

# THIẾT KẾ CẤU TRÚC CHÍNH SỬA GEN *OsSWEET* LIÊN QUAN ĐẾN BỆNH BẠC LÁ TRÊN LÚA TBR225

Trần Lan Đài<sup>1</sup>, Phùng Thị Thu Hương<sup>2</sup>, Cao Lệ Quyên<sup>2</sup>,  
Nguyễn Văn Cứ<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Thu Hà<sup>2</sup>, Phạm Xuân Hội<sup>2</sup>, Nguyễn Duy Phương<sup>2</sup>\*

## TÓM TẮT

Bệnh bạc lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) gây ra những thiệt hại nghiêm trọng cho sản xuất lúa gạo của nhiều quốc gia châu Á và châu Phi. Trong quá trình xâm nhiễm vào cây chủ, *Xoo* tiết ra protein đặc biệt TAL (Transcription activator like effector); protein này liên kết với các yếu tố *cis* đặc trưng trên vùng promoter và hoạt hóa biểu hiện của một số gen trong hệ gen cây chủ để phục vụ cho quá trình sinh trưởng và lây nhiễm của vi khuẩn trong cây. Trong nghiên cứu này, đã nghiên cứu TALome của 3 isolate (chủng phân lập) *Xoo* đại diện của Việt Nam. Isolate VXO\_11 mang gen *tal* mã hóa protein AvrXa7 và PthXo2B; trong khi VXO\_60 và VXO\_96 mang gen mã hóa TAL AvrXa7 và PthXo2A. Bốn trình tự crRNA (CRISPR RNA) đặc hiệu cho 2 vị trí DNA liên kết với TAL AvrXa7 và PthXo2A trên promoter *OsSWEET13* và *OsSWEET14* của giống lúa TBR225 đã được thiết kế bằng các công cụ tin sinh. Các crRNA đã được ghép nối vào vị trí *BtgZI* và *Bsal* trên vector trung gian pENTR4; toàn bộ cấu trúc biểu hiện sgRNA đã được chuyển vào vector pCas9 để tạo cấu trúc T-DNA biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9) hoàn chỉnh gây đột biến đồng thời hai promoter *OsSWEET13* và *OsSWEET14* của lúa TBR225. Đây sẽ là tiền đề cho việc tạo giống lúa TBR225 mới kháng bệnh bạc lá phổ rộng bằng công nghệ CRISPR/Cas9.

Từ khóa: Bạc lá, CRISPR/Cas9, SWEET, TAL, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

TAL effector được tạo ra từ các vi khuẩn gây bệnh thực vật thuộc chi *Xanthomonas* trong đó có *Xoo* là một vũ khí phân tử được tiêm vào tế bào nhân thực làm thay đổi quá trình phiên mã của cây chủ. Sau khi đi vào cây chủ, TAL effector định vị trong nhân tế bào và liên kết với trình tự promoter của gen nhiễm "S" (subceptibility) và hoạt hóa sự biểu hiện của chúng, tạo điều kiện cho sự nhân lên của vi khuẩn [3]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh đột biến xuất hiện tại vị trí EBE (effector-binding element) trên vùng promoter của các gen S này có thể giúp cây lúa chống lại sự xâm nhiễm của chủng *Xoo* tương ứng [6, 9, 10, 20].

Đa số các TAL effector của các chủng *Xoo* tấn công vào ít nhất một trong ba thành viên thuộc họ gen mã hóa protein vận chuyển đường *SWEET* (Sucrose-efflux transporter) [1, 16]. Các gen *OsSWEET11* và *OsSWEET13* là gen S của quần thể *Xoo* châu Á mang protein TAL PthXo1 và PthXo2 [20]. Tương tự, các chủng *Xoo* châu Á mang protein

TAL AvrXa7 và PthXo3 và các chủng châu Phi mang protein TAL TalC và Tal5 tấn công vào các EBE tương ứng nằm trên promoter *OsSWEET14* [10, 1]. Như vậy, khi phân tích TALome các chủng vi khuẩn *Xoo* sẽ giúp xác định được EBE tương ứng nằm trên promoter của gen S; từ đó thiết kế hệ thống chỉnh sửa gen nhằm tăng cường tính kháng bệnh bạc lá cho cây trồng.

Hệ thống CRISPR/Cas9 là một trong những công cụ chỉnh sửa hệ gen hữu hiệu nhất hiện nay. Cơ chế hoạt động của CRISPR/Cas9 về cơ bản là quá trình sgRNA (single guide RNA) điều tiết endonuclease Cas9 cắt đặc hiệu DNA sợi đôi, từ đó hoạt hóa hệ thống sửa chữa đứt gãy mạch đôi (Double-Strand Break-DSB) vốn có của tế bào [4], tạo ra đột biến tại vị trí mong muốn trong hệ gen. Do đó, công nghệ này rất phù hợp với các nghiên cứu cải tiến tính kháng bệnh bạc lá cho các giống lúa nhạy cảm với bệnh bạc lá thông qua việc chỉnh sửa các trình tự EBE trên gen S.

Nghiên cứu này đã tiến hành phân tích TALome của một số chủng *Xoo* đại diện của Việt Nam để xác định chính xác trình tự EBE và gen S trong hệ gen giống lúa TBR225 và thiết kế cấu trúc CRISPR/Cas9 nhận biết các EBE này. Kết quả nghiên cứu là tiền đề

<sup>1</sup> Trường Đại học Quy Nhơn  
<sup>2</sup> Viện Di truyền Nông nghiệp  
\*Email: phuongnd.bio@gmail.com

cho các nghiên cứu cơ chế gây bệnh ở mức phân tử của *Xoo* trên lúa TBR225, từ đó hướng tới mục tiêu tạo ra giống lúa TBR225 cải tiến kháng bệnh bạc lá phổ rộng.

**2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**2.1. Vật liệu nghiên cứu**

**Bảng 1. Danh sách các chủng *Xoo* đại diện sử dụng trong nghiên cứu**

STT	Tên	Địa điểm thu thập	Năm thu thập	Mức độ hoạt hóa gen	
				OsSWEET13	OsSWEET14
1	VXO_11	Hà Nội	2013	-	++
2	VXO_60	Nghệ An	2017	++	+
3	VXO_96	Hải Phòng	2016	++	++

Vector pENTR4-v1, pENTR4-v2 và pCas9 do nhóm nghiên cứu của tiến sĩ Sebastien Cunnac (Trung tâm Nghiên cứu vì sự phát triển - Montpellier, Pháp) cung cấp, được thiết kế dựa trên bộ khung vector pCAMBIA1300 (Marker Gene Technologies, Hoa Kỳ) và pENTR4 (Invitrogen, Hoa Kỳ). Các oligonucleotide dùng cho PCR được thiết kế và đặt mua từ hãng Sigma (Hoa Kỳ).

**2.2. Phương pháp nghiên cứu**

**2.2.1. Giải trình tự gen tal của vi khuẩn *Xoo***

Một khuẩn lạc được cấy ria trên môi trường PSA ở 28°C trong 48 giờ. DNA tổng số được tách chiết từ vi khuẩn *Xoo* bằng bộ kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega). Mẫu DNA của vi khuẩn *Xoo* được gửi giải trình tự và phân tích tại Trung tâm Nghiên cứu vì sự phát triển (Montpellier, Pháp). Trình tự đích của protein TAL được dự đoán bằng công cụ Tal-vez v.3.1.

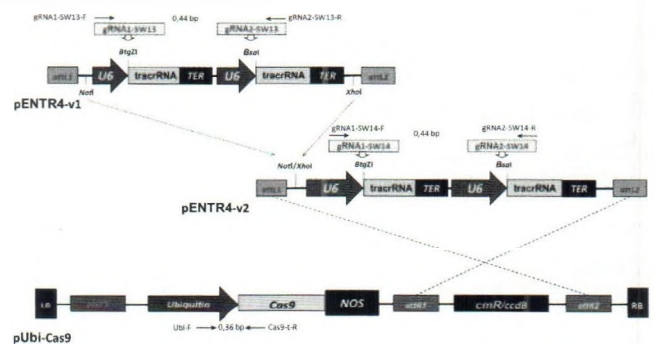
**2.2.2. Thiết kế trình tự gRNA**

Trình tự crRNA đặc hiệu cho promoter *OsSWEET13* và *OsSWEET14* của lúa TBR225 (gọi tắt là *SW13-TBR* và *SW14-TBR*) được thiết kế bằng phần mềm CRISPR-P v2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn>). Cấu trúc bậc II của các crRNA được phân tích bằng phần mềm Mfold 2.3 (<http://unafold.rna.albany.edu>). Các trình tự DNA tương đồng với các gRNA trong hệ gen lúa được xác định bằng phần mềm CCTop (<https://cctop.cos.uni-heidelberg>). Trình tự hệ gen lúa được tham chiếu từ cơ sở dữ liệu trên ngân hàng gen Ensemble Plants (<http://plants.ensemble.org>). Các trình tự gRNA đặc hiệu được lựa chọn dựa trên vị trí cắt DNA của Cas9 trên promoter đích, hàm lượng GC, sự có mặt của Guanine ở đầu 5', khả năng hình thành và duy trì cấu trúc bậc II ổn định, số lượng và trí trí đoạn DNA tương đồng xuất hiện trong hệ gen lúa [12].

Các chủng vi khuẩn *Xoo* do Bộ môn Bệnh học phân tử (Viện Di truyền Nông nghiệp) thu thập ở 3 tỉnh/thành, trong các giai đoạn khác nhau, lưu giữ và cung cấp [17].

**2.2.3. Thiết kế T-DNA mang cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa đa gen**

gRNA1-SW13 & gRNA2-SW13 và gRNA1-SW14 & gRNA2-SW14 được lần lượt chèn vào vị trí enzyme *BtgZI* và *BsaI* nằm sau vùng promoter *U6* trên pENTR4-v1 và pENTR4-v2 nhờ T4 DNA ligase để tạo vector tái tổ hợp pEN/gRNA-SW13 và pEN/gRNA-SW14. Tiếp theo, hai vector tái tổ hợp được xử lý đồng thời bằng *NotI/XhoI*; hai cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa EBE *PthXo2A* (*[U6:gRNA-SW13]*) trên được ghép vào vector pEN/gRNA-SW14 mạch thẳng để tạo thành vector tái tổ hợp pEN/gRNA-SW13::SW14 (Hình 1).



**Hình 1. Sơ đồ thiết kế vector pCas9/gRNA-SW13::SW14**

*Ghi chú: (crRNA) CRISPR RNA; (tracrRNA) trans-activating crRNA; (attR1, attR2, attL1 và attL2): trình tự nhận biết của LR clonase; (U6): promoter U6; (TER): vùng kết thúc phiên mã; (Ubiquitin): promoter Ubiquitin; (NOS): vùng kết thúc phiên mã NOS; (ccdB): gen độc gây chết tế bào vi khuẩn (control of cell death B gene); (cmR): gen kháng kháng sinh Chloramphenicol (Chloramphenicol resistance protein); (Cas9): trình tự mã hóa protein Cas9; (RB): bờ phải (right border); (LB): bờ trái (left border).*



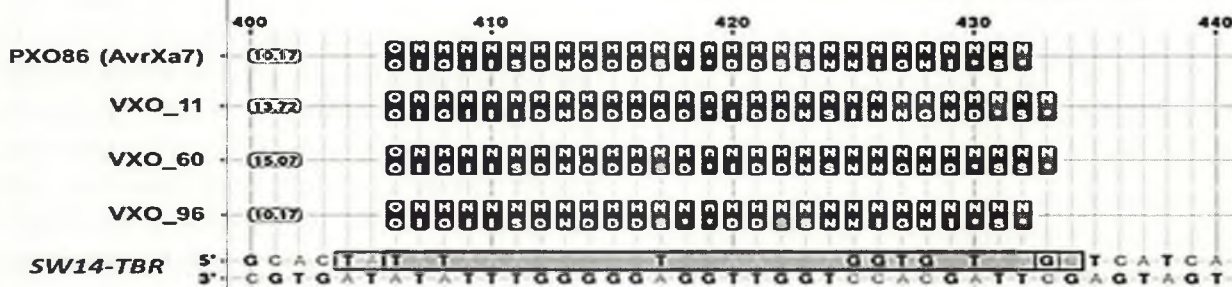
Đoạn trình tự chứa 4 cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa EBE *AvrXa7* và *PthXo2A* (*[U6:gRNA-SW13:SW14]*) được ghép nối pUbi/Cas9 bằng hệ thống Gateway (Invitrogen, Hoa Kỳ) (Hình 1). Vector tái tổ hợp pCas9/gRNA-SW13::SW14 được kiểm tra bằng PCR với 3 cặp mồi Ubi-F/Cas9-t-R (5'-CCCTGCCTTCATACGCTATT-3' và 5'-GCCTCGGCTGTCTCGCCA-3'; nhân bản đoạn DNA 0,36 bp); gRNA1-SW13Fw/gRNA2-SW13-Rv (5'-TGTTGAGTTGTGGTGCTTTTATAT-3' và 5'-GTGTGAGAGGAACGAAGGGAGTTG-3'; nhân bản đoạn DNA 0,44 bp), gRNA1-SW14-Fw/gRNA2-SW14-Rv (5'-TGTTGCTTAGCACCTGGTTGGAGG-3' và 5'-AAACGGTTGGAGGGTTATATAC-3'; nhân bản đoạn DNA 0,44 bp) và giải trình tự DNA.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Nghiên cứu TALome vi khuẩn *Xoo* đại diện của Việt Nam

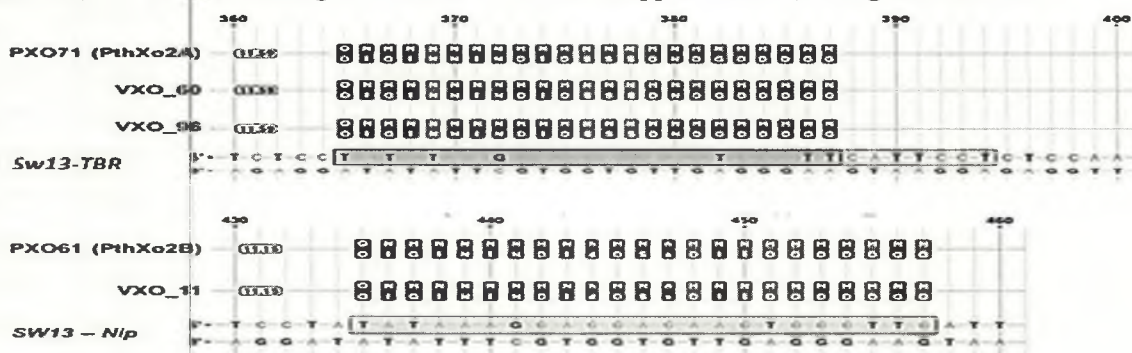
Để xác định trình tự các EBE có thể liên kết với protein TAL của các isolate *Xoo* Việt Nam (gọi tắt là VXO), 3 isolate VXO\_11, VXO\_60 và VXO\_96 (đại diện cho 3 vùng trồng lúa ở Hà Nội, Nghệ An, Hải Phòng) đã được lựa chọn giải trình tự nucleotide vùng gen *tal* và xác định trình tự axit amin suy biến trên protein TAL. Dựa vào trình tự axit amin của protein TAL, trình tự EBE liên kết với các TAL của 3 chủng *Xoo* này đã được giải mã.

Kết quả giải mã trình tự axit amin suy biến đã xác định được isolate VXO\_11 mang hai gen *tal* mã hóa hai protein TAL liên kết với hai EBE đã biết là *AvrXa7* (Hình 2) và *PthXo2B* (Hình 3) [14]. Trong khi đó, VXO\_60 và VXO\_96 có hai gen *tal* mã hóa 2 protein TAL liên kết với 2 EBE *AvrXa7* và *PthXo2A*. Kết quả này cho thấy các isolate VXO khi xâm nhiễm vào cây chủ có thể có thể hoạt hóa biểu hiện của các gen chứa một trong các trình tự EBE *AvrXa7*, *PthXo2A* và *PthXo2B* trong vùng promoter.



Hình 2. Dự đoán vị trí EBE trên promoter *SW14-TBR* liên kết với TAL của VXO

Ghi chú: Trình tự axit amin suy biến của protein TAL của 3 chủng *Xoo* Việt Nam (VXO\_11, VXO\_60, VXO\_96) được so sánh với chủng *Xoo* tham chiếu của Philippin (PXO86) mang TAL *AvrXa7*.



Hình 3. Dự đoán vị trí EBE trên *SW13-TBR* liên kết với TAL của VXO

Ghi chú: Trình tự axit amin suy biến của protein TAL của *Xoo* Việt Nam (VXO\_11, VXO\_60, VXO\_96) được so sánh với chủng *Xoo* tham chiếu của Philippin (PXO71 và PXO61) mang lần lượt TAL *PthXo2A* và *PthXo2B*. (*SW13-Nip*): trình tự promoter *OsSWEET13* của giống lúa *Nipponbare*.

Trong nhiều nghiên cứu trước đây, một số gen thuộc nhóm III của họ gen *SWEET* (*Sugars Will Eventually be Exported Transporter*) của lúa

(*OsSWEET*) mã hóa cho các protein vận chuyển sucrose từ nhu mô tới mạch dẫn của mô libe [5], bao gồm: *OsSWEET11*, *OsSWEET13* và *OsSWEET14* đã

được chứng minh là gen *S* đối với *Xoo* [2, 16]. Khi xâm nhiễm vào cây lúa, *Xoo* sẽ hoạt hóa các gen này để cung cấp nguồn dinh dưỡng cho sự sinh trưởng của vi khuẩn trong cây chủ [16]. Gần đây, Phạm Phương Ngọc và cs (2022) đã xác định cây lúa TBR225 khi được lây nhiễm với 3 isolate VXO\_11, VXO\_60 và VXO\_96 có sự tăng biểu hiện của 2 gen *OsSWEET13* và *OsSWEET14* với các mức độ khác nhau (nghiên cứu chưa công bố). Kết quả phân tích trình tự *SW13-TBR* và *SW14-TBR* cho thấy, các promoter này có chứa lần lượt EBE *PthXo2A* và *AvrXa7* [15]. Như vậy, kết hợp các phát hiện về trình tự promoter *OsSWEET* của lúa TBR225 và gen *tal* của vi khuẩn *Xoo*, cùng với kết quả phân tích biểu hiện gen, *OsSWEET14* được dự đoán là gen *S* của cả 3 isolate *Xoo* đại diện; trong khi *OsSWEET13* được dự đoán là đích tấn công của 2 isolate VXO\_60 và VXO\_96. Hai vị trí EBE *PthXo2A* và *AvrXa7* nằm trên 2 promoter này chính là mục tiêu cần chỉnh sửa bằng hệ thống CRISPR/Cas9 để tạo tính kháng bạc lá phổ rộng của giống lúa chủ lực TBR225.

### 3.2. Thiết kế cấu trúc sgRNA chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR*

Hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 là một trong những công nghệ chỉnh sửa gen tiềm năng để cải tạo tính trạng của cây trồng. Hệ thống này hoạt động dựa trên hai thành phần chính là: (i) protein Cas9 có hoạt tính endonuclease, (ii) phân tử sgRNA

dẫn đường cho phức hệ tới vị trí cần cắt được đặc hiệu bởi đoạn trình tự dài khoảng 20 nucleotide (crRNA) nằm ở đầu 5' [4]. Để phục vụ nghiên cứu chỉnh sửa các trình tự EBE nằm trên *SW13-TBR* và *SW14-TBR*, các crRNA đã được thiết kế bằng phần mềm CRISPR-P v2.0.

Kết quả thu được 56 trình tự crRNA, trong đó 20 trình tự crRNA chỉnh sửa EBE *PthXo2A* và 36 trình tự crRNA chỉnh sửa EBE *AvrXa7* (dữ liệu không được trình bày). Để đảm bảo khả năng biểu hiện và hiệu quả hoạt động của sgRNA, 11 trình tự crRNA đã được lựa chọn (Bảng 2, hình 4) tuân thủ đầy đủ các điều kiện (1) có vị trí cắt DNA nằm trên trình tự đích, (2) bắt đầu bằng Guanine (G) hoặc có thể bổ sung thêm G ở đầu 5', (3) hàm lượng GC từ 30-80%, (4) có khả năng hình thành sgRNA có cấu trúc bậc II ổn định (duy trì cấu trúc vòng loop RAR, SL2 và SL3), (5) tổng số cặp bazơ (TBP-total base pairs) < 13, (6) số cặp bazơ liên tục (CBP-consecutive base pairs) < 8, (7) số cặp bazơ bên trong cấu trúc crRNA (IBP-internal base pairs) < 7 [7, 12]. Hai trình tự crRNA có điểm On-score cao nhất và vị trí cắt DNA khác nhau đặc hiệu cho mỗi promoter đã được lựa chọn cho thí nghiệm thiết kế cấu trúc T-DNA chỉnh sửa sgRNA, bao gồm crRNA13-1 và crRNA13-4 đặc hiệu cho *SW13-TBR* và crRNA14-1 và crRNA14-3 đặc hiệu cho *SW14-TBR*.

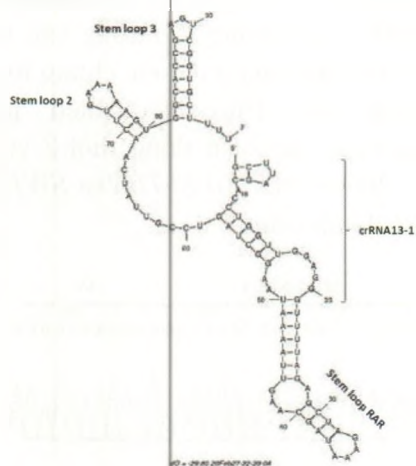
**Bảng 2.** Trình tự crRNA chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR*

Tên	Trình tự crRNA5'-3'	Kích thước	TBP	CBP	IBP	GSL	% GC	On score	Đích tác động
crRNA13-1	GAGAGGAACGAAGGGAGTTG	20	12	3	0	0	55	0,3028	PthXo2A
crRNA13-2	GAGTTGTGGTGCTTTTATAT	20	10	5	0	0	35	0,0448	PthXo2A
crRNA13-3	GGAGTTGTGGTGCTTTTATAT	21	12	6	0	0	40	0,0448	PthXo2A
crRNA13-4	GGAGAGGAACGAAGGGAGTTG	21	10	4	0	0	55	0,3028	PthXo2A
crRNA14-1	GCTTAGCACCTGGTTGGAGG	20	10	6	0	0	60	0,4770	AvrXa7
crRNA14-2	GAGCTTAGCACCTGGTTGGAGG	22	10	6	0	0	59	0,4770	AvrXa7
crRNA14-3	GTATATAAACCCCTCCAACC	21	2	2	0	0	48	0,1307	AvrXa7
crRNA14-4	GAGCTTAGCACCTGGTTGGA	20	10	6	0	0	55	0,1117	AvrXa7
crRNA14-5	GAGCTTAGCACCTGGTTGG	19	10	6	0	0	58	0,0660	AvrXa7
crRNA14-6	GCTTAGCACCTGGTTGGAG	19	10	6	0	0	58	0,0631	AvrXa7
crRNA14-7	GAGCTTAGCACCTGGTTGGAG	21	10	6	0	0	57	0,0631	AvrXa7

Ghi chú: (% GC) tỉ lệ phần trăm GC; (TBP) tổng số cặp bazơ; (CBP) số cặp bazơ liên tục; (IBP) số cặp bazơ trong cấu trúc của crRNA; (GSL) vòng loop bị phá vỡ cấu trúc; PthXo2: EBE trên promoter *SW13-TBR*; AvrXa7: EBE trên promoter *SW14-TBR*; (On score) điểm dự đoán khả năng nhận biết đúng vị trí đích (từ 0,00 -1,00).



Các trình tự crRNA tiếp tục được phân tích bằng công cụ CRISPR trong phần mềm CCTop để dự đoán tính đặc hiệu của các trình tự crRNA nhằm giảm thiểu khả năng nhận biết sai vị trí (off-target) của phức hệ Cas9/sgRNA [4]. Kết quả phân tích thu được (Bảng 3) cho thấy tất cả các trình tự tương đồng với các crRNA đều nằm trên vùng intron (*crRNA13-1*) hoặc là nằm xa gen chức năng (*crRNA13-4*; *crRNA14-1* và *crRNA14-3*). Do đó, trong trường hợp phức hệ CRISPR/Cas9 hoạt động không đặc hiệu cũng sẽ không gây ảnh hưởng tới hoạt động bình thường của các gen khác trong hệ gen lúa [12, 8].



Hình 4. Cấu trúc bậc II của sgRNA mang crRNA13-1

Ghi chú: Mô hình cấu trúc bậc II được dự đoán bằng phần mềm Mfold 2.3 mang vùng crRNA và các

cấu trúc vòng loop: Stem loop RAR (repeat and anti-repeat region), Stem loop2 và Stem loop3.

Như vậy, tổng hợp các kết quả phân tích, *crRNA13-1* & *crRNA13-4* và *crRNA14-1* & *crRNA14-3* sẽ lần lượt được sử dụng cho nghiên cứu gây đột biến EBE *PthXo2A* trên *SW13-TBR* (gọi tắt là gRNA1-SW13 và gRNA2-SW13) và *AvrXa7* trên *SW14-TBR* (gọi tắt là gRNA1-SW14 và gRNA2-SW14) theo cơ chế ghép nối điểm cuối không tương đồng (Non-homologous end joining) bằng hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 [4].

Trước đây, để tạo cải tiến tính kháng bạc lá ở lúa, Zeng (2018) hay Kim (2019) đã thiết kế sgRNA nhận biết vùng exon I và exon III để bất hoạt gen *OsSWEET14* [19] và *OsSWEET13* [11]. Trong một nghiên cứu khác, Zafar (2020) gây đột biến 4 EBE *PthXo3*, *AvrXa7*, *TalF*, *TalC* trên promoter *OsSWEET14* của giống lúa Super Basmati bằng 3 sgRNA khác nhau [18]. Tương tự, hai nghiên cứu gần đây ở Việt Nam cũng thiết kế 1 trình tự sgRNA để đồng thời chỉnh sửa vị trí EBE *PthXo3/AvrXa7/TalF* trên *OsSWEET14* của giống lúa TBR225 và Bắc thơm 7 [17, 15]. Trong nghiên cứu này, 4 trình tự sgRNA nhận biết vị trí *AvrXa7* trên *OsSWEET14* và *PthXo2A* trên *OsSWEET13* đã được lựa chọn để thiết kế cấu trúc CRISPR/Cas9 nhằm tạo tính kháng bạc lá phổ rộng cho giống lúa TBR225.

Bảng 3. Các trình tự crRNA tương đồng trong hệ gen lúa

Tên	Trình tự tương đồng <sup>1</sup>	Vị trí	Khoảng cách <sup>2</sup>	Mã số
crRNA13-1	GCGAGGCA[GGGAGGGAGTTG]	I	1459	Os01g0337500
crRNA13-4	AATTTGTC[GTGTTTTATAT]	-	1658	Os07g0229990
crRNA14-1	GCAGAGAA[GCTGGTTGGAGG]	-	8607	Os10g0409556
	ACATAGCA[CCTGGCTAGAGG]	-	8383	Os01g095607
crRNA14-3	CCTAAAAA[CTCCCTCCAACC]	-	6651	Os11g0562600
	AATATTTA[CTCCCTCCAACC]	-	23528	Os11g0146800
	CACATGAA[CCCCACCAACC]	-	15618	Os11g0530600

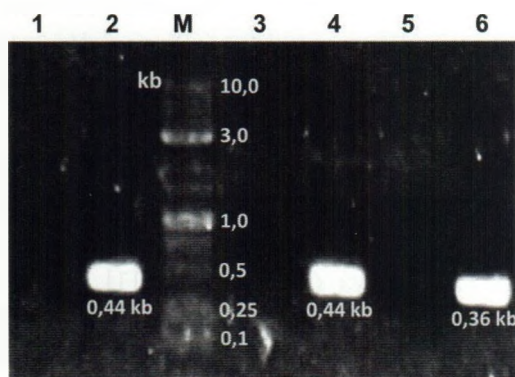
Ghi chú: Chữ trong ngoặc [ ] thể hiện trình tự tương đồng với vùng lõi (12 nu) của crRNA; chữ in đậm thể hiện vị trí sai khác so với vị trí Nu tương ứng trên crRNA.

### 3.3. Thiết kế cấu trúc T-DNA chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR*

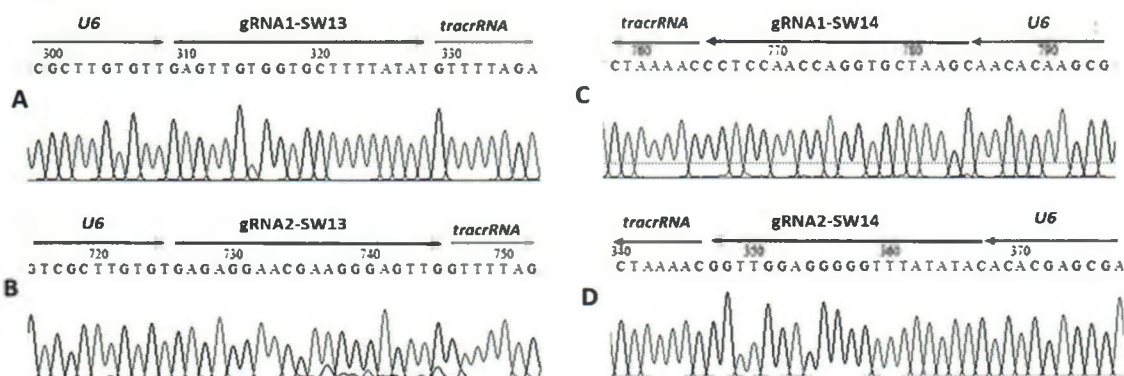
Để tạo ra cấu trúc biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa đồng thời EBE *PthXo2A* trên *SW13-TBR* và EBE *AvrXa7* trên *SW14-TBR*, bốn trình tự *crRNA13-1* & *crRNA13-4* và *crRNA14-1* & *crRNA14-3* đã được lần lượt ghép nối vào cấu trúc biểu hiện sgRNA trên khung vector pENTR4. Đoạn

trình tự DNA mang 4 cấu trúc biểu hiện sgRNA [*U6:gRNA-SW13:SW14*] được ghép nối vào vector nhị phân pUbi/Cas9 mang cấu trúc biểu hiện protein Cas9 [*Ubiquitin:Cas9:NOS*] bằng enzyme LR clonase. Plasmid tái tổ hợp được tách chiết từ thể biến nạp dương tính và kiểm tra sự có mặt của cấu trúc biểu hiện của 4 sgRNA bằng phương pháp PCR. Kết quả thu được cho thấy các sản phẩm PCR với cặp

mỗi Ubi-R/Cas9-t-R (đặc hiệu cho cấu trúc *[Ubiquitin:Cas9:NOS]*) và gRNA1-SW13-Fw/gRNA2-SW13-Rv (đặc hiệu cho cấu trúc *[U6:gRNA-SW13]*), gRNA1-SW14-Fw/gRNA2-SW14-Rv (đặc hiệu cho cấu trúc *[U6:gRNA-SW14]*) có kích thước lần lượt khoảng 0,36 bp, 0,44 bp và 0,44 bp phù hợp với kích thước theo tính toán lý thuyết.



Hình 5. Kiểm tra vector tái tổ hợp pCas9/gRNA:SW13::SW14



Hình 6. Giải trình trình tự pCas9/gRNA-SW13::SW14

*Ghi chú: Một phần vector pCas9/gRNA-SW13:SW14 được giải trình tự nucleotide. Trình tự các crRNA đã được ghép nối vào vị trí giữa promoter U6 và tracrRNA.*

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 [13]. Trong nghiên cứu này, cấu trúc biểu hiện sgRNA điều khiển bởi promoter *U6* nhận biết đồng thời vị trí của 2 EBE (*PthXo2A* và *AvrXa7*) trên *SW13-TBR* và

*Ghi chú: Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%. Giếng 1, 3 và 5: đối chứng âm (không có DNA khuôn); giếng 2, 4 và 6: khuôn là pCas9/gRNA-SW13::SW14; giếng 1 và 2: PCR với cặp mồi gRNA1-SW13-Fw/gRNA2-SW13-Rv; giếng 3 và 4: PCR với cặp mồi gRNA1-SW14-Fw/gRNA2-SW14-Rv; giếng 5 và 6: PCR với cặp mồi Ubi-F/Cas9-t-R; M: thang chuẩn DNA 1 kb.*

Để khẳng định sự ghép nối chính xác của các trình tự crRNA đích trong vector pCas9/gRNA-SW13::SW14, vector tái tổ hợp đã được giải trình tự nucleotide. Kết quả phân tích trình tự (Hình 6) cho thấy các crRNA đích đã được chèn chính xác vào giữa tracrRNA và promoter *U6* trong cấu trúc biểu hiện sgRNA. Các kết quả thu được chứng tỏ cấu trúc T-DNA mang cấu trúc biểu hiện phức hệ CRISPR/Cas9 gây đột biến đồng thời 2 vị trí EBE *PthXo2A* và *AvrXa7* trên *SW13-TBR* và *SW14-TBR* đã được thiết kế thành công.

*SW14-TBR* đã được tạo ra bằng kỹ thuật ghép nối DNA sử dụng enzyme cắt giới hạn và LR clonase. Vector tái tổ hợp tạo ra mang đầy đủ các cấu trúc biểu hiện phức hệ protein-RNA chỉnh sửa *SW13-TBR* và *SW14-TBR* sẽ được sử dụng cho nghiên cứu chỉnh sửa gen thông qua trung gian *Agrobacterium* sau này.

#### 4. KẾT LUẬN

Đã xác định được isolate VXO\_11 mang gen mã hóa protein TAL *AvrXa7* và *PthXo2B*, VXO\_60 và VXO\_96 mang gen mã hóa protein TAL *AvrXa7* và *PthXo2A*. Bốn trình tự crRNA nhận biết 2 EBE *AvrXa7* và *PthXo2A* trên *SW13-TBR* và *SW14-TBR* đã được xác định bằng công cụ tin sinh học. Cấu trúc T-DNA biểu hiện phức hệ chỉnh sửa gen



CRISPR/Cas9 mang đồng thời 4 crRNA gây đột biến *SW13-TBR* và *SW14-TBR* đã được thiết kế và kiểm tra bằng giải trình tự Nu.

Kết quả nghiên cứu là tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về vai trò của *OsSWEET13* và *OsSWEET14* liên quan tới tính miễn cảm với vi khuẩn *Xoo* của giống lúa TBR225, từ đó hướng tới việc tạo ra giống lúa mới kháng bệnh bạc lá phổ rộng.

#### 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. Bortesi L., Fischer R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol. Adv.*, 33(1):41-52.
5. 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):207-11.
6. Chu Z., Yuan M., Yao J., Ge X., Yuan B., Xu C., Li X., Fu B., Li Z., Bennetzen J. L., Zhang Q., Wang S. (2006). Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. *Genes Dev.*, 20(10):1250-1265.
7. Dang Y., Jia G., Choi J., Ma H., Anya E., Ye C., Shankar P and Wu H. (2015). Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency. *Genome Biology*, 280.
8. Doench J. G., Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E. W., Donovan K.F., Smith I., Tothova Z., Wilen C., Orchard R., Virgin H. W., Listgarten J. And Root D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Bio.*, 34 (3):184-191.
9. Doyle E. L., Stoddard B. L., and Bogdanove A. J. (2013). TAL effector: highly adaptable phyto-bacterial virulence factors and readily engineered DNA targeting proteins. *Trends Cell Biol*, 23(8): 390-398.
10. Hutin M., Sabot F., Ghesquière A., Koebnik R., Szurek B. (2015). A knowledge-based molecular screen uncovers a broad spectrum *OsSWEET13* resistance allele to bacterial blight from wild rice. *Plant J.*, 84(4):694-703.
11. 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(1):67. doi: 10.1186/s12284-019-0325-7.
12. Liang G., Zhang H., Lou D., Yu D. (2016). Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Sci. Rep.*, 6: 21451.
13. Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Wang B., Yang Z., Li H., Lin Y., Xie Y., Shen R., Chen S., Wang Z., Chen Y., Guo J., Chen L., Zhao X., Dong Z., Liu Y. G. (2015). A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants, *Molecular Plant*, 8(8):1274-1284.
14. Oliva R., Ji C., Atienza-Grande G., Huguet-Tapia J.C. and Perez-Quintero A. (2019). Broad spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing. *Nature biotechnology*, 37(11): 1344-1350.
15. Phùng Thị Thu Hương, Nguyễn Duy Phương, Phạm Xuân Hội (2018). Nghiên cứu phân lập promoter *OsSWEET14* và thiết kế cấu trúc gRNA tăng cường khả năng kháng bệnh bạc lá của giống lúa TBR225. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 23: 42-49.
16. Streubel J., Pesce C., Hutin M., Koebnik R., Boch J., Szurek B. (2013). Five phylogenetically close rice *SWEET* genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytol.*, 200:808-81.
17. Vũ Hoài Sâm, Nguyễn Thanh Hà, Cao Lệ 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 thom 7. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 2(353): 13-19.

18. Zafar K., Khan M. Z., Amin I., Mukhtar Z., Yasmin S., Arif M., Ejaz K. and Mansoor S. (2020). Precise CRISPR-Cas9 mediated genome editing in super basmati rice for resistance against bacterial blight by targeting the major susceptibility gene. *Front. Plant Sci.* 11:575. doi: 10.3389/fpls.2020.00575

19. Zeng 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):313. doi: 10.1186/s12870-020-02524-y.

20. Zhou J., Peng Z., Long J., Sosso D., Liu B., Eom J.-S. Huang S., Liu S., Cruz C., Frommer W., White F. And and Yang B. (2015). Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *Plant J.*, 82(4):632-43.

## DESIGN OF T-DNA CONSTRUCT FOR EDITING *SWEET* GENES INVOLVED BACTERIAL LEAF BLIGHT DISEASE IN TBR225 RICE VARIETY

Tran Lan Dai<sup>1</sup>, Phung Thi Thu Huong<sup>2</sup>, Cao Le Quyen<sup>2</sup>,  
Nguyen Van Cuu<sup>2</sup>, Nguyen Thi Thu Ha<sup>2</sup>, Pham Xuan Hoi<sup>2</sup>, Nguyen Duy Phuong<sup>2</sup>\*

<sup>1</sup>Quy Nhon University

<sup>2</sup>Institute of Agricultural Genetics

\*Email: phuongnd.bio@gmail.com

### Summary

Bacterial leaf blight (BLB) disease is caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), which leads to severe rice yield losses in many Asian and African countries. *Xoo* secretes special proteins called TALs (Transcription activator like effectors), which bind to specific *cis* elements located on the promoter region of host genes and activates them to serve its growth and infection in plants. In this study, we studied the TALome of three representative Vietnam *Xoo* isolates. Isolate VXO\_11 carries the *tal* gene encoding the proteins AvrXa7 and PthXo2B; while VXO\_60 and VXO\_96 carry genes encoding TAL AvrXa7 and PthXo2A. Four crRNA (CRISPR RNA) were designed using bioinformatics tools for targeting two host DNA sequences recognized by TAL AvrXa7 and PthXo2A on the *OsSWEET13* and *OsSWEET14* promoters of the TBR225 rice variety. Designed crRNAs were inserted into *BtgZI* and *BsaI* sites, respectively, of pENTR4 vector; sgRNA expression construct then ligated into pCas9 vector for generating the T-DNA construct expressing the TBR225 *OsSWEET13* and *OsSWEET14*-edited CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9) complex. This will be the premise for the generation of new rice varieties TBR225 with broad-spectrum resistance to BLB using CRISPR/Cas9 technology.

**Keywords:** *Bacterial leaf blight, CRISPR/Cas9, SWEET, TAL, Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*.

**Người phản biện:** PGS.TS. Lã Tuấn Nghĩa

**Ngày nhận bài:** 15/10/2021

**Ngày thông qua phản biện:** 15/11/2021

**Ngày duyệt đăng:** 22/5/2022