

NGHIÊN CỨU TÍNH KHÁNG BỆNH BẠC LÁ CỦA CÁC DÒNG LÚA TBR225 ĐỘT BIẾN PROMOTER *OsSWEET14*

Trần Lan Đài¹, Phạm Thu Hằng², Nguyễn Thị Thu Hà²,
Nguyễn Thanh Hà², Phạm Xuân Hội², Nguyễn Duy Phương^{2,*}

TÓM TẮT

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (*Xoo*) gây ra bệnh bạc lá lúa thông qua tương tác đặc hiệu giữa các TAL effector (transcription activator-like effector) và trình tự EBE (effector binding element) nằm trên vùng promoter của các gen thuộc họ gen mã hóa protein vận chuyển đường SWEET (Sugars will eventually be exported transporter), trong đó có gen *OsSWEET14*. Sử dụng công cụ CRISPR/Cas9 để gây đột biến một số trình tự đặc hiệu trên promoter này có thể vô hiệu hóa tính độc của các TAL effector giúp cây trồng kháng được bệnh bạc lá lúa. Đây là hướng nghiên cứu đầy triển vọng để cải thiện tính kháng bạc lá phổ rộng của các giống lúa chủ lực của Việt Nam, đặc biệt là giống lúa nhạy cảm với bệnh bạc lá như TBR225. Trong nghiên cứu trước đây, đã tạo được một số dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen thể hệ T₁ mang đột biến tại vị trí EBE *AvrXa7/Tal5* trên promoter *OsSWEET14*. Trong nghiên cứu này, phân tích trên dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen ở thể hệ T₂ đã chứng tỏ các đột biến trên promoter *OsSWEET14* không làm thay đổi các chỉ tiêu nông học cơ bản của cây. Sáu dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen T₂ không thay đổi mức độ biểu hiện gen đích *OsSWEET14* khi được lây nhiễm với vi khuẩn *Xoo* và thể hiện tính kháng hoàn toàn với isolate VXO_11, kháng nhẹ hoặc không kháng với isolate VXO_80 và VXO_100. Kết quả thu được là tiền đề cho nghiên cứu phát triển giống lúa TBR225 kháng bạc lá trong tương lai.

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

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa (*Oryza sativa* L.) là một trong những loại cây trồng ngũ cốc quan trọng nhất thế giới, cung cấp thức ăn cho con người nhiều hơn bất kỳ cây trồng khác. Bệnh bạc lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây ra là một bệnh hại lúa rất phổ biến, làm sụt giảm nghiêm trọng năng suất lúa trên toàn thế giới [1], trong đó có giống lúa TBR225 của Việt Nam. Cho đến nay, chọn tạo và sử dụng giống lúa kháng bệnh vẫn là một cách tiếp cận kinh tế và hiệu quả nhất trong việc quản lý bệnh bạc lá lúa.

Khả năng gây bệnh của *Xoo* phụ thuộc vào một loại độc tố được gọi là “TAL effector”, hoạt động tương tự như các yếu tố điều hòa phiên mã ở

thực vật [2, 3]. Các TAL effector sau khi đi vào nhân tế bào cây chủ sẽ liên kết với promoter của các gen đặc hiệu trong hệ gen thực vật và hoạt hóa sự biểu hiện của chúng [4]. Hệ gen *Xoo* điển hình chứa số lượng gen *tal* rất khác nhau giữa các chủng ở các khu vực địa lý khác nhau (chủng *Xoo* châu Á có 15-26 gen, chủng *Xoo* châu Phi có 8-10 gen và chủng *Xoo* Bắc Mỹ không có gen *tal*) [5]. Các gen mục tiêu của TAL effector trong hệ gen lúa được coi là các gen “nhễm” (*S* gen-susceptibility genes), đóng vai trò là các yếu tố nhạy cảm chính trong quá trình tương tác giữa cây lúa và *Xoo*. Trong một số trường hợp, tính đa hình trong trình tự EBE (liên kết với TAL) nằm trên promoter của các gen “nhễm” tạo ra tính kháng bệnh cho cây [3, 6]. *OsSWEET14* thuộc họ gen vận chuyển đường *SWEET*, được biết đến như một trong các gen “nhễm” được hoạt hóa bởi TAL effector của *Xoo* [6, 7]. Bằng các công nghệ chỉnh sửa gen như TALEN và CRISPR/Cas9, các nhà

¹ Trường Đại học Quy Nhơn

² Viện Di truyền nông nghiệp

*Email: phuondn.bio@gmail.com

nguyên cứu đã tạo ra đột biến trên vùng EBE của promoter *OsSWEET14* của giống lúa Kitaake và Bắc Thơm 7, kết quả là các dòng lúa mang đột biến này có khả năng kháng được các chủng *Xoo* châu Á và châu Phi [2, 8]. Điều này đã chứng minh tiềm năng của việc ứng dụng công nghệ chỉnh sửa hệ gen để tạo ra giống lúa TBR225 kháng bạc lá phổ rộng.

Nguyễn Duy Phương và cs (2019) đã chuyển cấu trúc biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa EBE *AvrXa7/Tal5* trên promoter *OsSWEET14* và thu được một số dòng lúa mang cấu trúc T-DNA [9]. Trong nghiên cứu này, để xác định ảnh hưởng của các đột biến *OsSWEET14* tới kiểu hình của

TBR225, đã tiếp tục phân tích các đặc điểm nông học và đánh giá khả năng kháng bệnh bạc lá của các dòng lúa TBR225 ở thế hệ T_2 mang các đột biến *OsSWEET14* đồng hợp. Kết quả thu được của nghiên cứu này sẽ là nền tảng đầy đủ để tạo giống lúa TBR225 kháng bệnh bạc lá phổ rộng bằng công nghệ gen trong tương lai.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

15 dòng lúa TBR225 đột biến *OsSWEET14* do Bộ môn Bệnh học phân tử, Viện Di truyền nông nghiệp cung cấp [10] (Bảng 1).

Bảng 1. Dòng lúa TBR225 đột biến *OsSWEET14* sử dụng trong nghiên cứu

Tên dòng	Loại đột biến ¹	Vị trí đột biến ²	Tên dòng	Loại đột biến ¹	Vị trí đột biến ²
D1.5.2.9	(-3) AAC	5	D1.12.37.19	(+1) A	17
D1.5.3.1	(-2) CC	18	D2.3.34.15	(+6) GCTTGA	20
D1.5.7.11	(-2) CC	18	D2.4.7.11	(-3) CCA	13
D1.5.7.19	(-3) AAC	5	D2.5.8.3	(-5) TGCTA	22
D1.7.20.1	(-6) CCAACC	13	D3.4.9.20	(+2) TG	19
D1.7.20.2	(-6) CCAACC	13	D3.6.22.10	(+1) C	21
D1.9.3.6	(+3) GAC	18	D3.12.25.2	(-3) TCC	12
D1.9.39.2	(+2) CT	19			

Ghi chú: ¹ Số Nu thay đổi trên *OsSWEET14*; (+/-) thêm/mất Nu; kí tự trong ngoặc thể hiện Nu thay đổi trên *OsSWEET14*; ² Vị trí của đột biến tính từ đầu 5' của EBE *AvrXa7*.

Các chủng vi khuẩn bạc lá VXO_11, VXO_80 và VXO_100 được phân lập năm 2013, 2016 và 2017 [11], lưu giữ tại Bộ môn Bệnh học phân tử, Viện Di truyền nông nghiệp.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Đánh giá đặc điểm nông học của lúa

Hạt của các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen *OsSWEET14* thế hệ 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. Sau 14 ngày, cây con được chuyển sang trồng trong chậu đất lớn và chăm sóc trong điều kiện nhà lưới. 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. Dòng lúa TBR225 không chuyển gen được sử dụng làm đối chứng. Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện nhà lưới, vụ mùa năm 2020.

2.2.2. Đánh giá biểu hiện gen *OsSWEET14*

Thí nghiệm phân tích biểu hiện gen được thực hiện theo mô tả của Li và cs (2013) bằng phương pháp RT-PCR [12]. Ba cây lúa từ mỗi dòng được lựa chọn ngẫu nhiên cho thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo. Lá cây lúa 4 tuần tuổi được lây nhiễm nhân tạo với vi khuẩn *Xoo* theo phương pháp cắt lá của Ke Y. và cs (2017) [13]. Lá lúa sau 48 giờ lây nhiễm được sử dụng để tách chiết RNA tổng số

theo quy trình hướng dẫn của hãng Invitrogen. Một microgram RNA được sử dụng cho mỗi phản ứng RT-PCR sử dụng lần lượt mỗi oligo (dT) và cặp mỗi OsSWEET14-qPCR-F/ OsSWEET14-qPCR-R. *OsEF1a* được sử dụng làm gen nội chuẩn. Thí nghiệm RT-PCR được lặp lại 3 lần trên mỗi cây.

2.2.3. Đánh giá khả năng kháng vi khuẩn bạc lá *Xoo*

Thí nghiệm lây nhiễm *Xoo* và đánh giá tính kháng vi khuẩn bạc lá của các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen được thực hiện theo phương pháp cắt lá, sử dụng chủng vi khuẩn bạc lá VXO_11, VXO_80 và VXO_100. Vi khuẩn *Xoo* được nuôi cấy trên môi trường PSA đặc để thu sinh khối và pha loãng trong dung dịch $MgCl_2$ 10 mM (OD_{600} đạt 0,5). Đầu phiến lá lúa (3 - 4 cm) được cắt bằng kéo đã được nhúng trong dung dịch vi khuẩn *Xoo*. Sau 14 ngày, chiều dài vết bệnh phát triển trên lá lúa được ghi lại. Khả năng kháng bạc lá được xếp theo thang điểm: kháng mạnh - R (vết bệnh < 8 cm), kháng vừa - MR (vết bệnh từ 8 - 12 cm) và miễn cảm - S (vết bệnh > 12 cm). Thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần, mỗi lần trên ít nhất 3 cây (lá thứ nhất và lá thứ hai trên mỗi nhánh của cây). Dòng

lúa TBR225 không chuyển gen được sử dụng làm đối chứng. Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện nhà lưới, vụ mùa năm 2020.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá một số đặc điểm nông học của dòng lúa TBR225 đột biến *OsSWEET14*

Để đánh giá mức độ ảnh hưởng của đột biến trên promoter *OsSWEET14* đến một số đặc điểm nông học của các dòng lúa chỉnh sửa gen, 15 dòng lúa TBR225 ở thế hệ T_2 mang đột biến đồng hợp đã được phân tích, đánh giá các chỉ tiêu: Thời gian sinh trưởng, chiều cao cây, số nhánh, số hạt chắc/bông và năng suất cá thể khi trồng trong điều kiện nhà lưới. Phân tích kết quả thu được bằng kiểm định ANOVA và *t*-test cho thấy, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các dòng lúa đột biến so với dòng lúa đối chứng không đột biến gen về tất cả các tính trạng nông học được quan sát (Bảng 2). Điều này chứng tỏ rằng các đột biến trên *OsSWEET14* được tạo ra bởi hệ thống CRISPR/Cas9 không gây ra ảnh hưởng tiêu cực đến các đặc điểm sinh trưởng phát triển của giống lúa TBR225.

Bảng 2. Kết quả đánh giá chỉ tiêu nông học của dòng lúa TBR225 đột biến *OsSWEET14*

Tên dòng	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Chiều cao (cm)	Số nhánh	Số hạt chắc/bông	Năng suất cá thể (gam)
WT	107,10±5,34 ^a	115,25±3,54 ^a	6,90±1,02 ^a	79,40±1,03 ^a	21,05±0,54 ^a
1.5.2.9	105,30±3,05 ^a	112,35±4,10 ^a	6,92±1,40 ^a	79,25±1,40 ^a	21,27±0,33 ^a
1.5.3.1	107,55±5,34 ^{ac}	114,32±4,14 ^a	6,88±1,08 ^a	79,25±1,39 ^a	21,60±0,26 ^a
1.5.7.11	108,42±3,18 ^a	115,48±3,18 ^a	6,90±1,15 ^a	81,25±1,05 ^{ab}	22,63±0,42 ^{ab}
1.5.7.19	106,85±4,28 ^a	113,25±4,28 ^a	7,14±1,20 ^{ab}	79,35±1,06 ^a	21,35±1,53 ^a
1.7.20.1	107,25±2,46 ^a	114,15±3,56 ^a	7,00±0,80 ^{ab}	80,95±1,18 ^{ab}	21,24±1,17 ^a
1.7.20.2	108,33±2,46 ^a	115,25±4,76 ^a	6,90±1,05 ^a	79,85±0,78 ^a	21,18±1,19 ^a
1.9.3.6	108,52±4,45 ^a	115,30±4,25 ^a	6,89±0,88 ^a	80,90±0,88 ^{ab}	21,18±0,33 ^a

1.9.39.2	109,15±4,18 ^a	116,15±5,18 ^a	6,95±0,85 ^a	79,65±1,04 ^a	21,56±0,32 ^a
1.12.37.19	107,14±4,42 ^a	114,35±4,92 ^a	7,14±1,20 ^{ab}	78,95±0,98 ^a	21,90±0,50 ^a
2.3.34.15	108,15±4,25 ^a	115,20±5,25 ^a	6,80±0,97 ^a	79,65±0,72 ^a	21,45 ±0,88 ^a
2.4.7.11	107,34±4,53 ^a	114,36±4,93 ^a	6,90±0,95 ^a	80,75±0,97 ^{ab}	21,25 ±0,96 ^a
2.5.8.3	108,13±3,82 ^a	115,45±4,82 ^a	6,92±0,99 ^a	79,50±1,42 ^a	21,69±0,68 ^a
3.4.9.20	108,18±4,54 ^a	115,35±3,76 ^a	6,88±1,17 ^a	79,5±0,78 ^a	21,18±1,19 ^a
3.6.22.10	108,23±3,25 ^a	115,33±3,25 ^a	6,79±0,84 ^a	80,10±0,88 ^a	21,25±0,33 ^a
3.12.25.2	108,52±4,28 ^a	116,50±3,18 ^a	7,20±1,25 ^{ab}	79,25±1,04 ^a	21,16±0,32 ^a

*Ghi chú: * Các giá trị trung bình có cùng kí tự sai khác nhau không có ý nghĩa thống kê (HSD test, $p>0,05$)*

Các gen thuộc họ gen *SWEET* không những liên quan đến con đường cung cấp chất dinh dưỡng cho vi sinh vật gây bệnh mà còn có vai trò quan trọng đối với quá trình phát triển phần hoa và tạo hạt của cây chủ [1, 14]. Nghiên cứu của Yang và cs (2006) tạo dòng lúa kháng bạc lá sử dụng công nghệ iRNA để bất hoạt gen *Os8N3/OsSWEET11* đã dẫn đến sự phát triển bất thường của phần hoa [6]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, các tính trạng nông học được đánh giá của dòng lúa TBR225 mang đột biến promoter *OsSWEET14* đều không có sự khác biệt đáng kể so với dòng lúa đối chứng trong điều kiện nhà lưới. Phát hiện này tương tự như kết quả nghiên cứu của Kim và cs (2019) khi gây đột biến gen *OsSWEET13* bằng CRISPR/Cas9 trên giống lúa Kitakee hay Oliva và cs (2019) tạo tổ hợp đột biến 3 promoter *OsSWEET11*, *OsSWEET13*, *OsSWEET14* và thu được dòng lúa kháng bệnh bạc lá mà không làm thay đổi các đặc điểm sinh trưởng, phát triển vốn có [15, 16]. Điều này có thể lý giải bởi một số giả thuyết khác nhau như do sự dư thừa hay hiện tượng bù đắp di truyền (genetic compensation) của các gen *SWEET* trong hệ gen lúa. Kết quả nghiên cứu này đã góp phần khẳng định rằng việc tạo ra các đột biến nhỏ trên vùng promoter của gen *OsSWEET14* bằng công nghệ CRISPR/Cas9 không ảnh hưởng đến sự sinh

trưởng, phát triển và năng suất của giống lúa TBR225.

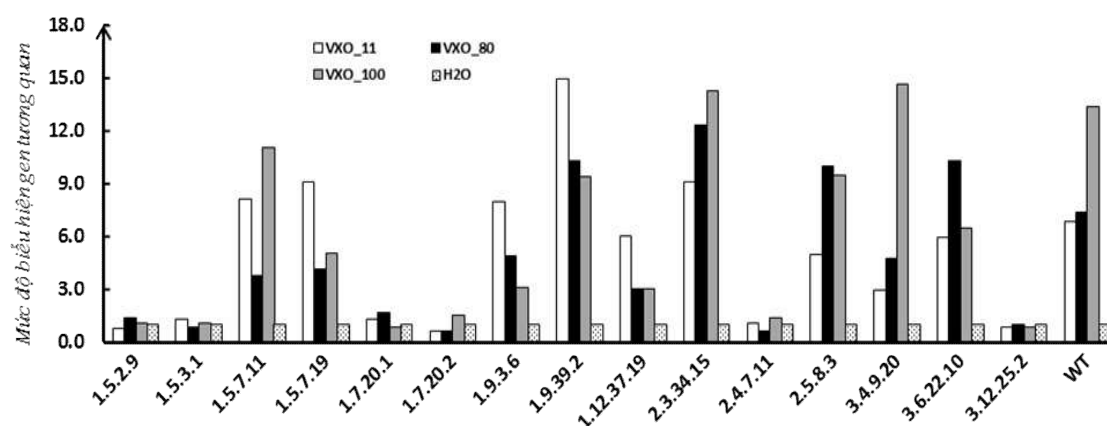
3.2. Nghiên cứu biểu hiện *OsSWEET14* trong các dòng lúa TBR225 đột biến

Các dòng lúa đột biến *OsSWEET14* được lấy nhiễm nhân tạo với ba isolate *Xoo* đại diện (VXO_11, VXO_80 và VXO_100) và phân tích mức độ biểu hiện của gen *OsSWEET14* để xác định hiệu quả của các đột biến được tạo ra bằng hệ thống CRISPR/Cas9 đối với hoạt động của gen đích.

Sản phẩm RT-PCR sau khi phân tích bằng phần mềm ImageJ (Hình 1) cho thấy, mức độ biểu hiện gen của các dòng lúa đột biến *OsSWEET14* được chia thành 2 nhóm rõ rệt. Nhóm thứ nhất bao gồm 6 dòng lúa (1.5.2.9; 1.5.7.19; 1.7.20.1; 1.7.20.2; 2.4.7.11 và 3.12.25.2) hầu như không có sự thay đổi đáng kể nào về mức độ biểu hiện của gen đích khi được lấy nhiễm với vi khuẩn *Xoo*. Nhóm thứ hai bao gồm 9 dòng lúa (1.5.3.1; 1.5.7.11; 1.9.3.6; 1.9.39.2; 1.12.37.19; 2.3.34.15; 2.5.8.3; 3.4.9.20 và 3.6.22.10) với mức độ biểu hiện gen *OsSWEET14* tăng đáng kể khi được lấy nhiễm với cả 3 isolate *Xoo* đại diện, tương tự như dòng lúa TBR225 đối chứng không chỉnh sửa gen. Kết quả này chứng tỏ các đột biến khác nhau trên EBE có thể ảnh hưởng khác nhau tới liên kết của EBE trên promoter *OsSWEET* với protein TAL của *Xoo*. Giả

thuyết này cũng đã được Blanvillain–Baufumé và cs (2017) đề cập đến trong nghiên cứu đột biến EBE *TalF/Tal5* trên *OsSWEET14* của lúa Kitaake [2]. Các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa gen không

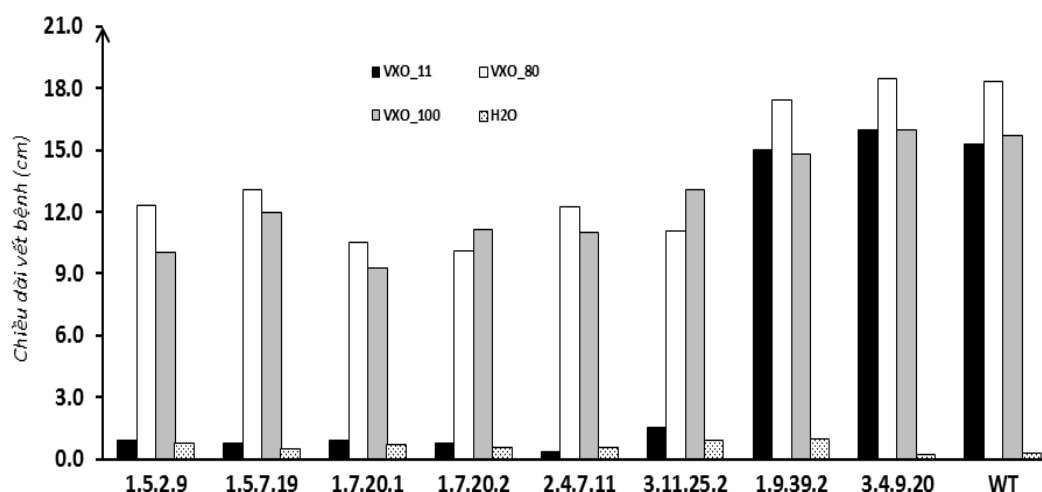
thay đổi biểu hiện gen *OsSWEET14* khi lây nhiễm *Xoo* được lựa chọn để đánh giá khả năng kháng bệnh bạc lá trong thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Biểu hiện của *OsSWEET14* trong dòng lúa TBR225 đột biến

Ghi chú: Biểu hiện của *OsSWEET14* trên dòng lúa TBR225 đột biến *OsSWEET14* lây nhiễm isolate *Xoo* đại diện (VXO_11, 80 và 100) được phân tích bằng RT-PCR. Đồ thị thể hiện giá trị tương quan mức độ biểu hiện gen giữa các mẫu lúa; mức độ biểu hiện gen *OsSWEET14* của mẫu lúa không lây nhiễm *Xoo* (H_2O) có giá trị bằng 1; *OsEF1a* được sử dụng làm gen nội chuẩn; (WT) dòng lúa TBR225 không đột biến *OsSWEET14*. Giá trị thể hiện trên đồ thị là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại thí nghiệm.

3.3. Đánh giá khả năng kháng bệnh bạc lá của dòng lúa TBR225 đột biến *OsSWEET14*



Hình 2. Đánh giá tính kháng bệnh bạc lá của dòng lúa TBR225 đột biến *OsSWEET14*

Ghi chú: Các dòng lúa đột biến *OsSWEET14* (1.5.2.9; 1.5.7.19; 1.7.20.1; 1.7.20.; 2.4.7.11; 3.11.25.2; 1.9.39.2 và 3.4.9.20) và không đột biến *OsSWEET14* (WT) được lây nhiễm nhân tạo các isolate *Xoo* đại diện (VXO_11, VXO_80 và VXO_100). (H_2O) thí nghiệm đối chứng âm (lây nhiễm dung dịch không chứa vi khuẩn *Xoo*).

Để chứng minh hiệu quả của công cụ CRISPR/Cas9 trong việc cải tiến tính kháng bệnh bạc lá cho giống lúa TBR225, sáu dòng lúa đột biến có mức độ biểu hiện *OsSWEET14* không thay đổi khi lây nhiễm *Xoo* (1.5.2.9; 1.5.7.19; 1.7.20.1; 1.7.20.2; 2.4.7.11 và 3.12.25.2) và hai dòng lúa đột biến có mức độ biểu hiện *OsSWEET14* thay đổi tương tự dòng lúa đối chứng khi lây nhiễm *Xoo* (1.9.39.2 và 3.4.9.20) được lựa chọn để đánh giá tính kháng với 3 isolate *Xoo* đại diện (VXO_11, VXO_80 và VXO_100) trong điều kiện nhà lưới (Hình 2).

Quan sát biểu hiện bệnh trên lá thu được sau 14 ngày lây nhiễm cho thấy hai dòng lúa đột biến *OsSWEET14* 1.9.39.2 và 3.4.9.20 không thể hiện tính kháng với tất cả các isolate *Xoo* được đánh giá. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả phân tích biểu hiện gen thu được ở trên, trong đó *OsSWEET14* tăng cường biểu hiện rất mạnh khi các dòng lúa này được lây nhiễm nhân tạo với 3 isolate VXO_11, VXO_80 và VXO_100 (Hình 1). Ngược lại, sáu dòng lúa 1.5.2.9; 1.5.7.19; 1.7.20.1; 1.7.20.2; 2.4.7.11 và 3.12.25.2 thể hiện tính kháng rõ rệt với isolate VXO_11; chiều dài vết bệnh trung bình quan sát được từ 0,4 – 1,5 cm (Hình 2). Tuy nhiên, sáu dòng lúa đột biến này lại chỉ kháng nhẹ hoặc không kháng đối với hai isolate VXO_80 và VXO_100; trong khi gen đích *OsSWEET14* cũng hầu như không thay đổi biểu hiện trong thí nghiệm đánh giá biểu hiện gen với hai isolate này. Các kết quả này gợi ý rằng *OsSWEET14* là gen “nhiễm” duy nhất của đối với isolate VXO_11; trong khi hai isolate VXO_80 và VXO_100 có thể có ít nhất 2 đích tấn công trong hệ gen của TBR225.

Các gen thuộc họ *SWEET* được xác định là gen “nhiễm” của *Xoo*, do đó khi tác động gây đột biến các gen này sẽ góp phần vô hiệu hóa các protein “độc” TALE của *Xoo*; kết quả là cây trồng có khả năng kháng được bệnh bạc lá [16]. Nghiên cứu trước đây đã tiến hành gây đột biến *OsSWEET14* trên giống lúa Kitaake bằng công nghệ TALEN hay *OsSWEET11* bằng CRISPR/Cas9 và thu được dòng lúa kháng chủng *Xoo* biểu hiện protein TAL *AvrXa7/PthXo3* hay

PthXo1 tương ứng. Tuy nhiên, tính kháng của dòng lúa Kitaake mang đột biến *AvrXa7/PthXo3* (*OsSWEET14*) và *PthXo1* (*OsSWEET11*) lại bị vô hiệu hóa bởi chủng *Xoo* mang protein đồng thời gen *tal* mã hóa *AvrXa7/PthXo3* và *PthXo2* [16]. Như vậy, tính kháng 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*. Trong nghiên cứu này, 6 dòng lúa 1.5.2.9; 1.5.7.19; 1.7.20.1; 1.7.20.2; 2.4.7.11 và 3.12.25.2 mang đột biến đồng hợp trên EBE *AvrXa7/Tal5/PthXo3* biểu hiện tính kháng isolate VXO_11 được tăng cường rõ rệt so với dòng lúa TBR225 đối chứng. Tính kháng không hoàn toàn/không kháng với các isolate còn lại có thể giải thích do sự có mặt của một/một vài EBE trên (các) gen “nhiễm” khác cũng được nhận biết bởi protein TAL khác của các isolate này.

Với các kết quả thu được như trên đã chứng minh triển vọng của công nghệ CRISPR/Cas9 trong việc cải tạo tính kháng bệnh bạc lá cho các giống lúa chủ lực của Việt Nam trong đó có giống lúa TBR225, đồng thời cũng chứng minh sự đa dạng về protein TAL của các chủng *Xoo* của Việt Nam. Trong tương lai, cần phải có những nghiên cứu đầy đủ và sâu hơn về TALome của các chủng vi khuẩn *Xoo* để có thể tạo ra tính kháng bạc lá phổ rộng cho các giống lúa trên.

4. KẾT LUẬN

Đột biến trên promoter *OsSWEET14* không gây ảnh hưởng tới một số đặc điểm nông sinh học chính của giống lúa TBR225, bao gồm các chỉ tiêu chiều cao cây, số nhánh, số hạt chắc trên bông, năng suất cá thể. Sáu dòng lúa TBR225 đột biến 1.5.2.9; 1.5.7.19; 1.7.20.1; 1.7.20.2; 2.4.7.11 và 3.12.25.2 có khả năng kháng vi khuẩn *Xoo* cao hơn so với dòng lúa đối chứng, thể hiện tính kháng hoàn toàn với isolate VXO_80, kháng nhẹ hoặc không kháng với isolate VXO_11 và VXO_100.

Kết quả thu được là cơ sở để tiếp tục nghiên cứu cơ chế phân tử quá trình xâm nhiễm của vi khuẩn *Xoo* trên giống lúa TBR225, từ đó phát triển tính kháng bệnh bạc lá phổ rộng cho giống lúa chủ lực này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yang J., Luo D., Yang B., Frommer W. B. & Eom J. S. (2018). SWEET11 and 15 as key players in seed filling in rice. *New Phytologist*, 218(2): 604-615. <https://doi.org/10.1111/nph.15004>
2. Blanvillain-Baufumé S., Reschke M., Solé M., Auguy F., Doucoure H., Szurek B., Meynard D., Portefaix M., Cunnac S., Guiderdoni E., Boch J., Koebnik R. (2017). Targeted promoter editing for rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* reveals differential activities for *SWEET14* inducing TAL effectors. *Plant Biotechnology Journal*, 15(3):306-317.
3. Hutin M., Perez-Quintero A. L., Lopez C. & Szurek B. (2015a). MorTAL Kombat: the story of defense against TAL effectors through loss-of-susceptibility. *Front Plant Science*, 6: 535.
4. Schornack S., Moscou M. J., Ward E. R. & Horvath D. M. (2013). Engineering plant disease resistance based on TAL effectors. *Annual Review of Phytopathology*, 51:383-406. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102255>
5. Erkes A., Reschke M., Boch J. & Grau J. (2017). Evolution of transcription activator-like effectors in *Xanthomonas oryzae*. *Genome Biology and Evolution*, 9(6) : 1599 - 1615. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx108>
6. Yang B., Sugio A. & White F. F. (2006). Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceeding of the National Academy of Science*, 103(27):10503-10508. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604088103>
7. 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(6065) : 207 - 211. <https://doi.org/10.1126/science.1213351>
8. Cao Lệ Quyên, Vũ Hoài Sâm, Nguyễn Thanh Hà, Nguyễn Thị Thu Hà, Phùng Thị Thu Hương, Trần Tuấn Tú, Phạm Xuân Hội, Nguyễn Duy Phương (2021). Nghiên cứu đặc điểm di truyền đột biến promoter *OsSWEET14* trên các dòng lúa Bắc thơm 7 chỉnh sửa gen. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 18:74-81.
9. Nguyễn Duy Phương, Phạm Thu Hằng, Phùng Thị Thu Hương, Phạm Xuân Hội (2019). Chuyển cấu trúc chỉnh sửa promoter *OsSWEET14* vào giống lúa TBR225. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 17(1): 1-7.
10. Trần Lan Đài, Phạm Thu Hằng, Cao Lệ Quyên, Phạm Thị Vân, Phạm Xuân Hội, Nguyễn Duy Phương (2021). Nghiên cứu đặc điểm di truyền đột biến của các dòng lúa TBR225 chỉnh sửa promoter *OsSWEET14*. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 20(5): 576-583.
11. Phạm Phương Ngọc, Trần Lan Đài, Đỗ Thị Hạnh, Nguyễn Quang Huy, Nguyễn Duy Phương (2021). Functional characterization of the *OsSWEET13* promoter involved in the infection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice cultivar TBR225. *Academia Journal of Biology*, 44(3):57-65.
12. Li T., Huang S., Zhou J., Yang B. (2013). Designer TAL effectors induce disease susceptibility and resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Molecular Plant*, 6(3): 781-789.
13. Ke Y., Hui S. & Yuan M. (2017). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* inoculation and growth rate on rice by clipping method. *Bio-protocol*, 7(19): e2568.
14. Chen L. Q. (2014). SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytologist*, 201(4): 1150-1155.
15. Kim Y. A., Moon H & Park C. J. (2019). CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of Os8N3 in rice to confer resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Rice*, 12: 67.
16. Oliva R., Ji C., Atienza-Grande G., Huguet-Tapia J. C., Perez-Quintero A., Li T., Eom J. S., Li C., Nguyen H., Liu B., Auguy F., Sciallano C., Luu V. T., Dossa G. S., Cunnac S., Schmidt S. M., Slamet-Loedin I. H., Vera Cruz C., Szurek B., Frommer W. B., White F. F., Yang B. (2019). Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing. *Nature Biotechnology*, 37(11): 1344-1350.

EVALUATION OF BACTERIAL LEAF BLIGHT DISEASE RESISTANCE OF *OsSWEET14*
PROMOTER-EDITED TBR225 RICE LINES

Tran Lan Dai¹, Pham Thu Hang², Nguyen Thi Thu Ha²,
Nguyen Thanh Ha², Pham Xuan Hoi², Nguyen Duy Phuong²

¹Quy Nhon University

²Agricultural Genetics Institute

Summary

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (*Xoo*) causes bacterial leaf blight through a specific interaction between the TAL effector (transcription activator-like effector) and the effector binding element (EBE) sequence located on the promoter region of the genes of the gene family encoding transport proteins SWEET (Sugars will eventually be exported transporter), which contains the *OsSWEET14* gene. Using the tool CRISPR/Cas9 to mutate some specific sequences on this promoter can neutralize the toxicity of TAL effectors to help plants resist the disease. This is a promising research direction to improve broad-spectrum blight resistance of Vietnam's elite rice varieties, especially the disease sensitive rice varieties such as TBR225. In the previous study, we have created a number of TBR225 rice lines with T1 gene editing that carry mutations at the EBE position *AvrXa7/Tal5* on the *OsSWEET14* promoter. In this study, analysis on the transgenic TBR225 rice line in the T2 generation showed that mutations in the *OsSWEET14* promoter did not change the basic agronomic traits of the plant. The six T2-edited TBR225 rice lines did not change the *OsSWEET14* target gene expression when infected with *Xoo* and exhibited complete resistance to isolates VXO_11, mild or no resistance to isolates VXO_80 and VXO_100. The obtained results are the premise for research and development of rice varieties TBR225 resistant to bacterial leaf blight in the future.

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

Người phản biện: PGS.TS. Lê Tuấn Nghĩa

Ngày nhận bài: 5/01/2023

Ngày thông qua phản biện: 7/02/2023

Ngày duyệt đăng: 14/7/2023