

# DI TRUYỀN TÍNH KHÁNG Ở CẤP ĐỘ PHÂN TỬ VÀ ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA KHÁNG BỆNH BẠC LÁ

Đình Xuân Hoàn<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Tho<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

Bệnh bạc lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) gây ra là một loại bệnh hại nghiêm trọng trên lúa có thể gây thiệt hại 50% năng suất. Sử dụng giống lúa kháng bệnh giúp kiểm soát một cách hiệu quả bệnh hại này. Các nghiên cứu về QTL (Quantitative trait locus)/gen kháng bệnh bạc lá cũng như nghiên cứu tương tác ký sinh - ký chủ ở cấp độ phân tử đã góp phần đẩy mạnh công tác chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá. Đến nay, 46 gen kháng vi khuẩn *Xoo* đã được xác định, trong đó 28 gen trội. 18/46 gen kháng vi khuẩn *Xoo* đã được phân lập bằng các phương pháp khác nhau. Bộ gen hoàn chỉnh của 4 nòi *Xoo* đã được công bố, chứa khoảng 5 triệu nucleotide với 9 - 19 gen mã hóa protein gây bệnh. Một số kỹ thuật sinh học phân tử như chọn giống bằng chỉ thị phân tử (Marker-assisted selection - MAS) và chỉnh sửa gen bằng CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9) đã được ứng dụng giúp đẩy nhanh quá trình chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá.

**Từ khóa:** Cây lúa, bệnh bạc lá, tính kháng, chọn tạo giống

## 1. Giới thiệu

Lúa (*Oryza sativa* L.) là một trong những cây lương thực chính của thế giới, với diện tích năm 2019 đạt 162 triệu hecta, cho sản lượng ước đạt hơn 755 triệu tấn (FAO, 2020). Lúa được trồng ở hơn 100 quốc gia trên thế giới, ở khắp các châu lục trừ Châu Nam Cực (Fukagawa and Ziska, 2019) và là nguồn cung cấp tinh bột cho hơn 50% dân số toàn cầu (Pradhan *et al.*, 2020). Do đó, việc nâng cao sản lượng và chất lượng lúa gạo là cần thiết để đảm bảo an ninh lương thực trong bối cảnh dân số thế giới tăng nhanh, biến đổi khí hậu toàn cầu, và các nguyên nhân khác (Qian *et al.*, 2016).

Chọn tạo giống lúa kháng bệnh là một trong những mục tiêu chính của các chương trình chọn giống hiện nay (Dinh *et al.*, 2020). Bệnh bạc lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) gây ra là loại bệnh hại phổ biến trên lúa, lây lan mạnh và gây thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất (Pradhan *et al.*, 2020). Bệnh có thể làm giảm năng suất đến 50% tùy thuộc vào giống lúa, giai đoạn sinh trưởng, vùng sinh thái và các điều kiện môi trường (Liu *et al.*, 2014). Cải thiện nền di truyền, kết hợp đặc tính năng suất cao và chất lượng tốt với khả năng kháng bệnh là biện pháp hiệu quả và bền vững nhất về mặt sinh thái để kiểm soát bệnh hại (Dinh *et al.*, 2020). Nhiều gen kháng bệnh đã được đưa vào các giống cây trồng để kiểm soát các loại

bệnh hại chính, đặc biệt là các gen trội. Tuy nhiên, quá trình tiến hóa song song giữa cây trồng và tác nhân gây bệnh dẫn đến việc các gen kháng thường bị vượt qua bởi sự xuất hiện của các nòi, chủng vi sinh vật gây bệnh mới. Do đó, việc phát hiện các nguồn vật liệu mang gen kháng mới cần được quan tâm, đồng thời cần có các biện pháp sử dụng có hiệu quả nguồn gen kháng sẵn có trong công tác chọn tạo giống kháng bệnh (Wang *et al.*, 2020).

Bài tổng quan này tập trung thảo luận về di truyền tính kháng bệnh bạc lá trên lúa, tác động qua lại giữa cây lúa và vi khuẩn *Xoo*, trong đó nhấn mạnh cơ chế hình thành tính kháng ở cấp độ phân tử, đồng thời cập nhật những thành tựu của việc ứng dụng các công cụ hiện đại trong chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá.

## 2. Nguồn gốc và phân bố của các gen *Xa* trên các nhiễm sắc thể

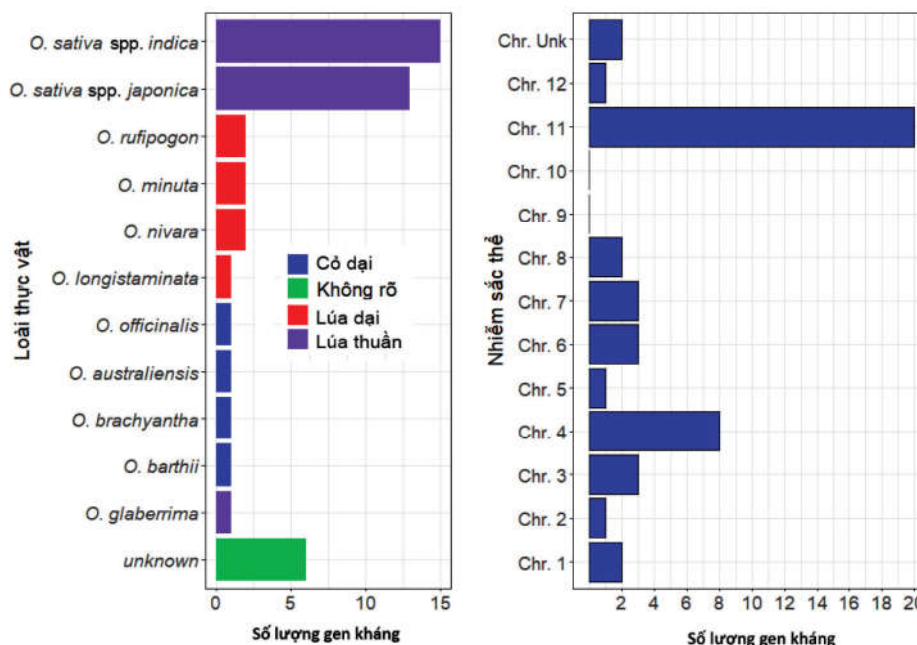
Đến nay, 46 QTLs/loci quy định tính kháng vi khuẩn *Xoo* (gọi tắt là “gen kháng”) đã được xác định trên lúa (Chen *et al.*, 2020). Phần lớn các gen này được xác định trên lúa thuần thuộc hai loài *O. sativa* spp. *indica* (15 gen) và *O. sativa* spp. *japonica* (13 gen); một số gen kháng được phát hiện trên lúa dại (7 gen) và cỏ dại (4 gen) (Hình 1). Báo cáo trước đây cho thấy các loài lúa dại mang nhiều gen kháng vi khuẩn *Xoo* (Angeles-Shim *et al.*, 2020)

<sup>1</sup> Viện Bảo vệ thực vật

\* Tác giả chính: Email: xuanhoan2008@gmail.com

nhưng ít được quan tâm nghiên cứu. Gen kháng bệnh bạc lá phân bố trên hầu hết các nhiễm sắc thể (NST), trừ NST số 9 và số 10, phần lớn các gen

kháng tập trung trên NST số 11 (20 gen) (Pradhan *et al.*, 2020) (Hình 1).



Hình 1. Nguồn gốc của các gen kháng vi khuẩn *Xoo* trên lúa đã được xác định (trái) và phân bố của chúng trên các NST (phải)

### 3. Cấu trúc bộ gen của vi khuẩn *Xoo*

Một số nòi *Xoo* như MAFF 311018, KACC 10331, PXO99<sup>A</sup> và AXO1947 đã được giải trình tự toàn bộ hệ gen. Bộ gen của vi khuẩn *Xoo* chứa khoảng 5 triệu nucleotide với tỷ lệ Guanine và

Cytocine chiếm khoảng 63,7%. Số lượng gen của các nòi này dao động từ 3.706 gen (nòi AXO1947) (Huguet *et al.*, 2016) đến 5.083 gen (nòi PXO99<sup>A</sup>) (Salzberg *et al.*, 2008). Tuy nhiên, số lượng gen mã hóa protein tấn công cây ký chủ khá tương đồng giữa các nòi (Bảng 1).

Bảng 1. So sánh bộ gen hoàn chỉnh của một số nòi vi khuẩn *Xoo*

Nòi	Kích thước (bp)	Tỷ lệ GC (%)	Tổng số gen	Số protein gây bệnh	TLTK
AXO1947	4.674.975	63,89	3.706	9	(Huguet <i>et al.</i> , 2016)
MAFF 311018	4.940.217	63,70	4.372	17	(Ochiai <i>et al.</i> , 2005)
KACC 10331	4.941.439	63,70	4.637	15	(Lee <i>et al.</i> , 2005)
PXO99A	5.240.075	63,60	5.083	19	(Salzberg <i>et al.</i> , 2008)

Việc giải trình tự bộ gen vi khuẩn *Xoo* giúp tìm hiểu về các gen mã hóa protein làm tăng khả năng gây bệnh, đồng thời cung cấp dữ liệu cho những nghiên cứu về tác động qua lại giữa vi khuẩn và cây lúa. Từ đó, các nhà nghiên cứu về di truyền và chọn tạo giống có thể hoạch định chiến lược phù hợp để phát triển giống lúa kháng bệnh bạc lá.

### 4. Tình hình nghiên cứu QTLs/loci quy định tính kháng bệnh bạc lá hại lúa

Các gen kháng vi khuẩn *Xoo* đầu tiên được xác định gồm *Xa-1*, *Xa-2*, *Xa-3*, và *Xa-11* được xác định tại Nhật Bản, và các gen từ *Xa-4* đến *Xa-10* được xác định tại Philipine (Pradhan *et al.*, 2020). Các gen kháng quy định mức độ kháng khác nhau với các

nòi vi khuẩn *Xoo* khác nhau (Hình 2). Hiện nay, các gen kháng bệnh bạc lá được định danh và đề xuất tên gọi từ *Xa1* đến *Xa46* thay vì *Xa-1* đến *Xa-46*.

Các gen kháng vi khuẩn *Xoo* gồm 18 gen lặn và 28 gen trội. Một số gen trội được xác định từ rất sớm gồm *Xa1* - *Xa4* (Kumar *et al.*, 2020). Nhiều

gen trội khác được xác định gần đây bao gồm *Xa35* - *Xa40* và *Xa46* (Chen *et al.*, 2020; Pradhan *et al.*, 2020). Các gen còn lại di truyền theo quy luật đơn gen lặn gồm *xa5*, *xa8-9*, *xa13*, *xa15*, *xa19-20*, *xa24* - 26, *xa28*, *xa31*, *xa33* - 34, *xa41* - 42, và *xa44* - 45 (Pradhan *et al.*, 2020).



**Hình 2.** Mức độ phản ứng của một số giống lúa với vi khuẩn *Xoo*. Các hình ảnh từ dưới lên trên thể hiện mức độ bị bệnh cấp 1, 3, 5, 7, và cấp 9

## 5. Phân lập và giải trình tự gen kháng vi khuẩn *Xoo*

Trong số 46 QTLs/loci quy định tính kháng vi khuẩn *Xoo* đã biết, 19 gen kháng vi khuẩn *Xoo* đã được phân lập và giải trình tự, bao gồm: *Xa1*, *Xa2/Xa31*, *Xa3/Xa26*, *Xa4*, *xa5*, *Xa7*, *Xa10*, *xa13*, *Xa14*, *Xa21*, *Xa23*, *xa25*, *Xa26*, *Xa27*, *xa41*, *Rxo1*, *Xa45*, và *CGS-Xo1<sub>11</sub>*. Mười gen trong số này đã được xác định mã hóa protein thuộc họ Nucleotide Binding Site Leucine-Rich Repeat (NLR); 4 gen thực thi (executor gene), 3 gen mã hóa protein vận chuyển đường (Sugar Eventually Will be Exported Transporter - SWEET), và 2 gen mã hóa các loại protein khác (*Xa4* và *xa5*) (Bảng 2).

Các gen kháng vi khuẩn *Xoo* mã hóa các loại protein khác nhau, và các protein này tham gia vào quá trình hình thành tính kháng bệnh theo các cơ chế khác nhau. NLR là họ protein phổ biến nhất liên quan đến tính kháng bệnh ở thực vật và động vật (Li *et al.*, 2015), được đặc trưng bởi các vùng lặp

lại chứa nhiều amino axit loại Leucine. Các miền giàu Leucine thường có tính tương đồng cao với các protein NLR khác. Các protein NLR được báo cáo tham gia vào tất cả các giai đoạn hình thành tính kháng bệnh như nhận diện vi sinh vật gây bệnh, lan truyền tín hiệu và kích hoạt phản ứng tự vệ (Dinh *et al.*, 2020). Đa số các gen kháng vi khuẩn *Xoo* được phân lập và giải trình tự cho đến nay thuộc nhóm protein này.

Các gen thực thi được phát hiện cho đến nay đều là các gen quy định tính kháng các loài vi khuẩn *Xanthomonas*, bao gồm các gen kháng *Xoo* trên lúa (*Xa10*, *Xa23*, *Xa27* và *Xa7*) và các gen quy định tính kháng vi khuẩn *X. campestris* (*Bs3* và *Bs4C*) trên ớt (Römer *et al.*, 2007; Strauß *et al.*, 2012). Các protein được mã hóa bởi gen thực thi thường có kích thước nhỏ, chứa một số vùng liên kết với màng tế bào, thường có trình tự amino axit rất khác với các loại protein đã biết, và chỉ biểu hiện khi có sự tương tác với protein đặc hiệu do vi khuẩn tiết vào tế bào ký chủ.

**Bảng 2.** Tổng hợp các gen kháng vi khuẩn *Xoo* đã được phân lập và giải trình tự

Stt	Gen kháng	Loại protein được mã hóa	Tài liệu tham khảo
1	<i>Xa1</i>	NBS-LRR <sup>(1)</sup>	(Ji <i>et al.</i> , 2016)
2	<i>Xa3/Xa26</i>	LRR-RLK <sup>(2)</sup>	(Xiang <i>et al.</i> , 2006)
3	<i>Xa4</i>	Wall-associated Kinase	(Hu <i>et al.</i> , 2017)
4	<i>xa5</i>	TFIIA $\gamma$ 5 transcription factor	(Jiang <i>et al.</i> , 2006)
5	<i>Xa10</i>	Executor R protein	(Tian <i>et al.</i> , 2014)
6	<i>xa13</i>	SWEET <sup>(4)</sup> -type protein	(Yang <i>et al.</i> , 2006)
7	<i>Xa21</i>	LRR-RLK <sup>(2)</sup>	(Pruitt <i>et al.</i> , 2015)
8	<i>Xa23</i>	Executor R protein	(Wang <i>et al.</i> , 2015)
9	<i>xa25</i>	SWEET <sup>(4)</sup> -type protein	(Zhou <i>et al.</i> , 2015)
10	<i>Xa27</i>	Executor R protein	(Gu <i>et al.</i> , 2005)
11	<i>xa41</i>	SWEET <sup>(4)</sup> -type protein	(Streubel <i>et al.</i> , 2013)
12	<i>Xa2/Xa31</i>	CTR-NLRs <sup>(3)</sup>	(Ji <i>et al.</i> , 2020)
13	<i>Xa7</i>	Executor R protein	(Chen <i>et al.</i> , 2021)
14	<i>Xa14</i>	CTR-NLRs <sup>(3)</sup>	(Ji <i>et al.</i> , 2020)
15	<i>Xa45</i>	CTR-NLRs <sup>(3)</sup>	(Ji <i>et al.</i> , 2020)
16	<i>Rxo1</i>	NBS-LRR <sup>(1)</sup>	(Zhao <i>et al.</i> , 2004)
17	<i>CGS-Xo1<sub>11</sub></i>	CTR-NLRs <sup>(3)</sup>	(Ji <i>et al.</i> , 2020)

Ghi chú: <sup>(1)</sup> Nucleotide Binding Site Leucine-Rich Repeat

<sup>(2)</sup> Leucine Rich Repeat Receptor-Like Kinase

<sup>(3)</sup> Centre Tandem Repeat Nucleotide Leucine Rich Repeats

<sup>(4)</sup> Suger Eventually Will be Transported

Các protein thuộc nhóm SWEET là mục tiêu có chọn lọc của các loài vi khuẩn gây bệnh trên cây trồng và chúng tạo điều kiện thuận lợi cho sự xâm nhập và gây bệnh của vi khuẩn (Chandran, 2015). Khả năng xâm nhập và gây bệnh của vi khuẩn bị giảm khi quá trình sinh tổng hợp các loại protein SWEET trong cây bị gián đoạn (Chandran, 2015). Gen *xa13*, *xa25* và *xa41* là các gen lặn và có liên quan mật thiết đến tính miễn cảm của cây lúa đối với bệnh bạc lá. Việc làm giảm mức độ biểu hiện hoặc bất hoạt những gen này giúp cải thiện tính kháng bệnh bạc lá của cây lúa (Streubel *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2015). Trong khi đó, protein Wall-associated Kinase được mã hóa bởi gen *Xa4* có thể tham gia vào quá trình nhận biết vi khuẩn *Xoo* từ màng tế bào và kích hoạt lớp phòng vệ thứ nhất của tế bào lúa (Decreux and Messiaen, 2005).

## 6. Thành tựu chọn tạo giống lúa kháng vi khuẩn *Xoo*/bệnh bạc lá

### 6.1. Chọn giống lúa bằng chỉ thị phân tử

Chọn giống bằng chỉ thị (MAS) là quá trình chọn lọc gián tiếp một tính trạng dựa vào chỉ thị phân

tử liên kết với tính trạng mong muốn thay vì chọn lọc trực tiếp (Ribaut and Hoisington, 1998). MAS đã được ứng dụng rộng rãi trong chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá ở nhiều quốc gia trên thế giới, đặc biệt là trong các dự án tích hợp nhiều gen kháng. Các chỉ thị vị trí chuỗi đánh dấu (Sequence-Tagged Sites - STS) đã được sử dụng trong việc tích hợp các gen *xa5*, *xa13* và *Xa21* vào ba dòng lúa gồm IR65598-112, IR65600-42, và IR65600-96 (Sanchez *et al.*, 2000). Các dòng tích hợp ba gen có tính kháng cao với cả 6 chủng vi khuẩn *Xoo* (chiều dài vết bệnh nhỏ hơn 2,5 cm) trong khi các dòng thuần ban đầu cho chiều dài vết bệnh lên đến 20,5 cm. Tương tự, các gen kháng *Xa4*, *xa5*, *xa13* và *Xa21* đã được tích hợp trên giống lúa IR24 nhờ sử dụng các chỉ thị đa hình chiều dài đoạn giới hạn (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP) giúp tạo tính kháng cao với cả 6 chủng vi khuẩn *Xoo* (Huang *et al.*, 1997). Giống lúa PR106 cũng đã được cải tiến tính kháng vi khuẩn *Xoo* nhờ tích hợp các gen kháng *xa5*, *Xa13* và *Xa21* thông qua ứng dụng chỉ thị STS (Singh *et al.*, 2001). Khi lây nhiễm nhân tạo với 17 mẫu vi khuẩn *Xoo*, chiều dài vết bệnh lớn nhất ghi nhận trên dòng PR106 đã tích hợp 3 gen kháng là 1,67 cm trong khi

chiều dài vết bệnh trên giống PR106 ban đầu cao nhất đạt 26,33 cm. Ở Việt Nam, so với giống lúa LT2 thuần chủng, dòng LT2 được tích hợp gen *Xa21* cho chiều dài vết bệnh với 2 chủng vi khuẩn *Xoo* 981.HUA10146 và 996.HUA10147 từ 17,5 và 21,1 cm giảm xuống còn 4,4 và 8,0 cm (Nguyen *et al.*, 2018a). Công nghệ MAS đã được sử dụng để tích hợp hai gen kháng *Xa21* và *Xa7* vào giống lúa Bắc thơm 7 nhiễm bệnh, và đã tạo được các dòng kháng với nhiều chủng vi khuẩn *Xoo* (Nguyen *et al.*, 2018b).

## 6.2. Chọn giống lúa bằng công nghệ chuyển gen

Việc chuyển gen mục tiêu vào cây lúa đã được phát triển từ những năm 1980, trong đó việc dùng vi khuẩn *Agrobacterium* làm trung gian là một trong những phương pháp phổ biến nhất được dùng để nghiên cứu chức năng của gen, cải thiện các tính trạng nông học, tăng năng suất lúa (Ratanasut *et al.*, 2017). Chuyển gen kháng vi khuẩn *Xoo* vào giống lúa mục tiêu là biện pháp trực tiếp và thuận tiện nhất để kiểm soát bệnh bạc lá. Gen kháng phổ rộng *Xa21* đã được chuyển vào giống lúa Minghui 63 giúp làm giảm chiều dài vết bệnh xuống còn 1 – 2 cm trên dòng chuyển gen so với 15 – 18 cm trên giống thuần ban đầu ở thời điểm 14 ngày sau lây nhiễm (Zhang *et al.*, 1998). Các dòng chuyển gen Minghui 63 và WanB mang gen *Xa21* thể hiện tính kháng cao, đồng thời con lai giữa hai dòng chuyển gen này cũng cho thấy tính kháng cao và ổn định với bệnh bạc lá (Jiadao *et al.*, 2001). Gen *Xa21* cũng được chuyển vào giống lúa IR50 (mang gen *Xa4*) giúp làm tăng tính kháng với cả ba nòi vi khuẩn *Xoo*. Chiều dài vết bệnh của tất cả các dòng chuyển gen đều nhỏ hơn 4 cm trong khi giống IR24 cho chiều dài vết bệnh 13,5 – 17,8 cm, và trên giống IR50 là 9,4 cm (Narayanan *et al.*, 2002).

## 6.3. Chọn giống lúa bằng kỹ thuật chỉnh sửa gen CRISPR-Cas9

CRISPR/Cas9 là một trong những kỹ thuật hiện đại giúp các nhà khoa học chỉnh sửa một phần bộ gen của sinh vật bằng cách cắt bỏ, thêm vào, hoặc thay đổi một hoặc một số đoạn trình tự DNA. Hiện nay, đây là phương pháp chỉnh sửa gen đơn giản nhất, linh hoạt và chính xác nhất. Từ năm 2019 đến nay, kỹ thuật CRISPR/Cas9 được phát triển rất mạnh, ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực trên nhiều loài sinh vật khác nhau, trong đó có chỉnh sửa gen lúa để tạo tính kháng bệnh bạc lá. Giống lúa nhiễm vi khuẩn *Xoo* Zhonghua11

được tăng cường tính kháng bằng cách dùng kỹ thuật CRISPR/Cas9 để can thiệp vào vùng mã hóa protein của gen *OsSWEET14* (gen nhiễm bệnh) của giống gốc (Zeng *et al.*, 2020). Các biến thể của gen *OsSWEET14* đã tổng hợp ra các protein chỉ có 1 hoặc không có vùng liên kết với màng tế bào, trong khi protein *OsSWEET14* gốc có 7 vùng liên kết với màng tế bào. Sự thay đổi về cấu trúc protein đã làm gián đoạn đáng kể quá trình vận chuyển đường, từ đó làm tăng tính kháng vi khuẩn *Xoo* của các dòng lúa mang các thể biến dị này. Kỹ thuật này cũng được dùng để thay đổi trình tự nhận diện vi khuẩn trên vùng điều hòa của các gen *OsSWEET11*, *OsSWEET13* và *OsSWEET14* để có được tính kháng vi khuẩn *Xoo* (Xu *et al.*, 2019; Zafar *et al.*, 2020). Sự thay đổi trình tự nhận diện của các gen trên khiến các chất tiết của vi khuẩn *Xoo* không thể kích hoạt quá trình sinh tổng hợp protein, do đó hạn chế khả năng xâm nhập và gây bệnh của vi khuẩn. Gen *Xa13* quyết định sự phát triển của hạt phấn, đồng thời làm tăng tính miễn cảm của cây lúa với bệnh bạc lá. Vùng điều hòa của gen này được thay đổi bằng cách loại bỏ 149 nucleotide nhờ kỹ thuật CRISPR/Cas9 làm cho gen không bị kích hoạt bởi vi khuẩn *Xoo*, từ đó tạo nên tính kháng bệnh bạc lá, trong khi không làm ảnh hưởng đến sự phát triển của hạt phấn (Li *et al.*, 2020).

## 7. Hướng nghiên cứu trong tương lai

Phần lớn các QTLs/loci quy định tính kháng vi khuẩn *Xoo* đã được phát hiện trên lúa trồng và một số ít được phát hiện trên các loài lúa dại. Nguồn gen kháng vi khuẩn *Xoo* trên các loài lúa dại rất phong phú và cần được quan tâm nghiên cứu trong thời gian tới nhằm tìm ra nguồn gen kháng mới.

Việc hoàn thành giải trình tự bộ gen của vi khuẩn *Xoo* cũng như phân lập và giải trình tự các gen kháng vi khuẩn *Xoo* trên lúa tạo điều kiện thuận lợi cho các nghiên cứu về tương tác giữa ký sinh và ký chủ ở cấp độ phân tử. Cần tiếp tục phân lập và giải trình tự các gen kháng nhằm tìm hiểu cơ chế hình thành tính kháng của chúng, từ đó nâng cao khả năng ứng dụng của các gen này trong các chương trình chọn tạo giống.

Bên cạnh đó, cần đẩy mạnh ứng dụng các kỹ thuật hiện đại như MAS và CRISPR/Cas9 trong việc tích hợp nhiều gen kháng bệnh để hình thành tính kháng phổ rộng và bền vững, đồng thời rút ngắn thời gian tạo ra các giống lúa kháng bệnh.

## Tài liệu tham khảo

- Angeles-Shim, B., Shim J., Vinarao B., Lapis S., Singleton J.**, 2020. A novel locus from the wild allotetraploid rice species *Oryza latifolia* Desv. confers bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) resistance in rice (*O. sativa*). *PLoS one*, 15 (2): e0229155.
- Chandran, D.**, 2015. Co-option of developmentally regulated plant SWEET transporters for pathogen nutrition and abiotic stress tolerance. *IUBMB Life*, 67 (7): 461-471.
- Chen, S., Wang C., Yang J., Chen B., Wang W., Su J., Feng A., Zeng L., Zhu X.**, 2020. Identification of the novel bacterial blight resistance gene *Xa46* (t) by mapping and expression analysis of the rice mutant H120. *Scientific Reports*, 10 (1): 1-11.
- Chen, X., Liu P., Mei L., He X., Chen L., Liu H., Shen S., Ji Z., Zheng X., Zhang Y.**, 2021. *Xa7*, a new executor R gene that confers durable and broad-spectrum resistance to bacterial blight disease in rice. *Plant Communications*, 2 (3): 100143.
- Decreux, A., Messiaen J.**, 2005. Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. *Plant Cell Physiology*, 46 (2): 268-278.
- Dinh, H. X., Singh D., Periyannan S., Park R. F., Pourkheirandish M.**, 2020. Molecular genetics of leaf rust resistance in wheat and barley. *Theoretical Applied Genetics*, 133 (7): 2035-2050.
- FAO**, (2020). Crops. In: FAOSTAT (ed) 2017 - 2020. FAO, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Fukagawa, N. K., Ziska L. H.**, 2019. Rice: importance for global nutrition. *Journal of Nutritional Science Vitaminology*, 65 (Supplement): S2-S3.
- Gu, K., Yang B., Tian D., Wu L., Wang D., Sreekala C., Yang F., Chu Z., Wang G.-L., White F. F.**, 2005. R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*, 435 (7045): 1122-1125.
- Hu, K., Cao J., Zhang J., Xia F., Ke Y., Zhang H., Xie W., Liu H., Cui Y., Cao Y.**, 2017. Improvement of multiple agronomic traits by a disease resistance gene via cell wall reinforcement. *Nature Plants*, 3 (3): 1-9.
- Huang, N., Angeles E., Domingo J., Magpantay G., Singh S., Zhang G., Kumaravadevel N., Bennett J., Khush G.**, 1997. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theoretical Applied Genetics*, 95 (3): 313-320.
- Huguet, J., Peng Z., Yang B., Yin Z., Liu S., White F.**, 2016. Complete genome sequence of the African strain AXO1947 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Genome Announcements*, 4 (1):
- Ji, C., Ji Z., Liu B., Cheng H., Liu H., Liu S., Yang B., Chen G.**, 2020. *Xa1* allelic R genes activate rice blight resistance suppressed by interfering TAL effectors. *Plant Communications*, 1 (4): 100087.
- Ji, Z., Ji C., Liu B., Zou L., Chen G., Yang B.**, 2016. Interfering TAL effectors of *Xanthomonas oryzae* neutralize R-gene-mediated plant disease resistance. *Nature Communications*, 7 (1): 1-9.
- Jiadao, W., Jianbo Y., Chuanwan X., Li L., Taihe X., Dahu N., Xiufeng W., Shirong J., Yixiong T., Shiping Z.**, 2001. Study on resistance gene to bacterial blight *Xa21* transgenic rice and their hybrid combinations. *Acta Agronomica Sinica*, 27 (1): 29-34.
- Jiang, G.-H., Xia Z.-H., Zhou Y.-L., Wan J., Li D.-Y., Chen R.-S., Zhai W.-X., Zhu L.-H.**, 2006. Testifying the rice bacterial blight resistance gene *xa5* by genetic complementation and further analyzing *xa5* (*Xa5*) in comparison with its homolog TFIIAγ1. *Molecular Genetics Genomics*, 275 (4): 354-366.
- Kumar, A., Kumar R., Sengupta D., Das S.N., Pandey M.K., Bohra A., Sharma N.K., Sinha P., SkH., Ghazi I.A.**, 2020. Deployment of genetic and genomic tools toward gaining a better understanding of rice-*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* interactions for development of durable bacterial blight resistant rice. *Frontiers in Plant Science*, 11: 1152.
- Lee, B.-M., Park Y.-J., Park D.-S., Kang H.-W., Kim J.-G., Song E.-S., Park I.-C., Yoon U.-H., Hahn J.-H., Koo B.-S.**, 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Research*, 33 (2): 577-586.
- Li, C., Li W., Zhou Z., Chen H., Xie C., Lin Y.**, 2020. A new rice breeding method: CRISPR/Cas9 system editing of the *Xa13* promoter to cultivate transgene-free bacterial blight-resistant rice. *Plant Biotechnology Journal*, 18 (2): 313.
- Li, X., Kapos P., Zhang Y.**, 2015. NLRs in plants. *Current Opinion in Immunology*, 32: 114-121.
- Liu, W., Liu J., Triplett L., Leach J. E., Wang G.-L.**, 2014. Novel insights into rice innate immunity against bacterial and fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 52: 213-241.
- Narayanan, N., Baisakh N., Vera Cruz C., Gnanamanickam S., Datta K., Datta S.**, 2002. Molecular breeding for the development of blast and bacterial blight resistance in rice cv. IR50. *Crop Science*, 42 (6): 2072-2079.
- Nguyen, H. T., Vu Q. H., Van Mai T., Nguyen T. T., Vu L. D., Nguyen T. T., Nguyen L. V., Vu H. T. T., Nong H. T., Dinh T. N.**, 2018a. Marker-assisted selection of *Xa21* conferring resistance to bacterial leaf blight in Indica rice cultivar LT2. *Rice Science*, 25 (1): 52-56.

- Nguyen, T. T., Quang V. H., Van Tan M., Lam V. Đ., Toshitsugu N., Hue N. T., Hue N. T., Long N. V., Van Hoan N., Van Liet V., 2018b. Marker-assisted pyramiding of *Xa21* and *Xa7* genes conferring resistance to bacterial leaf blight in indica cultivar Bacthóm7. *African Journal of Biotechnology*, 17 (50): 1389-1396.
- Ochiai, H., Inoue Y., Takeya M., Sasaki A., Kaku H., 2005. Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of effector genes and insertion sequences to its race diversity. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 39 (4): 275-287.
- Pradhan, S., Barik S., Nayak D., Pradhan A., Pandit E., Nayak P., Das S., Pathak H., 2020. Genetics, Molecular Mechanisms and Deployment of Bacterial Blight Resistance Genes in Rice. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 39 (4): 360-385.
- Pruitt, R. N., Schwessinger B., Joe A., Thomas N., Liu F., Albert M., Robinson M. R., Chan L. J. G., Luu D. D., Chen H., 2015. The rice immune receptor XA21 recognizes a tyrosine-sulfated protein from a Gram-negative bacterium. *Science Advances*, 1 (6): e1500245.
- Qian, Q., Guo L., Smith S. M., Li J., 2016. Breeding high-yield superior quality hybrid super rice by rational design. *National Science Review*, 3 (3): 283-294.
- Ratanasut, K., Rod-In W., Sujipuli K., 2017. In planta Agrobacterium-mediated transformation of rice. *Rice Science*, 24 (3): 181-186.
- Ribaut, J.-M., Hoisington D., 1998. Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends in Plant Science*, 3 (6): 236-239.
- Römer, P., Hahn S., Jordan T., Strauss T., Bonas U., Lahaye T., 2007. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science*, 318 (5850): 645-648.
- Salzberg, S. L., Sommer D. D., Schatz M. C., Phillippy A. M., Rabinowicz P. D., Tsuge S., Furutani A., Ochiai H., Delcher A. L., Kelley D., 2008. Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99 A. *BMC genomics*, 9 (1): 1-16.
- Sanchez, A., Brar D., Huang N., Li Z., Khush G., 2000. Sequence tagged site marker-assisted selection for three bacterial blight resistance genes in rice. *Crop Science*, 40 (3): 792-797.
- Singh, S., Sidhu J., Huang N., Vikal Y., Li Z., Brar D., Dhaliwal H., Khush G., 2001. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. *Theoretical Applied Genetics*, 102 (6): 1011-1015.
- Strauß, T., Van Poecke R. M., Strauß A., Römer P., Minsavage G. V., Singh S., Wolf C., Strauß A., Kim S., Lee H.-A., 2012. RNA-seq pinpoints a *Xanthomonas* TAL-effector activated resistance gene in a large-crop genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (47): 19480-19485.
- 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 Phytologist*, 200 (3): 808-819.
- Tian, D., Wang J., Zeng X., Gu K., Qiu C., Yang X., Zhou Z., Goh M., Luo Y., Murata-Hori M., 2014. The rice TAL effector-dependent resistance protein XA10 triggers cell death and calcium depletion in the endoplasmic reticulum. *The Plant Cell*, 26 (1): 497-515.
- Wang, C., Zhang X., Fan Y., Gao Y., Zhu Q., Zheng C., Qin T., Li Y., Che J., Zhang M., 2015. XA23 is an executor R protein and confers broad-spectrum disease resistance in rice. *Molecular Plant*, 8 (2): 290-302.
- Wang, S., Liu W., Lu D., Lu Z., Wang X., Xue J., He X., 2020. Distribution of Bacterial Blight Resistance Genes in the Main Cultivars and Application of *Xa23* in Rice Breeding. *Frontiers in Plant Science*, 11 1363.
- Xiang, Y., Cao Y., Xu C., Li X., Wang S., 2006. *Xa3*, conferring resistance for rice bacterial blight and encoding a receptor kinase-like protein, is the same as *Xa26*. *Theoretical Applied Genetics*, 113 (7): 1347-1355.
- Xu, Z., Xu X., Gong Q., Li Z., Li Y., Wang S., Yang Y., Ma W., Liu L., Zhu B., 2019. Engineering broad-spectrum bacterial blight resistance by simultaneously disrupting variable TALE-binding elements of multiple susceptibility genes in rice. *Molecular Plant*, 12 (11): 1434-1446.
- Yang, B., Sugio A., White F. F., 2006. Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 103 (27): 10503-10508.
- 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. *Frontiers in Plant Science*, 11 575.
- 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 Biology*, 20 (1): 1-11.
- Zhang, S., Song W.-Y., Chen L., Ruan D., Taylor N., Ronald P., Beachy R., Fauquet C., 1998. Transgenic elite indica rice varieties, resistant to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Breeding*, 4 (6): 551-558.
- Zhao, B., Ardales E., Brasslet E., Clafin L., Leach J., Hulbert S., 2004. The *Rxo1/Rba1* locus of maize controls resistance reactions to pathogenic and non-host bacteria. *Theoretical Applied Genetics*, 109 (1): 71-79.
- Zhou, J., Peng Z., Long J., Sosso D., Liu B., Eom J. S., Huang S., Liu S., Vera Cruz C., Frommer W. B., 2015. Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *The Plant Journal*, 82 (4): 632-643.

## Molecular genetics of resistance and the application of biotechnology in rice breeding for bacterial blight resistance

Xuan Hoan Dinh, Thi Tho Nguyen

### Abstract

The bacterial blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) is a severe rice disease that can cause yield losses of up to 50%. Using resistant rice varieties control effectively this disease. Studies on QTL (Quantitative trait locus)/ genes for blight resistance as well as the study of host-pathogen interaction at the molecular level have contributed supporting the breeding of resistant rice varieties. To date, 46 genes conferring resistance to *Xoo* have been identified, of which 28 were conferred by single dominant genes. 18/46 *Xoo* resistance genes have been isolated by various approaches. The complete genome of 4 isolates of *Xoo* has been published, containing about 5 million nucleotides with 9-19 genes encoding pathogen effectors. A number of molecular biology techniques such as marker-assisted selection (MAS) and gene editing by Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 - CRISPR/Cas9) have been applied to promote molecular biology to speed up the process of selecting rice varieties resistant to blight disease.

**Keywords:** Rice, bacterial blight, resistance, rice breeding

Ngày nhận bài: 04/8/2021  
Ngày phản biện: 17/9/2021

Người phản biện: TS. Nguyễn Duy Phương  
Ngày duyệt đăng: 24/12/2021

## KẾT QUẢ BIẾN NẠP CẤU TRÚC CRISPR/Cas9 CHỈNH SỬA GEN *GmHyPRP1* VÀO GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT22 THÔNG QUA VI KHUẨN *Agrobacterium tumefaciens*

Nguyễn Hữu Kiên<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Hòa<sup>1</sup>, Tống Thị Hương<sup>1</sup>,  
Nguyễn Trung Anh<sup>1</sup>, Đinh Thị Thu Ngân<sup>1</sup>, Chu Đức Hà<sup>2</sup>,  
Phạm Vũ Long<sup>3</sup>, Đinh Thị Mai Thu<sup>1</sup>, Lê Thị Mai Hương<sup>1</sup>,  
Jae-Yean Kim<sup>4</sup>, Vũ Văn Tiến<sup>1,4</sup>, Phạm Xuân Hội<sup>1</sup>,  
Lê Đức Thảo<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Đông<sup>1,7</sup>

### TÓM TẮT

Chỉnh sửa gen bằng công nghệ CRISPR/Cas9 hiện là hướng nghiên cứu đầy hứa hẹn để phát triển các giống đậu tương đáp ứng mục tiêu nâng cao năng suất, chất lượng hạt và có khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi do ngoại cảnh gây ra. Hiệu quả biến nạp gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* phụ thuộc vào một số yếu tố như vector, promoter, gen chọn lọc, chủng vi khuẩn, và đặc biệt là khả năng tái sinh của giống đậu tương. Nghiên cứu nhằm biến nạp cấu trúc CRISPR/Cas9 chỉnh sửa gen *GmHyPRP1* vào giống đậu tương ĐT22 thông qua chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105. Kết quả cho thấy, khi biến nạp cấu trúc chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 vào giống đậu tương ĐT22 cho tỷ lệ đa chồi, tỷ lệ sống sót sau chọn lọc và hiệu quả tiếp nhận lần lượt là 87,44%, 7,43% và 4,58%.

**Từ khóa:** Biến nạp gen, CRISPR/Cas9, giống đậu tương ĐT22

<sup>1</sup> Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào Thực Vật, Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Việt Nam

<sup>2</sup> Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

<sup>3</sup> Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, Việt Nam

<sup>4</sup> Phòng Thí nghiệm Nghiên cứu cơ bản về chỉnh sửa gen ở thực vật, Trường Đại học Quốc gia Gyeongsang, Hàn Quốc

\*Tác giả chịu trách nhiệm: kienbio280888@gmail.com