

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^{1,*}, Nguyễn Thị Hòa¹, Tống Thị Hương¹,
Nguyễn Trung Anh¹, Đinh Thị Thu Ngân¹, Chu Đức Hà²,
Phạm Vũ Long³, Đinh Thị Mai Thu¹, Lê Thị Mai Hương¹,
Jae-Yean Kim⁴, Vũ Văn Tiến^{1,4}, Phạm Xuân Hội¹,
Lê Đức Thảo¹, Nguyễn Văn Đồng^{1,7}

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

¹ 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

² Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

³ Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, Việt Nam

⁴ 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

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong số các mặt hàng nông sản hiện nay, đậu tương (*Glycine max* L.) là cây họ đậu được trồng rộng rãi và có giá trị quan trọng nhất trên thế giới, chiếm 50% sản lượng của cây họ đậu và 68% tổng sản lượng cây trồng trên toàn thế giới. Là nguồn cung cấp protein và dầu thực vật dồi dào cho sản xuất thực phẩm và thức ăn gia súc, tuy nhiên năng suất của cây đậu tương chủ yếu phụ thuộc vào các yếu tố môi trường canh tác (Cai *et al.*, 2015). Tình hình hạn hán và xâm nhập mặn ngày càng gia tăng đã và đang đe dọa nghiêm trọng tới năng suất cây trồng và an ninh lương thực trên toàn thế giới. Việt Nam cũng bị ảnh hưởng do nằm trong vùng chịu sự tác động của biến đổi khí hậu. Hạn, mặn là các stress phi sinh học gây ra những ảnh hưởng bất lợi khác nhau lên quá trình trao đổi chất ở thực vật. Nhằm đối phó với các tác động bất lợi, thực vật kích hoạt một loạt các cơ chế sinh hóa, sinh lý và phân tử khác nhau giúp chúng đáp ứng và sống sót (Li *et al.*, 2017).

Để cải thiện các tính trạng nông sinh học liên quan tới năng suất, chất lượng và khả năng chống chịu lại các stress sinh học và phi sinh học ở cây trồng, cách tiếp cận truyền thống và/hoặc kết hợp sinh học phân tử đã được sử dụng như chọn lọc di truyền, chọn tạo đột biến và phương pháp tiếp cận dựa trên giải trình tự toàn bộ hệ gen... Dù đã đạt được nhiều thành tựu, quá trình chọn tạo và phát triển các giống cây trồng mới thông qua các phương pháp này nhìn chung còn nhiều hạn chế về thời gian và phụ thuộc các giai đoạn lai tạo, chọn lọc và thử nghiệm (Ahmar *et al.*, 2020). Tuy nhiên, những tiến bộ gần đây trong công nghệ chỉnh sửa gen, và nổi bật là hệ thống CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated protein 9 (Cas9)) đã mở ra một kỷ nguyên mới cho nhân giống cây trồng. CRISPR/Cas9 được biết tới như là công nghệ mạnh mẽ và hiệu quả có thể chỉnh sửa có định hướng một hoặc nhiều gen đích của một nhóm cần thiết mà không làm ảnh hưởng tới các gen khác. Cho đến nay, công nghệ chỉnh sửa gen bằng hệ thống CRISPR/Cas9 đã được nghiên cứu ứng dụng rộng rãi và thành công trên nhiều đối tượng cây trồng chính như cây lúa gạo, lúa mì, ngô,... (Upadhyay *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014); tuy nhiên, việc nghiên cứu ở cây đậu tương vẫn còn

gặp một số hạn chế.

Ở nghiên cứu trước đây, cấu trúc CRISPR/Cas9 mang các sgRNAs cho chỉnh sửa gen *GmHyPRP1* trên cây đậu tương đã được thiết kế thành công (Nguyễn Hữu Kiên và *ctv.*, 2020). Do vậy, để đánh giá khả năng tiếp nhận cấu trúc chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 của giống đậu tương ĐT22, phương pháp biến nạp thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* vào nốt lá mầm được sử dụng trong nghiên cứu này.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hạt giống đậu tương ĐT22 được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu do Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ chọn tạo và cung cấp.

Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 có chứa vector pID mang 3 đoạn cassette: 35S:Cas9, 35S:Bar và U6:sgRNAs (Nguyễn Hữu Kiên và *ctv.*, 2020) được lưu giữ tại phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp. Các cặp mồi đặc hiệu nhân gen *Bar* và *Cas9* được thiết kế dựa trên phần mềm Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) và liệt kê tại Bảng 1.

Bảng 1. Các cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu

STT	Cặp mồi	Trình tự (5' - 3')	Chiều dài đoạn gen mục tiêu (bp)
1	Bar-F	AAATGCTCCACTGACGTTCC	588
2	Bar-R	ATCCCACATCATGCCAATTT	
3	Cas9-F	CGCTAATCTTGCAGGTAGCC	514
4	Cas9-R	CCGTTGTGTGATCAGTTTGG	

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp biến nạp gen

Để tiến hành chuyển nạp cấu trúc chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 vào giống đậu tương ĐT22, phương pháp biến nạp vào nốt lá mầm của Zeng và cộng tác viên (2004) có cải tiến phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm được sử dụng cho nghiên cứu. Các loại môi trường sử dụng được mô tả ở các nghiên cứu trước đây (Nguyễn Văn Đồng và *ctv.*, 2012, 2013, 2017, 2018).

Hạt đậu tương được khử trùng khô bằng khí Clo trong hộp khử trùng theo tỷ lệ 100 mL NaOCl

và 4 mL HCl 12N trong 16 tiếng trước khi gieo nảy mầm trên môi trường GM trong 5 ngày ở điều kiện 24°C, chu kỳ 18 giờ sáng và 6 giờ tối (điều kiện này được sử dụng trong suốt quá trình thí nghiệm). Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 mang cấu trúc CRISPR/Cas9 chỉnh sửa gen *GmHyPRP1* lưu giữ ở tủ -80°C từ 3 khuẩn lạc riêng biệt (để sử dụng cho 3 thí nghiệm độc lập) được phục hồi và nuôi trong môi trường YEP lỏng có bổ sung 25 mg/L rifampicin và 50 mg/L kanamycin cho đến khi OD₆₅₀ đạt 1,1 - 1,2. Cặn khuẩn được ly tâm với tốc độ 3500 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Cặn tế bào vi khuẩn được hòa trong dịch CCM lỏng cho tới khi đạt OD₆₅₀ = 0,6. Hạt đậu tương nảy mầm được loại bỏ trụ dưới lá mầm và tách làm 2 nửa và tạo 7 - 8 vết thương từ giữa lá mầm tới trụ dưới lá mầm. Mầm lá mầm được ngâm trong dung dịch khuẩn 30 phút và đặt úp lên môi trường đồng nuôi cấy CCM đặc trong 5 ngày. Mầm lá mầm đồng nuôi cấy được ngâm trong dung dịch SIM lỏng có bổ sung 200 mg/L cefotaxime và đặt trên đĩa môi trường SIM đặc không bổ sung kháng sinh chọn lọc trong 14 ngày. Mầm sau thời gian cảm ứng tạo chồi được cấy chuyển sang môi trường SIM mới có bổ sung kháng sinh chọn lọc 10 mg/L glufosinate trong 14 ngày. Các cụm chồi sống sót được chuyển sang môi trường SEM có bổ sung kháng sinh chọn lọc 5 mg/L trong thời gian từ 14 - 28 ngày. Các chồi (> 3 cm) được cắt và ngâm trong IBA (1 mg/mL) từ 1 - 2 phút rồi đặt vào môi trường RM không có kháng sinh chọn lọc trong 14 ngày. Chồi có rễ phát triển nhiều hơn 2 rễ được rửa với nước rồi chuyển cây sang chậu đất nhỏ và chăm sóc trong 7 ngày ở điều kiện ánh sáng, nhiệt độ tương tự bảo trước khi chuyển sang bầu lớn hơn và đưa vào nhà lưới.

Quá trình biến nạp cấu trúc chỉnh sửa gen vào giống đậu tương ĐT22 được theo dõi và đánh giá thông qua các chỉ tiêu sau:

Tỷ lệ mầm đa chồi (%) = (Số mầm nhiều hơn 2 chồi ở SIM/Tổng số mầm lây nhiễm) × 100.

Tỷ lệ sống sót sau chọn lọc (%) = (Số mầm sống sót ở RM/Số mầm chọn lọc ban đầu trên SIM) × 100.

2.2.2. Phương pháp phân tích cây chỉnh sửa gen bằng PCR

Mầm lá của các cây đậu tương sống sót sau khi chuyển ra nhà lưới được sử dụng để tách

chiết DNA tổng số bằng phương pháp CTAB (Nguyễn Văn Đồng và *ctv.*, 2013). Các mẫu DNA tổng số được sử dụng cho PCR với các cặp mồi đặc hiệu tương ứng (Bảng 1) bằng Kit EZ PCR Mix-Tracking Dye (Công ty sinh hóa Phù sa, Việt Nam) với thành phần phản ứng: EZ PCR Mix-Tracking dye và Buffer 1X: 45 µL, mỗi xuôi (10 µM): 1 µL, mỗi ngược (10 µM): 1 µL, DNA tổng số: 1 µL, bổ sung H₂O cho đủ thể tích phản ứng 50 µL; theo chu trình: Biến tính 95°C 5 phút, 35 chu kỳ (biến tính 95°C 30 giây, gắn mồi 57°C 35 giây, kéo dài 72°C 90 giây), kéo dài 72°C 10 phút, 4°C tùy thời gian. Sau khi PCR kết thúc, 10 µL dung dịch của mỗi phản ứng được sử dụng để điện di trên gel agarose 1% cùng với thang chuẩn (GeneRuler 1kb DNA ladder). Cuối cùng, sản phẩm PCR được kiểm tra dưới đèn UV, chụp ảnh, đánh giá và tính toán hiệu quả biến nạp.

Hiệu quả biến nạp (%) = (Số cây dương tính với PCR với gen *Cas9* và hoặc *Bar*/Số mẫu biến nạp) × 100.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

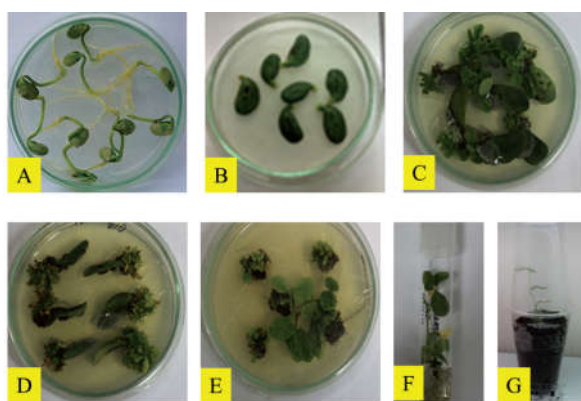
Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 01 năm 2020 đến tháng 07 năm 2021 tại phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả biến nạp cấu trúc chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 vào giống đậu tương ĐT22

Sau khi thiết kế thành công vector CRISPR/Cas9 có chứa các sgRNA cho chỉnh sửa gen *GmHyPRP1* (Nguyễn Hữu Kiên và *ctv.*, 2020), việc nghiên cứu biến nạp cấu trúc chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 vào giống đậu tương ĐT22 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* được thực hiện.

Áp dụng quy trình biến nạp được xây dựng ở trên, 3 thí nghiệm biến nạp cấu trúc CRISPR/Cas9 chỉnh sửa gen *GmHyPRP1* vào nốt lá mầm giống đậu tương ĐT22 được thực hiện sử dụng chủng vi khuẩn *EHA105* mang vector pID chứa các cassette 35S:Cas9, 35S:Bar và U6:sgRNAs. Quá trình biến nạp cấu trúc CRISPR/Cas9 chỉnh sửa gen *GmHyPRP1* vào giống đậu tương ĐT22 được trình bày như hình 1. Kết quả của các lần lặp lại được tổng hợp trong bảng 2.



Hình 1. Một số hình ảnh của quá trình chuyển nạp cấu trúc vector CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa gen *GmHyPRP1* ở cây đậu tương ĐT22

Chú thích: (A) Hạt đậu tương nảy mầm trên đĩa GM sau 5 ngày; (B) Mẫu được đồng nuôi cấy trên đĩa CCM sau 5 ngày; (C) Cảm ứng tạo chồi trên SIM sau 14 ngày; (D) Mẫu được chọn lọc trên SIM có bổ sung 10 mg/L glufosinate sau 14 ngày; (E) Giai đoạn kéo dài chồi trên SEM có bổ sung 5 mg/L glufosinate; (F) Giai đoạn cảm ứng tạo rễ ở RM; (G) Cây ở giai đoạn chuyển ra bầu đất nhỏ.

Như kết quả trình bày ở bảng 2, mỗi thí nghiệm được thực hiện đồng nuôi cấy khoảng 200 mẫu, sau quá trình cảm ứng tạo chồi trên SIM, cảm ứng tạo chồi kết hợp chọn lọc trên SIM có bổ sung 10 mg/L glufosinate, kéo dài chồi kết hợp chọn lọc trên SEM

có bổ sung 5 mg/L glufosinate và ra rễ trên RM và thu được một số kết quả như sau: Tỷ lệ đa chồi trung bình của 3 thí nghiệm đạt trên 87,44%; tỷ lệ sống sót trung bình sau khi chọn lọc là 7,43%, và đã thu được tổng số 30 cây ở giai đoạn RM và được chuyển ra bầu đất, trung bình thu được 10 cây/1 thí nghiệm. Nghiên cứu của Nguyễn Văn Đồng và cộng tác viên (2018) khi chuyển gen *GmNAC004* dưới sự điều khiển của promoter 35S vào giống đậu tương ĐT22 thu nhận tỷ lệ đa chồi đạt 69,56% và tỷ lệ sống sót chỉ là 3,84%. Trong khi sử dụng cấu trúc Rd29A:*GmNAC004* tỷ lệ đa chồi trung bình chỉ đạt 64,04% và tỷ lệ sống sót sau chọn lọc là 4,68% (Nguyễn Văn Đồng và *ctv.*, 2017). Một nghiên cứu khác khi đánh giá ảnh hưởng của các hạt nano bạc, đồng và coban đến quá trình biến nạp gen *Bar* vào giống đậu tương ĐT22 cho thấy khi bổ sung nano đồng khả năng tạo đa chồi đạt cao nhất là 86,68% và tỷ lệ sống sót đạt 3,99% (Nguyễn Trung Anh và *ctv.*, 2018). Các kết quả nghiên cứu cho thấy, giống đậu tương ĐT22 khi được biến nạp với cấu trúc chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 cho tỷ lệ đa chồi và khả năng sống sót cao hơn hẳn so với các nghiên cứu trước đó. Như vậy, giống đậu tương ĐT22 bước đầu cho thấy cũng có khả năng tiếp nhận hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 như các cấu trúc chuyển gen đã sử dụng trước đó.

Bảng 2. Kết quả biến nạp cấu trúc CRISPR/Cas9 cho chỉnh sửa gen *GmHyPRP1* vào giống đậu tương ĐT22 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Môi trường	Tổng số mẫu qua 3 lần thí nghiệm	Trung bình số mẫu
GM	400	133,33 ± 1,96
CCM	667	212,33 ± 4,38
SIM	606	202,00 ± 2,62
SIM (glufosinate 10 mg/L)	403	134,33 ± 1,91
SEM (glufosinate 5 mg/L)	213	71,00 ± 1,25
RM	30	10,00 ± 0,47
Ra đất	30	10,00 ± 0,47
Số mẫu đa chồi	557	185,67 ± 0,72
Tỷ lệ đa chồi (%)	-	87,44 ± 2,00
Tỷ lệ sống sót sau chọn lọc (%)	-	7,43 ± 0,25
Hiệu quả biến nạp (%)	-	4,58 ± 0,43

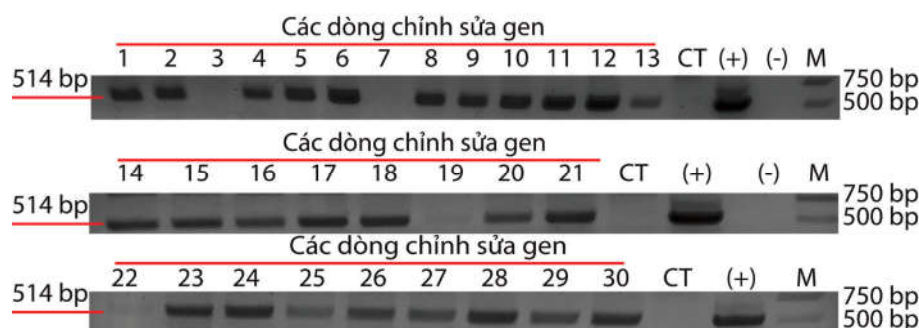
Ghi chú: GM: Môi trường nảy mầm; CCM: Môi trường đồng nuôi cấy; SIM: Môi trường cảm ứng tạo chồi; SEM: Môi trường kéo dài chồi, RM: Môi trường ra rễ.

Qua kết quả này cho thấy, cấu trúc CRISPR/Cas9 cho chỉnh sửa gen *GmHyPRP1* đã được chuyển nạp vào giống đậu tương ĐT22 và thu nhận được các cây thế hệ T_0 . Tuy nhiên, để có thể xác định được hiệu quả biến nạp và khả năng tiếp nhận cấu trúc chỉnh sửa gen của giống đậu tương này như thế nào, thì các cây T_0 thu nhận cần tiếp tục được kiểm tra bằng phân tích PCR.

3.2. Kết quả đánh giá hiệu quả chuyển nạp cấu trúc chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 vào giống đậu tương ĐT22 bằng PCR

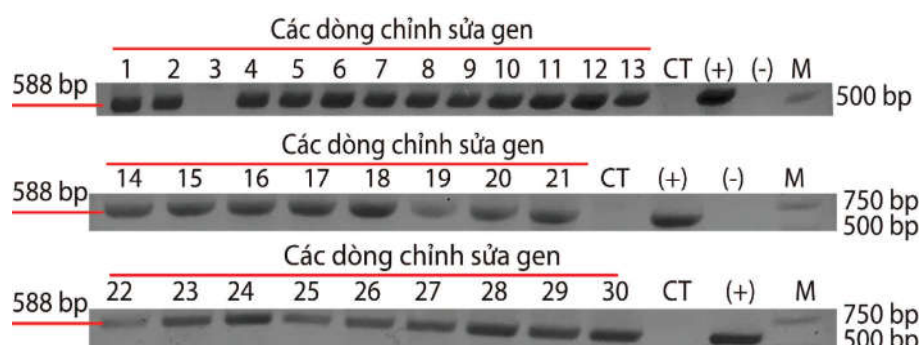
Từ kết quả biến nạp, 30 cây đậu tương thế hệ T_0 được trồng và chăm sóc ở trong nhà lưới. Khi cây chuyển ra đất 10 - 15 ngày được thu mẫu lá

cho tách chiết DNA tổng số và phân tích sự có mặt của gen *Cas9* và *Bar* bằng PCR. Kết quả PCR với gen *Cas9* và *Bar* ở trong các cây chỉnh sửa gen cho thấy, có 26 dòng T_0 trên tổng số 30 dòng mang gen *Cas9*, và 29/30 dòng dương với gen *Bar* (Hình 2 và 3). Trong đó, mẫu số 3 là đều cho kết quả âm tính với *Cas9* và *Bar*. Từ kết quả PCR gen *Cas9* và *Bar* của các cây đậu tương T_0 chỉnh sửa gen cho thấy, hiệu quả tiếp nhận cấu trúc chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 của giống đậu tương ĐT22 đạt 4,58%. Qua kết quả này, quy trình biến nạp cấu trúc vector CRISPR/Cas9 cho chỉnh sửa gen *GmHyPRP1* vào giống đậu tương ĐT22 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* đã được xây dựng thành công.



Hình 2. Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen *Cas9* ở các cây đậu tương T_0 chỉnh sửa gen

Chú thích: 1 - 30: Các dòng đậu tương T_0 chỉnh sửa gen; CT: Cây đối chứng không chuyển gen ĐT22; (+): Đối chứng dương từ DNA plasmid của vector pID; (-): Đối chứng âm H_2O ; M: GeneRuler 1kb DNA ladder.



Hình 3. Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen *Bar* ở các cây đậu tương T_0 chỉnh sửa gen

Chú thích: 1 - 30: Các dòng đậu tương T_0 chỉnh sửa gen *GmHyPRP1*; CT: Cây đối chứng không chuyển gen ĐT22; (+): Đối chứng dương từ DNA plasmid của vector pID; (-): Đối chứng âm H_2O ; M: GeneRuler 1kb DNA ladder.

Cùng với sự phát triển của khoa học công nghệ, có nhiều cách tiếp cận để chuyển gen vào cây đậu tương như chuyển gen thông qua callus, chuyển gen vào lông rễ, chuyển gen trực tiếp bằng súng bắn gen... tùy vào từng mục đích nghiên cứu. Tuy nhiên, phương pháp chuyển gen vào nốt lá mầm

thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* đang được áp dụng phổ biến cho đến ngày nay vì tính tiện lợi và chi phí thấp. Theo phương pháp này, tỷ lệ tạo đa chồi, tỷ lệ sống sót sau chọn lọc và hiệu quả biến nạp tùy thuộc vào yếu tố di truyền của giống đậu tương, cấu trúc và kích thước vector, chủng vi

khuẩn và ngoài ra cũng liên quan tới điều kiện tiến hành nghiên cứu (Olthoft *et al.*, 2003; Xinping and Deyue, 2006; Đinh Thị Phòng và Nguyễn Thị Thư, 2007; Trần Thị Cúc Hòa, 2008; Nguyễn Văn Đồng và *ctv.*, 2012, 2013, 2017, 2018; Nguyễn Trung Anh và *ctv.*, 2018; Le *et al.*, 2020). Cụ thể, khi chuyển gen *GmNAC004* và *GmMyb* vào giống đậu tương ĐT22, hiệu quả quả biến nạp chỉ đạt trong khoảng 0,28-1,6 % (Nguyễn Văn Đồng và *ctv.*, 2013; 2018; Nguyễn Trung Anh và *ctv.*, 2018). Trong khi ở nghiên cứu này, cũng là chuyển gen vào giống đậu tương ĐT22, tuy nhiên hiệu quả biến nạp đạt 4,58% cao hơn hẳn so với các nghiên cứu trước đó, sự khác biệt ở đây có thể là do hệ thống cấu trúc đã sử dụng.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này chỉ ra rằng, hệ thống cấu trúc CRISPR/Cas9 cho chỉnh sửa gen quan tâm được sử dụng hoàn toàn thích hợp để biến nạp vào nốt lá mầm giống đậu tương ĐT22 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Kết quả này bổ sung hướng tiếp cận mới tiềm năng cho công tác chọn tạo giống đậu tương có định hướng trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Trung Anh, Nguyễn Văn Đồng, Nguyễn Anh Vũ, Lê Thị Mai Hương, Hà Văn Chiến, Nguyễn Hoài Châu, Lê Thị Thu Hiền, 2018. Nghiên cứu ảnh hưởng của các hạt nano kim loại đơn lẻ đến quá trình chuyển gen vào giống đậu tương ĐT22 Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 2: 56-60.
- Nguyễn Văn Đồng, Nguyễn Mai Hương, Nguyễn Hữu Kiên, 2012. Nghiên cứu quy trình biến nạp gen vào giống đậu tương ĐT22 thông qua *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 9 (39): 119-124.
- Nguyễn Văn Đồng, Nguyễn Anh Vũ, Nguyễn Hữu Kiên, Dương Tuấn Bảo, 2013. Nghiên cứu biến nạp gen liên quan đến khả năng kháng hạn và kháng thuốc trừ cỏ vào giống đậu tương ĐT22. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 11: 3-9.
- Nguyễn Văn Đồng, Nguyễn Anh Vũ, Lê Thị Mai Hương, Nguyễn Trung Anh, 2017. Nghiên cứu chuyển gen *GmNAC004* vào giống đậu tương ĐT22 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, (3): 13-17.
- Nguyễn Văn Đồng, Nguyễn Anh Vũ, Lê Thị Mai Hương, Nguyễn Trung Anh, 2018. Nghiên cứu chuyển cấu trúc gen 35S::*GmNAC004* vào giống đậu tương ĐT22 thông qua chủng khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA101. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 11: 32-37.
- Trần Thị Cúc Hòa, 2008. Hiệu quả tạo dòng đậu tương biến đổi gen từ giống MTĐ 176, HL 202, Maverick và William 82 bằng phương pháp nốt lá mầm qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 1: 14-19.
- Nguyễn Hữu Kiên, Vũ Văn Tiến, Nguyễn Trung Anh, Lê Thị Mai Hương, Đoàn Thị Hải Dương, Đinh Thị Mai Thu, Nguyễn Thị Hòa, Tống Thị Hương, Đinh Thị Thu Ngân, Phạm Xuân Hội, Jae-Yean Kim, Nguyễn Văn Đồng, 2020. Thiết kế hệ thống vector CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa gen *GmHyPRP1*, một gen của cây đậu tương liên quan tới quá trình chống chịu đa stress phi sinh học. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 24: 10-17.
- Đinh Thị Phòng, Nguyễn Thị Thư, 2007. Chuyển gen *Gus* vào đỉnh phôi hạt chính giống đậu tương ĐT12 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 5 (4): 471- 478.
- Ahmar S., Gill R.A., Jung K.H., Faheem A., Qasim M.U., Mubeen M., Zhou W., 2020. Conventional and molecular techniques from simple breeding to speed breeding in crop plants: recent advances and future outlook. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7): 2590.
- Cai Y., Chen L., Liu X., Sun S., Wu C., Jiang B., Han T., Hou W., 2015. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in soybean hairy roots. *PLoS one*, 10: e0136064.
- Le H., Nguyen N.H., Ta D.T., Le T.N.T., Bui T.P., Le N.T., Nguyen C.X., Rolletschek H., Stacey G., Stacey M.G., Pham N.B., Do P.T., Chu H.H., 2020. CRISPR/Cas9-mediated knockout of galactinol synthase-encoding genes reduces raffinose family oligosaccharide levels in soybean seeds. *Frontiers in Plant Science*, 11: 2033.
- Li P., Cao W., Fang H., Xu S., Yin S., Zhang Y., Lin D., Wang J., Chen Y., Xu C., Yang Z., 2017. Transcriptomic profiling of the maize (*Zea mays* L.) leaf response to abiotic stresses at the seedling stage. *Frontiers in Plant Science*, 8: 290-290.
- Liang Z., Zhang K., Chen K., Gao C., 2014. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *Journal of Genetics and Genomics*, 41, 63-68.
- Olthoft P.M., Flagel L.E., Donovan C.M., Somers D.A., 2003. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method, *Planta*, 216 (5): 723-735.
- Upadhyay S.K., Kumar J., Alok A., Tuli R., 2013. RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 3: 2233-2238.

Xinping Y.I and Deyue Y.U., 2006. Transformation of multiple soybean cultivars by infecting cotyledonary-node with *Agrobacterium tumefaciens*. *African Journal of Biotechnology*, 5 (20): 1989-1993.

Xu R., Li H., Qin R., Wang L., Li L., Wei P., Yang J., 2014. Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-

mediated CRISPR-Cas system in rice. *Rice*, 7: 5.

Zeng P., Vadnais D.A., Zhang Z., Polacco J.C., 2004. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Reports*, 22 (7): 478-482.

Study on transformation of the CRISPR/Cas9 for editing *GmHyPRP1* into soybean cultivar ĐT22 via *Agrobacterium tumefaciens*

Nguyen Huu Kien, Nguyen Thi Hoa, Tong Thi Huong, Nguyen Trung Anh, Dinh Thi Thu Ngan, Chu Duc Ha, Pham Vu Long, Dinh Thi Mai Thu, Le Thi Mai Huong, Jae-Yean Kim, Vu Van Tien, Pham Xuan Hoi, Le Duc Thao, Nguyen Van Dong

Abstract

Gene editing using CRISPR/Cas9 system is a promising approach to develop soybean cultivars with improving yield, grain quality and enhancing tolerance to adverse environmental conditions. The efficiency of gene transformation via *Agrobacterium tumefaciens* depends on numerous factors such as vectors, promoters, selection marker genes, bacterial strains, and especially regeneration ability of soybean cultivars. The study aimed to transform the CRISPR/Cas9 for editing *GmHyPRP1* into soybean cultivar ĐT22 using *A. tumefaciens* strain EHA105. The results showed that the multi-shoot and survival shoot rates and transformation efficiency reached 87.44%, 7.43%, and 4.58%, respectively.

Keywords: Gene transformation, CRISPR/Cas9, soybean cultivar ĐT22

Ngày nhận bài: 04/8/2021

Ngày phản biện: 08/9/2021

Người phản biện: TS. Trần Đức Trung

Ngày duyệt đăng: 24/12/2021

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA DẠNG PHÂN BÓN VÀ CHẾ PHẨM PHUN QUA LÁ TỚI NĂNG SUẤT VÀ CHẤT LƯỢNG GIỐNG LÊ XANH, HUYỆN BẢO LẠC, TỈNH CAO BẰNG

Nguyễn Bá Tuấn^{1*}, Nguyễn Xuân Cường¹, Hoàng Văn Toàn¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu ảnh hưởng của dạng phân bón và chế phẩm phun qua lá cho cây lê xanh được tiến hành tại huyện Bảo Lạc, tỉnh Cao Bằng. Kết quả cho thấy: Bón phân tổng hợp NPK tốt hơn bón phân đơn, sinh trưởng, năng suất và chất lượng của lê xanh đều tốt hơn. Các công thức bón NPK tổng hợp cho tỷ lệ đậu quả cao (4,80%); quả to (399,13 - 185,57 g/quả), năng suất (74,67 - 86,83 kg/cây); chất lượng tốt (đường tổng số 7,98 - 8,12%; độ brix từ 11,4 - 11,6%; hàm lượng vitamin C: 12,2- 12,6 mg/100 g), cao hơn quy trình canh tác của người dân. Việc sử dụng lượng bón 4,0 kg NPK 13 : 13 : 13 + TE đạt kết quả cao nhất. Sử dụng các chất điều tiết sinh trưởng, phân vi lượng đều cho kết quả tốt. Tỷ lệ đậu quả của công thức phun BA đạt 5,00%; GA3 đạt 4,70% và BA đạt 4,43%. Số lượng quả/cây của các công thức lần lượt là 281,77; 280,3 và 311,5 quả/cây, khối lượng quả cao đạt 388,13 g/quả và năng suất đạt từ 89,17 - 108,30 kg/cây, tăng so với đối chứng từ 19,67 - 38,80 kg/cây, hàm lượng đường tổng số, độ brix và hàm lượng vitamin C tăng. Trong đó, công thức 3: phun Borric 20 ppm đạt kết quả cao nhất.

Từ khóa: Lê xanh Bảo Lạc, phân bón tổng hợp, chế phẩm phun qua lá

¹Viện Nghiên cứu Rau quả

* Tác giả chính: E-mail: nguyentbatuan2910@gmail.com