

NGHIÊN CỨU TÍNH KHÁNG BỆNH BẠC LÁ CỦA CÁC DÒNG LÚA BẮC THƠM 7 ĐỘT BIẾN PROMOTER *OsSWEET14*

Cao Lệ Quyên¹, Vũ Hoài Sâm², Nguyễn Thanh Hà¹, Phạm Thị Vân¹,
Nguyễn Văn Cửu¹, Trần Tuấn Tú³, Phạm Xuân Hội¹, Nguyễn Duy Phương^{1,*}

TÓM TẮT

Vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) gây bệnh bạc lá trên lúa thông qua cơ chế hoạt hóa một số gen mã hoá protein vận chuyển đường của cây chủ, bao gồm cả *OsSWEET14* nhờ protein tiết loại III TAL (transcription activator-like). Gây đột biến chính xác vị trí tương tác với protein TAL trên promoter của *OsSWEET14* bằng các công cụ chỉnh sửa gen như CRSIPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein-9 nuclease) là một trong những hướng nghiên cứu rất tiềm năng để cải tiến tính kháng bạc lá của các giống lúa. Gần đây, đã tạo được một số dòng lúa Bắc thơm 7 (BT7) chỉnh sửa gen mang đột biến đồng hợp trên promoter *OsSWEET14*. Trong nghiên cứu này, các dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen tiếp tục được phân tích kiểu hình để đánh giá ảnh hưởng của các đột biến. Trong điều kiện nhà lưới, tất cả các dòng lúa BT7 chỉnh sửa gen đều có các chỉ tiêu nông học khác biệt không đáng kể so với dòng lúa đối chứng không chỉnh sửa gen, bao gồm thời gian sinh trưởng (102 - 106 ngày), chiều cao cây (100 - 107 cm), số nhánh (6 - 9 nhánh), số hạt chắc trên bông (81 - 89 hạt), năng suất cá thể (18 - 19 g/cây) và hàm lượng amylose trong nội nhũ (14 - 15%). Ba dòng lúa 1.12.07, 1.15.21 và 3.01.19 không thay đổi mức độ biểu hiện *OsSWEET14* khi được lây nhiễm nhân tạo với 3 isolate *Xoo* đại diện VXO_11, VXO_60 và VXO_96. Cả 3 dòng lúa này đều thể hiện tính kháng rõ rệt với VXO_11 và kháng nhẹ với VXO_96. Kết quả này là tiền đề cho nghiên cứu phát triển giống lúa BT7 kháng bạc lá phổ rộng trong tương lai.

Từ khóa: Bắc thơm 7, bệnh bạc lá lúa, CRISPR/Cas9, *OsSWEET14*, *Xanthomonas oryzae*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bạc lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (*Xoo*) gây ra thiệt hại rất lớn cho sản xuất lúa gạo. Bắc thơm 7 (BT7) là giống lúa chủ lực của khu vực đồng bằng sông Hồng, được canh tác với diện tích rất lớn do có chất lượng gạo thơm ngon, năng suất cao. Tuy nhiên, nhược điểm lớn nhất của giống lúa BT7 là rất mẫn cảm với vi khuẩn *Xoo* và bệnh bạc lá lúa [10]. Chính vì vậy, nghiên cứu cải tiến tính kháng bạc lá cho giống lúa BT7 nói riêng và các giống lúa phổ biến trong sản xuất nói chung là mục tiêu quan trọng của nhiều chương trình chọn tạo giống lúa.

Vi khuẩn *Xoo* xâm nhiễm vào cây chủ thông qua hệ thống protein tiết loại III, gọi là TAL effector. Protein TAL sau khi xâm nhập vào tế bào cây chủ sẽ hoạt động như những nhân tố phiên mã, bám vào các

trình tự đích đặc hiệu (effector binding element - EBE) trên vùng promoter của các gen “nhiễm” (susceptibility gene) và tăng cường biểu hiện của gen đích tổng hợp ra các sản phẩm hỗ trợ quá trình xâm nhiễm và sinh trưởng của vi khuẩn *Xoo* [3]. *OsSWEET14* thuộc nhóm III của họ gen *SWEET* mã hóa cho các protein vận chuyển sucrose từ nhu mô tới mạch dẫn của mô libe, đã được xác định là đích tác động của một số TAL effector và hoạt động như gen “nhiễm” đối với *Xoo* [3]. Các đột biến xuất hiện tại vị trí EBE trên promoter *OsSWEET14* (gọi tắt là *SW14*) có thể tạo ra tính kháng *Xoo* cho cây lúa [2,9]. Việc cải tiến khả năng kháng bệnh bạc lá cho các giống lúa phổ biến trong sản xuất thông qua tác động tới các gen “nhiễm” như *OsSWEET14* đã trở thành một hướng nghiên cứu đầy triển vọng cho các chương trình chọn tạo giống lúa.

Gần đây, bằng công cụ CRISPR/Cas9, đã tạo được một số dòng lúa BT7 mang đột biến trên *SW14* tại vị trí tương tác với protein TAL *AvrXa7* của *Xoo* (gọi tắt là EBE *AvrXa7*) và không mang cấu trúc T-DNA trong hệ gen [11,4]. Trong nghiên cứu này, đã

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp

² Viện Dược liệu

³ Bộ Khoa học và Công nghệ

*Email: phuongnd.bio@gmail.com

tiếp tục đánh giá các đặc điểm nông sinh học và khả năng kháng một số chủng *Xoo* đại diện của các dòng lúa BT7 đột biến để chứng minh vai trò của đột biến *SW14* đối với kiểu hình của cây lúa BT7. Kết quả thu được sẽ là tiền đề cho nghiên cứu tạo giống lúa BT7 có khả năng kháng bệnh bạc lá phổ rộng bằng công nghệ gen sau này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các dòng lúa Bắc thom 7 đột biến *SW14* do Bộ môn Bệnh học phân tử (Viện Di truyền Nông nghiệp) cung cấp [11,4] (Bảng 1).

Bảng 1. Dòng lúa BT7 đột biến *SW14* 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
1.01.28	-5 (GCTAA)	22	3.01.19	+1 (T)	14
1.10.15	-3 (GGT)	19	4.16.08	-5 (AGGTG)	18
1.12.07	+3 (GCA)	15	5.14.13	-5 (TGCTA)	21
1.15.21	-6 (CCAGGT)	16	5.14.21	-4 (GTGC)	20
1.23.04	+1 (T)	20	6.07.30	-1 (T)	21
2.02.01	-3 (TGC)	21	6.13.05	-3 (GCT)	22

¹ Số Nu thay đổi trên *SW14*; (+/-) thêm/mất Nu; kí tự trong ngoặc thể hiện Nu thay đổi trên *SW14*.

² Vị trí của đột biến tính từ đầu 5' của *EBE AvrXa7*.

Chủng vi khuẩn bạc lá VXO_11, VXO_60 và VXO_96 được phân lập năm 2013, 2016 và 2017 [10], 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 cây lúa

Hạt lúa 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 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 và hàm lượng amylose.

Hàm lượng amylose được đánh giá theo phương pháp của Juliano và cs (1971) [6]. Hạt lúa đã được bóc vỏ, làm trắng, nghiền nhỏ. 100 mg bột đã nghiền được bổ sung thêm 1 mL Ethanol 95% và 9 mL NaOH 1 N. Hỗn hợp được đun sôi ở 100°C trong 10 phút và bổ sung thêm nước cất đến thể tích 100 mL. 5 mL dung dịch được trộn đều với 1 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 quy đổi để xác định ra hàm lượng amylose.

2.2.2. Đánh giá biểu hiện gen *OsSWEET14*

Thí nghiệm phân tích biểu hiện gen được thực hiện theo mô tả trước đây của Li và cs (2013) bằng phương pháp RT-PCR [8]. Lá cây lúa 4 tuần tuổi sau 48 giờ lây nhiễm với vi khuẩn *Xoo* được sử dụng để tách chiết RNA tổng số. Một microgram RNA được sử dụng mỗi phản ứng RT-PCR sử dụng lần lượt mỗi oligo (d1) và cặp mỗi *SW14-qPCR-F/ SW14-qPCR-R*. *OsEF1a* được sử dụng làm gen nội chuẩn. Ba cây lúa từ mỗi dòng được lựa chọn ngẫu nhiên cho thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo. 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 đột biến gen được thực hiện theo phương pháp cắt lá cải tiến của Ke và cs (2017) [7]. Vi khuẩn *Xoo* nuôi cấy trên môi trường PSA ở 28°C; sinh khối vi khuẩn *Xoo* được thu lại và pha loãng trong dung dịch MgCl₂ 10 mM đến giá trị OD₆₀₀ đạt 0,5. Cây lúa trong giai đoạn đẻ nhánh (khoảng 45 ngày sau khi cấy) được sử dụng cho thí nghiệm lây nhiễm *Xoo*. Đầu phiến lá (3 – 4 cm) của cây lúa 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). Dòng lúa

BT7 không đột biến gen được sử dụng làm đối chứng.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá một số đặc điểm nông học của dòng lúa BT7 đột biến *SW14*

Để xác định đột biến trên *SW14* có gây ảnh hưởng tới một số đặc điểm nông học của các dòng lúa BT7 hay không, 12 dòng lúa BT7 mang đột biến đồng hợp đã được phân tích, đánh giá các chỉ tiêu bao gồm thời gian sinh trưởng, chiều cao cây, số

nhánh, số hạt chắc trên bông và năng suất cá thể trong điều kiện gieo trồng trong nhà lưới.

Kết quả phân tích 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 và dòng lúa đối chứng không đột biến gen về tất cả các tính trạng nông học được quan sát (Bảng 2). Kết quả này chứng tỏ các đột biến trên promoter *SW14* 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.

Bảng 2. Kết quả đánh giá chỉ tiêu nông học của các dòng lúa BT7 đột biến *SW14*

Tên dòng	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Chiều cao (cm)	Số nhánh	Số hạt chắc/bông	Năng suất cá thể (g)	Hàm lượng amylose (%)
WT	105,15±4,54 ^a	104,05±4,57 ^{ab}	8,90±1,66 ^a	82,40±1,03 ^a	18,04±0,54 ^a	14,18±1,03 ^a
1.01.28	102,35±3,00 ^a	107,35±6,00 ^b	8,70±1,49 ^a	81,25±1,40 ^a	18,227±0,33 ^a	14,25±1,40 ^a
1.10.15	104,51±6,34 ^{ac}	106,85±2,91 ^b	7,50±1,08 ^{ab}	81,25±1,39 ^a	18,368±0,26 ^a	14,25±1,39 ^a
1.12.07	105,40±3,18 ^a	103,55±6,64 ^{ab}	7,70±1,16 ^{ab}	89,25±1,05 ^b	19,268±0,42 ^b	14,95±1,01 ^b
1.15.21	103,80±4,28 ^a	101,70±4,13 ^a	8,30±1,25 ^a	82,30±1,06 ^a	18,837±1,53 ^a	15,02±1,06 ^a
1.23.04	104,15±2,56 ^a	100,80±2,93 ^a	8,30±0,82 ^a	83,15±1,18 ^a	18,124±1,17 ^a	15,15±1,08 ^a
2.02.01	105,35±2,76 ^a	103,10±3,72 ^{ab}	7,40±1,17 ^{ab}	82,20±0,78 ^a	18,318±1,19 ^a	14,20±0,88 ^a
3.01.19	105,50±4,25 ^a	101,35±2,46 ^a	7,60±0,84 ^{ab}	83,00±0,88 ^a	18,012±0,33 ^a	15,00±0,88 ^a
4.16.08	106,05±4,18 ^a	101,25±2,12 ^a	7,30±0,67 ^{ab}	82,05±1,04 ^a	18,089±0,32 ^a	15,05±1,01 ^a
5.14.13	104,15±4,92 ^a	103,20±3,87 ^{ab}	8,90±1,28 ^a	81,95±0,98 ^a	18,999±0,50 ^a	14,97±0,97 ^a
5.14.21	105,50±4,25 ^a	102,50±1,97 ^a	7,50±0,97 ^{ab}	82,05±0,72 ^a	18,043 ±0,88 ^a	14,75±0,72 ^a
6.07.30	104,32±3,93 ^a	102,65±3,48 ^a	6,30±0,95 ^c	83,10±0,97 ^{aa}	18,125 ±0,96 ^a	14,10±0,97 ^a
6.13.05	105,10±3,82 ^a	100,15±5,02 ^a	7,10±0,99 ^{ab}	81,70±1,42 ^a	18,269±0,68 ^a	14,70±1,10 ^a

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

Họ gen *SWEET* không chỉ có vai trò quan trọng đối với quá trình phát triển phần hoa và tạo hạt của thực vật mà còn liên quan tới con đường cung cấp chất dinh dưỡng của các vi sinh vật gây bệnh [5,13]. Trong nghiên cứu trước đây, các đột biến đơn trên *ossweet11* hay đột biến kép trên đồng thời *ossweet11-ossweet15* đều gây ảnh hưởng tới quá trình phát triển nội nhũ và làm đầy hạt trên cây lúa Kitaake [13]. 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 bị giảm năng suất hạt [1,12]. 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* đều 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 gen *SWEET* trong điều kiện bình thường.

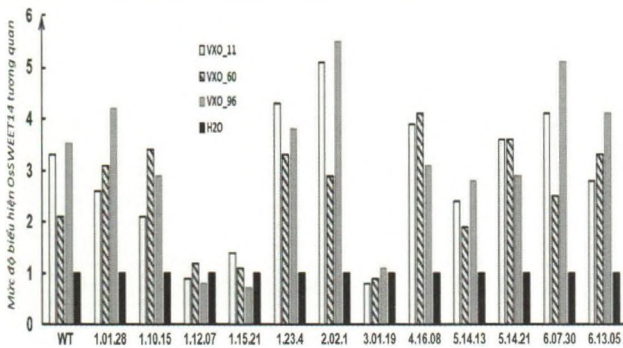
Phát hiện này tương tự như kết quả nghiên cứu đã được công bố gần đây, trong đó các tổ hợp đột biến khác nhau tại vị trí các EBE trên promoter *SW11*, *SW13* và *SW14* cũng không gây ra bất kì ảnh hưởng tiêu cực nào đối với khả năng sinh trưởng, phát triển và sinh sản của cây lúa Kitaake [9]. Mặc dù 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 *SWEET* trong hệ gen lúa. Kết quả của nghiên cứu này đã chứng tỏ rằng việc tạo ra các đột biến nhỏ trên vùng promoter của gen *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.

3.2. Nghiên cứu biểu hiện *OsSWEET14* trong các dòng lúa BT7 đột biến *SW14*

Để xác định chính xác hiệu quả của các đột biến tạo ra bằng hệ thống CRISPR/Cas9 trên *SW14* đối với sự hoạt động của gen đích, các dòng lúa đột biến

SW14 được lây nhiễm nhân tạo với ba isolate *Xoo* đại diện (VXO_11, VXO_60 và VXO_96) và phân tích mức độ biểu hiện gen *OsSWEET14*.

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 1) cho thấy, các dòng lúa đột biến *SW14* được chia thành 2 nhóm rõ rệt. Nhóm thứ nhất bao gồm 9 dòng lúa 1.01.28, 1.10.15, 1.23.4, 2.02.01, 4.16.08, 5.14.13, 5.14.21, 60.7.30 và 6.13.05, với mức độ biểu hiện gen *OsSWEET14* tăng rõ rệt khi được lây nhiễm với cả 3 isolate VXO đại diện, tương tự như dòng lúa BT7 đối chứng không chỉnh sửa gen. Nhóm thứ hai bao gồm 3 dòng lúa 1.12.07, 1.15.21 và 3.01.19, hầu như không có sự thay đổi đáng kể nào về mức độ biểu hiện của gen đích khi được lây nhiễm với vi khuẩn *Xoo*, tương tự như thí nghiệm đối chứng lây nhiễm bằng H₂O.



Hình 1. Biểu hiện của *OsSWEET14* trong dòng lúa BT7 đột biến *SW14*

Ghi chú: Biểu hiện của *OsSWEET14* trên cây lúa BT7 đột biến *SW14* lây nhiễm isolate *Xoo* đại diện (VXO_11, 60 và 96) 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* (H₂O) có giá trị bằng 1; *OsEF1α* được sử dụng làm gen nội chuẩn; (WT) cây lúa BT7 không đột biến *SW14*. Giá trị thể hiện trên đồ thị là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại thí nghiệm.

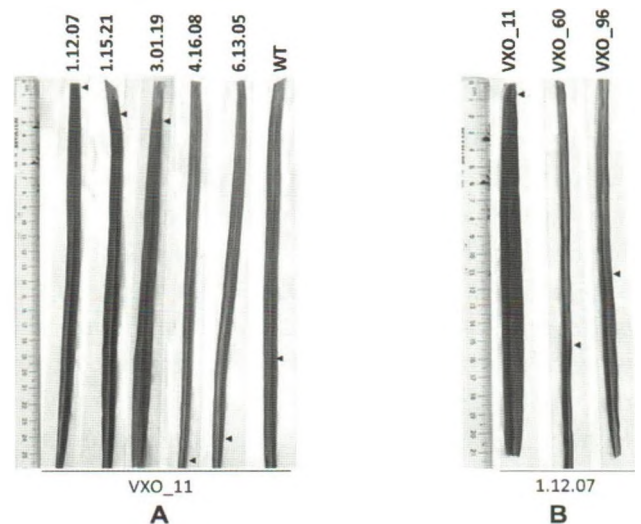
Phân tích sâu hơn về loại đột biến *SW14* trong mỗi dòng lúa cho thấy không có điểm chung giữa các dòng lúa trong mỗi nhóm (cả hai nhóm đều bao gồm các dòng lúa mang đột biến thêm và mất Nu). Tuy nhiên, vị trí đột biến trên *SW14* trên các dòng lúa thuộc hai nhóm có sự khác biệt nhau rõ rệt. Trong khi 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, 15 và 16). Kết quả này chứng tỏ vị trí 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 thiết này cũng đã được Blanvillain-Baufumé và cs (2017) đề cập đến trong công bố trước đây, khi nghiên cứu đột biến EBE *Tal5/TalF* trên *SW14* của lúa Kitaake [2].

Như vậy, 3 dòng lúa BT7 mang đột biến *SW14* được tạo ra bằng công cụ CRISPR/Cas9 bao gồm 1.12.07, 1.15.21 và 3.01.19 có mức độ biểu hiện gen đích không thay đổi khi được lây nhiễm với isolate *Xoo* đại diện của Việt Nam.

3.3. Đánh giá khả năng kháng bệnh bạc lá của dòng lúa BT7 đột biến *SW14*

Để chứng minh vai trò của các đột biến *SW14* đối với tính kháng bệnh bạc lá của giống lúa BT7, ba dòng lúa đột biến 1.12.07, 1.15.21 và 3.01.19 (có mức độ biểu hiện *OsSWEET14* không thay đổi khi lây nhiễm *Xoo*) và hai dòng lúa đột biến 4.16.08 và 6.13.05 (có mức độ biểu hiện *OsSWEET14* thay đổi tương tự dòng lúa đối chứng khi lây nhiễm *Xoo*) được lựa chọn để đánh giá khả năng kháng 3 isolate *Xoo* đại diện (VXO_11, VXO_60 và VXO_96) trong điều kiện nhà lưới (Hình 2).

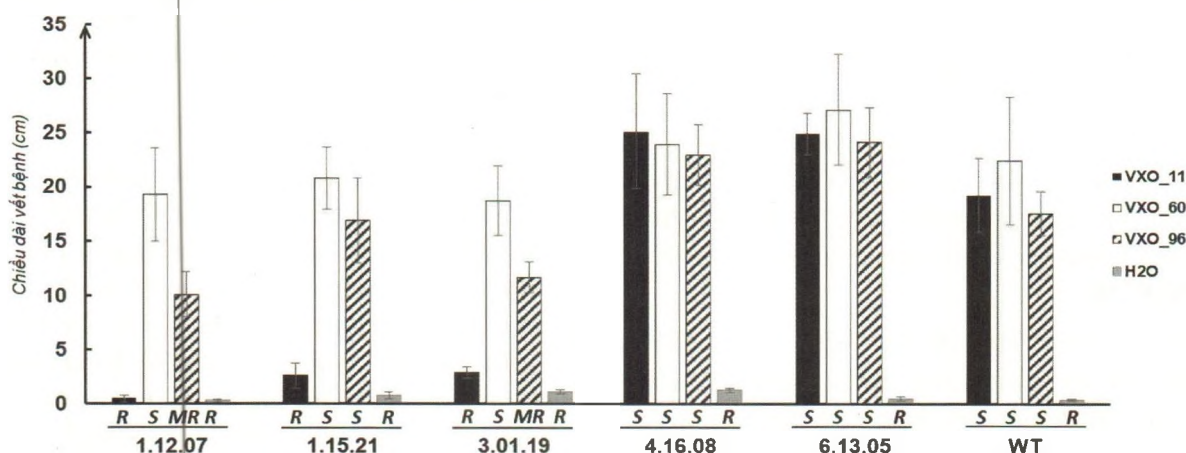


Hình 2. Lây nhiễm *Xoo* nhân tạo trên dòng lúa BT7 đột biến *SW14*

Ghi chú: Các dòng lúa đột biến *SW14* (1.12.07, 1.15.21, 3.01.19, 4.16.08 và 6.13.05) và không đột biến *SW14* (WT) được lây nhiễm nhân tạo với các isolate *Xoo* đại diện (VXO_11, VXO_60 và VXO_96). Hình ảnh được ghi lại sau 14 ngày lây nhiễm. Mũi tên thể hiện vị trí vết bệnh xuất hiện trên lá.

Hình ảnh quan sát biểu hiện bệnh trên lá thu được sau 14 ngày lây nhiễm (Hình 3) cho thấy hai dòng lúa đột biến *SW14* 4.16.08 và 6.13.05 không thể hiện tính kháng với tất cả các isolate VXO 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_60 và VXO_96 (Hình 1). Ngược lại, ba dòng lúa 1.12.07, 1.15.21 và 3.01.19 thể hiện tính kháng rõ rệt với isolate VXO_11; chiều dài vết bệnh trung bình quan sát được từ 0,5 – 2,9 cm (Hình 2A, hình 3). Tuy nhiên, ba dòng lúa đột biến này lại chỉ kháng nhẹ hoặc không kháng đối với hai isolate

VXO_60 và VXO_96; đồng thời 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 đối với cây lúa BT7 isolate VXO_11; trong khi hai isolate VXO_60 và VXO_96 có ít nhất 2 đích tấn công trong hệ gen của BT7. Bên cạnh đó, tính kháng nhẹ của hai dòng lúa đột biến *SW14* 1.12.07 và 3.01.19 đối với isolate VXO_96 cũng gợi ý rằng so với isolate 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.



Hình 3. Đánh giá tính kháng bệnh bạc lá của dòng lúa BT7 đột biến *SW14*

Ghi chú: Các dòng lúa đột biến *SW14* (1.12.07, 1.15.21, 3.01.19, 4.16.08 và 6.13.05) và không đột biến *SW14* (WT) được lây nhiễm nhân tạo các isolate *Xoo* 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 vi khuẩn *Xoo*; (MR) kháng nhẹ vi khuẩn *Xoo*; (S) không kháng vi khuẩn *Xoo*. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Một số thành viên thuộc họ gen *SWEET* là đích tấn công của protein TAL do vi khuẩn *Xoo* tiết ra khi xâm nhiễm vào cây lúa và hoạt động như những gen “nhiễm” đối với bệnh bạc lá [9]. Các dòng lúa Kitaake mang đột biến promoter *SW14* tạo ra bởi công nghệ TALEN [9] hay đột biến promoter *OsSWEET11* tạo bởi công nghệ CRISPR/Cas9 [9] 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* (*SW14*) và *PthXo1* (*SW11*) lại không thể hiện khi nhiễm bởi chủng *Xoo* biểu hiện đồng thời AvrXa7/PthXo3 và PthXo2 [9]. 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*. Trong nghiên cứu này, ba

dòng lúa 1.12.07, 1.15.21 và 3.01.19 mang đột biến đồng hợp trên EBE *AvrXa7* biểu hiện tính kháng được tăng cường rõ rệt với isolate VXO_11 so với dòng lúa BT7 đối chứng. Tính kháng không hoàn toàn/không kháng với hai isolate 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 isolate 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 isolate VXO_60 và VXO_96) biểu hiện đồng thời nhiều gen *tal*, trong đó có *avrXa7*, giống như đa số các chủng *Xoo* châu Á đã được nghiên cứu trước đây [9]. Nhóm thứ hai (đại diện bởi isolate VXO_11) chỉ biểu hiện *AvaXa7*.

Như vậy, các kết quả nghiên cứu thu được ở trên không chỉ cho thấy triển vọng cải tiến tính kháng bạc

là 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.

4. KẾT LUẬN

Tất cả các dòng lúa BT7 đột biến *SW14* có đặc điểm nông sinh học tương đương với dòng lúa không đột biến về các chỉ tiêu chiều cao cây, số nhánh, số hạt chắc trên bông, năng suất cá thể và hàm lượng amylose trong nội nhũ. Ba dòng lúa 1.12.07, 1.15.21 và 3.01.19 không thay đổi mức độ biểu hiện gen đích *OsSWEET14* khi được lây nhiễm với vi khuẩn *Xoo*; thể hiện tính kháng hoàn toàn với isolate VXO_11, kháng nhẹ với isolate VXO_96 và không kháng với isolate VXO_60. 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 BT7, từ đó phát triển tính kháng bệnh bạc lá phổ rộng cho giống lúa BT7.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí 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” (2017-2020), thuộc Chương trình Công nghệ sinh học Nông nghiệp - Thủy sản của Bộ Nông nghiệp và PTNT. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Antony G., Zhou J., Huang S., Li T., Liu B., White F., Yang B. (2010). Rice *xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene *Os11N3*. *Plant Cell*, 22(11): 3864-76.

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 Biotechnol. J.*, 15(3): 306-317.

3. Boch J., Bonas U. (2010). *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 48: 419-36.

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 PTNT*, 18: 74-81.

5. Chen L. Q. (2014). SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytol.*, 201(4): 1150-1155.

6. Juliano B. O. (1971). A simplified assay for milled rice amylose. *Cereal Science Today*, 334-338.

7. 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.

8. 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.

9. 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. *Nat Biotechnol.*, 37(11): 1344-1350.

10. Vũ Hoài Sâm, Nguyễn Thanh Hà, Cao Lê Quyên, Nguyễn Duy Phương, Phạm Xuân Hội (2019). Nghiên cứu vai trò gen *OsSWEET14* trong quá trình xâm nhiễm của vi khuẩn gây bệnh bạc lá trên lúa Bắc thơm 7. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, 2(353): 13-19.

11. Vu Hoai Sam, Pham Thi Van, Nguyen Thanh Ha, Nguyen Thi Thu Ha, Phung Thi Thu Huong, Pham Xuan Hoi, Nguyen Duy Phuong, Cao Le Quyen (2021). Design and transformation of *OsSWEET14*-editing T-DNA construct into Bacthom 7 rice cultivar. *Academia Journal of Biology*, 43(1): 99-108.

12. Yang B., Sugio A., White F. F. (2006). *Os8N3* is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(27): 10503-10508.

13. 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): 604-615.

EVALUATION OF BACTERIAL LEAF BLIGHT DISEASE RESISTANCE OF *OsSWEET14* PROMOTER-EDITED BACTHOM 7 RICE LINES

Cao Le Quyen¹, Vu Hoai Sam², Nguyen Thanh Ha¹, Pham Thi Van¹,
Nguyen Van Cuu¹, Tran Tuan Tu³, Pham Xuan Hoi¹, Nguyen Duy Phuong^{1,*}

¹*Agricultural Genetics Institute*

²*National Institute of Medicinal Materials*

³*Vietnam Ministry of Science and Technology*

**Email: phuongnd.bio@gmail.com*

Summary

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (*Xoo*) causes bacterial leaf blight (BLB) disease in rice through the activation of host genes encoding sugar transport proteins, including *OsSWEET14* by using TAL (transcription activator-like) effectors. Using gene editing tools such as CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein-9 nuclease) for precise mutation of the TAL-binding sites on the promoter region of the target genes is a potential solution to improve BLB resistance of major rice varieties. Recently, we generated several *OsSWEET14*-edited Bacthom 7 (BT7) rice lines carrying homozygous mutations on the *OsSWEET14* promoter. In this study, phenotype of gene-edited BT7 lines were analyzed to evaluate the effects of *OsSWEET14* mutations. Under net-house condition, the agronomic indexes including growth duration (102 - 106 days), plant height (100 - 107 cm), number of tillers per plant (6 - 9 tillers), number of filled grains per panicle (81 - 89 seeds), yield per plant (18 - 19 g/plant) and amylose content (14 - 15%) were not significantly different from those of the control plants. The expression of *OsSWEET14* in three rice lines 1.12.07, 1.15.21 and 3.01.19 were not induced by the artificial infection of three representative *Xoo* isolates VXO_11, VXO_60 and VXO_96. Especially, these mutation lines showed the complete resistance to VXO_11 and slight resistance to VXO_96. The obtained results are a premise for development of BLB-resistant BT7 rice variety in the future

Keywords: *Bacterial leaf blight disease, Bacthom 7, CRISPR/Cas9, OsSWEET14, Xanthomonas oryzae.*

Người phản biện: PGS.TS. Hà Viết Cường

Ngày nhận bài: 24/9/2021

Ngày thông qua phản biện: 25/10/2021

Ngày duyệt đăng: 01/11/2021