cấu trúc chuyển gen. Tuổi phôi từ 8-12 DAP đã được sử dụng làm vật liệu chuyển gen. Hạt lúa non sau khi bỏ vỏ được khử trùng bằng cồn 70% trong 10 giây, sau đó được khử trùng bằng dung dịch NaOCl 1,5% trong 5 phút và tráng lại 5 lần bằng nước cất vô trùng. IE của IR64 sau khi tách được ủ với nước ấm ở 43°C trong 30 giây, và được làm lạnh trên đá một phút và được ly tâm ở 83000 vòng trong 10 phút ở 25°C, sau đó, IE được đặt trên đĩa môi trường lây nhiễm NB-As. Vi khuẩn *A. tumefaciens* sau 3 ngày nuôi cấy khởi động, được nuôi huyền phù trong môi trường AA-inf một giờ trước khi tiến hành lây nhiễm. Nhỏ 5 µL dịch khuẩn lên mỗi phôi, ủ 15 phút ở nhiệt độ 25°C, sau đó gấp phôi vào đĩa môi trường NB-As khác để đồng nuôi cấy 7 ngày trong tối ở 25°C. Sau đồng nuôi cấy, cắt bỏ phần chồi mới, cấy chuyển mẫu lên môi trường CCMC để phôi phục hồi lần 1 trong 5 ngày, lần 2 (chia mỗi callus thành 6 phần) trong 10 ngày trên cùng môi trường ở điều kiện 30°C ngoài sáng. Nuôi cấy chọn lọc 2 lần trên cùng môi trường CCMCH75 ở điều kiện nhiệt độ 32°C, ánh sáng 5000 lux, thời gian nuôi cấy lần 1 là 10 ngày, lần 2 là 7 ngày. Sau đó các callus kháng hygromycin sinh trưởng tốt có màu trắng vàng được nhặt cấy vào môi trường tiền tái sinh NBPRCH40 nuôi cấy trong 7 ngày ở điều kiện nhiệt độ 32°C, ánh sáng 5000 lux; tái sinh trên môi trường RNMH30 trong 14 ngày ở điều kiện nhiệt độ 32°C, ánh sáng 5000 lux; chồi tái sinh được nuôi

cấy tạo rễ trên môi trường MSIH30 trong 14 ngày điều kiện nhiệt độ 32°C, ánh sáng 5000 lux. Tổng thời gian nuôi cấy từ khi đồng nuôi cấy đến khi đưa cây ra vườn ươm là 74 ngày [57].

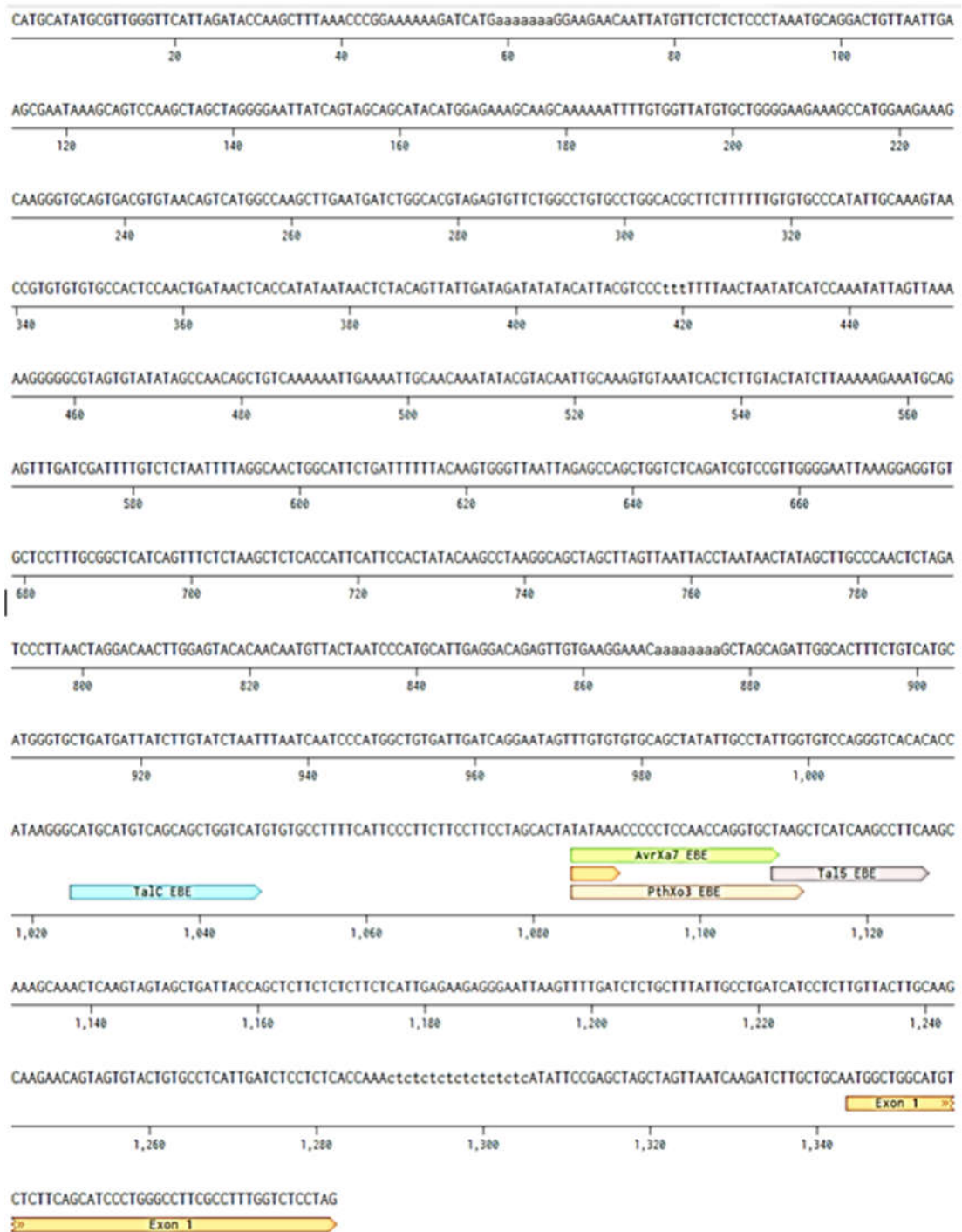
Kỹ thuật chuyển gen IE theo quy trình của Slamet (2014)

Năm 2014, quy trình chuyển gen IE cải tiến của Slamet vào giống lúa IR64 cũng đã được công bố. Cũng với tuổi phôi 8 -12 DAP, sau khi khử trùng bằng cồn 70%, hạt non được khử trùng trong 5 phút bằng NaOCl chỉ 1%. IE được tách khỏi hạt non và không qua bước tiền xử lý nhiệt như quy trình của Hiei (2008), được đồng nuôi cấy với dung dịch khuẩn (môi trường A200) trên môi trường A201 trong tối 7 ngày ở 25°C. Sau đó, IE được phục hồi (resting) trên môi trường A202 ở nhiệt độ 30°C trong 5 ngày ngoài sáng. Chọn lọc 3 lần trên cùng môi trường A203, mỗi lần 10 ngày ở điều kiện sáng 30°C, chia callus thành 4 phần sau chọn lọc 1. Môi trường tiền tái sinh và môi trường tái sinh lần lượt là A204 (10 ngày) và A205 (14 ngày), với cùng điều kiện nuôi cấy là 25°C ngoài sáng. Cuối cùng, chồi tái sinh được tạo rễ trên môi trường MS0 trong 1- 2 tuần trước khi chuyển ra nhà kính. Tổng thời gian thực hiện quy trình khoảng 76-80 ngày, tuy nhiên, hiệu suất chuyển gen chỉ đạt 25-40% [124]

Phụ lục 4. Trình tự các oligonucleotide sử dụng trong nghiên cứu

Tên	Trình tự	Gen/Vector	Mục đích thí nghiệm	Kích thước (bp)
SW14-F	CATGCATATGCGTTGGGTTTC	<i>SW14-BT</i>	Phân lập <i>SW14-BT</i>	1395
SW14-R	CTAGGAGACCAAAGGCGAA			
T7	AATACGACTCACTATAG	pGEM-T	Kiểm tra và giải trình tự pGEM/SW14-BT	168
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG			
Ubi-t-F	CCCTGCCTTCATACGCTATT	[Ubi:Nos]	Kiểm tra pCas9/gRNA-SW14	4315
NOS-t-R	AGACCGGCAACAGGATTCAA	(pCas9)		
Cas9-F	CCATGGCCCCAAAGAAGAAG	Cas9 (pCas9)		4108
Cas9-R	TCAATCGCCGCCGAGTTG			
Cas9-t-R	GCCTCGGCTGTCTCGCCA	Cas9 (pCas9)		
U6-F	GGATCCGGATCATGAACCAACG	pENTR4-gRNA		451
Ter-R	GAATTCGATATCAAGCTT			
pEN-F	CTACAAACTCTTCCTGTTAGTTAG	pENTR4-gRNA	Kiểm tra pENTR4-gRNA	1384
pEN-R	ATGGCTCATAACACCCCTTG			
gRNA-SW14-F	<u>GTGTGGCTTGATGAGCTTAGCACC</u>	gRNA-SW14	Thiết kế pENTR4/gRNA-SW14	
gRNA-SW14-R	<u>AAACGGTGCTAAGCTCATCAAGCC</u>			
SW14-t-F	AACAAAAAAAAGCTAGCAGA	<i>SW14-BT</i>	Phân tích đột biến cây chuyển gen	711
SW14-t-R	CTTCGCCTTTGGTCTCCTAG			
SW14-qPCR-F	ACTTGCAAGCAAGAACAGTAGT	<i>OsSWEET14</i>	Phân tích biểu hiện gen	168
SW14-qPCR -R	ATGTTGCCTAGGAGACCAAAGG			
RB-t-F	CTTTTCTCTTAGGTTTAC	pCas9	Giải trình tự pCas9/gRNA-SW14	1574
Ubi-t-R	GACCATGTCTAACTGTTC			
HPT-F	AAGGAGGTGATCCAGCC	pCas9,	Kiểm tra cây chuyển gen	618
HPT-R	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	pH-Ubi-Cas9-7		
Actin-F	TGATGGTGTCAGCCACACT	OsActin	Kiểm tra cây chuyển gen	230
Actin-R	TGGTCTTGGCAGTCTCCATT			
EF1 α -F	AGGCGCTGCTCAACTTCCCG	OsEF1 α	Phân tích biểu hiện gen	101
EF1 α -R	CACGCACTCACCGTCGCTCA			
Xo3756F	CATCGTTAGGACTGCCAGAAG		Định danh <i>Xanthomo nas</i>	331
Xo3756R	GTGAGAACCACCGCCATCT			

Phụ lục 6. Trình tự đầy đủ đoạn promoter *SW14-BT*



Phụ lục 7. Danh mục cây BT7 đưa ra ngoài và sống sót trong nhà lưới

Cây tái sinh			Cây sống sót trong nhà lưới (sau 14 ngày)		
Lô 1	Lô 2	Lô 3	Lô 1	Lô 2	Lô 3
1.01	2.01	3.01	1.01	2.02	3.01
1.02	2.02	3.02	1.02	2.03	3.02
1.03	2.03	3.03	1.03	2.04	3.04
1.04	2.04	3.04	1.05	2.05	3.05
1.05	2.05	3.05	1.07	2.06	3.06
1.06	2.06	3.06	1.08	2.07	3.07
1.07	2.07	3.07	1.09	2.08	3.08
1.08	2.08	3.08	1.10	2.11	3.09
1.09	2.09	3.09	1.11	2.12	3.10
1.10	2.10	3.10	1.12	2.13	3.11
1.11	2.11	3.11	1.14	2.15	3.13
1.12	2.12	3.12	1.15	2.16	3.14
1.13	2.13	3.13	1.16	2.17	3.15
1.14	2.14	3.14	1.17	2.18	3.17
1.15	2.15	3.15	1.18	2.19	3.18
1.16	2.16	3.16	1.20	2.21	3.19
1.17	2.17	3.17	1.21	2.23	3.20
1.18	2.18	3.18	1.22	2.24	3.21
1.19	2.19	3.19	1.23	2.25	3.22
1.20	2.20	3.20	1.24	2.26	3.23
1.21	2.21	3.21	1.25	2.27	3.24
1.22	2.22	3.22	1.26	2.29	3.25
1.23	2.23	3.23	1.28	2.30	3.27
1.24	2.24	3.24	1.30		3.28
1.25	2.25	3.25	1.31		3.30
1.26	2.26	3.26	1.32		3.32
1.27	2.27	3.27	1.34		3.33
1.28	2.28	3.28	1.35		3.35
1.29	2.29	3.29	1.37		3.38
1.30	2.30	3.30	1.38		3.39
1.31		3.31			3.40
1.32		3.32			3.41
1.33		3.33			3.42
1.34		3.34			3.44
1.35		3.35			3.45
1.36		3.36			
1.37		3.37			
1.38		3.38			
		3.39			
		3.40			
		3.41			
		3.42			
		3.43			
		3.44			
		3.45			
		3.46			
		3.47			

Phụ lục 8. Danh mục dòng lúa BT7 kiểm tra PCR dương tính

TT	Môi Actin			Môi HPT			Môi Cas9			Môi gRNA-SW14		
	Lô 1	Lô 2	Lô 3	Lô 1	Lô 2	Lô 3	Lô 1	Lô 2	Lô 3	Lô 1	Lô 2	Lô 3
1	1.01	2.02	3.01	1.01	2.02	3.01	1.01	2.02	3.01	1.01	2.02	3.01
2	1.02	2.03	3.02	1.02	2.03	3.02	1.02	2.03	3.02	1.02	2.03	3.02
3	1.03	2.04	3.04	1.03	2.04	3.04	1.03	2.04	3.04	1.03	2.04	3.04
4	1.05	2.05	3.05	1.05	2.05	3.05	1.05	2.06	3.05	1.05	2.06	3.05
5	1.07	2.06	3.06	1.07	2.06	3.06	1.07	2.07	3.06	1.07	2.07	3.06
6	1.08	2.07	3.07	1.08	2.07	3.07	1.08	2.08	3.07	1.08	2.08	3.07
7	1.09	2.08	3.08	1.09	2.08	3.08	1.09	2.11	3.08	1.09	2.11	3.08
8	1.10	2.11	3.09	1.10	2.11	3.09	1.10	2.12	3.09	1.10	2.12	3.09
9	1.11	2.12	3.10	1.11	2.12	3.10	1.11	2.13	3.10	1.11	2.13	3.10
10	1.12	2.13	3.11	1.12	2.13	3.11	1.12	2.15	3.11	1.12	2.15	3.11
11	1.14	2.15	3.13	1.14	2.15	3.13	1.14	2.16	3.13	1.14	2.16	3.13
12	1.15	2.16	3.14	1.15	2.16	3.14	1.15	2.17	3.14	1.15	2.17	3.14
13	1.16	2.17	3.15	1.16	2.17	3.15	1.16	2.18	3.15	1.16	2.18	3.15
14	1.17	2.18	3.17	1.17	2.18	3.17	1.17	2.19	3.17	1.17	2.19	3.17
15	1.18	2.19	3.18	1.18	2.19	3.18	1.18	2.23	3.18	1.18	2.23	3.18
16	1.20	2.21	3.19	1.20	2.21	3.19	1.20	2.24	3.19	1.20	2.24	3.19
17	1.21	2.23	3.20	1.21	2.23	3.20	1.21	2.25	3.20	1.21	2.25	3.20
18	1.22	2.24	3.21	1.22	2.24	3.21	1.22	2.27	3.21	1.22	2.27	3.21
19	1.23	2.25	3.22	1.23	2.25	3.22	1.23	2.29	3.22	1.23	2.29	3.22
20	1.24	2.26	3.23	1.24	2.26	3.23	1.24	2.30	3.25	1.24	2.30	3.25
21	1.25	2.27	3.24	1.25	2.27	3.24	1.25		3.27	1.25		3.27
22	1.26	2.29	3.25	1.26	2.29	3.25	1.26		3.28	1.26		3.28
23	1.28	2.30	3.27	1.28	2.30	3.27	1.28		3.30	1.28		3.30
24	1.30		3.28	1.30		3.28	1.30		3.35	1.30		3.35
25	1.31		3.30	1.31		3.30	1.32		3.38	1.32		3.38
26	1.32		3.32	1.32		3.32	1.34		3.40	1.34		3.40
27	1.34		3.33	1.34		3.33	1.35		3.41	1.35		3.44
28	1.35		3.35	1.35		3.35	1.37		3.42	1.37		3.45
29	1.37		3.38	1.37		3.38			3.44			
30	1.38		3.39	1.38		3.39			3.45			
31			3.40			3.40						
32			3.41			3.41						
33			3.42			3.42						
34			3.44			3.44						
35			3.45			3.45						

Phụ lục 9. Sàng lọc các dòng lúa BT7 chuyển gen bằng qPCR.

STT	Lô 1		Lô 2		Lô 3	
	Dòng	Av 2 Δ Ct \pm SD	Dòng	Av 2 Δ Ct \pm SD	Dòng	Av 2 Δ Ct \pm SD
1	1.01	0.53 \pm 0.002	2.02	0.48 \pm 0.031	3.01	1.05 \pm 0.057
2	1.02	0.95 \pm 0.057	2.03	0.94 \pm 0.027	3.02	0.55 \pm 0.029
3	1.03	0.52 \pm 0.028	2.04	0.49 \pm 0.013	3.04	0.41 \pm 0.018
4	1.05	0.51 \pm 0.017	2.06	0.49 \pm 0.043	3.05	0.91 \pm 0.012
5	1.07	0.47 \pm 0.020	2.07	1.01 \pm 0.212	3.06	0.49 \pm 0.032
6	1.08	1.25 \pm 0.017	2.08	0.53 \pm 0.002	3.07	0.52 \pm 0.020
7	1.09	0.52 \pm 0.029	2.11	0.53 \pm 0.002	3.08	1.15 \pm 0.019
8	1.10	0.51 \pm 0.008	2.12	0.52 \pm 0.029	3.09	1.52 \pm 0.029
9	1.11	1.37 \pm 0.015	2.13	0.41 \pm 0.057	3.10	0.51 \pm 0.008
10	1.12	0.53 \pm 0.044	2.15	1.01 \pm 0.212	3.11	0.58 \pm 0.021
11	1.14	0.57 \pm 0.014	2.16	0.93 \pm 0.026	3.13	0.52 \pm 0.059
12	1.15	0.44 \pm 0.048	2.17	0.53 \pm 0.002	3.14	0.49 \pm 0.038
13	1.16	1.17 \pm 0.126	2.18	0.41 \pm 0.057	3.15	0.50 \pm 0.041
14	1.17	0.90 \pm 0.053	2.19	1.17 \pm 0.126	3.17	0.93 \pm 0.026
15	1.18	0.54 \pm 0.027	2.23	0.91 \pm 0.212	3.18	1.27 \pm 0.126
16	1.20	0.48 \pm 0.031	2.24	1.20 \pm 0.159	3.19	0.51 \pm 0.039
17	1.21	1.01 \pm 0.212	2.25	0.95 \pm 0.057	3.20	0.88 \pm 0.037
18	1.22	1.10 \pm 0.159	2.27	1.29 \pm 0.035	3.21	0.41 \pm 0.028
19	1.23	0.49 \pm 0.035	2.29	0.99 \pm 0.040	3.22	1.49 \pm 0.027
20	1.24	0.50 \pm 0.049	2.30	0.93 \pm 0.026	3.25	0.52 \pm 0.029
21	1.25	1.17 \pm 0.020			3.27	0.41 \pm 0.057
22	1.26	0.51 \pm 0.033			3.28	1.61 \pm 0.112
23	1.28	0.97 \pm 0.015			3.30	1.26 \pm 0.059
24	1.30	0.91 \pm 0.022			3.35	1.52 \pm 0.069
25	1.32	0.93 \pm 0.026			3.38	1.31 \pm 0.037
26	1.34	0.99 \pm 0.040			3.40	1.45 \pm 0.019
27	1.35	0.91 \pm 0.027			3.44	1.07 \pm 0.02
28	1.37	0.91 \pm 0.008			3.45	0.57 \pm 0.012

Phụ lục 10. Kết quả đánh giá sinh trưởng của dòng lúa BT7 đột biến thể hệ T₀.

STT	Tên dòng	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Chiều cao cây trưởng thành (cm)	Số hạt thu được (hạt)
1	BT7-WT	105	105,20	85
2	BT7 <i>in vitro</i> , không chuyển gen	102	100,51	43
3	1.01	104	100,00	53
4	1.03	105	100,20	32
5	1.05	103	56,83	0
6	1.07	104	99,13	8
7	1.09	Cây chết sau khi trồng ra đất		
8	1.10	105	98,55	61
9	1.12	106	98,17	58
10	1.15	104	100,38	44
11	1.18	105	62,20	11
12	1.23	104	101,83	29
13	1.24	Cây chết sau khi trồng ra đất		
14	1.26	105	100,17	0
15	2.02	105	99,50	68
16	2.04	102	97,67	37
17	2.06	104	99,17	5
18	2.08	105	101,67	14
19	2.12	Cây chết sau khi trồng ra đất		
20	2.13	103	98,95	10
21	2.17	Cây chết sau khi trồng ra đất		
22	2.18	104	95,25	7
23	3.02	105	104,33	11
24	3.04	102	41,88	0
25	3.06	Cây chết sau khi trồng ra đất		
26	3.10	104	101,17	8
27	3.11	Cây chết sau khi trồng ra đất		
28	3.13	105	44,57	0
29	3.14	103	96,75	55
30	3.19	104	98,50	6
31	3.21	105	100,75	18
32	3.25	Cây chết sau khi trồng ra đất		
33	3.27	106	96,17	16
34	3.45	Cây chết sau khi trồng ra đất		