

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HỒ CHÍ MINH

\*\*\*\*\*

NGUYỄN BẰNG PHI

NGHIÊN CỨU GIÁ TRỊ BIỂU HIỆN MicroRNA TRONG  
TUYỂN CHỌN GIỐNG LÚA KHÁNG BỆNH ĐẠO ÔN  
(*Magnaporthe oryzae*)

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học

Mã số: 9. 42. 02. 01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thành phố Hồ Chí Minh, Năm 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HỒ CHÍ MINH

\*\*\*\*\*

NGUYỄN BẰNG PHI

NGHIÊN CỨU GIÁ TRỊ BIỂU HIỆN MicroRNA TRONG  
TUYỂN CHỌN GIỐNG LÚA KHÁNG BỆNH ĐẠO ÔN  
(*Magnaporthe oryzae*)

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học

Mã số: 9. 42. 02. 01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

- PGS.TS. NGUYỄN BẢO QUỐC
- TS. NGUYỄN NGỌC BẢO CHÂU

Thành phố Hồ Chí Minh, Năm 2023

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến PGS.TS. Nguyễn Bảo Quốc, TS. Nguyễn Ngọc Bảo Châu đã tận tình hướng dẫn và truyền đạt cho tôi nhiều kiến thức quý báu trong suốt quá trình thực hiện và hoàn thành luận án này;

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Đinh Xuân Phát, TS. Nguyễn Vũ Phong, TS. Huỳnh Văn Biết, TS. Lê Thị Diệu Trang đã luôn quan tâm, góp ý xây dựng trong suốt quá trình thực hiện luận án;

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến các thầy, cô trong Khoa Khoa Học Sinh Học đã hỗ trợ tôi rất nhiều trong quá trình học và thực hành tại Khoa.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến Ban Giám Hiệu và Phòng Sau Đại Học - Trường Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập; Ban lãnh đạo Trường Đại Học Thủ Dầu Một, Tỉnh Bình Dương đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi tham gia khóa học và thực hiện luận án nghiên cứu này;

Tôi xin cảm ơn các bạn đồng nghiệp và gia đình đã động viên khuyến khích, giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập tại Trường.

Tác giả luận án

Nguyễn Bằng Phi

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi được thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Nguyễn Bảo Quốc và TS. Nguyễn Ngọc Bảo Châu tại Trường Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực đã được công bố trong các tạp chí, hội nghị khoa học bởi tác giả, nhóm tác giả và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả luận án

Nguyễn Bằng Phi

## TÓM TẮT

### NGUYỄN BẢNG PHI – “Nghiên cứu giá trị biểu hiện microRNA trong tuyển chọn giống lúa kháng bệnh đạo ôn (*Magnaporthe oryzae*)”

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9. 42. 02. 01

Trường Đại học Nông Lâm TP.Hồ Chí Minh, 2015 – 2022.

MicroRNAs (miRNAs) là những phân tử RNA có kích thước nhỏ (20-25 nu) đóng vai trò chính trong việc điều hòa cây trồng chống chịu lại các tác nhân sinh học và phi sinh học. Cơ chế của quá trình điều hòa thông qua quá trình làm câm lặng gen ở mức độ phiên mã và sau phiên mã. Trong đó, phân tử *osa-miR7695* được mô tả là một microRNA chuyên biệt trên cây lúa với khả năng điều hòa gen đích *OsNramp6* làm tăng khả năng chống chịu của cây lúa với nấm gây bệnh đạo ôn (*Magnaporthe oryzae*) nhờ việc kiểm soát nồng độ của các ion kim loại sắt và các hydroxyl tự do ở cây lúa. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng sự biểu hiện của phân tử *osa-miR7695* chỉ xuất hiện trên các giống lúa *japonica* cũng như vai trò và sự kiểm soát của *osa-miR7695* đối với gen đích *OsNramp6* cùng tám biến thể phiên mã của chúng trên cây lúa vẫn chưa thật sự rõ ràng. Trong luận văn này, nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá mức độ biểu hiện của một số microRNAs như *osa-miR7695*, *osa-miR169a*, *osa-miR160a* trong việc điều hòa cây lúa chống chịu lại nấm gây bệnh đạo ôn *Magnaporthe oryzae* tại Việt Nam bằng phương pháp Real-time PCR. Đồng thời, thông qua phương pháp Real-time PCR cùng các công cụ tin sinh học, nghiên cứu đã mô tả đầy đủ vai trò của phân tử *osa-miR7695* trong việc điều hòa các biến thể phiên mã của gen *OsNramp6* (Natural resistance associated macrophage protein 6) liên quan đến khả năng miễn dịch của cây lúa đối với nấm gây bệnh đạo ôn *Magnaporthe oryzae*. Kết quả nghiên cứu về mức độ và giá trị biểu hiện của phân tử *osa-miR7695* giữa nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn, *Magnaporthe oryzae* trồng tại Việt Nam cho thấy mức độ biểu hiện của *osa-miR7695* trên nhóm lúa chống chịu cao hơn nhóm lúa mẫn cảm từ 2 – 4 lần, ở các thời điểm 24 hpi, 48 hpi, và 72 hpi. Đặc biệt, sự khác biệt cao nhất về mức độ biểu hiện của

*osa-miR7695* tại thời điểm 72 hpi cũng được quan sát và ghi nhận giữa nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm với nấm *M. oryzae*. Bên cạnh đó, kết quả phân tích đường cong ROC (Receiver Operating Curve) để xác định mức độ nhạy, độ đặc hiệu trong việc phân biệt nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm cho thấy giá trị AUC (area under the curve) là 0,9. Tương tự, kết quả nghiên cứu còn cho thấy *osa-miR169a* và *osa-miR160a* có sự gia tăng biểu hiện mang tính khác biệt trên các giống lúa chống chịu với nấm *M. oryzae* ở các thời điểm lần lượt là 72 hpi và 24 hpi. Điều này cho thấy phương pháp phân biệt nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm *M. oryzae* dựa trên phân tử chỉ thị *osa-miR7695*, *osa-miR169a* và *osa-miR160a* là rất hiệu quả. Kết quả nghiên cứu vai trò điều hòa của gen đích *OsNramp6* cho thấy, có 8 biến thể phiên mã của gen này được mã hóa từ *OsNramp6.1* đến *OsNramp6.8*. Các nghiên cứu trước đây cho rằng *osa-miR7695* chỉ ức chế duy nhất 01 biến thể phiên mã *OsNramp6.8* (*s-Nramp6*). Tuy nhiên, nghiên cứu của chúng tôi cho thấy *osa-miR7695* ức chế biến thể phiên mã *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4*. Kết quả cho thấy mức độ biểu hiện của phân tử *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* tăng cao ở thời điểm 24 hpi, khi so sánh giữa nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm. Mức độ biểu hiện của *OsNramp6.1* trên nhóm lúa mẫn cảm gấp **6,5 lần** so với nhóm lúa chống chịu; và mức độ biểu hiện của *OsNramp6.4* trên nhóm lúa mẫn cảm gấp **3,6 lần** so với nhóm lúa chống chịu. Phân tích đường cong ROC của hai biến thể này cho thấy giá trị AUC của *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* tương ứng bằng 1 và 0,937. Điều này cho thấy phân tử *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* là các phân tử chỉ thị rất tốt cho việc phân biệt nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn, *M. oryzae*. Bên cạnh đó kết quả phân tích các microRNAs liên quan đến việc điều hòa các biến thể phiên mã *OsNramp6* cho thấy có 06 phân tử microRNAs tiềm năng. Trong đó, có 02 microRNAs đã được mô tả chức năng trong việc điều hòa lúa chống lại sự xâm nhiễm nấm *M. oryzae* là *osa-miR159a* và *osa-miR444a*.

Từ khóa: Bệnh đạo ôn, *Magnaporthe oryzae*, miRNA, *OsNramp6*

## SUMMARY

**NGUYEN BANG PHI – “Expression profile of microRNA in selecting rice resisting blast fungus (*Magnaporthe oryzae*)”**

Major: Biotechnology Code: 9. 42. 02. 01

Nong Lam University, 2015 – 2022.

MicroRNAs (miRNAs) are small RNAs (20-25 nu) regulating plant against biotic and abiotic agents. Mechanism of the microRNA regulation through gene silencing on the transcriptional and post-transcriptional stage. The microRNA *osa-miR7695* was described as a rice-specific microRNA in regulating the target gene *OsNramp6*, leading to increase resistance to rice blast fungus (*Magnaporthe oryzae*) through controlling iron accumulation and free hydroxyls in rice. Previous studies showed that the expression of the molecule *osa-miR7695* is only present in *japonica* rice varieties, as well as the role of *osa-miR7695* in controlling the *OsNramp6* target gene and eight transcriptional variants of *OsNramp6* is still not clear. Therefore, in this thesis, the study was carried out to evaluate the expression level of some microRNAs in regulating rice resisting to the rice blast fungus (*Magnaporthe oryzae*) in Viet Nam by Real-time PCR method. Simultaneously, through Real-time PCR method and bioinformatic tools, the study also described the role of *osa-miR7695* in regulating transcriptional variants of *OsNramp6* (Natural resistance associated macrophage gene protein 6) involving in rice immunity against rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. The result of this study on *osa-miR7695* expression value between the blast-resistant rice group and the blast-susceptible rice group grown in Viet Nam showed that the expression value of *osa-miR7695* in the blast-resistant rice group was 2-4 times higher than in the blast-susceptible rice group, at time points 24 hpi, 48 hpi, and 72 hpi. Particularly, the highest difference of *osa-miR7695* expression level at 72 hpi was observed and recorded between blast-resistant rice group and blast-susceptible rice group. In addition, the result of ROC (Receiver Operating Curve) curve analysis to determine the sensitivity, specificity in

distinguishing blast-resistant rice group and blast-susceptible rice group showed that the AUC value (area under the curve) was 0.9. Similarly, the results showed that *osa-miR169a* and *osa-miR160a* expression level increasing in *M. oryzae* resistant rice group at 72 hpi and 24 hpi, respectively. These results demonstrated that the method based on markers (*osa-miR7695*, *osa-miR169a* and *osa-miR160a*) in distinguishing resistant and susceptible rice groups against *M. oryzae* was very effective. The results of studying the regulatory role of the *OsNramp6* target gene showed that there were 8 transcriptional variants of this gene encoded from *OsNramp6.1* to *OsNramp6.8*, previous studies suggested that *osa-miR7695* inhibits only transcriptional variant *OsNramp6.8* (*s-Nramp6*). However, our study showed that *osa-miR7695* inhibits transcriptional variants *OsNramp6.1* and *OsNramp6.4*. The results showed that the expression level of *OsNramp6.1* and *OsNramp6.4* increased at 24 hpi, compared between the blast-resistant rice group and the blast-susceptible rice group. Expression level of *OsNramp6.1* in the blast-susceptible rice group was 6.5 times higher than in the blast-resistant rice group; and expression level of *OsNramp6.4* in the blast-susceptible rice group was 3.6 times higher than in the blast-resistant rice group. Analyzing ROC curve of two transcriptional variants showed that AUC values of *OsNramp6.1* and *OsNramp6.4* were 1 and 0.937, respectively. This is meaning that *OsNramp6.1* and *OsNramp6.4* are good markers for distinguishing blast-resistant and blast-susceptible rice groups. Besides, analysis of microRNAs involving in regulating *OsNramp6* transcriptional variants showed that there were 06 potential miRNAs. Of these, two microRNAs were characterized in regulating rice against *M. oryzae* infection, *osa-miR159a* and *osa-miR444a*.

Keywords: *Magnaporthe oryzae*, miRNA, *OsNramp6*, rice blast



## MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN .....	i
LỜI CAM ĐOAN .....	ii
TÓM TẮT .....	iii
SUMMARY .....	v
MỤC LỤC.....	vii
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT .....	x
DANH SÁCH CÁC BẢNG .....	xii
DANH SÁCH CÁC HÌNH .....	xiii
MỞ ĐẦU.....	1
1. Tính cấp thiết của đề tài.....	1
2. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài.....	2
2.1. Ý nghĩa khoa học.....	2
2.2. Ý nghĩa thực tiễn .....	2
3. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài.....	2
4. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu .....	3
4.1. Đối tượng nghiên cứu.....	3
4.2. Phạm vi nghiên cứu.....	3
5. Những đóng góp mới của luận án.....	3
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....	4
1.1. Nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa, <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	4
1.1.1. Hệ thống miễn dịch của thực vật chống lại tác nhân gây bệnh.....	7
1.1.2. Tính kháng di truyền của lúa đối với nấm gây bệnh đạo ôn, <i>M. oryzae</i> ....	8

1.1.3. Vai trò của các phân tử RNAs nhỏ liên quan đến tính kháng bệnh đạo ôn trên lúa. ....	10
1.2. Quá trình sinh tổng hợp microRNA ở thực vật .....	11
1.3. Vai trò và chức năng của các miRNAs làm tăng khả năng kháng nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa, <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	15
1.4. Vai trò và chức năng của các miRNAs làm giảm khả năng kháng nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa, <i>Magnaporthe oryzae</i> . ....	18
1.5. Vai trò và chức năng của gen <i>OsNramp6</i> .....	22
Chương 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	25
2.1. Nội dung nghiên cứu.....	25
2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu .....	25
2.3. Vật liệu nghiên cứu.....	25
2.4. Phương pháp nghiên cứu .....	28
2.4.1. Phương pháp xác định và đánh giá khả năng chống chịu với nấm <i>M. oryzae</i> trên các giống lúa thí nghiệm. ....	28
2.4.2. Phương pháp chiết xuất RNA.....	30
2.4.3. Phương pháp xác định sự hiện diện của phân tử <i>osa-miR7695</i> trên các giống lúa thí nghiệm.....	31
2.4.4. Phương pháp xác định sự biểu hiện của phân tử <i>osa-miR7695</i> , <i>osa-miR169a</i> , <i>osa-miR160a</i> và <i>OsNramp6</i> trên các giống lúa chống chịu và miễn cảm. ....	34
2.4.5. Phương pháp xác định sự biểu hiện của các biến thể phiên mã <i>OsNramp6</i> .....	35
2.4.6. Phương pháp xác định microRNA tiềm năng .....	37
2.4.7. Phương pháp phân tích thống kê .....	37
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....	38
3.1. Xác định nấm <i>M. oryzae</i> trên các giống lúa bằng phương pháp PCR.....	38

3.2. Đánh giá khả năng chống chịu/mẫn cảm với nấm <i>M. oryzae</i> trên các giống lúa thí nghiệm. ....	46
3.3. Xác định sự hiện diện của phân tử <i>osa-miR7695</i> trên các giống lúa thí nghiệm. ....	53
3.4. Đánh giá mức độ biểu hiện của phân tử <i>osa-miR7695</i> trên các giống lúa thuộc nhóm chống chịu và nhạy cảm với nấm gây bệnh đạo ôn, <i>M. oryzae</i> .....	65
3.5. Phân tích giá trị biểu hiện của phân tử <i>osa-miR7695</i> trên các giống lúa chống chịu và nhạy cảm với nấm <i>M. oryzae</i> . ....	69
3.6. Đánh giá biểu hiện của phân tử <i>osa-miR160a</i> trên các giống lúa chống chịu và nhạy cảm với nấm gây bệnh đạo ôn, <i>Magnaporthe oryzae</i> . ....	73
3.7. Đánh giá biểu hiện của phân tử <i>osa-miR169a</i> trên các giống lúa chống chịu và nhạy cảm với nấm gây bệnh đạo ôn, <i>Magnaporthe oryzae</i> . ....	78
3.8. Đánh giá mức độ biểu hiện của <i>OsNramp6</i> trên các giống lúa chống chịu và nhạy cảm với nấm <i>M. oryzae</i> . ....	85
3.9. Phân tích mức độ và giá trị biểu hiện của các biến thể phiên mã <i>OsNramp6</i> ở nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa nhạy cảm với nấm <i>M. oryzae</i> . ....	88
3.10. Nhận diện các microRNAs tiềm năng trong việc điều hòa <i>OsNramp6.1</i> và <i>OsNramp6.4</i> ở lúa. ....	95
Chương 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	102
4.1. Kết luận.....	102
4.2. Đề nghị.....	102
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CÓ LIÊN QUAN ĐÃ CÔNG BỐ .....	103
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	104

## DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ABA: abscisic acid

ACO: 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxydase

ARF: auxin responsive factor

CDS: Cu/Fe dismutase

CIPK10: CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 10

DCL1: Dicer-like protein 1

Effector: phân tử tác động

EIN: ethylene-insensitive

Elicitor: phân tử kích thích.

ET: ethylen

ETI: effector-triggered immunity

GA: gibberellic acid

GRF: growth regulating factor

Hpi: Hours post inoculation

JA: Jasmonate acid

Mature miRNA: miRNA trưởng thành

MiRNA isoform: miRNA đồng dạng.

MITEs: Miniature Inverted-Repeat Transposable Elements

NBS-LRR: nucleotide binding site – leucine rich repeats

*NF-YA*: nuclear transcription factor Y

Nramp6: Natural resistance-associated macrophage protein 6

ORF: open reading frame

PAMP: pathogen-associated molecular patterns

pre-miRNA: precursor microRNA

pri-miRNA: primary microRNA transcript

PRRs: pattern recognition receptors

PTI: pattern-triggered immunity

RDR: RNA Dependent RNA Polymerase

Receptor: phân tử thụ quan

RISC: RNA induced gene silencing complex

RNAi: RNA interference

ROS: reactive oxygen species

Rpm: rounds per minute

SA: Salicylic acid

SOD: superoxide dismutase

SPL: SQUAMOSA promoter-binding protein-like transcription factor

TE: transposable element

Transcript variant: biến thể phiên mã

UTR: untranslated region.

## DANH SÁCH CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Danh sách giống lúa sử dụng trong thí nghiệm. ....	27
Bảng 2. 2. Trình tự đoạn primer sử dụng trong phương pháp Nested RT-PCR .....	32
Bảng 2.3. Trình tự đoạn primer sử dụng trong phản ứng Real-time PCR ( <i>osa-miR7695</i> ). ....	34
Bảng 2.4. Danh sách trình tự các đoạn primer cho phản ứng Real time PCR để xác định sự biểu hiện của các biến thể phiên mã <i>OsNramp6</i> . ....	36
Bảng 3. 1. Tỷ lệ phần trăm của vùng nhiễm trên lá lúa gây ra bởi <i>M. oryzae</i> ở 19 giống lúa, sử dụng phần mềm Assess v.2.0. ....	51
Bảng 3.2. Kết quả đo tỷ lệ A(260/280) của các giống lúa thí nghiệm. ....	54
Bảng 3.3. Kết quả ly trích RNA tổng số và xử lý DNase I trên các giống lúa. ....	55
Bảng 3.4. Phân tích biểu đồ hộp giá trị biểu hiện của <i>osa-miR7695</i> ở nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm ở các thời điểm khác nhau (24 hpi, 48 hpi, 72 hpi) .....	70
Bảng 3. 5. Kết quả phân tích đường cong ROC <i>osa-miR7695</i> của nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm.....	72
Bảng 3.6. Kết quả phân tích biểu đồ hộp (box plot) mức độ biểu hiện của <i>osa-miR160a</i> giữa nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với <i>M. oryzae</i> ở 24 hpi ( <i>hpi: hour post inoculation</i> ). ....	77
Bảng 3.7. Phân tích biểu đồ hộp (box plot) mức độ biểu hiện của <i>osa-miR169a</i> giữa nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với <i>M. oryzae</i> ở 72 hpi. ....	84
Bảng 3.8. Giá trị $2^{-\Delta Ct}$ trong biểu đồ hộp (Box plot) thể hiện mức độ biểu hiện của <i>OsNramp6.1</i> và <i>OsNramp6.4</i> ở nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm với nấm <i>M. oryzae</i> , thời điểm 24 hpi. ....	93
Bảng 3.9. Kết quả phân tích thống kê đường cong ROC của <i>OsNramp6.1</i> và <i>OsNramp6.4</i> .....	94
Bảng 3.10. Các miRNAs tiềm năng trong việc điều hòa biến thể phiên mã <i>OsNramp6.1</i> , <i>OsNramp6.4</i> và <i>OsNramp6.8</i> .....	98

## DANH SÁCH CÁC HÌNH

Hình 1.1. Vòng đời gây bệnh của nấm gây bệnh đạo ôn <i>Magnaporthe spp.</i> bao gồm giai đoạn sinh sản vô tính, sinh sản hữu tính và giai đoạn lây nhiễm (Dean và ctv., 2005).....	5
Hình 1.2. Quá trình gây bệnh của nấm gây bệnh đạo ôn (Were, 2018).....	7
Hình 1.3. Hệ thống phòng thủ PTI và ETI trên thực vật (Han và Jung, 2013).....	8
Hình 1.4. Quá trình sinh tổng hợp microRNA (Lee và ctv., 2020) .....	12
Hình 2.1. Trình tự và vị trí bắt cặp của 2 cặp primer (P1,P2) và (P3,P4) trong phản ứng Nested RT-PCR.....	33
Hình 3.1. Hình thái bào tử của hai mẫu nấm phân lập từ lá và cỏ bông biểu hiện triệu chứng bệnh đạo ôn.....	39
Hình 3.2. Sự hình thành các cấu trúc xâm nhiễm của mẫu nấm gây bệnh đạo ôn phân lập được sau các thời gian quan sát khác nhau. (c) bào tử, (g) nảy mầm, (a) giác bám (appressorium). .....	40
Hình 3.3. Tính chuyên biệt của cặp primer Pot2 transposon trong việc xác định nấm gây bệnh đạo ôn và trong chẩn đoán bệnh đạo ôn trên đồng ruộng.....	43
Hình 3.4. Kết quả BLAST trình tự DNA sản phẩm PCR bằng cặp primer Pot2 transposon của mẫu nấm gây bệnh đạo ôn phân lập từ lá lúa nhiễm bệnh tại Đồng Nai (LĐN) và lá lúa biểu hiện triệu chứng bệnh đạo ôn trên cơ sở dữ liệu DNA của NCBI. ....	44
Hình 3.5. Kết quả BLAST trình tự DNA sản phẩm PCR bằng cặp primer Pot2 transposon của mẫu nấm gây bệnh đạo ôn phân lập từ lá lúa nhiễm bệnh đạo ôn (LN) và lá lúa biểu hiện triệu chứng bệnh đạo ôn trên cơ sở dữ liệu DNA của NCBI. ....	45
Hình 3.6. Kết quả chủng bệnh nấm <i>M. oryzae</i> LBT2 trên lá của 10 giống lúa. ....	47
Hình 3.7. Trạng thái của cây lúa trước khi chủng bệnh ở hai giống thử nghiệm. (a) J-short; (b) OM6162.....	48
Hình 3.8. Sự sinh trưởng của cây lúa ở 20 giống nghiên cứu sau 14 ngày trồng. ....	49
Hình 3.9. Kết quả chủng bệnh nấm <i>M. oryzae</i> LBT2 trên lá của giống IR50404 ....	50

Hình 3.10. Kết quả điện di thử nghiệm trên giống lúa J-short (giống <i>japonica</i> ).....	57
Hình 3.11. Kết quả điện di của gen đối chứng nội <i>OsUbi1</i> trên các giống lúa .....	58
Hình 3.12. Kết quả điện di phản ứng PCR1 sử dụng cặp đoạn primer (P1,P2).....	59
Hình 3.13. Kết quả điện di phản ứng PCR2 sử dụng cặp primer (P3,P4) .....	60
Hình 3.14. Kết quả điện di xác định sự hiện diện của <i>osa-miR7695</i> trên 19 giống lúa.....	60
Hình 3.15. Kết quả giải trình tự của <i>LpJET1.2</i> chứa trình tự của phân tử precursor <i>osa-miR7695</i> . .....	62
Hình 3.16. Kết quả cloning và giải trình tự của phân tử precursor <i>osa-miR7695</i> (487bp). .....	63
Hình 3.17. Kết quả phân tích BLAST ( <i>osa-miR7695</i> ) với dữ liệu miRBase. ....	64
Hình 3.18. Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR7695</i> trên một số giống lúa đại diện cho hai nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm <i>M. oryzae</i> .....	66
Hình 3.19. Mức độ biểu hiện của microRNA <i>osa-miR7695</i> ở 19 giống lúa trồng ở Việt Nam. Mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm chống chịu và mẫn cảm (** tương đương $P \leq 0,01$ ; hpi: giờ sau lây nhiễm). .....	68
Hình 3.20. Biểu đồ hộp mô tả biểu hiện của <i>osa-miR7695</i> ở 19 giống lúa chống chịu và mẫn cảm. Mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê (**: $P < 0,01$ ; hpi: giờ sau lây nhiễm).....	70
Hình 3. 21. Đường cong ROC (Receiver operator characteristic) thể hiện độ nhạy và độ đặc hiệu của giá trị $2^{-\Delta Ct}$ ( <i>osa-miR7695</i> ) trong việc phân biệt nhóm giống lúa chống chịu và mẫn cảm. Diện tích bên dưới đường cong (AUC) là 0,899. ....	72
Hình 3.22. Kết quả mức độ biểu hiện của <i>osa-miR160a</i> trên các giống lúa thuộc nhóm chống chịu và mẫn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn, <i>M. oryzae</i> . .....	75
Hình 3. 23. Biểu đồ hộp (box plot) các giá trị biểu hiện của <i>osa-miR160a</i> trên 10 giống lúa thuộc hai nhóm chống chịu và mẫn cảm với <i>M. oryzae</i> ở các thời điểm sau lây nhiễm khác nhau (24, 48 và 72 hpi). Dấu * chỉ mức độ khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa 2 nhóm lúa ( $P < 0,05$ ). .....	76



- Hình 3.24. Mức độ biểu hiện của *osa-miR169a* trên các giống lúa thuộc nhóm chống chịu và mẫn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn, *M. oryzae* (hpi: giờ sau lây nhiễm).....81
- Hình 3.25. Biểu đồ hộp (box plot) các giá trị biểu hiện của *osa-miR169a* trên 12 giống lúa thuộc hai nhóm chống chịu và mẫn cảm với *M. oryzae* ở các thời điểm sau nhiễm khác nhau (0, 24, 48 và 72 hpi). Dấu \*\* chỉ mức độ khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa 2 nhóm lúa ( $P \leq 0,01$ ). .....83
- Hình 3.26. Biểu hiện của gen *OsNramp6* ở 06 giống lúa tiêu biểu (03 giống lúa chống chịu, 03 giống lúa mẫn cảm). .....87
- Hình 3.27. Cấu trúc gen của các biến thể phiên mã *OsNramp6* và vị trí thiết kế primer realtime-PCR. ....89
- Hình 3.28. Mức độ biểu hiện của các biến thể phiên mã *OsNramp6* giữa nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm *M. oryzae* trồng ở Việt Nam, ở các thời điểm nhiễm nấm *M. oryzae* khác nhau. Mức độ ý nghĩa thống kê,  $P \leq 0,01$  (\*\*),  $P \leq 0,05$  (\*); hpi: giờ sau nhiễm. ....91
- Hình 3.29. Biểu đồ hộp (Box plot) thể hiện mức độ biểu hiện của biến thể phiên mã *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* của 08 giống lúa trồng ở Việt Nam, thời điểm 24 hpi. Mức độ ý nghĩa  $P \leq 0,01$  (\*\*),  $P \leq 0,05$  (\*). .....92
- Hình 3. 30. Đường cong ROC của *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4*. Diện tích dưới đường cong (AUC) của *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* tương ứng là 1 và 0,937 ( $P \leq 0,05$ ).....94
- Hình 3.31. Sơ đồ vị trí bắt cặp của 06 microRNA tiềm năng trên 03 biến thể phiên mã *OsNramp6.1*, *OsNramp6.4* và *OsNramp6.8* .....97

## MỞ ĐẦU

### 1. Tính cấp thiết của đề tài

Bệnh đạo ôn là bệnh do nấm *Magnaporthe oryzae* gây ra, phân bố rộng khắp các vùng trồng lúa, đặc biệt là những nơi có khí hậu ôn hòa, độ ẩm cao, gây thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất lúa (Sharma và ctv., 2012). Các nghiên cứu về tính kháng với nấm *M. oryzae* gây hại trên lúa đã được tiến hành từ những năm đầu thập niên thế kỷ 17, và trong vòng hai thập niên gần đây thì các nghiên cứu về lúa kháng nấm *M. oryzae* đã được tiến hành rất mạnh mẽ. Bên cạnh các nghiên cứu về gen kháng nấm *M. oryzae* thì các nghiên cứu về sự biểu hiện của microRNA nổi lên như một dấu ấn sinh học giúp phân biệt tính kháng đối với nấm gây bệnh đạo ôn trên cây lúa. Nghiên cứu gần đây của Campo và ctv. (2013) đã chỉ ra rằng sự biểu hiện gia tăng *osa-miR7695* có liên quan đến kháng nấm *M. oryzae* trên lúa. Trong đó, *osa-miR7695* kiểm soát sự biểu hiện của gen đích *OsNramp6* (*Os01g31870*) vốn liên quan đến hệ miễn dịch của cây lúa trong việc chống chịu sự xâm nhiễm của nấm *M. oryzae*, cụ thể là *osa-miR7695* điều hòa 02 biến thể phiên mã *OsNramp6.1* (*s-Nramp6*) và *OsNramp6.8* (*l-Nramp6*) (Campo và ctv., 2013, Peris-Peris và ctv., 2017). Hơn thế nữa, bên cạnh phân tử *osa-miR7695* còn có rất nhiều phân tử microRNAs khác như: *osa-miR169a*, *osa-miR162a*, *osa-miR164a*, *osa-miR398b*, *osa-miR168*, *osa-miR398*, *osa-miR167d*, *osa-miR160a* v.v... được mô tả là có liên quan đến hệ miễn dịch của cây lúa chống chịu với sự xâm nhiễm của nấm *M. oryzae*. Ở Việt Nam, công tác nghiên cứu, phát triển các giống lúa có khả năng kháng cao và bền vững đối với bệnh đạo ôn vẫn đang được chú trọng và cần những giải pháp hiệu quả về mặt sinh học phân tử. Đánh giá mức độ biểu hiện của các phân tử miRNAs cùng các gen mục tiêu đích của nó hứa hẹn trong việc đưa ra một cái nhìn toàn cảnh về vai trò của các RNA ngắn không mã hóa đối với sự đáp ứng miễn dịch của cây lúa, đồng thời cũng là một triển vọng để ứng dụng các phân tử microRNAs và các gen mục tiêu này như là một công cụ hỗ trợ cho việc xác định và phân biệt các nhóm lúa chống chịu và miễn cảm với nấm *M. oryzae*, phục vụ cho công tác lai tạo và đánh giá khả năng chống chịu của các giống lúa tại Việt Nam hiện nay. Từ những cơ sở nêu trên, đề tài “**Nghiên cứu**

giá trị biểu hiện microRNA trong tuyển chọn giống lúa kháng bệnh đạo ôn (*Magnaporthe oryzae*)” đã được tiến hành.

## 2. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

### 2.1. Ý nghĩa khoa học

Góp phần xác định sự hiện diện và vai trò của *osa-miR7695* đối với tính kháng nấm gây bệnh đạo ôn (*Magnaporthe oryzae*) trên giống lúa (*Oryza sativa* L.) ở Việt Nam.

Khái quát rõ và đầy đủ hơn về mối tương tác giữa các biến thể phiên mã gen *OsNramp6* với hệ thống các phân tử miRNAs trên cây lúa.

Góp phần hỗ trợ công tác phân biệt và lai tạo giống lúa chống chịu nấm gây bệnh đạo ôn (*Magnaporthe oryzae*) trên cây lúa (*Oryza sativa* L.).

Tạo tiền đề cho các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng miRNA không chỉ trên nấm *M. oryzae* mà còn trên các tác nhân gây bệnh khác.

### 2.2. Ý nghĩa thực tiễn

Góp phần xây dựng các dữ liệu khoa học nhằm đánh giá giống lúa chống chịu nấm gây bệnh đạo ôn (*M. oryzae*) thông qua phân tử *osa-miR7695* hoặc các biến thể phiên mã của gen *OsNramp6*. Đây là một cách tiếp cận của di truyền biểu sinh dựa trên sự biểu hiện của các phân tử miRNAs trong công tác nghiên cứu các giống lúa chống chịu và miễn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn.

## 3. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài

Xác định sự hiện diện của *osa-miR7695* trên các giống lúa *japonica* và *indica*.

Phân tích mức độ và giá trị biểu hiện của *osa-miR7695*, *osa-miR160a* và *osa-miR169a* trên nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa miễn cảm trồng tại Việt Nam.

Xác định mối liên hệ giữa phân tử *osa-miR7695* và các biến thể phiên mã của gen đích *OsNramp6*.

Phân tích mức độ và giá trị biểu hiện của các biến thể phiên mã *OsNramp6* trên nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm trồng tại Việt Nam.

Dự đoán, tìm kiếm các microRNAs khác ngoài *osa-miR7695* trong việc tác động đến các biến thể phiên mã của gen đích *OsNramp6*.

#### **4. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu**

##### **4.1. Đối tượng nghiên cứu**

Đối tượng nghiên cứu của đề tài là các phân tử *osa-miR7695*, *osa-miR169a*, *osa-miR160a* và *OsNramp6* liên quan đến khả năng chống chịu nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa, *Magnaporthe oryzae*.

##### **4.2. Phạm vi nghiên cứu**

Nghiên cứu giới hạn trong việc phân tích giá trị và mức độ biểu hiện của các phân tử *osa-miR7695*, *osa-miR169a*, *osa-miR160a* và *OsNramp6*, để từ đó góp phần hỗ trợ cho công tác lai tạo giống lúa chống chịu nấm gây bệnh đạo ôn.

Nghiên cứu được thực hiện ở quy mô phòng thí nghiệm và thực hiện chủng bệnh trên cây lúa trong điều kiện phòng thí nghiệm

#### **5. Những đóng góp mới của luận án**

Xác định được sự hiện diện của *osa-miR7695* trên giống lúa *indica*.

Phân tích so sánh mức độ và giá trị biểu hiện của *osa-miR7695* và *osa-miR169a*, *osa-miR160a* trên nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm trồng tại Việt Nam.

Đánh giá được mức độ và giá trị biểu hiện của hai biến thể *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* phù hợp cho việc làm chỉ thị sinh học cho tính kháng nấm gây bệnh đạo ôn trên cây lúa.

Mô tả một cách đầy đủ về sự tương tác của biến thể phiên mã *OsNramp6.1*, *OsNramp6.8* với một số phân tử miRNAs trên lúa.

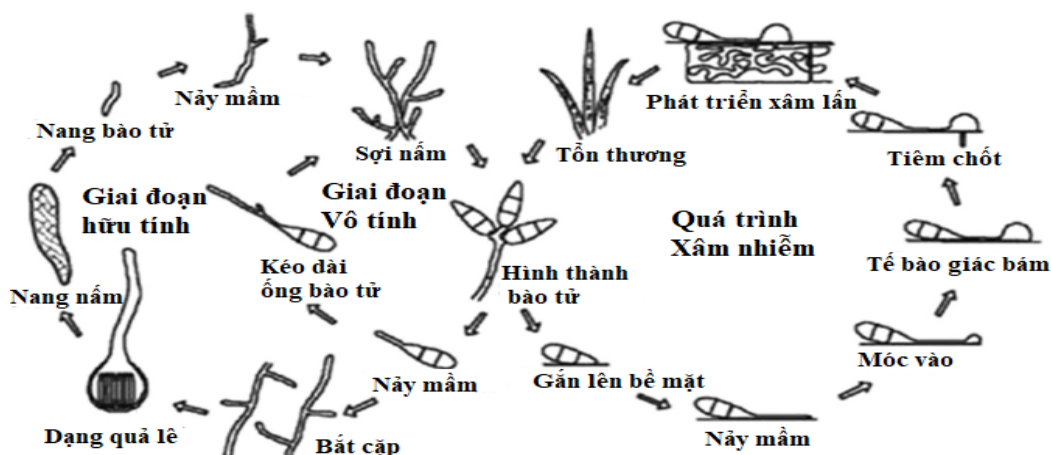
## Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. Nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa, *Magnaporthe oryzae*.

Trong những năm qua, tác nhân gây bệnh đạo ôn trên lúa có nhiều tên gọi khác nhau. Giai đoạn vô tính của nấm gây bệnh đạo ôn được Saccardo đặt tên là *Pyricularia grisea* vào năm 1880 và sau đó được Cavara đặt tên là *Pyricularia oryzae* vào năm 1892. Trong giai đoạn hữu tính tên gọi của nấm gây bệnh đạo ôn lại được đặt tên là *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr vào năm 1970 và nhanh chóng được đổi tên thành *Magnaporthe oryzae* (Couch và Kohn, 2002; Zhang và ctv., 2016b). Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây cũng chỉ ra rằng *Pyricularia oryzae* được xem là cách đặt tên chính xác cho tác nhân gây bệnh đạo ôn trên lúa ở cả giai đoạn vô tính và hữu tính do khả năng gây bệnh và các đặc điểm sinh thái, tiến hóa của nấm gây bệnh đạo ôn (Moreira và ctv., 2015; Zhang và ctv., 2016b). Tuy nhiên, tên đồng nghĩa với nấm *Pyricularia oryzae* là *Magnaporthe oryzae* được khuyến nghị sử dụng thống nhất chung cho tác nhân này trong các công bố khoa học (Zhang và ctv., 2016b). Quá trình gây bệnh của nấm *M. oryzae* bao gồm hai giai đoạn là sinh sản sinh dưỡng và sinh sản vô tính, thời gian từ lúc bắt đầu tiếp xúc với lá lúa đến lúc phát tán bào tử kéo dài khoảng 1 tuần. Giai đoạn sinh sản hữu tính rất ít khi gặp trên đồng ruộng hoặc trên cây ký chủ, tuy nhiên giai đoạn sinh sản hữu tính có thể được tạo ra trong ống nghiệm trong trường hợp hai mẫu nấm phân lập có kiểu giao phối tương thích và được bắt cặp với nhau (**Hình 1.1**).

Trong giai đoạn vô tính (anamorphic) thường tìm thấy trên đồng ruộng, *P. oryzae* hình thành bào tử với hình dạng đặc trưng quả lê, hình trứng. Bào tử có hai vách ngăn với đáy hình tròn, đỉnh mỏng, màu hơi sẫm hoặc vàng nhạt và có một rốn hạt nhỏ ở góc gắn với cuống bào tử (conidiophore) (Couch và Kohn, 2002). Ở giai đoạn hữu tính (teleomorphic) thường không quan sát được trong tự nhiên và chỉ được thực hiện bằng cách ghép đôi các cá thể tương thích trong ống nghiệm (Moreira và ctv., 2015). Nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa cũng được xem là tác nhân bán sinh dưỡng (hemibiotrophic). Đây là một phương thức tồn tại mà trong đó nấm bắt đầu ở giai

đoạn sinh dưỡng khi hệ miễn dịch của thực vật bị ức chế và sau đó là chuyển sang giai đoạn hoại tử nơi thúc đẩy quá trình chết của tế bào (Fernandez và Orth, 2018).

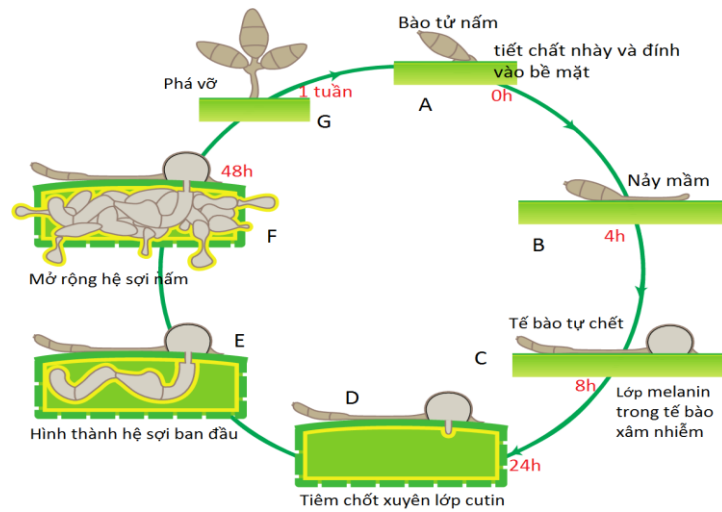


**Hình 1.1.** Vòng đời gây bệnh của nấm gây bệnh đạo ôn *Magnaporthe spp.* bao gồm giai đoạn sinh sản vô tính, sinh sản hữu tính và giai đoạn lây nhiễm (Dean và ctv., 2005).

Các tác nhân gây bệnh trên cây trồng luôn tiến hóa liên tục nhằm vượt qua những rào cản của hệ miễn dịch thực vật (Fernandez và Orth, 2018; Vale và ctv., 2001). Như mô tả ở **Hình 1.2**, nấm gây bệnh đạo ôn, *M. oryzae* bắt đầu xâm nhiễm bằng cách hình thành bào tử bám trên bề mặt kỵ nước của lá và sau đó nảy mầm, hình thành các cấu trúc xâm nhiễm như giác bám (appressoria), ống xâm nhiễm (penetration peg) (Martin-Urdiroz và ctv., 2016). Ống mầm (germ tube) sau khi hình thành từ bào tử sẽ nhận biết bề mặt lá và hình thành giác bám để từ đó giúp nấm *M. oryzae* xâm nhiễm vào tế bào thực vật thông qua tác động của lực trương cơ học và các enzyme phân hủy thành tế bào (Fernandez và Orth, 2018; Martin-Urdiroz và ctv., 2016; Nguyen và ctv., 2011; Vu và ctv., 2012; Yan và Talbot, 2016). Các ống xâm nhiễm sẽ hình thành và tấn công vào các tế bào của thực vật theo cả chiều dọc và chiều ngang (Nguyen và ctv., 2011). Sự tương tác này xảy ra trong các tế bào biểu bì và trung bì dẫn đến sự xâm nhiễm mô và hình thành các vết thương rõ ràng trên lá sau khi nhiễm 72 giờ (Martin-Urdiroz và ctv., 2016). Sự xâm nhiễm này phụ thuộc vào điều kiện môi trường và khí hậu thuận lợi cho nấm gây bệnh đạo ôn, *M. oryzae*.

Thông thường nhiệt độ khoảng 25 °C – 28 °C là nhiệt độ tốt nhất cho sự nảy mầm của bào tử và xâm nhiễm (Filippi và ctv., 2011). Sự xuất hiện và phát triển của nấm gây bệnh đạo ôn cũng tăng lên khi ẩm độ không khí trên 90%, mây mù hoặc bón quá nhiều đạm là các nguyên nhân tạo điều kiện cho mầm bệnh hình thành và phát triển (Prabhu và ctv., 2009).

Các triệu chứng do nấm *M. oryzae* gây ra trên lúa thường được quan sát và ghi nhận trên lá, bẹ lá, cổ lá, chùy, cuống và hạt (Ribot và ctv., 2008). Triệu chứng gây bệnh của nấm *M. oryzae* bắt đầu từ các đốm hoại tử nhỏ màu nâu xuất hiện trên lá và phát triển thành hình elip với rìa màu nâu và màu xám hoặc trắng (Agbowuro và ctv., 2020). Theo thời gian, những tổn thương này tăng kích thước theo hướng các mạch lá và khi nhiễm nặng sẽ xuất hiện quầng vàng bao quanh vết nhiễm cho đến khi mô chết (Agbowuro và ctv., 2020). Do đó, nấm *M. oryzae* sẽ gây ra những tác động nghiêm trọng trên cây lúa như làm giảm năng suất hạt do tác động trực tiếp của việc ngăn chặn sự dịch chuyển chất dinh dưỡng làm cho hạt kém hình thành hoặc thậm chí làm bông lúa bất thụ (Prabhu và Filippi, 1995). Ở giai đoạn sinh dưỡng của lúa, nấm *M. oryzae* sẽ làm ảnh hưởng đến tầm vóc và số lượng đẻ nhánh của cây làm ảnh hưởng đến năng suất (Ribot và ctv., 2008). Thông thường bệnh đạo ôn ở cổ bông sẽ gây ra thiệt hại lớn nhất về năng suất hạt gạo trong quá trình xâm nhiễm (Filippi và ctv., 2011). Nhìn chung, không thể loại trừ hoàn toàn bệnh đạo ôn trên đồng ruộng nhưng có thể giảm đáng kể những thiệt hại do bệnh gây ra thông qua biện pháp quản lý cây trồng tổng hợp (Prabhu và ctv., 2009). Việc lạm dụng các loại thuốc diệt nấm để kiểm soát nấm gây bệnh đạo ôn trên đồng ruộng là một mối nguy hiểm tiềm ẩn đối với sức khỏe và môi trường, dễ dẫn đến hình thành các chủng nấm gây bệnh đạo ôn kháng thuốc (Maciel, 2018; Srivastava và ctv., 2017). Do đó, xu hướng sử dụng các giống lúa chống chịu với nấm *M. oryzae* và quản lý trồng trọt tốt trên đồng ruộng được xem là giải pháp mang tính bền vững hiện nay (Filippi và ctv., 2011).



**Hình 1.2.** Quá trình gây bệnh của nấm gây bệnh đạo ôn (Were, 2018)

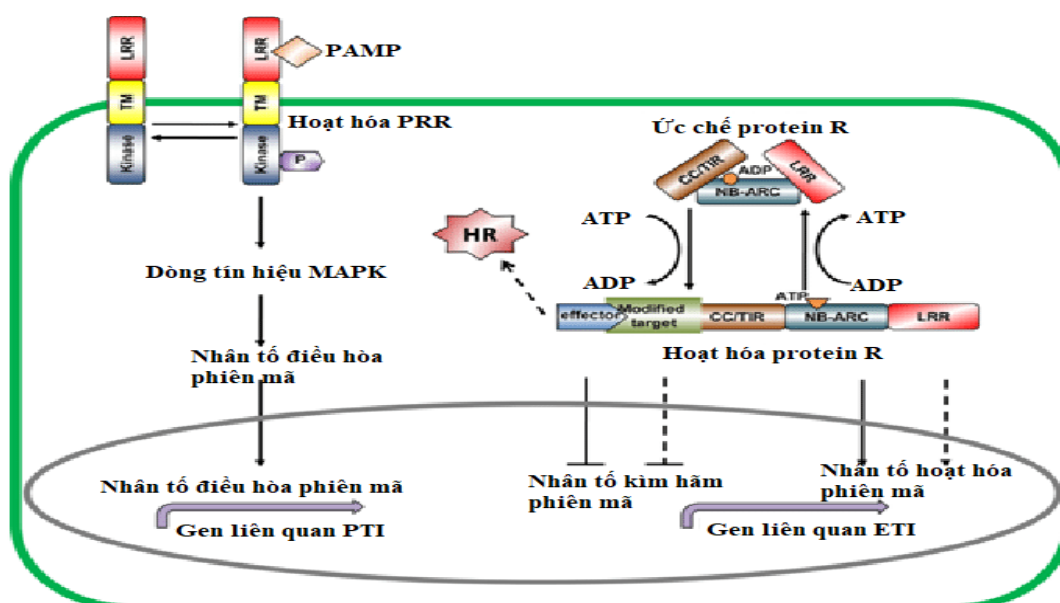
*Chú thích: [A] Bào tử nấm gây bệnh đạo ôn gắn vào bề mặt [B] Nảy mầm của bào tử, bằng cách tạo ra một ống mầm (germ tube), phần trên đỉnh của ống mầm hình thành thành một cái móc, mục đích để cảm nhận các đặc tính hóa học và vật lý của bề mặt. [C] Hình thành tế bào xâm nhiễm (appressoria cell). Một lớp melanin hình thành bên trong vách tế bào xâm nhiễm. [D] Bằng cách sử dụng áp lực trương phòng, một cái chốt/ống của nấm gây bệnh đạo ôn được đẩy xuyên qua lớp cutin của lá. [E] Hình thành hệ sợi nấm ban đầu. [F] Hệ sợi nấm xâm chiếm toàn bộ các mô. [G] Phá vỡ tế bào ra thoát ra.*

### 1.1.1. Hệ thống miễn dịch của thực vật chống lại tác nhân gây bệnh

Ở cây trồng có hai hệ thống phòng thủ thuộc hệ thống miễn dịch là PTI (pathogen-associated molecular pattern triggered immunity) và ETI (effector triggered immunity) (Weiberg và Jin, 2015). Hệ thống thứ nhất là PTI, được hoạt hóa khi các phân tử elicitors trên nấm *M. oryzae* tiếp xúc với các phân tử receptors trong hệ thống miễn dịch PTI dẫn đến hệ thống PTI ức chế sự xâm nhiễm của nấm *M. oryzae* (Weiberg và ctv., 2014). Tuyến phòng thủ đầu tiên này bao gồm các thụ thể có ở màng sinh chất đóng vai trò nhận diện các yếu tố mầm bệnh và kích hoạt phản ứng phòng vệ. Các yếu tố gây bệnh là các phân tử liên kết với mầm bệnh (*PAMPs*) được bảo tồn và là các phân tử đặc hiệu, có tính vi sinh vật cao. Các thụ thể nhận dạng mầm bệnh (*PRRs*) nhận diện *PAMP* thông qua vùng ngoại bào lặp lại giàu leucine (*LRRs*) và các protein kinase nội bào. Khi nhận diện *PAMP*, các thụ thể *PRRs* tạo ra một dòng tín hiệu xuôi dòng bao gồm sản xuất các chất có tính oxy hóa (*ROS*)



cảm ứng các protein kinase phụ thuộc canxi (*CDPK*), protein kinase hoạt hóa mitogen (*MAPK*), phytohormones và kích thích tố báo hiệu (axit jasmonic, axit salicylic, ethylene). Tuy nhiên, nấm *M. oryzae* có thể tấn công hệ thống miễn dịch PTI thông qua vai trò của các effectors. Và các gen kháng (*R gene*) trên cây trồng tạo ra các protein có khả năng nhận biết các effectors để kích hoạt hệ thống ETI kháng nấm gây bệnh đạo ôn (Katiyar-Agarwal và Jin, 2007). Các phân tử effectors được mã hóa bởi các gen không độc (avirulence genes) ở nấm *M. oryzae*, còn gen kháng (*R gene*) ở lúa mã hóa các phân tử protein bắt giữ các phân tử effectors của nấm *M. oryzae* (Padmanabhan và ctv., 2009) (Hình 1.3).



Hình 1.3. Hệ thống phòng thủ PTI và ETI trên thực vật (Han và Jung, 2013)

### 1.1.2. Tính kháng di truyền của lúa đối với nấm gây bệnh đạo ôn, *M. oryzae*

Lúa (*Oryza sativa* L.) là cây lương thực rất quan trọng trong nông nghiệp và cũng là cây trồng có bộ gen (genome) được giải trình tự hoàn toàn cũng như được sử dụng là mô hình nghiên cứu trong các cây cùng họ (Arumuganathan và Earle, 1991). Bộ gen của cây lúa có khoảng 430 triệu bp, ước tính khoảng 46 đến 56 nghìn gen cho nhóm lúa *indica* và khoảng 32 đến 50 nghìn gen cho nhóm lúa *japonica* (Chiu và ctv., 2002; Goff và ctv., 2002; Hori và ctv., 2017; Project, 2007). Thông tin này

rất có ý nghĩa cho việc tìm hiểu các cơ chế phân tử chi phối tính kháng di truyền đối với các tác nhân gây bệnh trên lúa, đặc biệt là nấm gây bệnh đạo ôn, *M. oryzae*.

Bộ gen của nấm gây bệnh đạo ôn cũng mã hóa hàng trăm effectors có liên quan đến tính kháng của lúa. Một số effectors được nhận biết bởi các thụ thể miễn dịch nội bào thuộc liên kết nucleotide lặp lại giàu leucine (*NLR*) (De la Concepcion và ctv., 2021; Stein và ctv., 2018). Thực vật có khả năng hình thành rất nhiều dạng *NLRs* để vô hiệu hóa các yếu tố độc lực hay các effectors được tiết ra từ các tác nhân gây bệnh (De la Concepcion và ctv., 2021). Sau khi phát hiện mầm bệnh, *NLR* sẽ kích hoạt các phản ứng miễn dịch có khả năng làm gián đoạn sự lây lan của mầm bệnh. Cấu trúc của *NLR* ở thực vật bao gồm các miền tích hợp không chính thức (integrated non-canonical domains). Các miền tích hợp này đóng vai trò như primer bẫy để phát hiện mầm bệnh (Stein và ctv., 2018; De la concepcion và ctv., 2021). Các thụ thể *NLRs* mang các miền tích hợp này sẽ chịu trách nhiệm cho một số gen kháng bệnh đạo ôn (De la Concepcion và ctv., 2021). Tuy nhiên, cơ chế này cuối cùng lại thúc đẩy sự phát triển của các biến thể effectors mới thoát khỏi sự phát hiện của hệ miễn dịch thực vật. Vì lý do này, việc sử dụng thông tin *NLR* trong các bộ gen tham chiếu sẽ là cơ hội lớn cho các chương trình cải tiến cây trồng. Trong một nghiên cứu sử dụng 13 bộ gen tham chiếu của các loài *Oryza*, 5,408 gen *NLR* đã được xác định trong đó có 535 gen *NLR* được phát hiện trên các giống lúa thuộc nhóm *indica* (*Oryza sativa* vg. *indica*) (Stein và ctv., 2018).

Để tìm ra các gen kháng liên quan đến nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa, các nhà khoa học thường tìm hiểu thông qua vị trí các gen tính trạng số lượng QTL (Quantitative trait loci). Hiện nay, có khoảng 350 QTL được biết là có liên quan đến tính kháng của cây lúa và có khoảng 85 QTL đã được mô tả rõ ràng (Ashkani và ctv., 2016; Srivastava và ctv., 2017). Các QTL đầu tiên liên quan đến tính kháng bệnh đạo ôn đã được đánh dấu bởi Wang và ctv. (1994) và kể từ đó, việc tìm kiếm các QTL ngày càng tăng nhằm hỗ trợ cho việc tạo khả năng kháng nấm *M. oryzae* trên lúa bền vững hơn (Ashkani và ctv., 2016). Số lượng QTL nhiều sẽ có nghĩa là có nhiều nguồn kháng một phần và giúp làm giảm sự lây lan của mầm bệnh, giữ áp lực chọn lọc thấp

trong quần thể nấm gây bệnh đạo ôn (*M. oryzae*) và duy trì khả năng kháng bệnh đạo ôn lâu bền trên lúa (Maciel, 2018; Sharma và ctv., 2012). QTL được sử dụng để xác định các gen kháng thuốc và cũng để phát triển các dấu hiệu liên quan đến các gen này. Đối với tính kháng bệnh đạo ôn ở lúa, các QTL có hiệu quả chống lại một số chủng *M. oryzae* đã được xác định, và hầu hết đều liên quan đến các gen định tính (Srivastava và ctv., 2017). Một số QTL đã được sử dụng để tạo hình tháp gen (Sharma và ctv. 2012).

### **1.1.3. Vai trò của các phân tử RNAs nhỏ liên quan đến tính kháng bệnh đạo ôn trên lúa.**

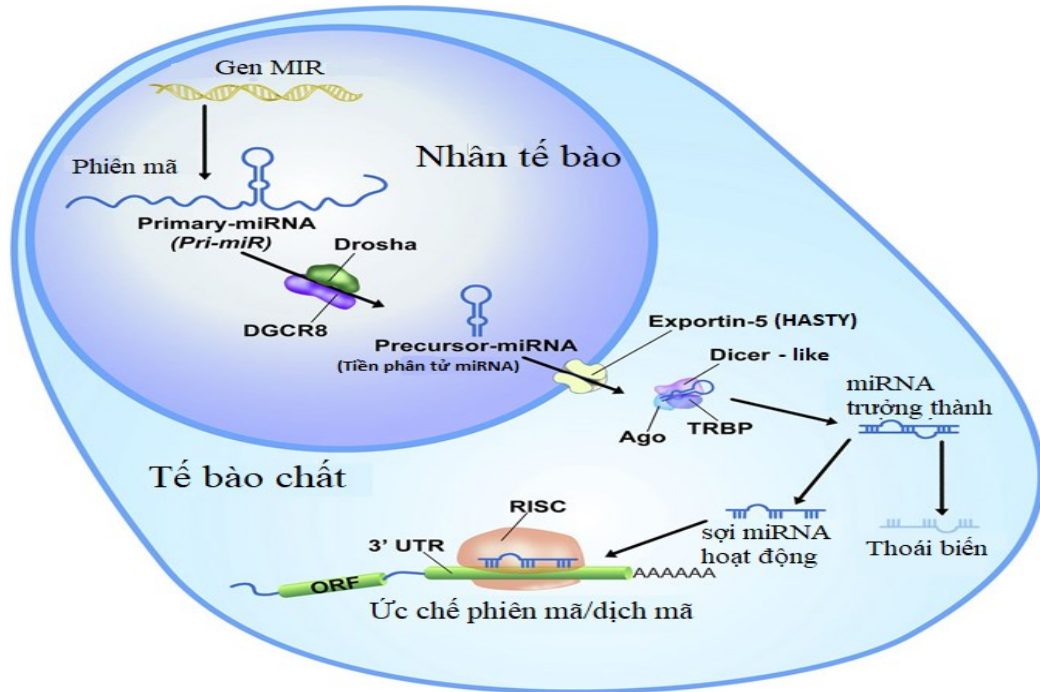
Các phản ứng miễn dịch của thực vật được kiểm soát chặt chẽ bởi các yếu tố điều hòa như các yếu tố phiên mã và các phân tử RNAs nhỏ (Deng và ctv., 2018). Các phân tử RNAs nhỏ nội sinh trong thực vật bao gồm miRNA và siRNA. Cả hai phân tử này đều được hình thành từ hoạt động phân cắt của protein Dicer (*DCL*) và sau đó chúng kết hợp với các protein ARGONAUTE (*AGO*) để tạo thành các phức hợp làm câm lặng gen do RNA gây ra (*RISC*) (Baulcombe, 2004). Các phức hợp *RISCs* này sẽ liên kết cụ thể với trình tự DNA hoặc RNA thông tin của các gen mục tiêu và kìm hãm sự biểu hiện của chúng ở mức độ phiên mã, sau phiên mã hoặc dịch mã thông qua quá trình methyl hóa DNA, phân cắt mRNA hoặc kìm hãm quá trình dịch mã (Brodersen và ctv., 2008; Llave, 2004; Song và ctv., 2019; Wu và ctv., 2010). Các nghiên cứu gần đây cho thấy RNA nhỏ (bao gồm microRNA, siRNA và piRNA) đóng vai trò chính trong việc điều hòa hệ thống PTI và ETI ở cây trồng (Fu và ctv., 2006; Khraiwesh và ctv., 2012). Giữa cây trồng và nấm *M. oryzae* tương tác với nhau thông qua phân tử RNA nhỏ (small RNA), từ đó tạo ra một cuộc cạnh tranh để kiểm soát quyền điều khiển hệ thống miễn dịch thông qua RNA nhỏ (Weiberg và Jin, 2015). Nấm *M. oryzae* có thể kiểm soát hệ thống PTI và ETI thông qua microRNA, và ngược lại lúa cũng có thể ngăn cản sự xâm nhiễm của nấm *M. oryzae* thông qua microRNA (Baldrich và ctv., 2015; Li và ctv., 2019b; Zuo và ctv., 2014).

Các nghiên cứu ứng dụng siRNA trong việc tạo các giống lúa chống chịu cũng được thực hiện bằng phương pháp ức chế gen thông qua ký chủ (host induced gene silencing – HIGS). Phương pháp HIGS đã được mô tả thành công trong việc phòng chống sự xâm nhiễm của nấm bệnh *Puccinia striiformis* sp. tritici (Chen và ctv., 2014), nấm *Fusarium graminearum* (Cheng và ctv., 2015), nấm *Blumeria graminis* (Pliego và ctv., 2013), nấm *Puccinia triticina* (Panwar và ctv., 2013). Trên lúa, phương pháp HIGS cũng đã được nghiên cứu và tiến hành thành công nhằm tạo ra cây lúa có khả năng kháng nấm gây bệnh đạo ôn một cách bền vững (Guo và ctv., 2019). Hầu hết các nghiên cứu sử dụng HIGS để kháng nấm gây bệnh đạo ôn đều tập trung vào các gen gây độc hoặc các gen tham gia vào quá trình phát triển của nấm *M. oryzae*. Ví dụ như gen *PLS1* (*plastin1*) liên quan đến quá trình điều hòa tế bào xâm nhiễm (Clergeot và ctv., 2001), gen *MPG1* (*mannose-1-phosphate guanyltransferase*) mã hóa cho hydrophobin giúp nấm gây bệnh đạo ôn tương tác trên bề mặt vật chủ (Talbot và ctv., 1996), gen *PMK1* (*Mitogen-activated protein kinase pmk-1*) điều hòa sự xâm nhiễm và phát triển hệ sợi nấm gây bệnh đạo ôn (Xue và ctv., 2002), gen *RVS167* (*amphiphysin*) và gen *Las17* (*Proline-rich protein*) điều hòa sự xâm nhiễm của tế bào giác bám (Dagdas và ctv., 2012; Penn và ctv., 2015), gen *MoAPI* (*modulator of apoptosis 1*) mã hóa nhân tố phiên mã *bZIP* trong quá trình hình thành bào tử đỉnh của nấm gây bệnh đạo ôn, điều hòa sự phát triển sợi nấm và cả tính gây bệnh của nấm gây bệnh đạo ôn (Guo và ctv., 2011; Guo và ctv., 2019). Tóm lại, phân tử RNA nhỏ (bao gồm microRNA, siRNA, piwiRNA) đóng vai trò rất quan trọng trong việc điều hòa cây lúa sinh trưởng, phát triển và chống chịu với các tác nhân sinh học và phi sinh học (Khraiwesh và ctv., 2012; Tang và Chu, 2017)

## 1.2. Quá trình sinh tổng hợp microRNA ở thực vật

MicroRNAs là những đoạn RNA nhỏ có kích thước 20-25 nu, sợi đơn, có tác dụng điều hòa gen ở giai đoạn phiên mã và sau phiên mã (**Hình 1.4**). Kể từ sau khi phát hiện ra miRNA vào năm 1993 thì hàng loạt miRNAs khác nhau ở thực vật và động vật đã được phát hiện (Voinnet, 2009). Đồng thời, các nghiên cứu về cơ chế

hình thành miRNA, và sự tác động lên mRNA đích cũng đã được nghiên cứu và hiểu một cách rõ ràng.



**Hình 1.4.** Quá trình sinh tổng hợp microRNA (Lee và ctv., 2020)

*Chú thích:* Các phân tử microRNA được phiên mã bởi enzyme RNA polymerase II từ gen MIR tạo ra pri-miRNA (chứa đuôi poly A). Tiếp đó, pri-miRNA được cắt bằng enzyme ribonuclease III (Drosha) thành tiền phân tử microRNA (precursor-miRNA) có chiều dài khoảng 70 nt thân cuộn vòng. Sau đó, phân tử precursor-miRNA sẽ được vận chuyển ra ngoài tế bào chất nhờ protein Exportin-5 và được cắt bằng enzyme ribonuclease (Dicer), tạo thành phân tử microRNA trưởng thành (mature miRNA). Phân tử miRNA trưởng thành này tiếp tục gắn với phức hợp câm lặng gen (RISC) để nhận biết các phân tử mRNA đích thông qua việc bắt cặp không hoàn hảo với sợi miRNA khuôn mẫu (sợi miRNA hoạt động) và dẫn đến kết quả là ức chế quá trình phiên mã hoặc ngăn chặn quá trình dịch mã.

Trên cây trồng, phân tử miRNA được tạo thành từ tiền phân tử miRNAs (precursor miRNA) với các cấu trúc thân vòng (dài khoảng 70 nu) và được phân cắt bởi enzyme RNaseIII là Dicer-like 1 (*DCL1*) tạo thành các sợi đôi miRNA-miRNA\*, trong đó có 1 sợi đơn hoạt động (guide strand miRNA) và 1 sợi đơn bị thoái biến (passenger strand miRNA\*). Sợi đơn miRNA hoạt động sẽ kết hợp với phức hợp câm lặng gen (*RISC*) để hình thành nên phức hợp ức chế gen (*RISC* – RNA induced gene silencing) tham gia vào quá trình ức chế gen sau phiên mã (bằng cách cắt đoạn mRNA

đích) hoặc ức chế quá trình dịch mã (bằng cách ngăn chặn sự hình thành 80S ribosome từ 2 tiểu đơn vị 40S và 60S) (Brodersen và ctv., 2008; Gu và Kay, 2010).

Phân tử miRNA được phiên mã từ gen tạo ra miRNA (MIR gene), yếu tố gen nhảy hoặc vùng giữa gen (intergenic region) (Qin và ctv., 2015). Hầu hết các loài cây đều sở hữu trên 100 gen tạo ra miRNA và có riêng đơn vị phiên mã (transcription unit) gắn với gen MIR (Griffiths-Jones và ctv., 2008). Các gen MIRs này thường nằm ở vị trí giữa hai gen chức năng (intergenic genes) (Rhoades và ctv., 2002). Gen MIR được phiên mã nhờ enzyme RNA polymerase II (Pol II) tạo thành pri-miRNA, phân tử pri-miRNA được bảo vệ bằng cách gắn mũ 7-methylguanosine ở đầu 5' (Xie và ctv., 2005) và gắn đuôi polyA ở đầu 3' (Mallory và ctv., 2004). Tham gia vào việc phân cắt precursor miRNAs có rất nhiều Dicer-like protein (*DCL*) tạo thành một họ *DCL*. Các loại *DCLs* khác nhau sẽ tạo ra miRNA có kích thước khác nhau, ví dụ như: *DCL1* và *DCL4* tạo miRNA có kích thước 21 nu, *DCL2* tạo ra miRNA kích thước 22 nu, và *DCL3* tạo miRNA kích thước 24 nu (Rogers và Chen, 2013). Ở thực vật, *DCL1* đóng vai trò chính trong việc tạo miRNA, do vậy phần lớn miRNAs ở thực vật có kích thước 21 nu (Rogers và Chen, 2013; Voinet, 2009). *DCL1* có vai trò rất quan trọng trong quá trình điều hòa các quá trình sinh lý ở cây trồng. Đột biến mất chức năng *DCL1* ở cây *Arabidopsis thaliana* làm chết phôi (Fukudome và Fukuhara, 2017). Mỗi loại enzyme *DCL(1-4)* có vai trò khác nhau trong quá trình điều hòa cây trồng chống chịu lại các tác nhân sinh học và phi sinh học (Voinet, 2009). Đồng thời, các enzyme *DCLs* có sự phân tầng về chức năng ở các mô khác nhau của cây trồng, điều này cũng cho thấy các phân tử *DCLs* điều hòa quá trình tạo ra miRNA tùy theo không gian và thời gian (Rogers và Chen, 2013).

Ở lúa, nhiều nghiên cứu đã chứng minh miRNA đóng vai trò trong việc điều hòa các quá trình sinh dưỡng và các đáp ứng với tác nhân gây bệnh (Song và ctv., 2019; Xie và ctv., 2015). Bên cạnh đó, khá nhiều nghiên cứu cho thấy miRNA đóng vai trò quan trọng trong sự tương tác giữa lúa và nấm *M. oryzae* (Baldrich và ctv., 2015 ; Li và ctv., 2014). Nghiên cứu cho thấy có nhiều thành phần tác động đến quá trình sinh tổng hợp miRNA, trong đó các protein *DCLs*, *RDRs* và *AGOs* là các thành

phần chính tham gia tổng hợp miRNA (Dong và ctv, 2013; Feng và ctv., 2021). Bộ gen của lúa mã hóa tạo ra 8 phân tử *OsDCLs* và 19 phân tử *AGOs* (Kapoor và ctv., 2008). Các phân tử *OsDCLs* bao gồm *OsDCL1a*, *OsDCL1b*, *OsDCL1c*, *OsDCL2a*, *OsDCL2b*, *OsDCL3a*, *OsDCL3b/OsDCL5*, và *OsDCL4* (Kapoor và ctv., 2008; Margis và ctv., 2006). Mỗi phân tử *OsDCLs* có vai trò tạo ra các phân tử RNAs nhỏ khác nhau. Trong đó, phân tử *OsDCL1* và *OsDCL3a* có vai trò sinh tổng hợp các phân tử miRNAs có kích thước 21-24 nu (Feng và ctv., 2021); phân tử *OsDCL3b/OsDCL5* và *OsDCL4* tham gia tổng hợp các phân tử siRNAs có kích thước 21-24 nu (Song và ctv., 2012). Các nghiên cứu cho thấy có 5 phân tử *OsDCLs* đáp ứng với sự xâm nhiễm của nấm *M. oryzae* là *OsDCL1*, *OsDCL2*, *OsDCL3a*, *OsDCL3b/OsDCL5* và *OsDCL4* (Du và ctv., 2011; Feng và ctv., 2021; Salvador-Guirao và ctv, 2019). Trong đó, phân tử *OsDCL1a* có vai trò hỗ trợ cho sự xâm nhiễm của nấm *M. oryzae* thông qua sự điều hòa giảm các gen mã hóa cho phân tử phytoalexin và các gen kháng *OsPR1a* và *OsPBZ1* (Salvador-Guirao và ctv, 2019). Bên cạnh đó, phân tử *OsDCL1* cũng được điều hòa ngược (negative feedback) bởi phân tử *miR162a* (Zhang và ctv., 2015). Nghiên cứu gần đây cho thấy biểu hiện tăng *osa-miR162a* sẽ giúp tăng cường khả năng kháng nấm *M. oryzae* gây bệnh đạo ôn ở lúa thông qua sự kích thích các gen kháng và nồng độ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nhưng đồng thời biểu hiện tăng *osa-miR162a* cũng làm giảm sản lượng lúa (Li và ctv., 2020).

Để tìm ra các miRNAs liên quan đến sự tương tác giữa lúa và nấm *M. oryzae*, hầu hết các nghiên cứu đều tiến hành phân tích so sánh sự thay đổi biểu hiện của các miRNAs trên giống lúa kháng và giống lúa mẫn cảm (Baldrich và ctv., 2015; Li và ctv., 2019b). Các nghiên cứu hiện nay đã tìm ra 70 miRNAs từ 61 họ miRNAs có liên quan đến hệ miễn dịch của cây lúa giúp chống chịu với khả năng xâm nhiễm của nấm gây bệnh đạo ôn *M. oryzae* và các phân tử elicitors của nấm *M. oryzae* (**Phụ lục 1**). Hầu hết các miRNAs trong số 70 miRNAs kể trên đều liên quan đến việc điều hòa các gen tham gia vào các hoạt động sinh trưởng, phát triển và miễn dịch ở cây lúa như: điều hòa tín hiệu hormon (auxin, axit salicylic, axit jasmonic, ethylen), tín hiệu gốc tự do (reactive oxygen species - ROS) quá trình sinh tổng hợp sRNA, và các gen

ở vùng mã đầu của khung đọc mở (upstream open reading frames) (Li và ctv., 2019b). Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng các dạng biểu hiện của một số miRNAs liên quan đến khả năng chống chịu nấm gây bệnh đạo ôn *M. oryzae* trên lúa (Baldrich và San Segundo, 2016; Campo và ctv., 2021; Li và ctv., 2019b). Các nghiên cứu này chia các miRNAs thành 2 nhóm bao gồm: nhóm miRNAs biểu hiện tăng (up-regulation) như: *osa-miR159a*, *osa-miR160*, *miR162*, *osa-miR166*, *osa-miR398*, *osa-miR7695*, *osa-miR812w*; và nhóm miRNAs biểu hiện giảm (down-regulation) như: *miR164*, *osa-miR167*, *osa-miR169*, *osa-miR319*, *osa-miR396*, *osa-miR399*, *osa-miR439*, *osa-miR444*, *miR1873*. Một số nghiên cứu khác cũng ghi nhận *osa-miR162a*, *osa-miR396*, *osa-miR1873* có vai trò cân bằng giữa sản lượng và mức độ kháng *M. oryzae* trên cây lúa (Chandran và ctv., 2019; Li và ctv., 2020; Zhou và ctv., 2020).

### **1.3. Vai trò và chức năng của các miRNAs làm tăng khả năng kháng nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa, *Magnaporthe oryzae***

Đến thời điểm hiện tại, có 9 miRNAs có biểu hiện tăng liên quan đến việc tăng khả năng kháng nấm *M. oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa đã được công bố. Trong đó có 5 phân tử miRNA nổi bật bao gồm các miRNAs sau: *osa-miR159a*, *osa-miR160*, *osa-miR162*, *osa-miR166*, *osa-miR7695*.

***Osa-miR159*** được mô tả là có liên quan đến khả năng kháng nấm *M. oryzae* ở lúa thông qua sự ức chế gen đích là *OsGAMYB* (*Transcriptional activator of gibberellin-dependent alpha-amylase*) *OsGAMYBL* (*OsGAMYBL-like*), và *OsZF* (*zinc-finger*) (Chen và ctv., 2021). Các gen đích này có vai trò trong việc điều hòa các quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lúa (Millar và ctv., 2019). *Osa-miR159* có chiều dài 21 nu, có tính bảo tồn cao ở cây *Arabidopsis* và cây lúa; *osa-miR159* có vai trò ức chế các gen *OsGAMYB*, *OsGAMYBL*, và *OsZF* thông qua quá trình cắt mRNA của các gen này. Trên cây lúa, mô-đun *osa-miR159/OsGAMYB* kiểm soát các gen liên quan đến sự biểu hiện axit gibberellic, axit abscisic từ đó tác động đến quá trình hấp thu năng lượng và tăng cường chiều cao ở lúa (Zhang và ctv., 2016c). Biểu hiện tăng *osa-miR159a* làm tăng khả năng kháng nấm *M. oryzae* ở lúa (Chen và ctv., 2021). Bằng cách dùng kỹ thuật Crisp/Cas9 để triệt tiêu hoạt động của các gen đích



*OsGAMYB*, *OsGAMYB* và *OsZF*, kết quả cho thấy tất cả các cây lúa đột biến đều có biểu hiện tăng tính kháng với nấm *M. oryzae* và mức độ tổn thương giảm so với đối chứng. Ngoài ra, mức độ kháng giảm dần theo thứ tự các dòng lúa đột biến *gambl*, *gamyb* và *zf*. Điều này cho thấy gen *OsGAMYBL* đóng vai trò quan trọng nhất trong tính kháng bệnh đạo ôn trên lúa so với 2 gen còn lại. Tuy nhiên, kiểu hình của các dòng lúa đột biến gen *gambl*, *gamb* và *zf* đều có sự phát triển bất thường, riêng dòng lúa đột biến *zf* có kiểu hình ít bị bất thường nhất (Chen và ctv., 2021). Bộ gen của lúa có 6 gen mã hóa cho *osa-miR159*, và tạo ra các isoforms (miRNA đồng dạng) là: *osa-miR159a*, *osa-miR159b*, *osa-miR159c*, *osa-miR159d*, *osa-miR159e* và *osa-miR159f*. Trong đó, *osa-miR159a/b* ức chế gen *OsGAMYB* và *OsGAMYBL*, và *osa-miR159a* đóng vai trò quan trọng nhất trong việc tạo tính kháng nấm *M. oryzae* ở lúa, so với các miRNA đồng dạng còn lại (Chen và ctv., 2021).

***miR160*** là một họ miRNA có tính bảo tồn cao, đóng vai trò trong việc điều hòa các gen *ARFs* (*Auxin response transcription factors genes*) ở cây trồng (Li và ctv., 2019b). Trên lúa, biểu hiện tăng *osa-miR160* làm tăng khả năng kháng nấm *M. oryzae* thông qua sự ức chế các gen đích *ARFs*. Bộ gen của lúa có 6 vị trí gen tạo ra *osa-miR160*, tuy nhiên chỉ tạo ra 3 isoforms (miRNA đồng dạng) trưởng thành là *osa-miR160a/b/c/d*, *osa-miR160e*, và *osa-miR160f* (Li và ctv., 2019b). Ở lúa, *osa-miR160* ức chế 5 gen *ARFs* (*ARF8*, *ARF10*, *ARF13*, *ARF18*, *ARF22*). Trong đó, *osa-miR160a* ức chế các gen *ARF8*, *ARF10* and *ARF13*. Biểu hiện tăng *osa-miR160a* làm tăng khả năng kháng nấm *M. oryzae* thông qua ức chế các gen đích *ARFs* (Li và ctv., 2019b). Ở trạng thái bình thường, *osa-miR160a* tích lũy ở một mức độ nhất định để tăng cường phản ứng miễn dịch bằng cách ngăn chặn sự biểu hiện của *ARF*. Khi tiếp xúc với mầm bệnh, cây lúa sẽ kích hoạt tích lũy của *osa-miR160a* dẫn đến tăng cường khả năng chống lại mầm bệnh và giảm biểu hiện *ARFs*. Trong số các *ARFs* này, *ARF8* hoạt động như một chất điều hòa giảm đối với sự kháng bệnh bằng cách liên kết trực tiếp với promoter và ngăn chặn vi khuẩn phiên mã bởi *WRKY45* (*transcriptional regulators through W-boxes*), mã hóa một cơ quan điều chỉnh chính của khả năng kháng bệnh (Feng và ctv., 2022). Bên cạnh đó, các gen *ARFs* còn có vai trò trong

việc tác động đến tín hiệu auxin điều hòa sinh trưởng ở cây trồng, cho nên cây lúa biểu hiện tăng *osa-miR160* sẽ có kiểu hình dị thường như lùn, hạt nhỏ, lá xoắn (Huang và ctv., 2016), đồng thời ức chế tín hiệu auxin là một cách phòng vệ của thực vật trước sự xâm nhiễm của mầm bệnh khi nhiều loại mầm bệnh có khả năng kiểm soát con đường auxin giúp tăng biểu hiện bệnh (Wang và ctv., 2007).

***miR162*** là một họ miRNA có tính bảo tồn ở cây trồng, có liên quan đến căng thẳng sinh học và phi sinh học ở cây trồng (Li và ctv., 2020). *Osa-miR162* ức chế gen đích là *OsDCL1*, gen tham gia vào quá trình sinh tổng hợp hầu hết các miRNAs ở cây trồng. Do vậy, khi biểu hiện *osa-miR162* tăng sẽ dẫn đến sự bất thường kiểu hình ở cây trồng (Zhou và ctv., 2010). Liên quan đến đáp ứng căng thẳng phi sinh học ở cây trồng, *osa-miR162* làm tăng khả năng thích ứng với khô hạn thông qua sự ức chế gen *OsTRE1* (*Trehalase precursor 1*) ở cây lúa (Tian và ctv., 2015). Ở lúa, biểu hiện tăng *osa-miR162* làm tăng khả năng kháng nấm *M. oryzae* thông qua sự ức chế gen đích *OsDCL1*, đồng thời *osa-miR162* làm tăng mức độ biểu hiện của các gen kháng và tăng nồng độ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giúp cây lúa chống lại nấm *M. oryzae* tại vị trí xâm nhiễm (Zhang và ctv., 2015). *Osa-miR162* có 2 isoforms là *osa-miR162a* và *osa-miR162b*. Nghiên cứu gần đây cho thấy *osa-miR162a* có vai trò cân bằng khả năng kháng nấm *M. oryzae* và sản lượng lúa thông qua sự kiểm soát gen đích *OsDCL1*. Biểu hiện tăng *osa-miR162a* giúp cây lúa tăng khả năng kháng với nấm *M. oryzae*, tuy nhiên lại làm giảm sản lượng lúa. Ngược lại, khi biểu hiện giảm *osa-miR162a* thì cây lúa giảm khả năng kháng nấm *M. oryzae* nhưng lại tăng sản lượng lúa (Li và ctv., 2020).

***miR166*** là một họ miRNA có tính chất bảo tồn ở cây trồng, đích tấn công là họ gen *HD-ZIP III* transcription factor, tác động đến sự sinh trưởng và miễn dịch ở cây trồng (Li và ctv., 2019b; Salvador-Guirao và ctv., 2018). Các nghiên cứu cho thấy *miR166* liên quan đến các căng thẳng sinh học và phi sinh học ở cây trồng, phổ tác động của *miR166* rất rộng và tùy thuộc từng giống cây trồng (Khraiwesh và ctv., 2012). Họ *miR166* có khoảng 262 isoforms khác nhau ở 45 giống cây trồng, riêng ở lúa có 13 gen *MIR166* tạo ra 6 isoforms (Li và ctv., 2019b). Sự biểu hiện tăng miRNA đa nang (polycistronic miRNA) *osa-miR166k-miR166h* làm tăng khả năng kháng

nấm *M. oryzae* trên lúa thông qua sự điều khiển gen *EIN2* (*ethyleneinsensitive 2*) (Salvador-Guirao và ctv., 2018). Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của các thành viên trong họ *osa-miR166* có sự khác nhau trong quá trình nhiễm nấm *M. oryzae* hoặc tiếp xúc với các phân tử elicitors của nấm *M. oryzae* (Li và ctv., 2019b). Ví dụ *osa-miR166m* giảm biểu hiện khi được xử lý với các phân tử elicitors của nấm *M. oryzae*, trong khi *osa-miR166k*, *osa-miR166j* lại tăng biểu hiện khi tiếp xúc với nấm *M. oryzae* (Campo và ctv., 2013). Điều này cho thấy các thành viên trong họ *osa-miR166* có vai trò khác nhau trong việc điều hòa cây lúa kháng lại nấm *M. oryzae* (Li và ctv., 2019b). Bên cạnh đó, biểu hiện tăng miRNA đa năng *osa-miR166k-miR166h* còn giúp lúa tăng khả năng kháng với nấm *Fusarium fujikuroi* gây bệnh lúa von (Bakanae disease) (Li và ctv., 2019b).

***Osa-miR7695*** đóng vai trò điều hòa tăng khả năng kháng nấm *M. oryzae* và được biểu hiện ở lá trong suốt giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng của lúa (Campo và ctv., 2013). *Osa-miR7695* biểu hiện cao ở nhóm lúa chống chịu và tăng mức độ biểu hiện khi bị nhiễm nấm *M. oryzae* (Campo và ctv., 2013; Quoc và ctv., 2019). Hiện tại, *osa-miR7695* chỉ được tìm thấy ở cây lúa, bao gồm cả ở giống lúa *japonica* và *indica* (Campo và ctv., 2013; Quoc và ctv., 2019). *Osa-miR7695* tấn công gen đích là *OsNramp6* (Natural resistance-associated macrophage protein 6). Gen *OsNramp6* đóng vai trò trong việc điều hòa nồng độ ion kim loại sắt và mangan ở lúa. Biểu hiện tăng phân tử *OsNramp6* làm giảm khả năng kháng với nấm *M. oryzae* thông qua cơ chế làm giảm nồng độ ion sắt ở lúa (Peris-Peris và ctv., 2017). Tổng cộng có 8 biến thể phiên mã của gen *OsNramp6* sau quá trình cắt nối (alternative splicing). Trong đó, biến thể *OsNramp6.1* và *OsNramp6.8* có liên quan đến khả năng kháng nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa (Campo và ctv., 2013; Peris-Peris và ctv., 2017).

#### **1.4. Vai trò và chức năng của các miRNAs làm giảm khả năng kháng nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa, *Magnaporthe oryzae*.**

Cho đến nay, có 9 miRNAs có biểu hiện tăng liên quan đến làm giảm khả năng kháng nấm *M. oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa đã được mô tả chức năng, trong đó có

5 phân tử nổi bật bao gồm: *osa-miR164*, *osa-miR167*, *osa-miR169*, *osa-miR319*, *osa-miR396*.

***miR164*** là một họ miRNA có tính bảo tồn cao ở cây trồng, gen đích là họ gen *NAC transcription factor*. Họ gen *NAC transcription factor* là một trong những họ gen *TF* (Transcription factor) lớn nhất ở cây trồng, tham gia vào các quá trình điều hòa sự sinh trưởng, phát triển, đáp ứng với căng thẳng sinh học và phi sinh học ở cây trồng (Fang và ctv., 2014; Yuan và ctv., 2019). Gen *NAC* được chia thành 3 nhóm nhỏ (*NAM*, *CUC* và *ATAF*) tùy thuộc vào cấu trúc vùng C-terminal của protein *NAC* (Yuan và ctv., 2019). Ở lúa, có khoảng 151 gen *NAC*, mỗi gen *NAC* ở lúa lại có vai trò khác nhau (Yuan và ctv., 2019). Ví dụ như biểu hiện tăng *OsNAC10*, *OsNAC14* làm tăng khả năng chống chịu hạn ở lúa (Jeong và ctv., 2010; Shim và ctv., 2018); biểu hiện tăng *OsNAC4* làm tăng quá trình chết ở tế bào lúa (Kaneda và ctv., 2009); biểu hiện tăng *OsNAC111* làm tăng mức độ biểu hiện của các gen kháng chống lại nấm *M. oryzae* ở lúa (Yokotani và ctv., 2014); biểu hiện tăng *OsNAC66* làm tăng mức độ kháng nấm *M. oryzae* ở lúa (Yuan và ctv., 2019). Nghiên cứu gần đây cho thấy biểu hiện giảm *OsNAC60* làm tăng sự mẫn cảm với nấm *M. oryzae*, hay nói cách khác là biểu hiện tăng *OsNAC60* sẽ làm tăng khả năng kháng với nấm *M. oryzae* (Wang và ctv., 2018). Ở lúa, họ *osa-miR164* bao gồm 6 isoforms (*osa-miR164a/b/f*, *osa-miR164c*, *osa-miR164d*, *osa-miR164e*) trong đó *osa-miR164a* có vai trò ức chế trực tiếp đối với *OsNAC60*. Biểu hiện tăng *osa-miR164a* làm giảm khả năng kháng với nấm *M. oryzae* (Wang và ctv., 2018). Nghiên cứu cũng cho thấy *OsNAC60* có vai trò làm tăng đáp ứng miễn dịch ở cây trồng thông qua các hoạt động như tăng mức độ tích lũy *ROS*, tăng mức đào thải ion (ion leakage) tăng tích lũy callose và tăng mức độ biểu hiện của các gen kháng (Wang và ctv., 2018). Ngoài ra, nghiên cứu gần đây cho thấy *osa-miR64* được kiểm soát bởi mô-đun *osa-miR168/AGO* trong việc tạo tính miễn dịch với nấm *M. oryzae* (Wang và ctv., 2021a).

***miR167*** là một họ miRNA có tính bảo tồn ở cây trồng, gen đích tấn công là họ gen Auxin responsive factor (*ARF*) và gen Nucleotide leucine repeat (*NLR*) (Zhao và ctv., 2019). Auxin là một hormon chính ở cây trồng có vai trò điều hòa cây trồng sinh

trưởng và phát triển, từ giai đoạn phôi đến khi cây chết. Các nghiên cứu cho thấy auxin điều hòa tất cả các quá trình trên bằng cách điều khiển sự biểu hiện gen thông qua các nhân tố phiên mã *ARFs* (Li và ctv., 2016a). Nhân tố *ARF* gắn vào vùng promoter của các gen được điều hòa bởi auxin (auxin-related gene –*ARG*) để kích hoạt hoặc ức chế dựa vào vùng domain đặc trưng (*AuxRE*) của protein được mã hóa bởi gen *ARG* (Li và ctv., 2016a). Các gen *ARFs* có vai trò khác nhau, hoạt động ở giai đoạn phiên mã và sau dịch mã đối với gen được điều khiển (Li và ctv., 2016b). Mức độ biểu hiện của các gen *ARFs* được kiểm soát bởi các microRNAs (Baldrich và ctv., 2015; Li và ctv., 2016b). Hoạt động của các gen *ARFs* ở lúa và *Arabidopsis* tương đồng với nhau, trong đó *ARF6*, *ARF8*, *ARF12* là gen đích của *osa-miR167*; *ARF10*, *ARF6* và *ARF17* là gen đích của *osa-miR160* (Li và ctv., 2016a; Zhao và ctv., 2019). Ở lúa, *osa-miR167* có 10 thành viên (từ *osa-miR167a* đến *osa-miR167j*) trong đó *osa-miR167d* ức chế trực tiếp gen đích *ARF12*. Biểu hiện tăng của *osa-miR167d* làm giảm khả năng kháng nấm *M. oryzae* thông qua sự ức chế gen *ARF12* ở thời điểm 24h sau khi nhiễm nấm *M. oryzae* (Zhao và ctv., 2019). Nghiên cứu cho thấy biểu hiện tăng *ARF12* làm tăng mức độ biểu hiện gen *OsGH3-2* (*auxin-responsive GH3 gene*) là gen có vai trò bất hoạt *IAA* (một dạng hormon auxin). Biểu hiện tăng hormon *IAA* làm tăng mức độ miễn cảm với nấm *M. oryzae* thông qua việc tạo ra protein expansin, protein làm giảm độ cứng cáp của thành tế bào cây lúa (Fu và ctv., 2011). Tóm lại, khi tăng mức độ biểu hiện *ARF12* sẽ làm tăng mức độ kháng với nấm *M. oryzae* ở lúa (Fu và ctv., 2011; Zhao và ctv., 2019)

***miR169*** là một họ miRNA có 17 thành viên, tấn công vào gen đích là *NF-YA* (*nuclear transcription factor Y subunit*) (Li và ctv., 2019b). Họ gen *NF-Ys* là một họ gồm nhiều thành viên, sản phẩm là các protein tiểu đơn vị gắn đặc hiệu vào *CCAAT-box* ở vùng promoter (upstream) và điều hòa các gen vùng hạ nguồn (downstream) (Zhao và ctv., 2017). Bên cạnh protein tiểu đơn vị *NF-YA*, còn có *NF-YB* và *NF-YC*, các tiểu đơn vị này hợp thành protein thể ba (heterotrimer protein) có hoạt tính (Mantovani, 1999). Ở cây trồng, các tiểu đơn vị *NF-Ys* được mã hóa bởi một nhóm gen có số lượng khác nhau ở mỗi loại cây trồng. Ví dụ như ở lúa, có 11 gen *NF-YA*,

11 gen *NF-YB* và 7 gen *NF-YC*; còn ở *Arabidopsis* thì có 10 gen *NF-YA*, 10 gen *NF-YB* và 10 gen *NF-YC* (Petroni và ctv., 2012). Ở lúa, 8 trong số 11 gen *NF-YA* được báo cáo là gen đích của *osa-miR169*, bao gồm *NF-YA1* đến *NF-YA6*, *NF-YA10* và *NF-YA11* (Li và ctv., 2017). Sự gia tăng biểu hiện của *OsNF-YA* giúp tăng khả năng kháng nấm, vi khuẩn (Li và ctv., 2017). Nghiên cứu cho thấy, Mô-đun *miR169/NF-YA* có vai trò khác nhau trong việc điều hòa chống lại các căng thẳng phi sinh học (abiotic stress) ở thực vật (Li và ctv., 2017). Các nghiên cứu cho thấy biểu hiện tăng *osa-miR169* làm giảm khả năng kháng nấm *M. oryzae* ở cây lúa (Dong và ctv., 2018; Li và ctv., 2017). Trên lúa, *osa-miR169* được biết đến như một phân tử điều hòa giảm khả năng miễn dịch của cây lúa đối với nấm gây bệnh đạo ôn *M. oryzae*. Tuy nhiên, cơ chế hoạt động của *osa-miR169* thì vẫn chưa được khám phá rõ ràng (Li và ctv., 2017). Thí nghiệm trên giống lúa chuyển gen có biểu hiện tăng cao *osa-miR169a* cho thấy cây lúa trở nên cực kỳ mẫn cảm với nhiều chủng nấm *M. oryzae*, đồng thời cây lúa giảm biểu hiện các gen kháng và giảm tích lũy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ngược lại, khi cho cây lúa biểu hiện gen đích giả để bắt giữ các phân tử *osa-miR169a* thì cây lúa được tăng cường khả năng kháng nấm *M. oryzae* (Li và ctv., 2017). Tóm lại, *osa-miR169* điều hòa giảm khả năng kháng nấm *M. oryzae* thông qua sự ức chế gen đích *NF-YA*.

***miR319*** là một họ miRNA có tính bảo tồn cao ở cây trồng, gen đích tấn công là *OsTCP21* (*Teosinte branched/cycloidea/proliferation cell factor 21*) gen *OsTCP21* có vai trò mã hóa cho nhân tố phiên mã điều hòa các hoạt động sinh trưởng, phát triển và miễn dịch của cây trồng (Fang và ctv., 2021; Lopez và ctv., 2015). Mô-đun *osa-miR319/TCP21* đã được báo cáo có liên quan đến việc tăng cường khả năng chống chịu với các căng thẳng phi sinh học ở lúa như: tăng khả năng chống chịu lạnh (Wang và ctv., 2014), tăng cường sản lượng lúa (Wang và ctv., 2021b). Trong điều kiện bình thường, *TCP* có vai trò tăng cường hệ thống miễn dịch ETI thông qua *TIR* (Toll/interleukin-1 receptor) và *NLR* (nucleotide-binding domain leucine-rich repeat protein). Tuy nhiên, một số sinh vật gây bệnh có thể lợi dụng *TCP* để điều khiển hệ thống miễn dịch ở cây trồng và kích hoạt hệ thống hỗ trợ effector của mầm bệnh ETS (effector-triggered susceptibility). Các nghiên cứu cho thấy, ở trên lúa sinh vật gây

bệnh có thể sử dụng mô-đun *osa-miR319/OsTCP21* để mở đường cho sự xâm nhiễm của virus gây bệnh vàng lùn xoắn lá lúa (*Rice ragged stunt virus-RRSV*) thông qua sự ức chế con đường Jasmonic acid. Biểu hiện tăng *osa-miR319* làm tăng mức độ miễn cảm với *RRSV* (Zhang và ctv., 2016a). Hoặc nấm *M. oryzae* cũng sử dụng mô-đun *osa-miR319/OsTCP21* ức chế con đường axit Jasmonic để từ đó mở đường cho sự xâm nhiễm của nấm *M. oryzae* trên lúa. Biểu hiện tăng *osa-miR319/OsTCP21* làm tăng mức độ miễn cảm của lúa với nấm *M. oryzae* (Zhang và ctv., 2018)

***miR396*** là một họ miRNA có tính bảo tồn cao, gồm có 8 biến thể, gen đích tấn công là gen *Growth regulating factor (GFR)* (Gao và ctv., 2015). *osa-miR396* điều hòa giảm khả năng kháng nấm *M. oryzae* thông qua sự kìm hãm các gen *OsGRFs* (Chandran và ctv., 2019). Tổ hợp *osa-miR396/OsGRFs* điều chỉnh sự cân bằng giữa năng suất lúa và khả năng kháng nấm *M. oryzae* (Chandran và ctv., 2019; Duan và ctv., 2015). Ở lúa, có tất cả 12 gen *OsGRFs* chia làm 3 nhóm có đặc tính tương đồng nhau là: nhóm 1 (*OsGRF1, OsGRF2, OsGRF3, OsGRF4, OsGRF5*) nhóm 2 (*OsGRF6, OsGRF7, OsGRF8, OsGRF9*) và nhóm 3 (*OsGRF10, OsGRF11, OsGRF12*). Trong 3 nhóm gen *OsGRFs*, chỉ có duy nhất nhóm 2 có biểu hiện tăng mạnh khi có sự xâm nhiễm của nấm *M. oryzae*, và nhóm 2 có vai trò tăng cường khả năng kháng nấm *M. oryzae* trên lúa (Chandran và ctv., 2019).

Các nghiên cứu cho thấy, *osa-miR7695* có vai trò điều hòa tăng khả năng kháng nấm *M. oryzae* ở lúa thông qua sự ức chế gen *OsNramp6* (Campo và ctv., 2013). Sau đây, tác giả xin trình bày về vai trò và chức năng của gen *OsNramp6* tham gia trong quá trình điều hòa cây lúa chống chịu lại nấm gây bệnh đạo ôn, *Magnaporthe oryzae*.

### 1.5. Vai trò và chức năng của gen *OsNramp6*

Ở cây trồng, các ion kim loại được vận chuyển bởi các protein vận chuyển nằm trên màng tế bào, bao gồm các họ protein vận chuyển như P1B-ATPase, NRAMP, CDF, và ZIP (Maestri và ctv., 2010). Các protein vận chuyển nằm trên màng plasma đóng vai trò vận chuyển và điều hòa lượng ion kim loại ở cây trồng (Komal và ctv.,

2015). Trong số các họ protein vận chuyển kể trên thì họ protein NRAMP được phát hiện có vai trò trong việc điều hòa cây lúa kháng lại nấm *M. oryzae* (Campo và ctv., 2013).

Các protein NRAMP được phát hiện đầu tiên ở đại thực bào của chuột (Vidal và ctv., 1993), sau đó chúng được phát hiện ở vi khuẩn, nấm men, tảo, nấm mốc, cây trồng, và động vật (Nevo và Nelson, 2006). Các thành viên trong họ protein NRAMP có vai trò trong việc vận chuyển các ion  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , và  $Al^{3+}$  (Sasaki và ctv., 2012). Chức năng vận chuyển ion kim loại của protein NRAMP được bảo tồn ở tất cả các giới (Peris-Peris và ctv., 2017). Các nghiên cứu về chức năng của gen *Nramp* hầu hết được tiến hành trên cây lúa (*Oryza sativa*) và cây *Arabidopsis*. Có tổng cộng 6 gen *Nramp* ở *Arabidopsis* và 8 gen *Nramp* ở lúa (Belouchi và ctv., 1997; Thomine và ctv., 2000). Trong đó, *AtNramp1* và (*OsNramp1*, *OsNramp3*) có sự tương đồng, đóng vai trò trong việc điều hòa nồng độ sắt ở cây *Arabidopsis* và lúa (Curie và ctv., 2000). *AtNramp3* và *AtNramp4* đóng vai trò trong việc điều khiển sự cân bằng nồng độ  $Mn^{2+}$  (Lanquar và ctv., 2010), ngoài ra khi tăng biểu hiện *AtNramp3* dẫn đến sự nhạy cảm với  $Cd^{2+}$  ở rễ và tăng cường sự tích lũy sắt (Thomine và ctv., 2003). *AtNRAMP5* đóng vai trò trong việc vận chuyển  $Fe^{2+}$  và  $Mn^{2+}$  tham gia vào khả năng hữu thụ ở *Arabidopsis thaliana* (Pottier và ctv., 2013). *AtNramp6* đóng vai trò trong vận chuyển  $Cd^{2+}$  và khi *AtNramp6* biểu hiện tăng sẽ dẫn đến tăng cường mức độ mẫn cảm với  $Cd^{2+}$  ở *Arabidopsis thaliana* (Cailliatte và ctv., 2009).

Ở lúa, có tất cả 8 gen *Nramps* mã hóa tạo ra 8 protein NRAMPs, được đánh số thứ tự từ *OsNRAMP1* đến *OsNRAMP8* (Gross và ctv., 2003), các protein *OsNRAMPs* này cũng đóng vai trò trong việc vận chuyển, cân bằng các ion kim loại ở cây lúa *Oryza sativa*. Trong đó, *OsNRAMP1* đóng vai trò trong việc vận chuyển  $Fe^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  và Asen nhưng không vận chuyển  $Mn^{2+}$  (Tiwari và ctv., 2014). Gen *OsNramp1* chủ yếu được biểu hiện ở rễ, còn *OsNramp2* được biểu hiện ở lá, *OsNramp3* được biểu hiện ở cả lá và rễ (Belouchi và ctv., 1997). Nghiên cứu gần đây cho thấy protein *OsNRAMP2* được kích thích chủ yếu ở trong chồi khi nồng độ Cadmium tích lũy cao



(Zhao và ctv., 2018). Khác với protein OsNRAMP1 không có chức năng vận chuyển  $Mn^{2+}$ , protein OsNRAMP3 có thể vận chuyển được  $Mn^{2+}$  và phân phối trong các bó mạch, đặc biệt là tế bào mạch rây (Yang và ctv., 2013). Hầu hết các protein OsNRAMP vận chuyển ion hóa trị 2, chỉ riêng protein OsNRAMP4 là có chức năng vận chuyển được  $Al^{3+}$ , ion 3 hóa trị (Peris-Peris và ctv., 2017). Protein OsNRAMP5 có chức năng vận chuyển  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  và  $Cd^{2+}$  (Ishimaru và ctv., 2012). Protein OsNRAMP6 có vai trò tương tự protein OsNRAMP5 là vận chuyển  $Fe^{2+}$  và  $Mn^{2+}$ . Các nghiên cứu gần đây cho thấy gen *OsNramp6* còn đóng vai trò trong việc điều hòa cây lúa (*Oryza sativa*) chống lại nấm *M. oryzae* (Campo và ctv., 2013; Peris-Peris và ctv., 2017).

Sau quá trình cắt nối thay thế (alternative splicing) gen *OsNramp6* tạo ra 8 biến thể phiên mã khác nhau (08 transcript variants) được đánh số thứ tự từ 1 đến 8 (*OsNramp6.1* đến *OsNramp6.8*). Trong đó, đoạn dài nhất được ký hiệu là *l-Nramp6* (*Os01g31870.1*) chứa đầy đủ trình tự của gen *Nramp6* và đoạn ngắn nhất được ký hiệu là *s-Nramp6* (*Os01g31870.8*) do thiếu đoạn intron 6 (Peris-Peris và ctv., 2017). Ở lúa, gen *OsNramp6* đóng vai trò trong việc cân bằng nồng độ  $Fe^{2+}$ . Khi gen *OsNramp6* biểu hiện tăng thì dẫn đến khả năng kháng nấm *M. oryzae* giảm (Campo và ctv., 2013). Giữa gen *OsNramp6* và *osa-miR7695* có sự tương tác với nhau, cụ thể là *osa-miR7695* ức chế sự biểu hiện của gen *OsNramp6* dẫn đến khi *osa-miR7695* biểu hiện tăng thì cây lúa cũng tăng cường khả năng kháng lại nấm *M. oryzae* thông qua sự ức chế gen *OsNramp6* (Campo và ctv., 2013). Trong nghiên cứu của Campo và ctv., 2013) cho rằng chỉ có duy nhất biến thể có chiều dài ngắn nhất *s-Nramp6* (*OsNramp6.8*) chứa trình tự bổ sung với tiền phân tử *osa-miR7695* (*osa-miR7695* precursor) đồng thời mức độ tích lũy của *s-Nramp6* cũng giảm khi *osa-miR7695* tăng biểu hiện.

## Chương 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nội dung nghiên cứu

Đánh giá khả năng chống chịu hoặc mẫn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn (*Magnaporthe oryzae*) trên 19 giống lúa trồng ở Việt Nam.

Xác định sự hiện diện và phân tích mức độ biểu hiện của một số phân tử microRNA (*osa-miR7695*, *osa-miR169a*, *osa-miR160a*) trên các giống lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm *M. oryzae*.

Đánh giá mức độ biểu hiện của các biến thể phiên mã (transcripts) *OsNramp6* trên các nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm với nấm *M. oryzae*.

Tìm hiểu mối liên hệ giữa các biến thể phiên mã *OsNramp6* và một số microRNAs liên quan đến khả năng kháng với nấm gây bệnh đạo ôn, *M. oryzae*.

### 2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 10 năm 2015 đến tháng 10 năm 2020 tại Viện Công Nghệ Sinh Học và Môi Trường, Trường Đại Học Nông Lâm TP.Hồ Chí Minh.

Các giống lúa thí nghiệm được thu thập ở các Viện, công ty, vùng trồng lúa ở các tỉnh thuộc Việt Nam. Các giống lúa thí nghiệm được trồng tại nhà lưới Trường Đại Học Nông Lâm TP.Hồ Chí Minh.

Nghiên cứu mức độ biểu hiện của các phân tử microRNAs và các biến thể *OsNramp6* được thực hiện tại phòng thí nghiệm thuộc Viện Công Nghệ Sinh Học và Môi Trường, Trường Đại Học Nông Lâm TP.Hồ Chí Minh.

### 2.3. Vật liệu nghiên cứu

19 giống lúa thu thập được ở các vùng trồng lúa thuộc các tỉnh miền Bắc, miền Trung, miền Nam Việt Nam (**Bảng 2.1**)

Nguồn mẫu nấm gây bệnh đạo ôn *M. oryzae* LBT2 được lấy từ bộ sưu tập mẫu nấm gây bệnh đạo ôn *M. oryzae* tự phân lập (Hòa và ctv., 2016) được thu thập ở

các vùng trồng lúa thuộc các tỉnh thành miền Bắc, miền Trung và miền Nam Việt Nam.

Môi Trường nuôi cấy nấm *M. oryzae*:

+ Môi trường CM (môi trường tăng sinh nấm *M. oryzae*) 1,5g casamino acid 0,3%; 1,5g cao nấm men 0,3%; 2,5g đường sucrose 0,5%; pha trong 500ml nước cất.

+ Môi trường OMA (oat meal agar) (môi trường phát triển bào tử nấm *M. oryzae*) Bột yến mạch 25g; đường sucrose 15g; Agar 20g; nước cất đến 1000ml.

+ Môi trường tổng hợp PDA (Potato dextrose agar) (Môi trường cho sự phát triển của nấm *M. oryzae*) (Himedia-Ấn Độ) bột lỏng khoai tây 200 g/l, Dextrose 20 g/l, Agar 15 g/l, pH 5.6.

DNA lý trích từ các mẫu nấm *M. oryzae* và được sử dụng để định danh nấm *M. oryzae* bằng kỹ thuật PCR với primer Pot2 transposon (Pot2-F: 5' CGTCACACGTTCTTCAACC 3' và Pot2-R: 5' CGTTTCACGCTTCTCCG 3') (Harmon và ctv, 2003).

RNA tổng được lý trích theo phương pháp Trizol từ cây lúa 14 ngày tuổi ở các thời điểm 24h, 48h, 72h sau khi cho nhiễm nấm *M. oryzae*.

Hóa chất sử dụng cho kỹ thuật qRT-PCR: SensiFAST SYBR No-ROX mix (Bioline, UK), DNase I-RNase free (ThermoFisher, USA), các đoạn primer phiên mã ngược, các đoạn primer cho phân tích biểu hiện *osa-miR7695*, *OsNramp6*, *osa-miR169a*, *osa-miR160a*, EDTA 0.5M, TransAmp Buffer, Reverse Transcriptase. Hóa chất để điện di sản phẩm PCR: agarose (Promega, Mỹ), TBE bufer 1X (Promega, Mỹ), ladder 100 bp, 1kb (Promega, Mỹ). Hóa chất để thực hiện tổng hợp cDNA: RNA tổng số, ProtoScript II reaction Mix 10X và 20X. Hóa chất để thực hiện qPCR: Mastermix (Gotag), đoạn primer, cDNA, nước tinh khiết không RNAase.

Các thiết bị: Kính hiển vi, nồi hấp khử trùng (Tommy – Nhật Bản), cân điện tử (Ohaus – Trung Quốc), bếp điện, tủ cấy (Thiên Trường Scientific – Việt Nam), tủ

mát, tủ lạnh -20 °C, tủ sấy ( Boxun – Trung Quốc), máy vortex (EMCLAB – Đức), máy lắc (Stuart Scientific – Anh), máy PCR (Eppendorf – Đức), máy ly tâm (Beckman Coulter – Mỹ), bồn điện di (Advance – Nhật Bản), máy chụp gel (MultiDoc – It – Mỹ), lò vi sóng (Electrolux – Nhật Bản), khay đồ gel (OPTIMA, Nhật), đèn Blacklight.

Dụng cụ và vật tư tiêu hao khác: đèn cồn, que cấy tam giác, que cấy móc, kim mũi mác, lame, lammele, đĩa Petri, bình tam giác, becher, bình cầu, nước cất 2 lần, cốc thủy tinh, giấy thấm nước, micropipette và đầu tube các loại.

**Bảng 2.1.** Danh sách giống lúa sử dụng trong thí nghiệm.

STT	Giống lúa	Đặc điểm	Vị trí thu nhận (Huyện, Tỉnh)
1	ST5	Gạo thơm	Trần Đề, Sóc Trăng
2	Caroline gold	Gạo hạt dài	Hoa Kỳ
3	RVT	Fragrant rice	Cần Đức, Long An
4	OM8017	Giống lúa thuần (OM5472 / Jasmin85)	Long Mỹ, Hậu Giang
5	OM5451	Giống lúa thuần (Jasmine 85 / OM 2490)	Vũng Liêm, Vĩnh Long
6	IR50404	Gạo chuẩn	IRRI
7	OM2517	Gạo lai (OM1325 / OMCS94)	Phụng Hiệp, Hậu Giang
8	OM6162	Giống lúa thuần (C50 / Jasmine85)	Thanh Phú, Kiên Giang
9	OM9582	Giống lúa thuần (OM6976 / OM5166)	Tam Nông, Đồng Tháp
10	OM9921	Giống lúa thuần (OM2517 / Ròng)	Khánh Bình, Cà

		xanh // Lúa dài 72)	Mau
11	Nang Hoa 9	Giống lúa cao sản	Tân An, Long An
12	Jasmine85	Giống lúa thơm cao sản	IRRI
13	OM4900	Giống lúa thuần (C53 / Jasmine85)	Tri Tôn, An Giang
14	OM576	Giống lúa thuần (Hunggary / IR48)	Long Xuyên, An Giang
15	OM7347	Giống lúa thuần (KDM / BL)	Vĩnh Lợi, Bạc Liêu
16	BC15	Giống lúa cao sản	Công ty giống Thái Bình.
17	OM344	Giống lúa chất lượng cao (CK2003 / OM2008)	Long Mỹ, Hậu Giang
18	OM4218	Giống lúa thuần (OM 2031 / MTL250)	Châu Phú, An Giang
19	OM6976	Giống lúa thuần (IR68144 / OM997 // OM2718 /// OM2868)	Châu Phú, An Giang
20	MH480	Giống lúa lai	Đồng bằng sông Cửu Long

## 2.4. Phương pháp nghiên cứu

### 2.4.1. Phương pháp xác định và đánh giá khả năng chống chịu với nấm *M. oryzae* trên các giống lúa thí nghiệm.

Các giống lúa (**Bảng 2.1**) được thu thập là các giống lúa lai được trồng ở các vùng trồng lúa đang canh tác thuộc các tỉnh thành ở miền nam Việt Nam. Các giống được chọn theo tiêu chí sát với thực tế, là các giống lúa đang được canh tác và không chọn các giống lúa thuần. Các giống lúa được tác động bởi tác nhân gây stress (nấm gây bệnh đạo ôn) để từ đó đánh giá mức độ biểu hiện của microRNA (*osa-miR7695*, *osa-miR169a*, *osa-miR160a*) và các biến thể *OsNramp6* ở các thời điểm sau lây nhiễm

khác nhau. Việc phân biệt mức độ kháng nấm *M. oryzae* bằng cách đo mức độ nhiễm bằng phần mềm Access 2.0 (Lamari, 2008). Phần mềm Access 2.0 đã được ứng dụng trong việc phân biệt và chẩn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn (Campos-Soriano và ctv., 2020). Trong đó, các giống lúa chống chịu mạnh có mức độ nhiễm dưới 25% (Phansak và ctv., 2021).

Thí nghiệm đơn yếu tố được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại tương ứng 3 chậu cho mỗi nghiệm thức đánh giá. Hạt giống của mỗi nghiệm thức được khử trùng trước khi nảy mầm bằng cách lắc qua dung dịch Ethanol 70% trong 5 phút, rửa lại với nước cất 3 lần, tiếp đến khử trùng bằng Javel 1% trong 60 giây và tiếp tục rửa sạch bằng nước cất tiệt trùng. Sau đó, các hạt giống lúa được ngâm trong đĩa petri trong 36 giờ và ủ ẩm trong 48 giờ để các hạt giống nảy mầm và được gieo vào các chậu nhựa kích thước 18-14 cm (tương ứng chiều cao-ngang) với mỗi chậu 5 hạt. Các giống lúa được trồng thành cây con 14 ngày tuổi trong nhà lưới của phòng thí nghiệm RIBE302- 304, Viện nghiên cứu Công nghệ sinh học và môi trường, Trường Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh trước khi chủng bệnh theo quy trình của Campo và ctv. (2013).

Trong nghiên cứu này, các mẫu nấm gây bệnh đạo ôn được phân lập từ các mẫu lá lúa nhiễm bệnh đạo ôn tại Đồng Nai, Tiền Giang, sau đó được định danh loài và kiểm tra tính chuyên biệt bằng primer Pot2 transposon theo phương pháp đã được mô tả trước đây (Harmon và ctv., 2003). Những mẫu nấm gây bệnh đạo ôn được kích bào tử trong môi trường oat meal agar ở nhiệt độ 25 °C trong thời gian 6 ngày. Các sợi nấm sẽ được loại bỏ bằng cách chà xát trên bề mặt môi trường nuôi cấy bằng thanh bông gòn tiệt trùng và giữ mẫu ở nhiệt độ 25 °C trong hai ngày dưới đèn UV chuyên biệt. Bào tử sẽ được thu hồi bằng cách thêm nước cất vào môi trường nuôi cấy, chà xát trên bề mặt bằng thanh bông gòn tiệt trùng, lọc bằng giấy kimwipe và đếm trên buồng đếm tế bào hồng cầu dưới kính hiển vi. Mẫu nấm sẽ được nuôi cấy trong 100 ml môi trường CM lỏng (0,3% casamino acids, 0,3% yeast extract, 0,5% sucrose) ở 26 °C cho việc chiết xuất DNA tổng số theo hướng dẫn của kit GeneJET

Plant Genomic DNA purification và thực hiện phản ứng PCR để định danh bằng primer Pot2 transposon (**Phụ lục 2.1**).

Để chuẩn bị cho dung dịch huyền phù bào tử nấm gây bệnh đạo ôn, mẫu nấm phân lập *M. oryzae* LBT2 được lấy từ bộ sưu tập giống nấm gây bệnh đạo ôn *M. oryzae* (Hòa và ctv., 2016) nuôi cấy trên đĩa petri chứa môi trường oatmeal agar (25 g oatmeal, 15 g sucrose, 20 g agar, 1000 ml nước cất) trong 2 tuần. Tiếp đó, chuyển đĩa petri vào tối, chiếu đèn Blacklight tạo UV trong thời gian 2-3 ngày ở 25 °C để kích thích bào tử nảy mầm. Sau đó, bào tử *M. oryzae* LBT2 được phân lập, quan sát dưới kính hiển vi quang học và đếm số lượng bằng buồng đếm tế bào hồng cầu (Hemocytometer). Tiếp theo, bào tử nấm *M. oryzae* LBT2 được pha loãng ở nồng độ  $1 \times 10^5$  -  $5 \times 10^5$  bào tử/ml và trộn với dung dịch Tween20 0.1%, sau đó phun sương dung dịch bào tử này lên lá lúa 14 ngày tuổi của 19 giống lúa (**Bảng 2.1**).

Lá lúa sau khi phun bào tử nấm *M. oryzae* sẽ được đưa vào trong tối, ẩm ở nhiệt độ 25 °C để qua đêm và sau đó đưa ra nhà lưới. Theo dõi và ghi nhận kết quả mỗi nghiệm thức 5 cây cho một lần lặp lại và theo dõi lá thứ hai từ lá thành thực trên cùng. Vùng lá bị nhiễm của 19 giống lúa được thu thập ở các thời điểm 24h, 48h, và 72h sau khi nhiễm (hour post inoculation - hpi). Các mẫu lá được trữ lạnh và ly trích để thu thập RNA tổng. Sau 5-7 ngày, các mẫu lá lúa nhiễm nấm *M. oryzae* được thu thập 3 lá cho một cây lúa (lặp lại 5 cây cho mỗi nghiệm thức) và đánh giá mức độ nhiễm bằng phần mềm Assess 2.0 (APS Press, USA) (Lamari, 2008) để so sánh mức độ nhiễm theo công thức:

$$[\text{Mức độ nhiễm (\%)} = (\text{diện tích nhiễm} / \text{diện tích lá}) * 100].$$

#### **2.4.2. Phương pháp chiết xuất RNA.**

RNA tổng (bao gồm miRNA) của mẫu lá nhiễm bệnh ở các thời điểm khác nhau được chiết xuất bằng Trizol, trong môi trường vô trùng và không có RNAase, theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Thermo Fisher Scientific, USA). Quy trình tiến hành như sau: 1 g mẫu lá được nghiền với nitơ lỏng sau đó thêm 1 ml Trizol và giữ 10 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp đó, cho thêm 200  $\mu$ L chloroform (giữ lạnh) vào và ly

tâm ở tốc độ 10.000 rpm trong 10 phút. Dịch nổi được chuyển vào ống eppendorf 1.5ml, sau đó thêm 600  $\mu$ l isopropanol và cho kết tủa ở nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$  để qua đêm. Ngày tiếp theo, lấy hỗn dịch đem đi ly tâm 20 phút ở tốc độ 10.000 vòng/phút và lấy phần kết tủa đem đi rửa với diethyl pyrocarbonate (DEPC) ethanol 2 lần và để khô trong chân không. Cuối cùng, phần kết tủa được hòa tan với 100  $\mu$ L nước không có nuclease. Đo nồng độ và mức độ tinh khiết của RNA bằng máy NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Tất cả các mẫu RNA được xử lý với DNase I, Amplification Grade (Invitrogen, USA) để loại bỏ các phân tử DNA tồn dư. Quy trình xử lý với DNase I như sau: 1  $\mu$ g RNA tổng được hòa tan với buffer DNase I 1X để cho ra dung tích là 50  $\mu$ L, tiếp đó thêm DNase (200 U/ml) và ủ ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong 10 phút. Cuối cùng, để bất hoạt phản ứng, EDTA 0.5 M được thêm vào và ủ ở  $75^{\circ}\text{C}$  trong 10 phút (**Phụ lục 2**).

#### **2.4.3. Phương pháp xác định sự hiện diện của phân tử *osa-miR7695* trên các giống lúa thí nghiệm.**

Kỹ thuật nested RT-PCR được sử dụng để xác định sự hiện diện của *osa-miR7695* ở 19 giống lúa với các đoạn primer đặc hiệu (Campo và ctv., 2013) (**Hình 2.1**) (**Bảng 2.2**). Quy trình được tiến hành như sau: RNA tổng (Total RNA) được phiên mã ngược thành cDNA bằng kit SensiFAST cDNA Synthesis (Bioline, UK) (Quoc và ctv., 2019) (**Phụ lục 3**). Sản phẩm sau khi chạy RT-PCR của *osa-miR7695* được nhân dòng (clone) vào trong vector *pJET1.2* và chuyển vào tế bào *E.coli DH5 $\alpha$*  bằng phương pháp sốc nhiệt (Thermo Fisher Scientific, USA). Phương pháp này được tiến hành như sau: một khuẩn lạc đơn *E.coli DH5 $\alpha$*  duy nhất thu hồi từ đĩa thạch được nuôi cấy trong 1 ml môi trường LB và ủ trong tủ ủ lắc có tốc độ 200 rpm ở nhiệt độ  $37^{\circ}\text{C}$  trong 12-16 giờ. Tiếp đến bổ sung 99 ml môi trường LB và tiếp tục ủ lắc trong 3 - 4 giờ cho đến khi đo mật độ quang của mẫu ở bước sóng 600 nm đạt 0.4. Dịch nuôi cấy tế bào được đặt trên đá trong 20 phút sau đó li tâm lạnh ở  $4^{\circ}\text{C}$ , 4000 rpm trong 10 phút và loại bỏ phần môi trường nuôi cấy. Sinh khối tế bào sau li tâm được tái huyền phù trong 20 ml  $\text{CaCl}_2$  0,1M lạnh trong 30 phút sau đó tiếp tục li tâm lạnh ở  $4^{\circ}\text{C}$ , 4000 rpm trong 10 phút, loại bỏ phần dịch nổi và tái huyền phù trong 5 ml



hỗn hợp  $\text{CaCl}_2$  0,1M + 15% glycerol, trữ trong tủ âm sâu  $-80^\circ\text{C}$  chuẩn bị cho phản ứng sốc nhiệt. Ở giai đoạn sốc nhiệt, các tế bào được làm tan băng, bổ sung 1-5  $\mu\text{l}$  (10 pg – 100 ng) plasmid và ủ trên đá trong 30 phút. Sau đó chuyển hỗn hợp (tế bào – plasmid) sang bể ủ nhiệt ở  $42^\circ\text{C}$  trong 30 giây và đặt trên đá trong 2 phút. Tiếp đó bổ sung 1ml môi trường SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) đã được làm ấm và đặt trong tủ ủ lắ ở  $37^\circ\text{C}$ , 200 rpm trong 1 giờ. Sau đó cấy trải dịch nuôi cấy với độ pha loãng 1:10 và 1:100 trong môi trường chọn lọc LB có chứa ampicillin ở nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$  trong 16 giờ. Đoạn DNA pUC19 được dùng làm đối chứng dương cho quá trình cloning. Những dòng dương tính (positive clones) được chọn lựa và kiểm tra bằng phương pháp PCR với đoạn primer *LpJET1.2F* (5'CTGCTTTAACAACCTTGTGCCTGA 3') và *LpJET1.2R* (5'TTCCTGATGAGGTGGTTAGCAT 3'). Các đoạn chèn được giải trình tự tại công ty First Base, Malaysia. So sánh trình tự của các đoạn chèn bằng phần mềm BLAST với cơ sở dữ liệu miRBase (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

**Bảng 2. 2.** Trình tự đoạn primer sử dụng trong phương pháp Nested RT-PCR

Đoạn primer	Trình tự	Tài liệu tham khảo
P1	5' CACCGCCTGTAAAGAGGAGATGT 3'	(Campo và ctv., 2013)
P2	5' CGTTTTTGGGGTCACTACTGGA 3'	
P3	5' GAGTAAAATGCACTAGCGGTCCT 3'	
P4	5' GAGTAAAATACACCAGCGGTTCT 3'	
<i>OsUbi1-F</i>	5' CACCTTGGCTGACTACAACATCCA 3'	
<i>OsUbi1-R</i>	5' TGCTTACCAGCAAAGATCAGACGC 3'	



**2.4.4. Phương pháp xác định sự biểu hiện của phân tử *osa-miR7695*, *osa-miR169a*, *osa-miR160a* và *OsNramp6* trên các giống lúa chống chịu và miễn cảm.**

Mức độ biểu hiện của phân tử *osa-miR7695*, *osa-miR169a*, *osa-miR160a* và phân tử *OsNramp6.4* được đánh giá bằng phương pháp real-time quantitative PCR (qPCR) với kit SensiFAST SYBR No-ROX (Bioline, UK) (**Phụ lục 4**). Trình tự các primer sử dụng cho phản ứng qPCR được thể hiện trong **Bảng 2.3**. Phản ứng Real-time PCR được thực hiện bằng thiết bị Mygo Pro (IT-IS Life Science Ltd, UK) ở chu trình như sau: biến tính ban đầu 95 °C trong 2 phút, 40 chu kỳ bao gồm (biến tính 95 °C trong 10s, bắt cặp ở 65 °C trong 10s, kéo dài ở 72 °C trong 20s) và bảo quản sản phẩm lạnh ở nhiệt độ 10°C. Gen *OsUbi1* được sử dụng làm đối chứng nội như mô tả trong nghiên cứu trước đây (Campo và ctv., 2013). So sánh tương đối mức độ biểu hiện của *osa-miR7695*, *osa-miR169a*, *osa-miR160a* và *OsNramp6.4* được ước lượng bằng phương pháp  $2^{-\Delta Ct}$ . Giá trị chu kỳ ngưỡng (threshold cycle – Ct) là con số chu kỳ mà ở đó giá trị Ct tương quan ngược với nồng độ mẫu ban đầu. Điều đó có nghĩa là mẫu có nồng độ DNA ban đầu thấp thì sẽ có số chu kỳ cao, tức là Ct cao. Tương tự, mẫu với nồng độ ban đầu cao thì cần số chu kỳ thấp, tức là giá trị Ct thấp. Mức độ biểu hiện có thể được đánh giá bằng giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  với  $\Delta Ct = C_T$  của mẫu –  $C_T$  của *OsUbi1*. Mỗi phản ứng được lặp lại 3 lần và ghi nhận dữ liệu bằng công thức : trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (Standard deviation - SD).

**Bảng 2.3.** Trình tự đoạn primer sử dụng trong phản ứng Real-time PCR (*osa-miR7695*).

Tên đoạn primer	Trình tự	Tài liệu tham khảo
qPCR- <i>OsUbi1</i> -F	5' CACCTTGGCTGACTACAACATCCA 3'	(Campo và ctv., 2013)
qPCR- <i>OsUbi1</i> -R	5' TGCTTACCAGCAAAGATCAGACGC 3'	
<i>OsNramp6.4</i> - F	5' ACATGTGGGTCCAAGCTCAAC 3'	

<i>OsNramp6.4</i> - R	5' GAGTGCTTATTTGCCCTTGGC 3'	
<i>Osa-miR7695</i> -F	5' CGCGGATCCCACCGCCTGTAAAGAG GAGATGT 3'	Trong nghiên cứu này
<i>Osa-miR7695</i> -R	5' CGCCCCGGGCGTTTTTGGGGTCACTACT GGA 3'	
<i>Osa-miR169a</i> - F	5' ACAGGTACCTGATTCGCTGACGATGCACAG 3'	
<i>Osa-miR169a</i> - R	5' ACAGTCGACTGAATTGAATTTGGAAGGCC TG 3'	
<i>osa-miR160a</i> -F	5'GTGCCTGGCTCCCTGTATG3'	
<i>osa-miR160a</i> -R	5'TTGCACGCCACCCAGTAG3'	

#### 2.4.5. Phương pháp xác định sự biểu hiện của các biến thể phiên mã *OsNramp6*

Để nhận biết sự biểu hiện của các biến thể phiên mã *OsNramp6* ở nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm *M. oryzae*, kỹ thuật real-time PCR được sử dụng với chiết xuất lá lúa bị nhiễm *M. oryzae* ở các thời điểm khác nhau (24 hpi, 48 hpi, 72 hpi). Phương pháp tiến hành tương tự như phương pháp xác định sự biểu hiện của phân tử *osa-miR7695* (phía trên) với các đoạn primer được thiết kế đặc hiệu cho các biến thể phiên mã *OsNramp6* (**Bảng 2.4**). Trước khi tiến hành phân tích biểu hiện của các biến thể phiên mã *OsNramp6*, các đoạn primer đặc hiệu được thiết kế dựa trên các trình tự vùng mã hóa CDS thu được từ ngân hàng Genbank. Trong đó *OsNramp6* có 8 biến thể phiên mã lần lượt là *LOC\_Os01g31870.1*, *LOC\_Os01g31870.2*, *LOC\_Os01g31870.3*, *LOC\_Os01g31870.4*, *LOC\_Os01g31870.5*, *LOC\_Os01g31870.6*, *LOC\_Os01g31870.7*, *LOC\_Os01g31870.8*. Sau khi tiến hành giống hàng các đoạn trình tự biến thể này với

trình tự tham chiếu của *OsNramp6* để xác định các đoạn trình tự chuyên biệt cho mỗi biến thể phiên mã. Hai biến thể *LOC\_Os01g31870.2*, *LOC\_Os01g31870.3* có chung một đoạn trình tự chuyên biệt và ba biến thể *LOC\_Os01g31870.5*, *LOC\_Os01g31870.6*, *LOC\_Os01g31870.7* cũng có chung một đoạn trình tự chuyên biệt nên được lựa chọn để xây dựng cặp primer phát hiện chung cho các biến thể này lần lượt là *OsNramp6.23* và *OsNramp6.567*. Các biến thể còn lại *OsNramp6.1*, *OsNramp6.4*, *OsNramp6.8* được thiết kế chuyên biệt dựa trên các trình tự đã phát hiện. Các đoạn primer qPCR chuyên biệt trên được xây dựng trên phần mềm Primer3 dựa trên sự bắt cặp của các liên kết hydro với SYBR.

**Bảng 2.4.** Danh sách trình tự các đoạn primer cho phản ứng Real time PCR để xác định sự biểu hiện của các biến thể phiên mã *OsNramp6*.

Tên đoạn Primer	Trình tự	Tài liệu tham khảo
qPCR- <i>OsUbi1</i> -F qPCR- <i>OsUbi1</i> -R	5' CACCTTGGCTGACTACAACATCCA 3' 5' TGCTTACCAGCAAAGATCAGACGC 3'	Campo và ctv., 2013
<i>OsNramp6.1</i> -F <i>OsNramp6.1</i> -R	5' GCAGCCTATATTGCTGCTCTG 3' 5' AATCTCACCCAGAAACTGAATTGG 3'	Trong nghiên cứu này.
<i>OsNramp6.23</i> -F	5' CCATCGCATACTTGATCCT 3'	
<i>OsNramp6.23</i> -R	5' CCCAAATAGGAGTACCCATAGC 3'	
<i>OsNramp6.04</i> -F <i>OsNramp6.04</i> -R	5' TCTCCGGAATGAGAAAGTGC 3' 5' AAGTACCACCAATGCTGCAA 3'	
<i>OsNramp6.567</i> -F	5' AACTGTGTATGGTGTGGCCTTA 3'	
<i>OsNramp6.567</i> -R	5' AAATGTACCTGCATGATGTATTGG 3'	
<i>OsNramp6.8</i> -F	5' GCTACTCCACATCCCTTTCTG 3'	
<i>OsNramp6.8</i> -R	5' GCAGAGAAAATTCTTACCCATA 3'	

#### 2.4.6. Phương pháp xác định microRNA tiềm năng

Trình tự của các biến thể phiên mã của gen *OsNramp6* được thu nhận từ ngân hàng Genbank dưới định dạng FASTA. Các trình tự này được đưa vào phần mềm psRNATarget V2 (<http://plantgrn.noble.org>) với mức độ giới hạn trên (1000miB) để nhận diện các microRNA ở lúa có sự bắt cặp tương đồng với vùng 5'UTR của các biến thể phiên mã của gen *OsNramp6*, sử dụng giản đồ ghi điểm có sẵn (predefined scoring schema) kết hợp với dữ liệu của miRBase (Dai và ctv., 2018).

#### 2.4.7. Phương pháp phân tích thống kê

Số liệu được phân tích thống kê so sánh đa biến với phương pháp Tukey's test. Kiểm tra sự khác biệt giữa giống lúa chống chịu và mẫn cảm bằng phương pháp kiểm định giả thuyết t test và bác bỏ giả thuyết  $H_0$  ở mức độ ý nghĩa thống kê  $P \leq 0,05$ . Tất cả thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Mức độ đặc hiệu, độ nhạy của giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  (*osa-miR7695*, *osa-miR169a*, *OsNramp6*) khi so sánh giữa nhóm chống chịu và nhóm mẫn cảm, được xác định dựa trên phương pháp phân tích đường cong ROC (Receiver Operating Characteristic) (Fawcett, 2006). Phương pháp phân tích đường cong ROC đã được sử dụng khá nhiều trong các nghiên cứu ở rất nhiều lĩnh vực như: hàng không, giáo dục, nông nghiệp và đặc biệt là y khoa (Obuchowski và Bullen, 2018). Phương pháp ROC xác định mức độ đặc hiệu và độ nhạy dựa trên tỷ lệ dương tính giả và tỷ lệ âm tính giả (Fawcett, 2006). Dựa trên phương trình hồi quy logistic, phương pháp ROC xây dựng được đường cong ROC, trong đó mức độ đặc hiệu và độ nhạy được xác định bằng giá trị bên dưới đường cong ROC, area under the curve (AUC). Giá trị AUC dao động từ 0,5 đến 1, tương ứng với độ nhạy và độ đặc hiệu dao động từ thấp (0,5) đến cao (1) (Fawcett, 2006). Phương pháp phân tích ROC được tính toán phần mềm dựa trên nền web (<http://www.rad.jhmi.edu/jeng/javarad/roc/JROCFITi.html>) hoặc phần mềm Graphpad Prism 8.4.3 (Graphpad software, Inc., San Diego, CA).

Số liệu của các thí nghiệm được tính toán và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và phần mềm Graphpad Prism 8.4.3 (Graphpad software, Inc., San Diego, CA).

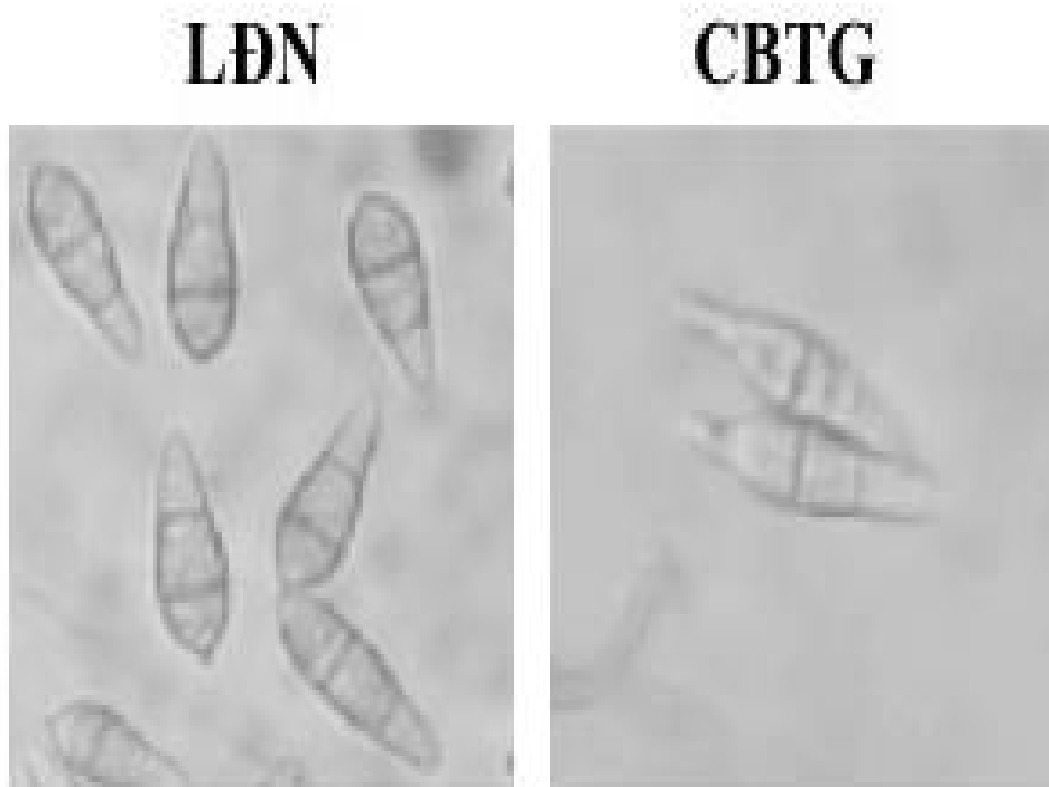
### Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Xác định nấm *M. oryzae* trên các giống lúa bằng phương pháp PCR.

Từ các nguồn mẫu lúa biểu hiện nhiễm bệnh đạo ôn, ít nhất 7 mẫu nấm bệnh bao gồm 4 mẫu phân lập từ lá và 3 mẫu phân lập từ cỏ bông được sử dụng để tiến hành quan sát đặc điểm hình thái cấu trúc xâm nhiễm chuyên biệt của nấm *M. oryzae*. Để đánh giá khả năng gây bệnh của các mẫu nấm nghiên cứu thì việc đánh giá khả năng hình thành các cấu trúc xâm nhiễm của nấm gây bệnh đạo ôn bao gồm số lượng bào tử, tỉ lệ nảy mầm và hình thành giác bám là những yếu tố quan trọng cần xác định cho mục đích đánh giá khả năng gây bệnh của nấm *M. oryzae* trên cây lúa. Trong thí nghiệm này hình thái bào tử của tất cả các mẫu nấm phân lập được quan sát sau khi cấy nấm trên môi trường OMA (oat meal agar) và được kích thích hình thành bào tử dưới bước sóng khoảng 300-400 nm của đèn UV. Kết quả nghiên cứu cho thấy có nhiều hình dạng bào tử khác nhau từ các mẫu nấm phân lập được. Sự đa dạng hình thái bào tử này là do lá nhiễm bệnh đạo ôn không chỉ có sự hiện diện của *M. oryzae* mà còn nhiều nấm gây bệnh khác có triệu chứng gây bệnh trên lúa giống như đạo ôn như *Curvularia luneta*, *Bipolaris oryzae*. Tuy nhiên, ít nhất hai mẫu nấm trong đó một mẫu phân lập từ lá nhiễm tại Đồng Nai (LĐN) và cỏ bông nhiễm tại Tiền Giang (CBTG) có hình thái bào tử giống nấm gây bệnh đạo ôn với hình dạng bầu dục hoặc thuôn dài và có hai vách ngăn đặc trưng (**Hình 3.1**) (Hamer và ctv., 1988; Couch và Kohn, 2002). Để tìm hiểu khả năng hình thành các cấu trúc xâm nhiễm, bào tử của LĐN và CBTG được kích thích và quan sát trên tấm lam kính như một bề mặt nhân tạo và ủ trong môi trường tối, ẩm. Kết quả chỉ ra rằng sau 6 giờ, trên 95% bào tử đều có hiện tượng nảy mầm và trong đó hơn 80% số bào tử nảy mầm này có hình thành giác bám trên bề mặt nhân tạo được quan sát thấy trên hai mẫu nấm (**Hình 3.2**).

Trong thí nghiệm lam kính được sử dụng như bề mặt nhân tạo để quan sát khả năng hình thành giác bám (appresoria) của bào tử nấm gây bệnh đạo ôn nên tỉ lệ hình thành giác bám sẽ thấp hơn so với bề mặt nhân tạo gần giống với lá lúa hơn hoặc trực tiếp trên lá. Tuy nhiên với tỉ lệ quan sát cao như trên chúng tôi có thể kết luận là sức

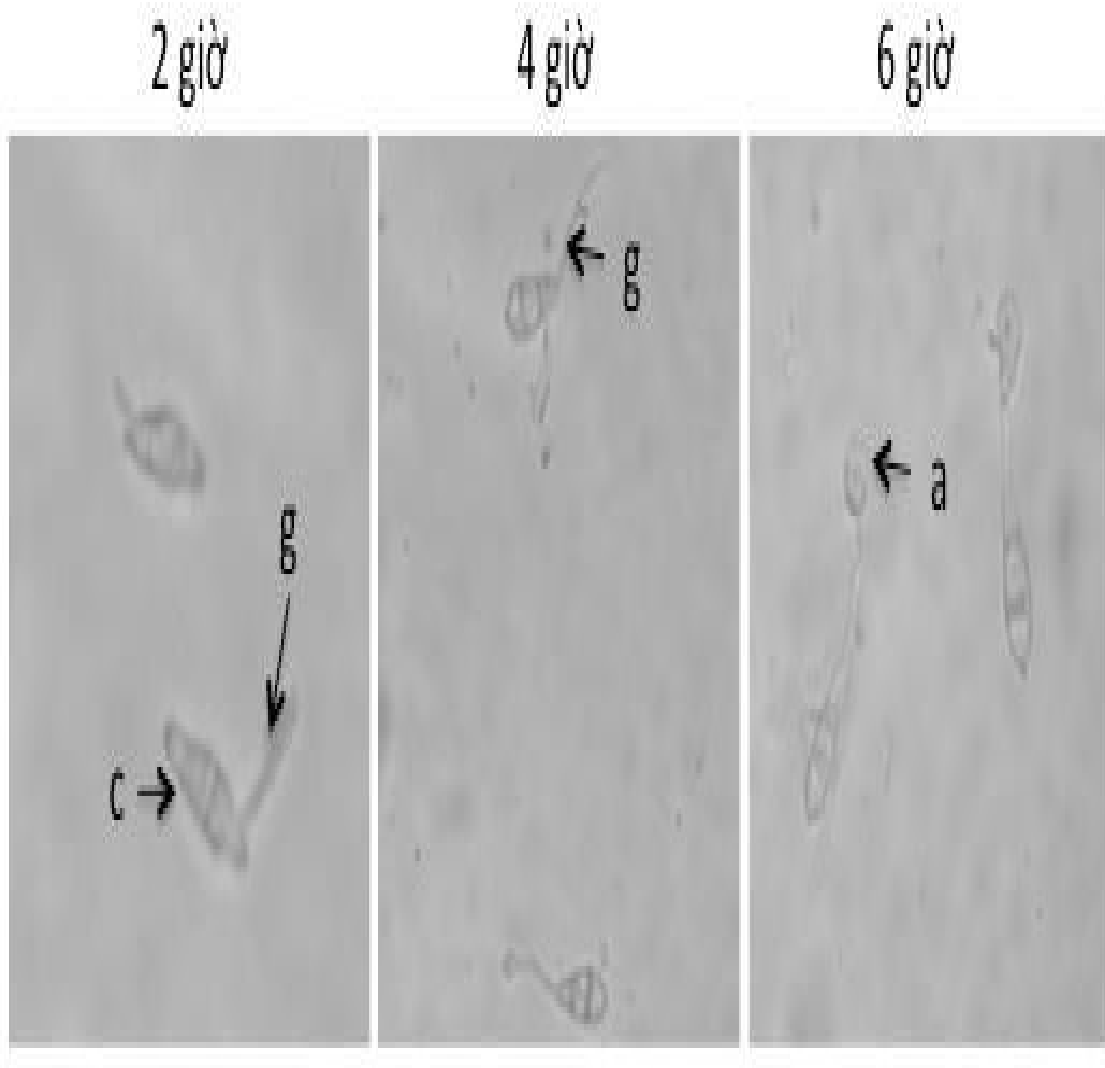
sống của hai mẫu nấm này khá cao và khả năng gây bệnh bằng các cấu trúc xâm nhiễm trên của chúng là khá mạnh. Dựa trên kết quả hình thái của hai mẫu nấm LĐN và CBTG có thể ban đầu kết luận chúng là nấm gây bệnh đạo ôn, *M. oryzae*. Phát hiện này sẽ giúp ích rất nhiều trong các thí nghiệm về sau liên quan đến khả năng lây bệnh của chúng trong quá trình lây bệnh trên cây trồng hay làm nguồn vật liệu cho việc nghiên cứu sâu hơn về phân tích chức năng của các gen gây bệnh ở mức độ toàn hệ gen của nấm gây bệnh đạo ôn hoặc ảnh hưởng của di truyền biểu sinh đến tính kháng của cây lúa đối với nấm gây bệnh đạo ôn.



**Hình 3.1.** Hình thái bào tử của hai mẫu nấm phân lập từ lá và cỏ bông biểu hiện triệu chứng bệnh đạo ôn.

*Chú thích: LĐN: mẫu nấm phân lập từ lá lúa nhiễm đạo ôn tại Đồng Nai. CBTG: mẫu nấm phân lập từ cỏ bông lúa nhiễm đạo ôn tại Tiền Giang.*





**Hình 3.2.** Sự hình thành các cấu trúc xâm nhiễm của mẫu nấm gây bệnh đạo ôn phân lập được sau các thời gian quan sát khác nhau. (c) bào tử, (g) nảy mầm, (a) giác bám (appressorium).

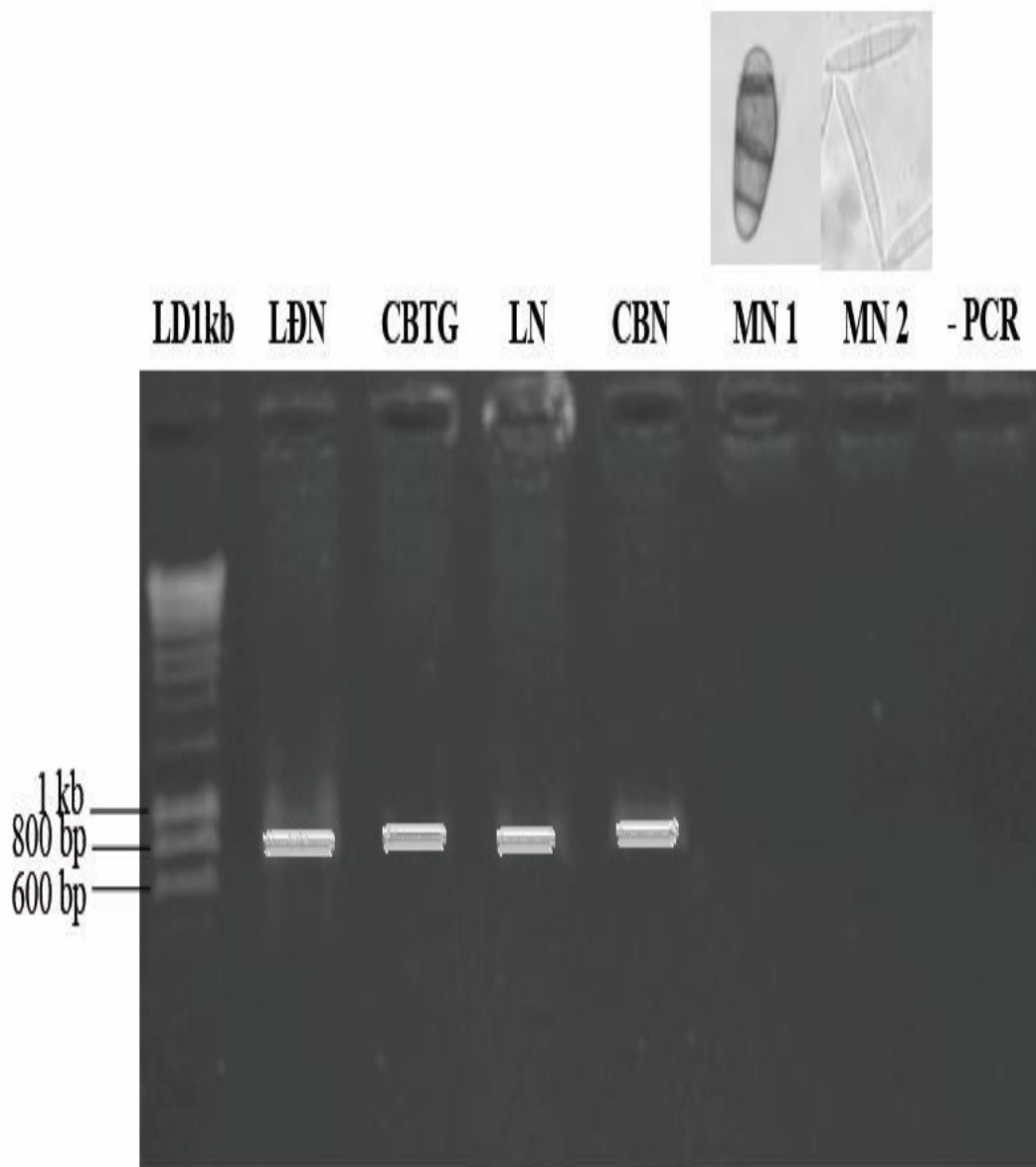
Để khẳng định thêm chính xác rằng hai mẫu nấm phân lập và đánh giá trên có phải là nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa, *M. oryzae* hay không, phương pháp PCR đã được sử dụng với cặp primer Pot2 transposon đã được nghiên cứu trên các chủng nấm *M. oryzae* gây bệnh đạo ôn trên loài cỏ chum trước đây (Harmon và ctv., 2003; Kachroo và ctv., 2000). Kết quả phân tích trình tự cho thấy đoạn primer Pot2 dùng trong nghiên cứu này khuếch đại đoạn DNA đặc trưng cho nấm gây bệnh đạo ôn *M. oryzae* có chiều dài là 687 bp nằm trong vùng có trình tự từ vị trí 1055 đến 1741 trong

tổng số 1861 bp của gen *Pot2* transposon trên. Trong nghiên cứu này, DNA của hai mẫu nấm được phân lập từ lá nhiễm bệnh đạo ôn (LĐN) và cỏ bông nhiễm bệnh đạo ôn (CBTG) được ly trích, thu nhận và tinh sạch để làm nguồn vật liệu cho phản ứng PCR. Đồng thời, hai mẫu nhiễm bệnh bao gồm lá nhiễm đạo ôn (LN) và cỏ bông nhiễm đạo ôn (CBN) được thu thập trên đồng ruộng cũng được ly trích, thu nhận DNA để đánh giá thêm khả năng ứng dụng của phương pháp PCR kết hợp với primer *Pot2* trong việc phát hiện và xác định nấm gây bệnh đạo ôn trên đồng ruộng (**Hình 3.3**).

Để đánh giá tính chuyên biệt của cặp primer *Pot2* transposon trong việc phát hiện *M. oryzae*, hai mẫu nấm có hình thái bào tử khác biệt so với bào tử của nấm gây bệnh đạo ôn (nấm 1, nấm 2) được sử dụng như là mẫu đối chứng âm vì trình tự khuếch đại của primer *Pot2* transposon được mô tả là tương đồng cao trên nấm gây bệnh đạo ôn nhưng không cao trên các mẫu nấm khác cho nên khả năng primer bắt cặp và khuếch đại trên hệ gen của nấm gây bệnh đạo ôn sẽ chuyên biệt hơn (Harmon và ctv., 2003). Dựa trên phân tích hình thái có thể xác định được hai mẫu nấm 1 và nấm 2 lần lượt là *Curvularia lunata* và *Fusarium* spp. Kết quả nghiên cứu ở **Hình 3.3** cho thấy giếng số 2 và số 3 tương ứng với các mẫu DNA từ các chủng nấm gây bệnh đạo ôn LĐN, CBTG khi tham gia phản ứng PCR với cặp primer *Pot2* đều cho sản phẩm khuếch đại với giá trị băng khuếch đại khoảng gần 800 bp. Mẫu LN và CBN (tương ứng giếng số 4 và số 5) nhiễm nấm gây bệnh đạo ôn đều cho sản phẩm băng khuếch đại PCR với kích thước tương tự như hai mẫu nấm gây bệnh đạo ôn trên. Điều này cho thấy có sự hiện diện của nấm gây bệnh đạo ôn trên mẫu lá và cỏ bông bị nhiễm. Riêng các mẫu DNA của nấm 1 và nấm 2 tương ứng với giếng số 6 và số 7 là những mẫu nấm không phải là nấm gây bệnh đạo ôn thì kết quả PCR đã chỉ ra không có băng sản phẩm khuếch đại khi dùng đoạn primer *Pot2* transposon. Kết quả giải trình tự hai chiều DNA sản phẩm PCR bằng cặp primer *Pot2* transposon và so sánh với dữ liệu gen trên NCBI bằng công cụ BLAST nucleotide đã chỉ ra rằng trình tự DNA sản phẩm PCR của các mẫu nấm phân lập từ lá, cỏ bông lúa và mẫu lá, cỏ bông nhiễm đạo ôn trên đều là *Pot2* transposon của *M. oryzae* (**Hình 3.4, Hình 3.5**). Điều này cho

thấy tính chuyên biệt của Pot2 transposon trong việc xác định nấm gây bệnh đạo ôn cũng như trong việc chẩn đoán bệnh đạo ôn trên đồng ruộng và trong phòng thí nghiệm. Độ tin cậy của quy trình này đã được kiểm chứng trên một số chủng nấm gây bệnh đạo ôn được phân lập từ lá và cỏ bông của lúa nhiễm ở miền Nam, miền Trung và miền Bắc Việt Nam. Sự hiện diện sản phẩm PCR của Pot2 transposon từ các mẫu nấm phân lập này đã giúp kết luận chúng là nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa, *M. oryzae* và quy trình này có thể được sử dụng để khẳng định sự hiện diện của nấm gây bệnh đạo ôn trong các thí nghiệm sau.

Việc phân lập và xác định nấm gây bệnh đạo ôn bằng phương pháp PCR có ý nghĩa rất lớn không chỉ trong việc phát hiện nhanh, kịp thời bệnh đạo ôn trên lúa mà còn giúp giảm rất nhiều thời gian và công sức trong việc xác định nấm gây bệnh đạo ôn. Nếu so với phương pháp truyền thống vốn mất từ 1 đến 2 ngày để quan sát sự xuất hiện của bào tử *M. oryzae* dưới kính hiển vi thì phương pháp này chỉ mất 5 giờ đồng hồ từ khâu chiết xuất nhanh DNA, phản ứng PCR, điện di và chụp ảnh.



**Hình 3.3.** Tính chuyên biệt của cặp primer Pot2 transposon trong việc xác định nấm gây bệnh đạo ôn và trong chẩn đoán bệnh đạo ôn trên đồng ruộng.

*Chú thích: LD1kb: HyperLadder<sup>TM</sup> 1 kb (Bioline, Hoa Kỳ); LĐN: mẫu nấm chiết xuất từ lá biểu hiện triệu chứng đạo ôn thu tại Đồng Nai; CBTG: mẫu nấm chiết xuất từ cổ bông biểu hiện triệu chứng đạo ôn thu tại Tiền Giang; LN: Lá lúa biểu hiện triệu chứng bệnh đạo ôn; CBN: Cổ bông lúa biểu hiện triệu chứng bệnh đạo ôn; MN1: mẫu nấm bệnh cây1; MN2: mẫu nấm bệnh cây 2; -PCR: Đối chứng âm (sử dụng nước)*

**M.grisea Pot 2 transposon transposase gene**

Sequence ID: [emb|Z33638.1](#) Length: 1861 Number of Matches: 1

Range 1: 1055 to 1738 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1258 bits(681)	0.0	683/684(99%)	0/684(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGTCACTCGTTCFTCAACCATTGGATCTATCGGTTTTTGGGCCGTTAAAAGAAGCTTATC			60
Sbjct 1055	CGTCACTCGTTCFTCAACCATTGGATCTATCGGTTTTTGGGCCGTTAAAAGAAGCTTATC			1114
Query 61	GACGTCAACTTGGATTTGTTAGCCAATTTGCTGTTCAACAGTTATTGAAAAACGAAATT			120
Sbjct 1115	GACGTCAACTTGGATTTGTTAGCCAATTTGCTGTTCAACAGTTATTGAAAAACGAAATT			1174
Query 121	TCCTACTTTGTTATCGAAAAGCCAGATTAAAAGCATTATAGCAAAAACCATTCAACTCG			180
Sbjct 1175	TCCTACTTTGTTATCGAAAAGCCAGATTAAAAGCATTATAGCAAAAACCATTCAACTCG			1234
Query 181	GTTGGCGTACAACGGGGTTATGCCCGTAAACTTGGTTAAACCACCTTTAAGCCCTTTT			240
Sbjct 1235	GTTGGCGTACAACGGGGTTATGCCCGTAAACTTGGTTAAACCACCTTTAAGCCCTTTT			1294
Query 241	TGTTAGAAAATAGCAACGCCAACGTTATAAAAAGATAAAAACAAACGTTTGCAAAGGGATA			300
Sbjct 1295	TGTTAGAAAATAGCAACGCCAACGTTATAAAAAGATAAAAACAAACGTTTGCAAAGGGATA			1354
Query 301	AAACACCGGAAAGCCAGCCCAAAAAATTAACGACCCGTCCTTACTTATTGGAAAACCC			360
Sbjct 1355	AAACACCGGAAAGCCAGCCCAAAAAATTAACGACCCGTCCTTACTTATTGGAAAACCC			1414
Query 361	CTAAAACGACCCGAGATATCCGACTTCAACTGCAAAAACCTTCCCAATCCAACAAAACCA			420
Sbjct 1415	CTAAAACGACCCGAGATATCCGACTTCAACTGCAAAAACCTTCCCAATCCAACAAAACCA			1474
Query 421	ACGCTACTTCACGTCCTTTTATTGCAAAAAGTCAAAAAGCTTCGAAGCCAAAGATACCC			480
Sbjct 1475	ACGCTACTTCACGTCCTTTTATTGCAAAAAGTCAAAAAGCTTCGAAGCCAAAGATACCC			1534
Query 481	TTTTGGCTAGCGCCAGCAAAAATCAGCTTATTGGAAGCACAACCTGGAGGCAATACGGC			540
Sbjct 1535	TTTTGGCTAGCGCCAGCAAAAATCAGCTTATTGGAAGCACAACCTGGAGGCAATACGGC			1594
Query 541	CGGTAAAAGGAGGAGGGTGGTTCCGGATCCAAACGAGCTTTGGTTAACAAACAGAACA			600
Sbjct 1595	CGGTAAAAGGAGGAGGGTGGTTCCGGATCCAAACGAGCTTTGGTTAACAAACAGAACA			1654
Query 601	TTATTGGATTGCAGGAAAATGATATAGAAAATTTGGAACCTTAGCTGATGAAGAAGAGG			660
Sbjct 1655	TTATTGGATTGCAGGAAAATGATATAGAAAATTTGGAACCTTAGCTGATGAAGAAGAGG			1714
Query 661	TTAATGAACCGGAGAAGCGTGAAA 684			
Sbjct 1715	TTAATGAACCGGAGAAGCGTGAAA 1738			

**Hình 3.4.** Kết quả BLAST trình tự DNA sản phẩm PCR bằng cặp primer Pot2 transposon của mẫu nấm gây bệnh đạo ôn phân lập từ lá lúa nhiễm bệnh tại Đồng Nai (LDN) và lá lúa biểu hiện triệu chứng bệnh đạo ôn trên cơ sở dữ liệu DNA của NCBI.

**M.grisea Pot 2 transposon transposase gene**

Sequence ID: [emb|Z33638.1](#) Length: 1861 Number of Matches: 1

Range 1: 1055 to 1738 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1258 bits(681)	0.0	683/684(99%)	0/684(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGTCACTCGTCTTCAACCATTGGATCTATCGGTTTTGGGCCGTTAAAAGAAGCTTATC	60		
Sbjct 1055	CGTCAACAGTTCTTCAACCATTGGATCTATCGGTTTTGGGCCGTTAAAAGAAGCTTATC	1114		
Query 61	GACGTCAACTTGGATTTGTTAGCCAATTTGCTGTTC AACAGTTATTGGAAAACGAAATT	120		
Sbjct 1115	GACGTCAACTTGGATTTGTTAGCCAATTTGCTGTTC AACAGTTATTGGAAAACGAAATT	1174		
Query 121	TCCTACTTTGTTATCGAAAAGCCAGATTTAAAAGCATTATAGCAAAAACCATTC AATCTG	180		
Sbjct 1175	TCCTACTTTGTTATCGAAAAGCCAGATTTAAAAGCATTATAGCAAAAACCATTC AATCTG	1234		
Query 181	GTTGGCGTACAACGGGGTTATGGCCGGTAAACTTGGTTAAACCACCTTTAAGCCCTTTTT	240		
Sbjct 1235	GTTGGCGTACAACGGGGTTATGGCCGGTAAACTTGGTTAAACCACCTTTAAGCCCTTTTT	1294		
Query 241	TGTTAGAAAATAGCAACGCCAACGTTATAAAAAGATAAAAAC AACGTTTGCAAAGGGATA	300		
Sbjct 1295	TGTTAGAAAATAGCAACGCCAACGTTATAAAAAGATAAAAAC AACGTTTGCAAAGGGATA	1354		
Query 301	AAACACCGGAAAGCCCAGCCCAAAAATTAACGACCCGCTTTACTTATTGGAAAACCC	360		
Sbjct 1355	AAACACCGGAAAGCCCAGCCCAAAAATTAACGACCCGCTTTACTTATTGGAAAACCC	1414		
Query 361	CTAAAACGACCCGAGATATCCGACTTCAACTGCAAAAAC TTCCCAATCCAACAAAACCA	420		
Sbjct 1415	CTAAAACGACCCGAGATATCCGACTTCAACTGCAAAAAC TTCCCAATCCAACAAAACCA	1474		
Query 421	ACGCTACTTCACGTCCTTTATTGCAAAAAGTCCAAAAAGCTTCGAAGCCAAAGATACCC	480		
Sbjct 1475	ACGCTACTTCACGTCCTTTATTGCAAAAAGTCCAAAAAGCTTCGAAGCCAAAGATACCC	1534		
Query 481	TTTTGGCTAGCGCCAGCAAAAATCAGCTTATTGGAAGCACA ACTGGAGGCAATACGGC	540		
Sbjct 1535	TTTTGGCTAGCGCCAGCAAAAATCAGCTTATTGGAAGCACA ACTGGAGGCAATACGGC	1594		
Query 541	CGGTTAAAAGGAGGAGGGTGGTTCGGATCCAAACGAGCTTTTGGTTAACAAACAGAACA	600		
Sbjct 1595	CGGTTAAAAGGAGGAGGGTGGTTCGGATCCAAACGAGCTTTTGGTTAACAAACAGAACA	1654		
Query 601	TTATTGGATTGCAGGAAAATGATATAGAAAATTTGGAACCTTTAGCTGATGAAGAAGAGG	660		
Sbjct 1655	TTATTGGATTGCAGGAAAATGATATAGAAAATTTGGAACCTTTAGCTGATGAAGAAGAGG	1714		
Query 661	TTAATGAACCGGAGAAGCGTGAAA 684			
Sbjct 1715	TTAATGAACCGGAGAAGCGTGAAA 1738			

**Hình 3.5.** Kết quả BLAST trình tự DNA sản phẩm PCR bằng cặp primer Pot2 transposon của mẫu nấm gây bệnh đạo ôn phân lập từ lá lúa nhiễm bệnh đạo ôn (LN) và lá lúa biểu hiện triệu chứng bệnh đạo ôn trên cơ sở dữ liệu DNA của NCBI.

### 3.2. Đánh giá khả năng chống chịu/mẫn cảm với nấm *M. oryzae* trên các giống lúa thí nghiệm.

Để đánh giá giống lúa chống chịu và miễn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn, phương pháp nhiễm bào tử nấm *M. oryzae* LBT2 được thực hiện trên 19 giống lúa trồng ở Việt Nam (Quoc và ctv., 2019). Sau 5-7 ngày lây nhiễm, 3 lá của mỗi giống lúa được thu thập và phân tích bằng phần mềm Access 2.0 (Phần mềm phân tích hình ảnh mức độ bệnh ở cây trồng (American Phytopathology Society, USA). Sự thay đổi phần trăm diện tích lá bệnh được quan sát ở cây lúa sẽ được đánh giá và phân loại vào nhóm chống chịu hoặc miễn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn để phục vụ cho các nghiên cứu sau.

Kết quả phân tích tỉ lệ nhiễm trung bình trên lá ở các giống lúa bằng phần mềm Access 2.0 chỉ ra rằng có sự đa dạng về mức độ nhiễm trên các giống lúa khác nhau đối với nấm *M. oryzae*. Tỉ lệ nhiễm trên các giống lúa nghiên cứu trải đều từ 4,02% đến 89,21%, trong đó OM8017 là giống có tỉ lệ nhiễm thấp nhất và OM7347 có tỉ lệ nhiễm cao nhất (**Hình 3.6, Bảng 3.1**). Nghiên cứu cũng cho thấy số lượng các giống có tỉ lệ nhiễm thấp đại diện cho tính kháng mạnh là khá thấp với 6/19 giống có tỉ lệ nhiễm dưới 25% và 13 giống còn lại có tỉ lệ nhiễm khá cao chủ yếu tập trung trong khoảng 31% - 45%. Để tiến hành phân tích về mặt phân tử các giống lúa có tỉ lệ nhiễm dưới 25% sẽ được xếp vào nhóm lúa chống chịu và các giống có tỉ lệ cao hơn được xếp vào nhóm miễn cảm dựa trên kết quả nghiên cứu của Campos-Soriano và ctv. (2020). Kết quả phân nhóm bao gồm 2 nhóm với nhóm chống chịu (ST5, OM8017, RVT, Gold Carolina, IR50404, và OM5451) và nhóm miễn cảm (OM6162, OM9921, Nang Hoa 9, OM2517, OM9582, Jasmine85, OM4900, OM576, BC15, OM344, OM6976, OM4218, và OM7347). Trong đó, nhóm miễn cảm có mức độ nhiễm trung bình đạt 51,94% gấp **3 lần** so với nhóm kháng chỉ là 14,49%, điều này cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mức độ xâm nhiễm của nấm *M. oryzae* giữa nhóm chống chịu và nhóm miễn cảm ( $P < 0,001$ ) (**Bảng 3.1**) (**Phụ lục 6**).



**Hình 3.6.** Kết quả chủng bệnh nấm *M. oryzae* LBT2 trên lá của 10 giống lúa.  
1. Tẻ tép, 2. Carolina Gold Rice, 3. RVT, 4. OM8017, 5. Nàng hoa 9, 6. Jasmine85, 7.  
OM4900, 8.OM7347, 9. OM4218, 10. OM6976.





(a)

(b)

**Hình 3.7.** Trạng thái của cây lúa trước khi chủng bệnh ở hai giống thử nghiệm. (a) J-short; (b) OM6162



**Hình 3.8.** Sự sinh trưởng của cây lúa ở 20 giống nghiên cứu sau 14 ngày trồng.



**Hình 3.9.** Kết quả chủng bệnh nấm *M. oryzae* LBT2 trên lá của giống IR50404

**Bảng 3. 1.** Tỷ lệ phần trăm của vùng nhiễm trên lá lúa gây ra bởi *M. oryzae* ở 19 giống lúa, sử dụng phần mềm Assess v.2.0.

<b>Nhóm lúa</b>	<b>Tên giống lúa</b>	<b>Mức độ nhiễm (%)</b>	<b>Giá trị nhiễm trung bình nhóm (%)</b>
<b>Nhóm lúa chống chịu</b>	ST5	7,26 ± 1,05	14,49 ± 0,48
	OM8017	4,02 ± 0,58	
	RVT	10,96 ± 0,15	
	Carolina gold	18,42 ± 0,13	
	OM5451	22,6 ± 0,8	
	IR50404	23,65 ± 0,19	
<b>Nhóm mẫn cảm</b>	OM6162	31,54 ± 3,15	51,94 ± 0,95
	OM9921	32,83 ± 0,65	
	Nang Hoa9	35,83 ± 0,11	
	OM2517	35,87 ± 2,03	
	OM9582	36,64 ± 0,88	
	Jasmine85	43,52 ± 0,13	
	OM4900	45,93 ± 0,5	
	OM576	46,27 ± 1,6	
	BC15	56,45 ± 0,32	
	OM344	63,32 ± 0,32	

	OM6976	76,76 ± 0,54	
	OM4218	81,01 ± 1,96	
	OM7347	89,21 ± 0,21	

*Chú thích: Mức độ nhiễm (%) là giá trị trung bình của 3 lần đo lặp lại trên mỗi giống lúa.*

Kết quả nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng các mẫu nấm phân lập nấm *M. oryzae* tại Bình Thuận, Việt Nam (LBT2) có khả năng phá vỡ tính kháng của các giống lúa chống chịu bệnh đạo ôn tại Thái Lan và Việt Nam dựa trên sự phát triển chỉ thị SCAR (Quoc và ctv., 2021). Do đó việc sử dụng mẫu nấm phân lập *M. oryzae* LBT2 được xem là có khả năng gây bệnh cao trên các giống lúa thí nghiệm nhằm tạo ra căng thẳng sinh học vốn được mô tả có liên quan đến sự điều hòa và hoạt động của các gen và phân tử miRNA riêng lẻ hoặc một họ phân tử miRNA cũng như kích hoạt các con đường biểu hiện gen và miRNA mới (Hòa và ctv., 2016; Šečić và ctv., 2021). Trong 6 giống lúa thể hiện khả năng kháng với mẫu nấm phân lập *M. oryzae* LBT2 thì có 5 giống lúa tốt nhất tại đồng bằng sông Cửu Long và 1 giống lúa có nguồn gốc từ Châu Phi được du nhập vào Mỹ và trồng phổ biến tại South Carolina vào những năm thập niên 1780. Giống lúa hạt dài Carolina Gold có tên khoa học là *Oryza glaberrima* (Steud.) và được mô tả là giống lúa có mang gen kháng *Pi-ta* (Lee và ctv., 2011). Điều này có thể lý giải cho khả năng chống chịu được với *M. oryzae* LBT2 vốn mang gen *AVR-Pita* theo thuyết tương tác gen-đối-gen (Quoc và ctv., 2021). Năm giống lúa còn lại được xem là những giống lúa chủ lực cho việc phát triển vùng lúa gạo phục vụ xuất khẩu ở Đồng Bằng Sông Cửu Long. Bên cạnh các giống lúa ST đã được công nhận thì giống lúa thơm RVT vốn được xem là giống lúa nổi tiếng thơm ngon được người tiêu dùng trong và ngoài nước ưa chuộng. Các giống lúa còn lại như OM8017 (OM5472 x Jasmine 85), OM5451 (OM2490 x Jasmine 85) và giống lúa nhập nội từ IRRI vào những năm 1990 (IR50404) cũng đã được công nhận do có những đặc điểm tốt về chất lượng và năng suất. Các giống lúa này cũng đã được minh chứng là kháng nấm gây bệnh đạo ôn từ trung bình đến tốt. Do đó kết quả chủng bệnh

trong nghiên cứu này với mẫu nấm phân lập *M. oryzae* LBT2 đã thể hiện tính đồng nhất với những khảo sát trước đây. Điều này cũng có thể lý giải là các giống lúa này có thể có mang nhóm gen kháng *Pi-ta* vốn cần được đánh giá sâu hơn sau này. Đối với các giống lúa thuộc nhóm miễn cảm với mẫu nấm phân lập *M. oryzae* LBT2 thì đa số các giống lúa sử dụng trong nghiên cứu này đều là những giống lúa lai trồng phổ biến tại Đồng Bằng Sông Cửu Long ngoại trừ giống lúa BC15 là trồng phổ biến ở phía bắc. Giống lúa BC15 là giống lúa có năng suất cao, phẩm chất tốt và được mô tả là có mang gen kháng đạo ôn. Tương tự như vậy các giống lúa lai như Nàng Hoa 9, OM2517, OM576, OM6976 đều được khảo sát là có khả năng kháng đạo ôn từ nhẹ đến trung bình. Tuy nhiên khi chủng bệnh với mẫu nấm phân lập *M. oryzae* LBT2 thì mức độ nhiễm nấm gây bệnh đạo ôn của các giống lúa này khá cao. Điều này cho thấy khả năng phá vỡ tính kháng của mẫu nấm phân lập *M. oryzae* LBT2 và khẳng định tính chính xác của chỉ thị SCAR đã được nghiên cứu và phát triển trước đây (Quoc và ctv., 2021). Một nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng khả năng cây trồng thể hiện tính kháng là tùy thuộc vào kiểu gen của tác nhân gây bệnh (Xiao và ctv., 2016). Khả năng phá vỡ tính kháng trên các giống lúa này một phần có thể hiểu là do các giống lúa này thiếu gen kháng *R* tương thích với gen *AVR* của mẫu nấm phân lập *M. oryzae* LBT2 hoặc có những đột biến trên gen kháng *R* của các giống lúa trên dẫn đến dễ bị phá vỡ tính kháng. Cần có những nghiên cứu sâu hơn về sự đa dạng SNPs trên các gen kháng *R* của lúa và gen *AVR* của nấm *M. oryzae* để có thể hiểu sâu hơn về sự tương tác trong hệ thống lúa và nấm *M. oryzae*. Các giống lúa còn lại trong nhóm này thì gần như thể hiện tính miễn cảm với mẫu nấm phân lập *M. oryzae* LBT2 và tương đồng với đánh giá trước đây của các giống lúa này khi được công nhận và trồng đại trà hiện nay.

### **3.3. Xác định sự hiện diện của phân tử *osa-miR7695* trên các giống lúa thí nghiệm.**

Để xác định sự hiện diện của phân tử *osa-miR7695* trên các giống lúa thí nghiệm, mẫu lá của các giống được tiến hành ly trích RNA tổng số theo công bố của Thermo Scientific, USA. Sau khi ly trích, RNA được kiểm tra nồng độ và độ tinh

kiết dựa trên tỷ lệ hấp thụ ở bước sóng 260nm và 280nm (A260/280) bằng máy NanoDrop™ nhằm đảm bảo chất lượng RNA và điều chỉnh cho phù hợp với từng phản ứng PCR. Kết quả nghiên cứu cho thấy hầu hết RNA tổng thu được từ mẫu lá ở tất cả các giống đều có độ tinh khiết cao phù hợp cho việc xác định sự hiện diện cũng như mức độ biểu hiện của phân tử *osa-miR7695* khi mức độ tinh khiết của mẫu RNA tổng đạt xấp xỉ 2,0 theo như hướng dẫn của nhà sản xuất Thermo Scientific, USA (**Bảng 3.2**) đồng thời các mẫu RNA tổng số được tiến hành xử lý DNaseI để loại bỏ các mẫu DNA tạp nhiễm còn sót lại và hồi quy các mẫu ly trích về nồng độ phù hợp cho phản ứng khuếch đại PCR (**Bảng 3.3**).

**Bảng 3.2.** Kết quả đo tỷ lệ A(260/280) của các giống lúa thí nghiệm.

STT	Tên giống	A(260/280)	STT	Tên giống	A(260/280)
1	ST5	2,034	11	Nang Hoa 9	2,036
2	Caroline gold	2,041	12	Jasmine85	1,996
3	RVT	1,999	13	OM4900	1,998
4	OM8017	2,031	14	OM576	2,428
5	OM5451	2,095	15	OM7347	2,194
6	IR50404	2,96	16	BC15	1,989
7	OM2517	1,989	17	OM344	2,322
8	OM6162	2,041	18	OM4218	2,251
9	OM9582	2,087	19	OM6976	2,385

Theo nghiên cứu trước đây của Campo và ctv. (2013) thì phân tử precursor *osa-miR7695* (tiền phân tử *osa-miR7695*) chỉ có trên giống lúa *japonica* và có vai trò quan trọng đối với tính kháng của lúa với nấm *M. oryzae*. Do đó, việc xác định sự hiện diện của *osa-miR7695* trong nghiên cứu này có vai trò rất quan trọng nhằm đánh

giá mức độ và giá trị biểu hiện của *osa-miR7695* trên các giống lúa trồng phổ biến tại Việt Nam. Tuy nhiên, hầu hết các giống lúa trong thí nghiệm đều thuộc giống lúa *indica*, do vậy chúng tôi cần thực hiện phản ứng thử nghiệm để kiểm tra và tối ưu phản ứng Nested PCR trên 01 giống lúa J-short (giống lúa *japonica*) trước tiên. Do phân tử precursor *osa-miR7695* có trình tự khá dài (487 bp) nên phản ứng Nested PCR được thực hiện để đạt hiệu quả đặc hiệu với các cặp primer (P1, P2) và (P3, P4) được sử dụng (Campo và ctv., 2013). Đầu tiên phản ứng PCR thứ nhất với cặp primer (P1, P2) khuếch đại vùng trình tự bắt đầu từ bên ngoài được thực hiện, sau đó phản ứng PCR thứ hai với cặp primer (P3, P4) nằm bên trong khuếch đại vùng trình tự bên trong được tiến hành. Trong đó, sản phẩm của phản ứng PCR thứ nhất được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR thứ hai. Bên cạnh đó, thí nghiệm so sánh phản ứng nested PCR giữa mẫu đã xử lý DNase I và chưa xử lý DNase I cũng được tiến hành nhằm bảo đảm kết quả không có sự nhầm lẫn do dương tính giả.

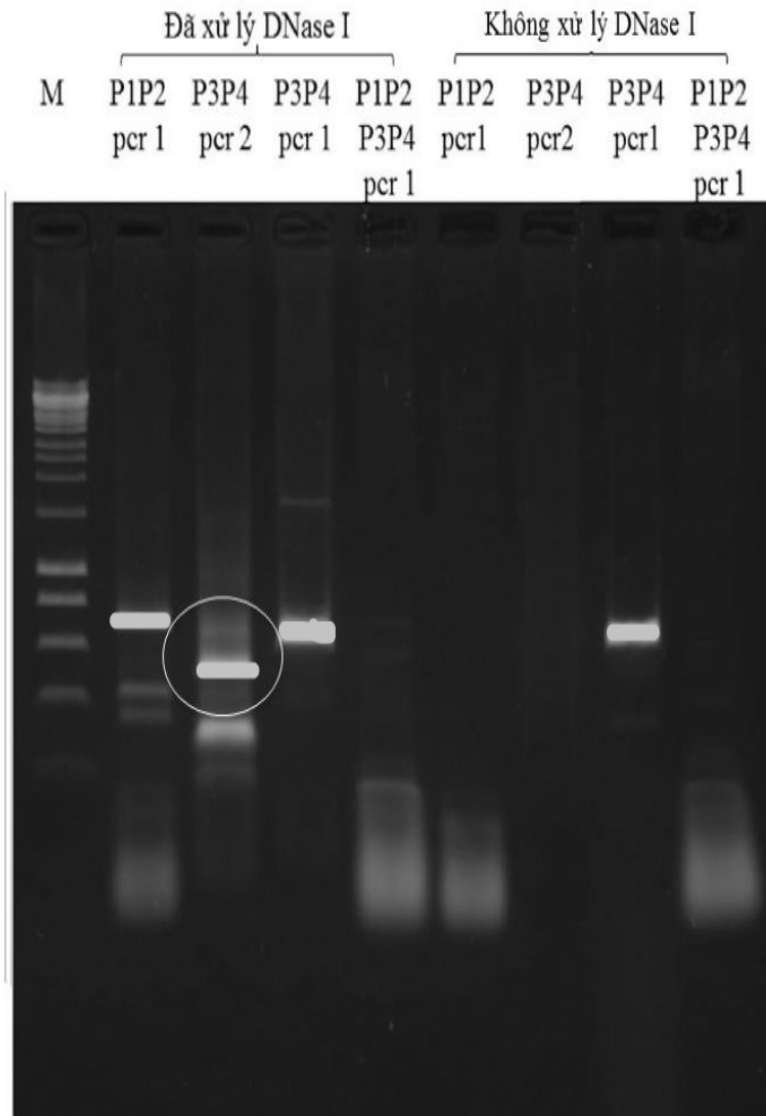
**Bảng 3.3.** Kết quả ly trích RNA tổng số và xử lý DNase I trên các giống lúa.

ST T	Ký hiệu	Tên giống	Trung bình ( $\mu\text{g/ml}$ )	Xử lý Dnase I		Nồng độ ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
				RNA ( $\mu\text{l}$ )	Dnase I buffer ( $\mu\text{l}$ )	
1	Rice 1	OM6976	476,7	2,6	47,4	0,025
2	Rice 2	OM2517	206,4	6,1	43,9	0,025
3	Rice 3	Carolina Gold Rice	350	3,6	46,4	0,025
4	Rice 4	OM8017	173,9	7,2	42,8	0,025
5	Rice 5	OM7347	131,3	9,5	40,5	0,025
6	Rice 6	OM5451	269,8	4,6	45,4	0,025
7	Rice 7	OM344	130,5	9,6	40,4	0,025
8	Rice 8	OM9582	241,7	5,2	44,8	0,025



9	Rice 9	OM4218	345,4	3,6	46,4	0,025
10	Rice 10	Nàng hoa 9	357,8	3,5	46,5	0,025
11	Rice 11	OM4900	232,8	5,4	44,6	0,025
12	Rice 12	OM9921	170,1	7,3	42,7	0,025
13	Rice 13	BC15	136,8	9,1	40,9	0,025
14	Rice 14	Jasmine85	252,2	5	45	0,025
15	Rice 15	Tẻ tếp	399,9	3,1	46,9	0,025
16	Rice 16	ST5	247,3	5,1	44,9	0,025
17	Rice 17	OM6162	519,8	2,4	47,6	0,025
18	Rice 18	RVT	66,5	18,8	31,2	0,025
19	Rice 19	Non- GMO	59,9	20,9	29,1	0,025
20	Rice 20	J- short	59,9	20,9	29,1	0,025

Kết quả điện di cho thấy chỉ có mẫu RNA đã xử lý DNase I cho ra kết quả có đoạn trình tự *osa-miR7695* đúng kích thước khi thực hiện PCR lần 2 với cặp primer (P3, P4) còn mẫu RNA chưa xử lý Dnase I thì không có băng điện di. Cả hai mẫu (xử lý DNase I và chưa xử lý DNase I) khi sử dụng một cặp đoạn primer (P3, P4) thì kết quả điện di cho ra băng nhưng sai kích thước. Đối với phản ứng PCR sử dụng cùng lúc hai cặp primer (P1, P2) và (P3, P4) trong một phản ứng thì kết quả điện di cho thấy không có băng xuất hiện (**Hình 3.10**)

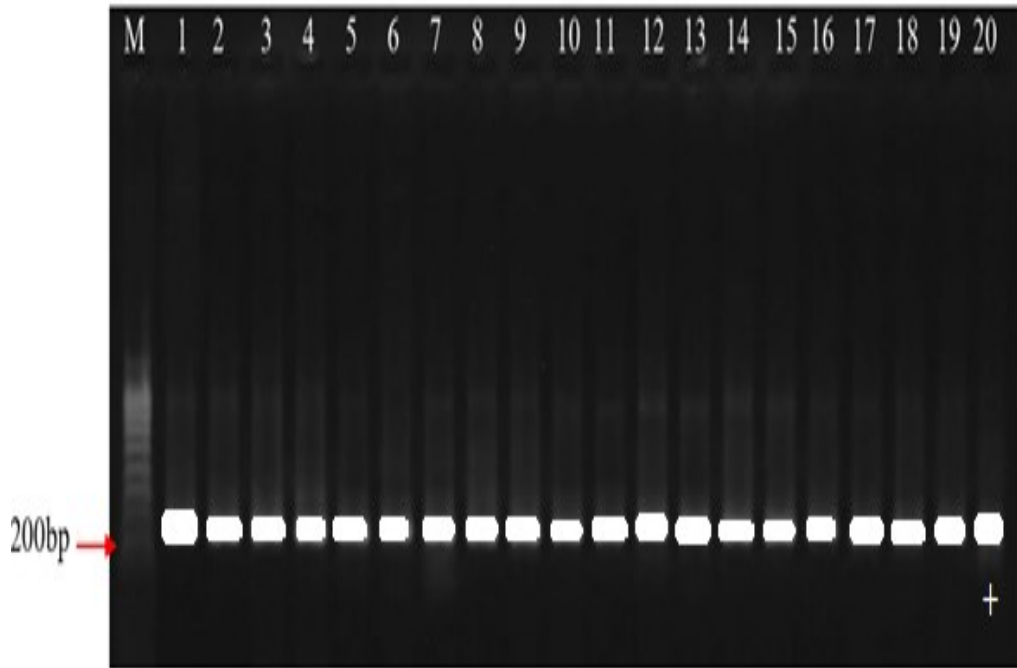


**Hình 3.10.** Kết quả điện di thử nghiệm trên giống lúa J-short (giống *japonica*)

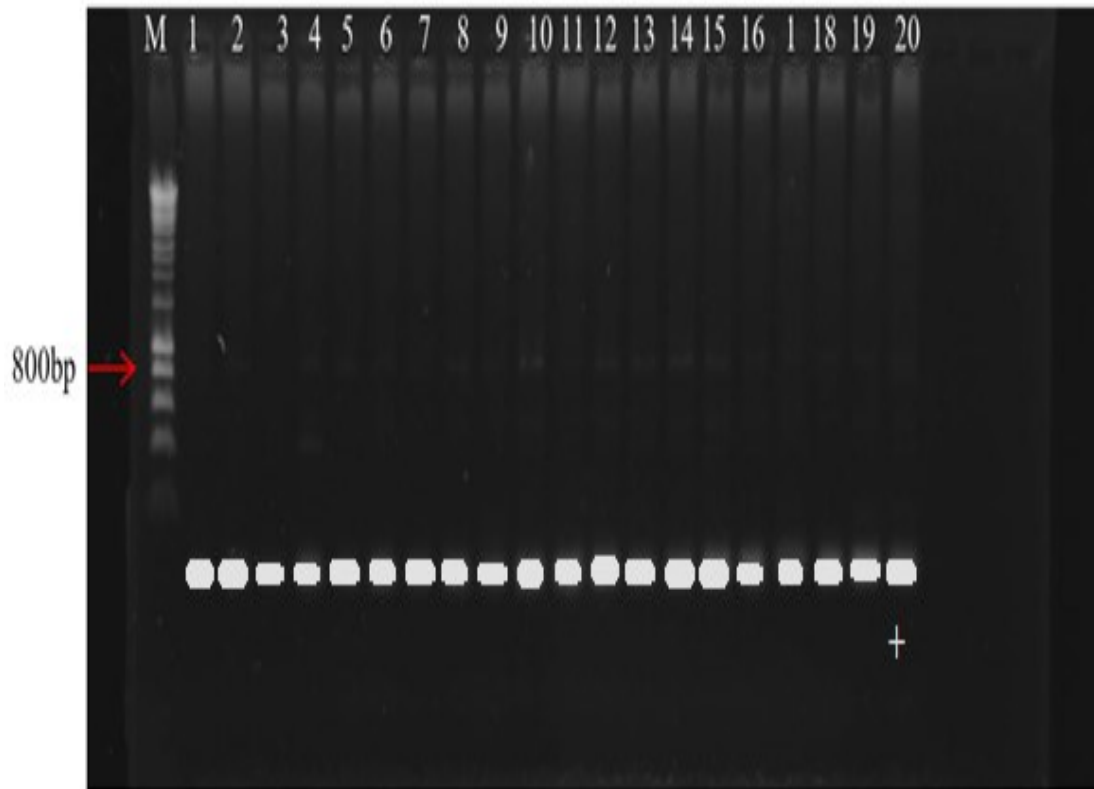
(M): Thang đo; (P1,P2) pcr1: sử dụng cặp primer (P1,P2) cho phản ứng PCR thứ 1; (P3,P4) pcr2: sử dụng cặp primer (P3,P4) cho phản ứng PCR thứ 2; (P3,P4) pcr1: sử dụng cặp primer (P3,P4) cho phản ứng PCR thứ 1; (P1,P2,P3,P4)pcr1: sử dụng cùng lúc cả 2 cặp primer (P1,P2) và (P3,P4) trong một phản ứng PCR thứ 1.

Sau khi tổng hợp cDNA, phản ứng PCR sử dụng đoạn primer *OsUbi1* được tiến hành để kiểm tra mức độ biểu hiện của gen đối chứng nội *OsUbi1* với đoạn DNA sản phẩm được khuếch đại có độ dài dự kiến là 366 bp nhằm kiểm tra chất lượng cDNA đã tổng hợp.

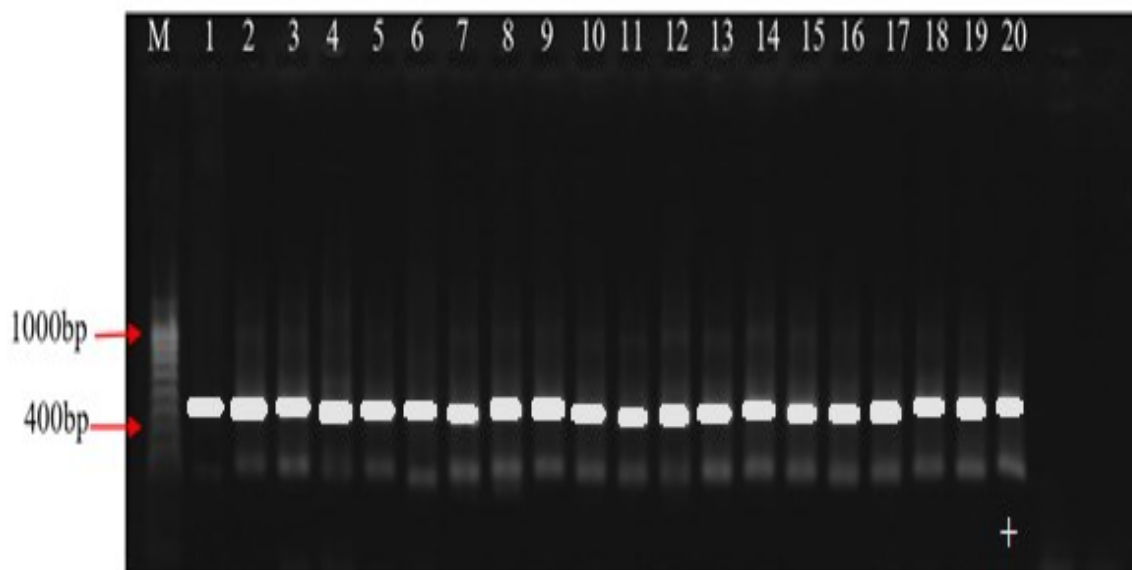
Kết quả tất cả 20 mẫu đều có băng khoảng 300 – 400 bp sáng đều nhau, điều này chứng tỏ cDNA được tổng hợp đạt chất lượng để sử dụng cho phản ứng Nested PCR (**Hình 3.11**)



**Hình 3.11.** Kết quả điện di của gen đối chứng nội *OsUbi1* trên các giống lúa (1): ST5; (2): Carolina Gold; (3): RVT; (4): OM8017; (5): OM5451; (6): IR50404; (7): OM2517; (8): OM6162; (9): OM9528; (10): OM9921; (11): Nang Hoa 9; (12): Jasmine85; (13): OM4900; (14): OM576; (15): OM7347; (16): BC15; (17): OM344; (18): OM4218; (19): OM6976; (20): J-short, đối chứng; M: thang đo 100bp.

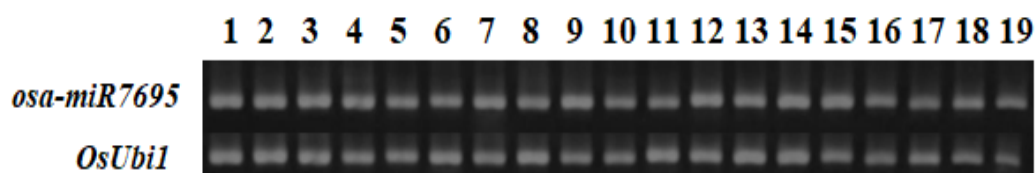


**Hình 3.12.** Kết quả điện di phản ứng PCR1 sử dụng cặp đoạn primer (P1,P2)  
 (1): ST5; (2): Carolina Gold; (3): RVT; (4): OM8017; (5): OM5451; (6): IR50404;  
 (7): OM2517; (8): OM6162; (9): OM9528; (10): OM9921; (11): Nang Hoa 9; (12):  
 Jasmine85; (13): OM4900; (14): OM576; (15): OM7347; (16): BC15; (17):  
 OM344; (18): OM4218; (19): OM6976; (20): J-short, đối chứng; M: thang đo 1kb.



**Hình 3.13.** Kết quả điện di phản ứng PCR2 sử dụng cặp primer (P3,P4)

(1): ST5; (2): Carolina Gold; (3): RVT; (4): OM8017; (5): OM5451; (6): IR50404; (7): OM2517; (8): OM6162; (9): OM9528; (10): OM9921; (11): Nang Hoa 9; (12): Jasmine85; (13): OM4900; (14): OM576; (15): OM7347; (16): BC15; (17): OM344; (18): OM4218; (19): OM6976; (20): J-short, đối chứng; M: thang đo 100bp.



**Hình 3.14.** Kết quả điện di xác định sự hiện diện của *osa-miR7695* trên 19 giống lúa.

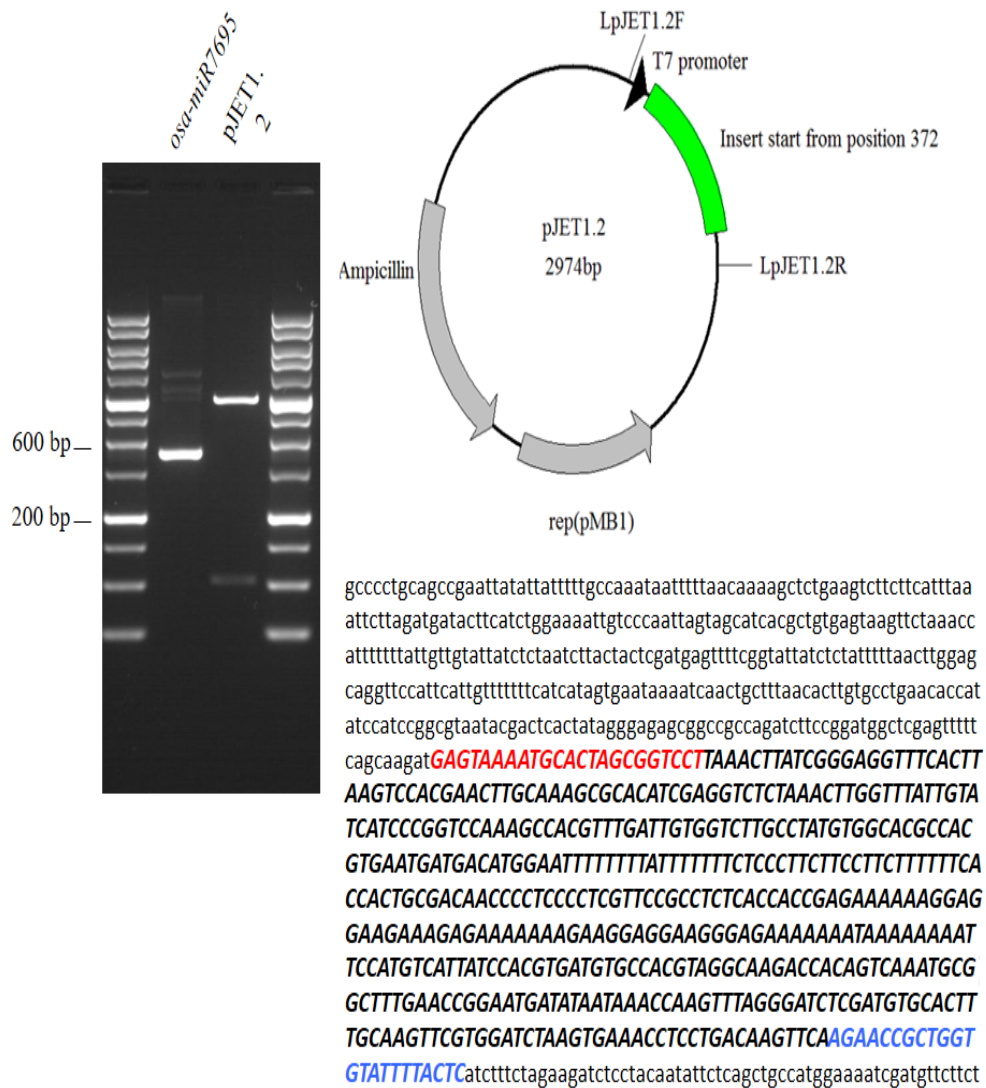
(1): ST5; (2): Carolina Gold; (3): RVT; (4): OM8017; (5): OM5451; (6): IR50404; (7): OM2517; (8): OM6162; (9): OM9528; (10): OM9921; (11): Nang Hoa 9; (12): Jasmine85; (13): OM4900; (14): OM576; (15): OM7347; (16): BC15; (17): OM344; (18): OM4218; (19): OM6976.

Kết quả điện di đánh giá chỉ ra rằng có tồn tại sự hiện diện của các sản phẩm khuếch đại nested RT-PCR được quan sát trên hầu hết 19 giống lúa thử nghiệm (**Hình 3.12, 3.13**). Gen *OsUbi1* được sử dụng như là một đối chứng nội thể hiện chất lượng của các cDNA tổng hợp từ RNA tổng số là tốt cho các phản ứng khuếch đại nested RT-PCR (**Hình 3.14**). Để kiểm tra sự chính xác các sản phẩm được khuếch đại từ phản ứng nested RT-PCR có phải là phân tử *precursor osa-miR7695* hay không, các sản phẩm này được thu hồi và biến nạp vào vector *pJET1.2* để tiến hành giải trình tự.

Kết quả nghiên cứu cho thấy sản phẩm khuếch đại của phản ứng RT-PCR sau khi được biến nạp vào vector *pJET1.2* và giải trình tự cho ra một chuỗi trình tự có kích thước dài 487 bp không tính kích thước của vector (**Hình 3.16**). Kết quả đánh giá sự tương đồng của chuỗi trình tự này trên cơ sở dữ liệu miRBase cho thấy đoạn trình tự này có điểm tương đồng rất cao với phân tử *osa-miR7695* với hai đoạn kết quả trên sợi dương của phân tử này là *osa-miR7695-5p* và *osa-miR7695-3p*. Sự tương đồng của chuỗi trình tự biến nạp với *osa-miR7695-5p* đạt 120 điểm và *osa-miR7695-3p* đạt 105 điểm với ngưỡng kì vọng lần lượt là 0,0004 và 0,006 cho thấy khả năng kết quả bị sai lệch khi dữ liệu được mở rộng là rất thấp (**Hình 3.17**). Bên cạnh đó, biểu đồ giống hàng cũng cho thấy không tồn tại điểm sai lệch (mismatch) nào giữa hai đoạn trình tự, qua đó có thể cho thấy đoạn kết quả khuếch đại này chính là *osa-miR7695* mà nghiên cứu cần xác định. Từ đó, có thể kết luận rằng phân tử *osa-miR7695* tồn tại trên tất cả các giống lúa trong nghiên cứu này.

gccc ctgcagcc gaatt atatt tttgccc aaat aatt tttta acaa aagctc tgaagtc tttct tcat ttaa tttct tagat ga tact tcat ctggaaa atgtc ccaa  
ttagtag catcacgct gtgagtaa gtct aaacc attttt attgttgat tate tctaa tctt acta ctccgat gagttt cggat tate tcta tttt taac ttggagca  
gggtc catt cattgt tttt tca tcat agtgaat aaaa tcaa ctgctt taac actt gtgcctgaa caac atat ccat ccggcgtaa tacgac tcaact atagg gaga  
gcggccgcc agatctccggat ggc tgaagttttc agcaagat **GAGTAAATGCACTAGCGGTCCTTAAACTTATCGGG**  
**AGGTTTCACTTAAGTCCACGAACCTTGCAAAGCGCACATCGAGGTCTCTAAACTTGGTTTATTGT**  
**ATCATCCCGGTCCAAAGCCACGTTTGATTGTGGTCTTGCCTATGTGGCACGCCACGTGAATGA**  
**TGACATGGAATTTTATTTTTCCTCCTTCTTCTTTTTCACCCTGCGACAACCCCT**  
**CCCCTCGTTCGCTCTCACACCAGAAAAAGGAGGAAGAAAGAGAAAAAGAAGGAGG**  
**AAGGGAGAAAAAATAAAAAATTCATGTCATTATCCACGTGATGTGCCACGTAGGCAAGA**  
**CCACAGTCAAATGCGGCTTTGAACCGAATGATATAATAAACCAAGTTTAGGGATCTCGATGT**  
**GCACTTTGAAGTTCGTGGATCTAAGTGAACCTCCTGACAAGTTCAAGAACCCTGGTGTATT**  
**TTACTC** atc ttt ctagaa ga tctc ctac aatat tct cagctgcc atggaaa atccgat gttct tctt ttattctc tcaa ga tttt caggctgt atattaaaa ctat  
att aagaa ctat gc taac caoct catc aggaaccgtt gtaggtggcgtg ggtttt tctt ggc aatc gactct catga aaact acgagct aaat attc aatat gtt  
oct ctgga ccaac tttat tctc catt tttt ttgaa cgaagttta gagcaagcttcaggaa actgaga caggaa ttat taaa aatt taaa tttt gaagaaa gtca  
gggttaa tagcat ccat tttt gctt tgcaggtt cctcagcatt tctt aaca aaagac gtctct ttgca catgtt taaa gttta aacct cctgt gtagaat tatt atcc g  
ctc ataa ttoc acac attat acgagcc gga agcata aagtga aagcct ggggtgc ctaat gagtga gcta actc acat taat tgcgtg cgc tcact goca  
att gcttt ccagtc gggaa aacct gtcgtg cc agctgcatt taat gaatc ggc caacgc gc ggggagaggc ggtt gctga ttggc gctc tccgct tccctc  
gctc actgac tgcctgc gctc gctgctg cggc gaggc gta cagct cact caaaggc gta atac ggtatc caca ga atca ggggata aacgc  
agggaaa gaacat gtagcaaa aggcagca aaaggcc aggaaccgt aaaaa ggc cgcgttgc tggcgttt toca taggctc cgcccc cctgac gag  
cat caca aaaaat cgacgct caagtc agaggtggc gaaa cccgac aggactat aaagatacca ggc gttc ccoct ggaagctc cctcgt ggcctc oct  
gttc cgacc tgccgt tacc gga taact gtcgcc tttc tocc ttcgg aagc gt ggc gcttt ctca tagctc acgctgt aggtatc tca gtt cgggtg agt  
cgtt cgctcc aagctg gct gtagcac ga acccc gttcagccc ga ccgctgc gc cttatcc gta acta tgcgtg agtcc aacc cggt aagac ac  
gactatc gc cact ggc agcagcca ctggtaa caggatt agcagagc aggtat gtaggc ggtc acagagttctt ga agtggggcct aacta cggct  
aca ctgaa gga cagtat ttgta tctgc tctgct gaagcca gttacc ttcggaa aaagagtt ggtagctc ttgat ccggcaaa caaac cacc gc tgg  
agcgggtg tttt tttt gcaagca gc agatt acgcgcaaaa aaaa aggatct caagaa ga tctttgat cttt tca cggggctgacgctc cagtgaa cg  
aaa actc acgta agggatt ttgcat ga gatta tcaaa aaggatc tca ccta ga tctt tta aatt aaaa atgaagtt taa atca atct aaagta tata tga  
gtaa actt ggt ctgaca gttac caatg ttaa tcagtgggca ccta tctc agcagtc tctctat ttc gttca tccat agttgc tgaact cccctc ggtgtagat  
aactacgat acgggagg gctta ccat ctgccc cagtgctc aatga taacc gc gagacca cgcctc accggctc cagatt tatcagcaaa taac cagcc  
agcc gga agggc cgagcgcagaa gtggtcct gc aacttat ccgct ccat ccagtc tatt aatt gttgcc ggaagc tagagta agtagtt ccocagtt a  
ata gttg cgc aacgtt gttcca ttgct acaggcat cgtggtgtca cgcctc gtcgtt ggtatggctt catt cagctc cggttcc caacga tcaa ggc gagtt  
aca tgaac cccca tgtgtgc aaaaa agcggta gc tcttcggtcc ccat cgtgtc agaagta agttggccgc agtgtta tcact catggt atggcag  
cactgcata aatt ctct actgt catgoc atcc gt aagat gc tttt ctgtgac tggtagtac tcaa ccaa gt catt ctgagaa tagtga tggcgc accga gtt  
gctc ttgccc ggc gtaac acgggata atacc gcgccac atagcaga actt aaaa gtctca tcat ttgaaaa cgttct tggggc gaaaa ctct caagg  
atc ttac cgtgtt gagatcc agttcga tgaac ccac tctgca cccaa ctgac tca gcatc tttt actt tcaac agcgttt ctgggtgagca aaaaac agg  
aaggca aaat gc cgcaaa aaagggaat aaggcgcaca cggaaatgtgaata ctca tact ctcc tttt tca atatt taat ga agcatt tat cagggtta ttgtc  
tca tgaagg gata cata ttga atgtat ttgaa aaaa aaac aaata ggggtt ccgcca catt tocc cgaaaa gt gccacc tga gtc taagaa acca ttat  
tat catga catt aacct ataa aaaa agcgtatc acgaggcc

**Hình 3.15.** Kết quả giải trình tự của *LpJET1.2* chứa trình tự của phân tử precursor  
*osa-miR7695*.



**Hình 3.16.** Kết quả cloning và giải trình tự của phân tử precursor *osa-miR7695* (487bp).

*Chú thích:* Trình tự màu đỏ: primer LpJET1.2F; Trình tự màu xanh: primer LpJET1.2R





## Kết quả tìm kiếm trình tự

See the [BLAST help pages](#) for detailed information about the meaning of the scores shown here.

Accession	ID	Query start	Query end	Subject start	Subject end	Strand	Score	Evalue	Alignment
MIMAT0029961	<a href="#">osa-miR7695-5p</a>	137	160	1	24	+	120	4e-04	<a href="#">Align</a>
MIMAT0029962	<a href="#">osa-miR7695-3p</a>	331	351	1	21	+	105	0.006	<a href="#">Align</a>
MIMAT0029961	<a href="#">osa-miR7695-5p</a>	328	351	1	24	-	84	0.35	<a href="#">Align</a>
MIMAT0026437	<a href="#">sbi-miR6230-3p</a>	395	414	2	21	+	82	0.51	<a href="#">Align</a>
MIMAT0029962	<a href="#">osa-miR7695-3p</a>	137	157	1	21	-	78	1.1	<a href="#">Align</a>
MIMAT0038756	<a href="#">cli-miR-9632-3p</a>	119	139	1	21	+	78	1.1	<a href="#">Align</a>
MIMAT0030334	<a href="#">hhi-miR-7790</a>	266	282	2	18	+	76	1.6	<a href="#">Align</a>
MIMAT0033610	<a href="#">sma-miR-8450-5p</a>	305	319	5	19	+	75	2.0	<a href="#">Align</a>
MIMAT0033610	<a href="#">sma-miR-8450-5p</a>	169	183	5	19	-	75	2.0	<a href="#">Align</a>
MIMAT0007465	<a href="#">gga-miR-1599</a>	291	310	1	20	+	73	2.9	<a href="#">Align</a>
MIMAT0007465	<a href="#">gga-miR-1599</a>	178	197	1	20	-	73	2.9	<a href="#">Align</a>
MIMAT0041119	<a href="#">eun-miR10221-3p</a>	407	426	3	22	-	73	2.9	<a href="#">Align</a>
MIMAT0041281	<a href="#">egr-miR-10266-5p</a>	276	295	1	20	-	73	2.9	<a href="#">Align</a>
MIMAT0043410	<a href="#">oni-miR-10881</a>	282	301	1	20	+	73	2.9	<a href="#">Align</a>
MIMAT0004294	<a href="#">cbr-miR-792</a>	169	186	2	19	+	72	3.5	<a href="#">Align</a>
MIMAT0004294	<a href="#">cbr-miR-792</a>	302	319	2	19	-	72	3.5	<a href="#">Align</a>

## Giống cột truy vấn miRNA

Query: 137-160	<a href="#">osa-miR7695-5p</a> : 1-24	score: 120	evaluate: 4e-04
UserSeq	137 ugccuauguggcagccacgugaa 160		
osa-miR7695-5p	1 ugccuauguggcagccacgugaa 24		
Query: 331-351	<a href="#">osa-miR7695-3p</a> : 1-21	score: 105	evaluate: 0.006
UserSeq	331 acgugauguccacguaggca 351		
osa-miR7695-3p	1 acgugauguccacguaggca 21		

**Hình 3.17.** Kết quả phân tích BLAST (*osa-miR7695*) với dữ liệu miRBase.

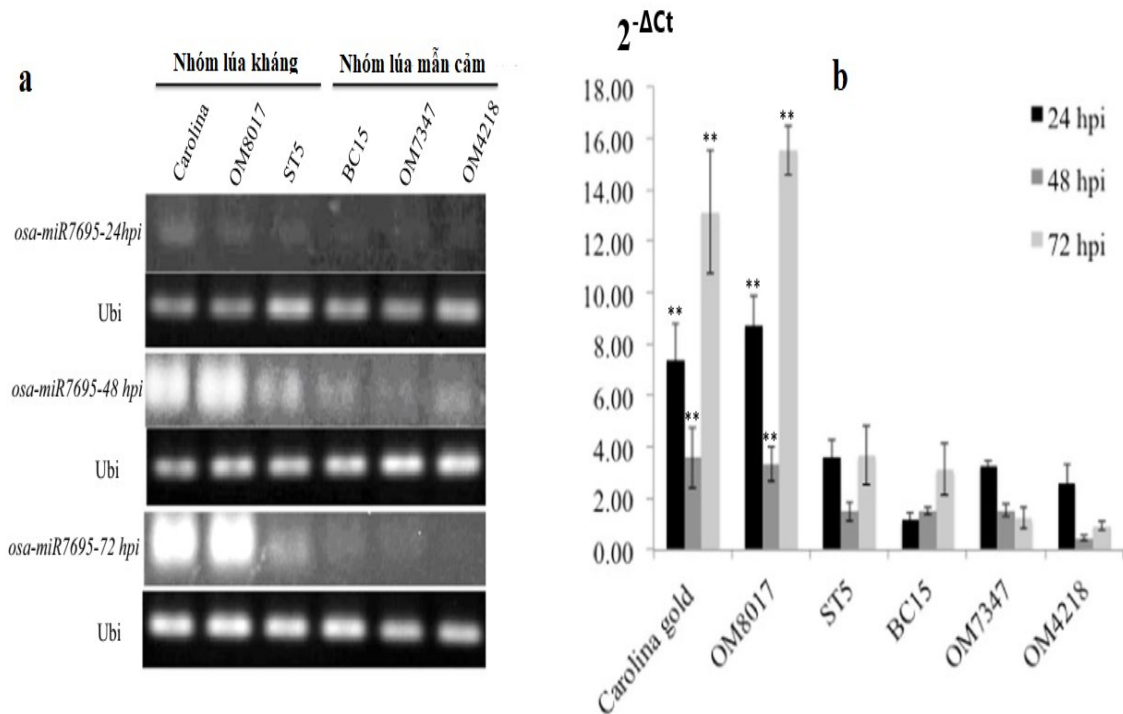
Kết quả phân tích trong thí nghiệm này cho thấy có sự hiện diện của phân tử *osa-miR7695* trên cả giống lúa *japonica* và *indica*. Kết quả này có sự khác biệt với công bố của Campo và ctv. (2013) vốn cho rằng phân tử *osa-miR7695* chỉ có trên giống lúa *japonica* mà không có trên giống *indica* bằng kỹ thuật Northern blot. Trong

nghiên cứu này nhóm tác giả cho rằng việc phát hiện *osa-miR7695* ở nhóm *japonica* ôn đới và nhiệt đới nhưng không phải ở nhóm *indica* là do 2 nhóm này có thể có nguồn gốc từ các quần thể hoang dã khác nhau. Lịch sử thuần hóa lúa gạo vẫn còn là một vấn đề tranh luận. Mặc dù người ta thường cho rằng *O. glaberrima* có nguồn gốc từ tổ tiên hoang dã của nó là *O. barthii* (Linares, 2002), nhưng vẫn còn tranh cãi về tổ tiên hoang dã của loài *O. sativa*. Người ta đã đề xuất rằng các loài phụ *japonica* và *indica* của *O. sativa* là sản phẩm của các sự kiện thuần hóa riêng biệt từ các quần thể *O. rufipogon* tổ tiên đã khác biệt hóa (Londo và ctv., 2006). Sự hiện diện của *osa-miR7695* trong nghiên cứu của Campo và ctv. (2013) chủ yếu được thực hiện trên các giống lúa hoang dã thuộc nhóm *Oryza*. Tuy nhiên các giống lúa sử dụng trong nghiên cứu này ngoài Carolina Gold được xem là giống lúa thuộc nhóm *O. glaberrima* còn lại đa số là các giống lúa lai được thực hiện từ các nguồn vật liệu khác trong đó không loại trừ có nguồn gốc tổ tiên của chúng thuộc nhóm *japonica*. Sự hiện diện của *osa-miR7695* trên các giống lúa lai thuộc nhóm *indica* đã bổ sung cho kết quả nghiên cứu của Campo và ctv. (2013) và cũng đóng góp vào quá trình thuần hóa lúa. Ngày nay với sự gia tăng trình tự bộ gen của các loài lúa hoang dã và lúa trồng sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho việc hiểu được lịch sử tiến hóa của các miRNA mới được nhận dạng từ các giống lúa thuộc các nhóm khác nhau trong chi *Oryza*.

#### **3.4. Đánh giá mức độ biểu hiện của phân tử *osa-miR7695* trên các giống lúa thuộc nhóm chống chịu và mẫn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn, *M. oryzae***

Dựa trên kết quả sự hiện diện của của phân tử *osa-miR7695* trên các giống lúa thuộc nhóm *indica* tại Việt Nam, việc đánh giá sự khác biệt về mức độ biểu hiện giữa các giống lúa thuộc nhóm chống chịu và mẫn cảm được thực hiện bằng phương pháp RT-PCR và realtime PCR. Trong nghiên cứu này 3 giống lúa đại diện cho mỗi nhóm chống chịu và mẫn cảm với *M. oryzae* được sử dụng để tiến hành đánh giá khả năng biểu hiện của *osa-miR7695* ở các thời gian sau lây nhiễm khác nhau bao gồm 24 hpi, 48 hpi và 72 hpi. Kết quả phản ứng Nested RT-PCR cho thấy *osa-miR7695* hiện diện trên 06 giống lúa tiêu biểu thuộc nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm (**Hình 3.18a**). Ở các giống lúa thuộc nhóm lúa chống chịu, các băng điện di có xu hướng to,

rõ hơn theo trình tự 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi (**Hình 3.18a**). Trong khi đó, các băng điện di trên nhóm lúa miễn cảm rất mờ và không nhận ra được sự thay đổi giữa các thời điểm (**Hình 3.18a**). Kết quả phân tích qRT-PCR cho thấy mức độ biểu hiện của nhóm chống chịu cao hơn hẳn so với nhóm lúa miễn cảm ở các thời điểm 24 hpi, 48 hpi và 72 hpi (**Hình 3.18b**). Kết quả này rất tương đồng với kết quả biểu hiện của *osa-miR7695* trên hai nhóm lúa được thực hiện bằng phương pháp RT-PCR. Phân tích thống kê cho thấy có sự khác biệt giữa nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa miễn cảm (**Phụ lục 6**).



**Hình 3.18.** Mức độ biểu hiện của *osa-miR7695* trên một số giống lúa đại diện cho hai nhóm lúa chống chịu và miễn cảm với nấm *M. oryzae*.

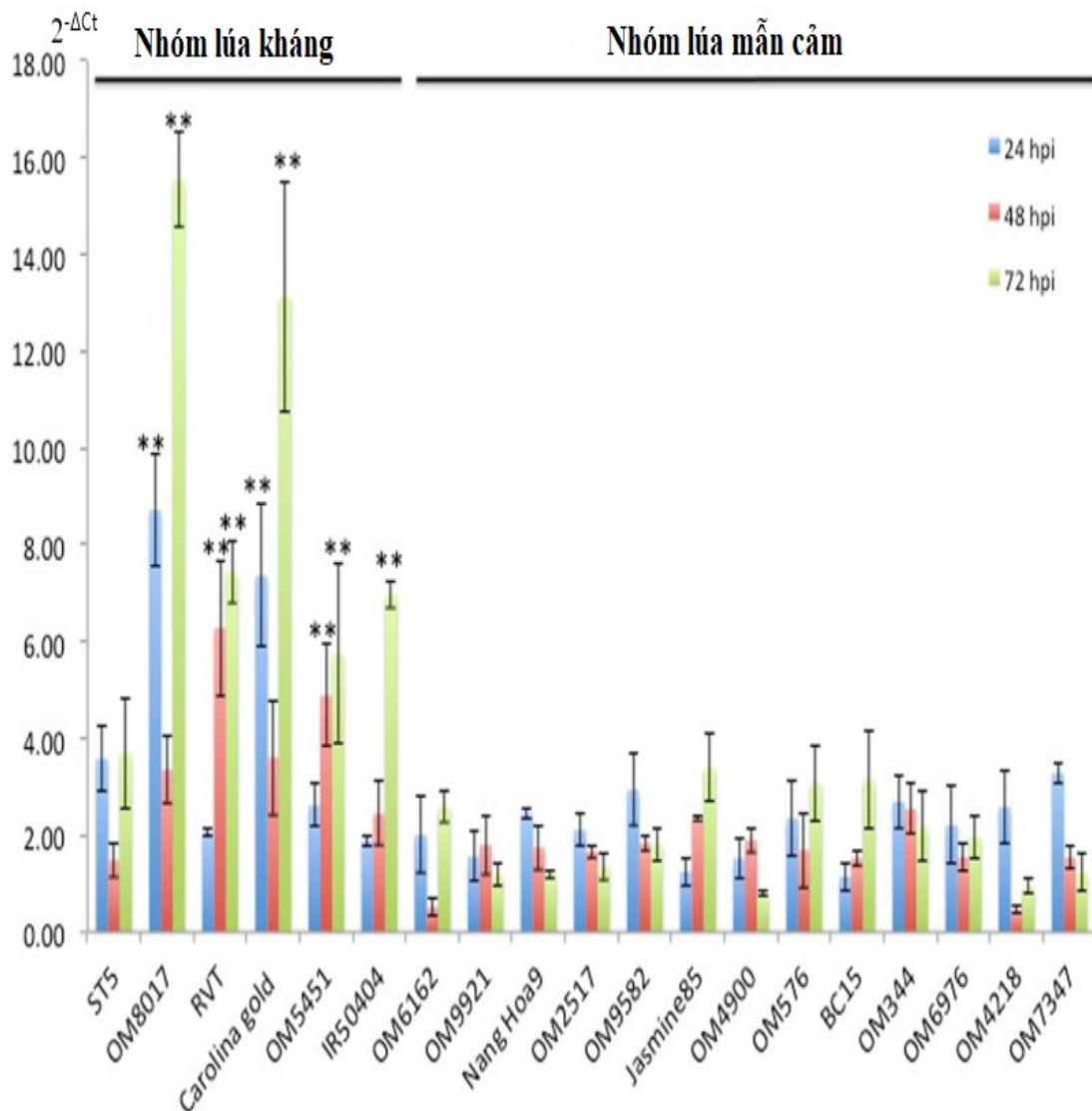
*Chú thích:* Hình a. Kết quả Nested PCR ; Hình b. Kết quả qRT-PCR trên 6 giống lúa đại diện ở các thời điểm sau lây nhiễm (\*\*:  $P \leq 0,01$ ; hpi: giờ sau lây nhiễm).

Để đánh giá rõ hơn sự khác biệt về mức độ biểu hiện *osa-miR7695* giữa các giống lúa trong hai nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa miễn với nấm *M. oryzae*, kỹ thuật qRT-PCR được tiến hành với các thời điểm nhiễm bệnh khác nhau (24 hpi, 48 hpi và 72 hpi). Kết quả cho thấy mức độ biểu hiện của *osa-miR7695* được điều hòa

tăng ở thời điểm 24 hpi ở cả nhóm lúa chống chịu và miễn cảm. Giá trị biểu hiện cao nhất của *osa-miR7695* được ghi nhận ở thời điểm 72 hpi trên nhóm lúa chống chịu và có sự khác biệt về mặt thống kê khi so sánh với nhóm lúa miễn cảm ở cùng thời điểm (**Phụ lục 6**) (**Hình 3.19**). Sự biểu hiện tăng *osa-miR7695* làm tăng nồng độ sắt, tăng cường đáp ứng miễn dịch thông qua sự ức chế gen đích *OsNramp6* (Campo và ctv., 2013; Peris-Peris và ctv., 2017). Bên cạnh đó, mô đun *osa-miR7695-OsNramp6* còn tham gia trong việc tăng cường tích lũy phytoalexins ở lúa thông qua tăng cường biểu hiện gen *OsCPS2*, *OsCPS4* (Feng và ctv., 2021). Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy có sự tương đồng với các báo cáo trước đây của Campo và ctv. (2013) vốn cho rằng biểu hiện tăng *osa-miR7695* làm tăng khả năng chống chịu nấm *M. oryzae* thông qua sự ức chế gen đích *OsNramp6*. Tuy nhiên, nghiên cứu của Campo và ctv. (2013) chỉ mới tiến hành phân tích so sánh mức độ biểu hiện giữa cây lúa chuyển gen biểu hiện tăng *osa-miR7695* và cây lúa đối chứng. Còn trong nghiên cứu này, thí nghiệm được tiến hành với tập hợp 19 giống lúa trồng thực tế tại Việt Nam. Kết quả này cũng là kết quả đầu tiên phân tích biểu hiện của *osa-miR7695* trên tập hợp nhiều giống lúa trồng tại Việt Nam. Đây là lần đầu tiên các dạng biểu hiện của *osa-miR7695* được đánh giá trên các giống lúa thuộc nhóm *indica* trồng tại Việt Nam. Kết quả này rất có ý nghĩa trong việc xây dựng các quy trình phân biệt các giống lúa thuộc nhóm chống chịu và miễn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn dựa trên các giá trị biểu hiện của phân tử *osa-miR7695*.

Bên cạnh đó, trong nhóm lúa chống chịu mặc dù khi đánh giá tỉ lệ nhiễm bệnh thì giống ST5 cho phần trăm tỉ lệ nhiễm bệnh rất tốt với phần trăm nhiễm chỉ 7,26%. Tuy nhiên, khi đánh giá biểu hiện của *osa-miR7695* thì lại cho thấy sự tích lũy biểu hiện của phân tử này khá thấp và chỉ cao hơn các giống ở nhóm miễn cảm một khoảng nhỏ (**Hình 3.18b**). Điều này có thể lý giải bởi tính ổn định trong sự biểu hiện tích lũy của các miRNA là không giống nhau hoàn toàn ở mọi cá thể. Biểu hiện của miRNA mang tính cá thể hóa cho từng nhóm tế bào, mô, cá thể, loài khác nhau và các giai đoạn sinh trưởng cũng như dưới các tác nhân khác nhau. Sự khác biệt này do bởi trong các tế bào, ở các giai đoạn khác nhau các miRNA sẽ điều hòa một hoặc nhiều

con đường tín hiệu khác nhau liên quan đến nhiều yếu tố đáp ứng với tính kháng. Mặc dù vậy trong trường hợp này, sự biểu hiện của *osa-miR7695* trên ST5 ở các giai đoạn khác nhau sau lây nhiễm vẫn tương đồng với nhóm chống chịu và khác hoàn toàn so với nhóm mẫn cảm (**Hình 3.19**). Do vậy, để có thể đánh giá chính xác sự biểu hiện của *osa-miR7695* trên ST5 cũng như tính ổn định của *osa-miR7695* trên tất cả các giống lúa trong nước, trong các thí nghiệm tiếp theo cần phải tăng số lượng mẫu nhiều hơn để đánh giá một cách khách quan nhất.

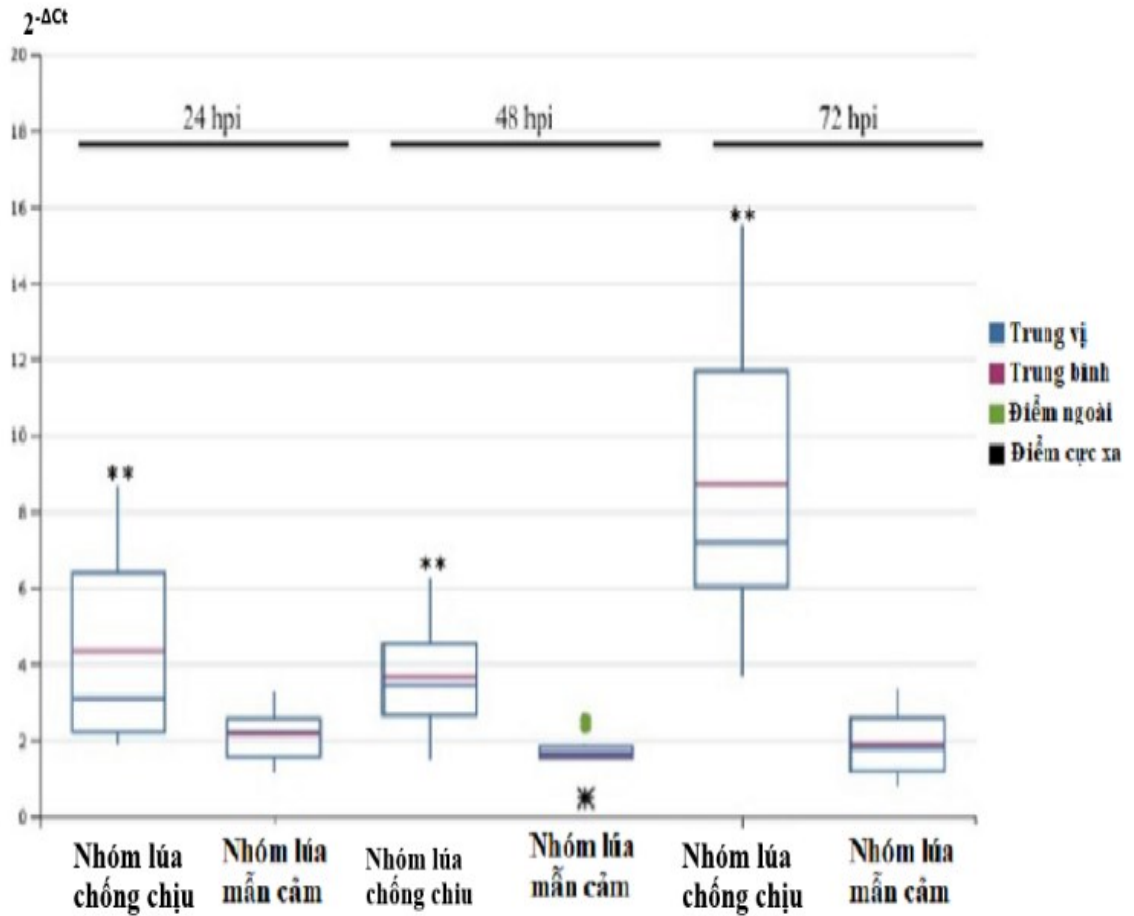


**Hình 3.19.** Mức độ biểu hiện của microRNA *osa-miR7695* ở 19 giống lúa trồng ở Việt Nam. Mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm chống chịu và mẫn cảm (\*\* tương đương  $P \leq 0,01$ ; hpi: giờ sau lây nhiễm).

### 3.5. Phân tích giá trị biểu hiện của phân tử *osa-miR7695* trên các giống lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm *M. oryzae*.

Khuynh hướng biểu hiện của phân tử *osa-miR7695* trên các giống lúa nghiên cứu đã được xác định, song giá trị biểu hiện chung của hai nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm vẫn cần được xác định. Phân tích biểu đồ hộp dựa trên giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  của *osa-miR7695* được thực hiện trên 19 giống lúa của cả hai nhóm chống chịu và mẫn cảm với *M. oryzae* ở các thời gian sau lây nhiễm khác nhau 24, 48 và 72 hpi. Kết quả chỉ ra rằng biểu hiện của *osa-miR7695* tăng mạnh ở 72 hpi và có sự khác biệt mang tính thống kê ở cả 2 nhóm (**Hình 3.20**).

Kết quả đánh giá mức độ biểu hiện của *osa-miR7695* trên hai nhóm lúa cho thấy ở thời điểm 24 hpi, giá trị biểu hiện của  $2^{-\Delta Ct}$  nằm trong khoảng **1,89 – 8,71** (nhóm giống lúa chống chịu) và **1,15 – 3,28** (nhóm giống lúa mẫn cảm). Sau 48 hpi, con số này ở nhóm giống lúa chống chịu dao động trong khoảng **3,68 – 6,28** và từ **1,63 – 2,55** trên nhóm mẫn cảm. Đến 72 hpi, giá trị biểu hiện  $2^{-\Delta Ct}$  nằm trong khoảng **8,75 – 15,54** (nhóm giống lúa chống chịu) và **1,91 – 3,39** (nhóm giống lúa mẫn cảm) (**Bảng 3.4**).



**Hình 3.20.** Biểu đồ hộp mô tả biểu hiện của *osa-miR7695* ở 19 giống lúa chống chịu và mẫn cảm. Mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê (\*\*:  $P < 0,01$ ; hpi: giờ sau lây nhiễm).

**Bảng 3.4.** Phân tích biểu đồ hộp giá trị biểu hiện của *osa-miR7695* ở nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm ở các thời điểm khác nhau (24 hpi, 48 hpi, 72 hpi)

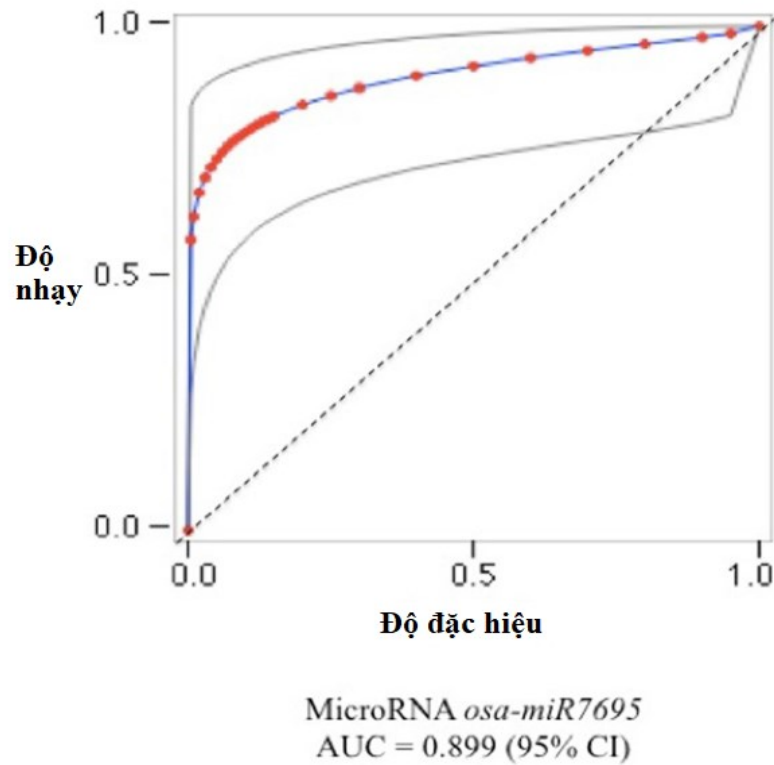
Nhóm lúa	Thời gian	Số lượng mẫu	Trung bình	Giá trị nhỏ nhất	Giá trị phân vị Q1	Giá trị trung vị	Giá trị phân vị Q3	Giá trị lớn nhất
Nhóm lúa chống chịu	24 hpi	6	4,37	1,89	2,21	3,1	6,42	8,71
Nhóm lúa mẫn cảm		13	2,16	1,15	1,57	2,21	2,58	3,28

Nhóm lúa chống chịu	48 hpi	6	3,68	1,49	2,68	3,48	4,56	6,28
Nhóm lúa miễn cảm		13	1,63	0,47	1,54	1,7	1,84	2,55
Nhóm lúa chống chịu	72 hpi	6	8,75	3,69	6,06	7,21	11,7	15,54
Nhóm lúa miễn cảm		13	1,91	0,8	1,19	1,8	2,6	3,39

Nhìn chung về mặt tổng quan không có sự thay đổi quá nhiều về khoảng ngưỡng biểu hiện giữa các thời điểm khác nhau ở cả hai nhóm. Tuy nhiên, về mặt biểu hiện trung bình có thể dễ dàng thấy được sự gia tăng biểu hiện rất cao ở khoảng 72 hpi so với cả 24 hpi và 48 hpi trên nhóm lúa chống chịu khi giá trị biểu hiện  $2^{-\Delta Ct}$  tăng từ **4,37** (24 hpi) lên **8,75** (72 hpi). Kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở tất cả các thời điểm đánh giá với độ tin cậy đạt đến 99% ( $P < 0,01$ ), qua đó cho thấy tiềm năng ứng dụng cao của *osa-miR7695* như một dấu ấn sinh học khi sự khác biệt biểu hiện được duy trì ở tất cả các thời điểm đánh giá.

Để xác định độ nhạy và đặc hiệu của giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  khi so sánh giữa 2 nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa miễn cảm, phương pháp đường cong ROC (receiver operator characteristic) được sử dụng (Quoc và ctv., 2019). Trong đó, độ nhạy và độ đặc hiệu được xác định dựa vào diện tích bên dưới đường cong (Area under the curve – AUC). Theo lý thuyết về hồi quy nhị phân, giá trị AUC dao động trong khoảng từ 0,5 đến 1 tương ứng với độ nhạy và độ đặc hiệu dao động từ thấp (0,5) đến cao (1). Kết quả phân tích cho thấy giá trị AUC đạt 0,899 (với độ tin cậy là 95%) (**Bảng 3.5**). Điều này cho thấy mô hình nhận diện, phân biệt nhóm lúa chống chịu và miễn cảm dựa trên *osa-miR7695* là chính xác, hiệu quả cao và có khả năng ứng dụng vào thực tế khi độ đặc hiệu và độ nhạy cao đại diện cho khả năng phân biệt dương tính thật và âm tính thật ở các giống lúa (**Hình 3.21**).





**Hình 3. 21.** Đường cong ROC (Receiver operator characteristic) thể hiện độ nhạy và độ đặc hiệu của giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  (*osa-miR7695*) trong việc phân biệt nhóm giống lúa chống chịu và mẫn cảm. Diện tích bên dưới đường cong (AUC) là 0,899.

**Bảng 3.5.** Kết quả phân tích đường cong ROC *osa-miR7695* của nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm.

Chỉ tiêu	<i>Osa-miR7695</i>
Diện tích dưới đường cong (AUC)	0,8988
Độ lệch chuẩn (Std. Error)	0,054
Số mẫu dương tính	18
Số mẫu âm tính	39

Phương pháp ROC được sử dụng để xác định độ nhạy và độ đặc hiệu từ đó tính toán tính chính xác và khả năng áp dụng thực tiễn của một mô hình dự đoán trong

hầu hết các lĩnh vực khoa học kỹ thuật (Obuchowski và Bullen, 2018). Đặc biệt trong lĩnh vực nông nghiệp liên quan đến tính kháng nấm bệnh, phương pháp ROC cũng được sử dụng trong việc xác định độ đặc hiệu và tính hiệu quả trong việc phân biệt có hoặc không có bệnh đạo ôn trên lúa nhờ mô hình hệ thống mạng nơ-ron tích chập sâu xử lý ảnh (Liang và ctv., 2019), dự báo tình trạng và khả năng nhiễm bệnh đạo ôn trên đồng ruộng bằng mô hình dự báo dựa trên dữ liệu thời tiết (Sriwana, 2022) và phân biệt giống lúa *indica* hoặc *japonica* (Kim, 2018). Tuy nhiên, hầu như chưa có công bố nào sử dụng cho việc phân biệt giống lúa chống chịu hoặc mẫn cảm dựa trên các giá trị biểu hiện của *osa-miR7695* bằng phương pháp ROC ở Việt Nam. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy độ nhạy và độ chuyên biệt khi sử dụng *osa-miR7695* là đạt yêu cầu khi giá trị AUC gần bằng 0,9 (giá trị 1 là hoàn hảo nhất) đồng nghĩa với việc mô hình phân biệt lúa dựa trên giá trị biểu hiện của *osa-miR7695* thu nhận từ phản ứng Realtime-PCR là hiệu quả, tính chính xác đạt xấp xỉ 90%. Điều này cho thấy tính ổn định của phân tử *osa-miR7695* khi phân tích giá trị biểu hiện của nó trên 2 nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm tại Việt Nam hoàn toàn có khả năng ứng dụng vào thực tế. Do vậy, kết quả phân tích cho thấy phân tử *osa-miR7695* có thể trở thành một chỉ thị phân tử (marker) tiềm năng hỗ trợ phân biệt giống lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn, *M. oryzae*. Điều này hỗ trợ rất nhiều cho các chương trình tuyển chọn và lai tạo các giống lúa tại Việt Nam hiện nay khi áp dụng sinh học phân tử vào các bước đánh giá ban đầu một cách nhanh chóng và kịp thời.

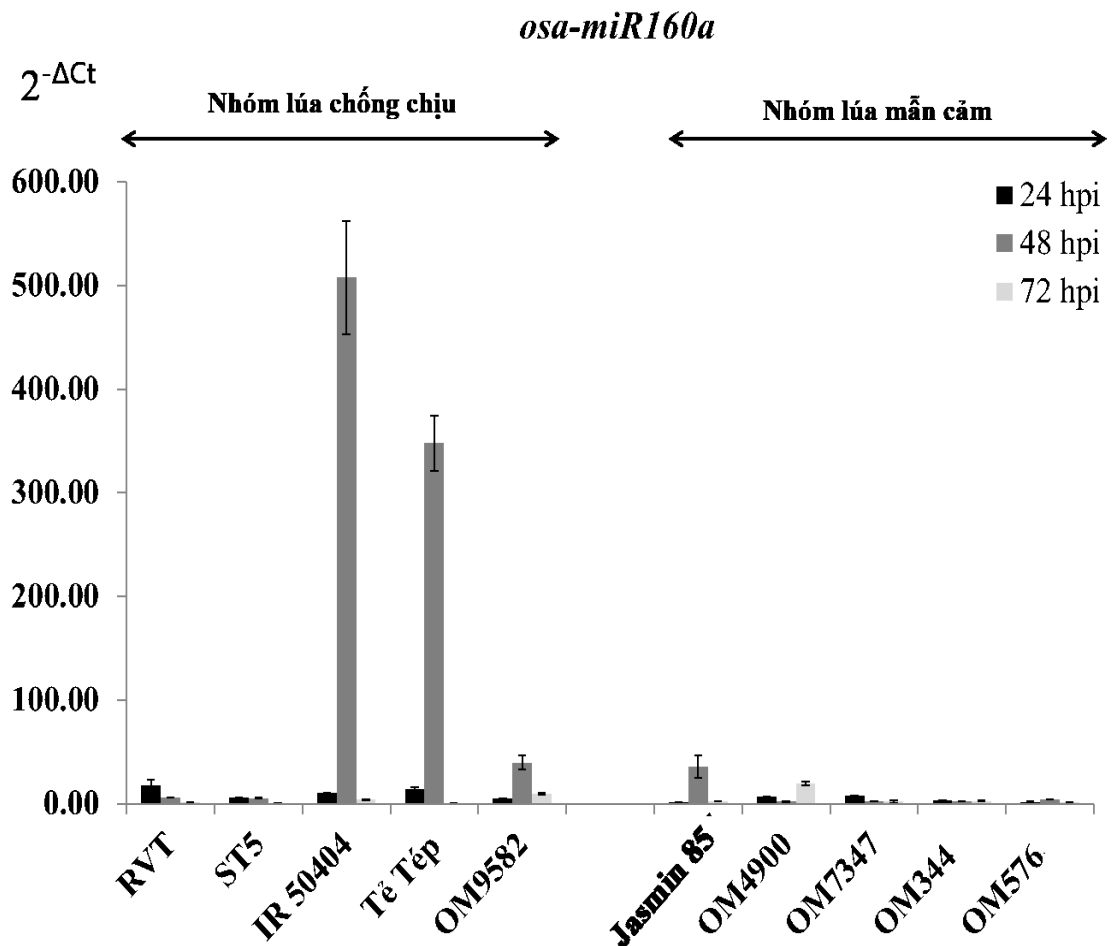
### **3.6. Đánh giá biểu hiện của phân tử *osa-miR160a* trên các giống lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn, *Magnaporthe oryzae*.**

Bộ gen của lúa có 6 vị trí gen tạo ra *osa-miR160*, tuy nhiên chỉ tạo ra có 3 isoforms (miRNA đồng dạng) trưởng thành là *osa-miR160a/b/c/d*, *osa-miR160e*, và *osa-miR160f* (Li và ctv., 2019). Nghiên cứu trước đây cho thấy biểu hiện tăng *osa-miR160a* làm tăng khả năng đề kháng với nấm *M. oryzae* ở lúa thông qua một số cơ chế như: tăng nồng độ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> khi có sự xâm nhiễm của nấm *M. oryzae*, tăng mức độ biểu hiện của các gen kháng *OsPRI*, *OsPRI0* (Li và ctv., 2014). Tuy nhiên, việc đánh giá mang tính ứng dụng mức độ biểu hiện của *osa-miR160a* trên các giống lúa thuộc

nhóm mẫn cảm và chống chịu với *M. oryzae* vẫn còn chưa rõ. Trong nghiên cứu này, để đánh giá mức độ biểu hiện của *osa-miR160a* trên các giống lúa bị lây nhiễm nấm *M. oryzae*, các phản ứng qRT-PCR được thực hiện với các mẫu lá lúa sau khi lây nhiễm ở 24, 48 và 72 hpi. Mặc dù có sự đa dạng về mức độ biểu hiện của *osa-miR160a* giữa các giống ở các thời điểm sau lây nhiễm khác nhau, kết quả cho thấy sự biểu hiện tăng của *osa-miR160a* được quan sát trên 3/5 (RVT, IR50404, Tẻ Tép) và 3/5 (IR50404, Tẻ Tép, OM9582) các giống lúa chống chịu ở các thời điểm lần lượt là 24 hpi và 48 hpi (**Hình 3.22**). Trong đó, biểu hiện của phân tử này đặc biệt cao ở 2 giống lúa chống chịu là IR50404 và Tẻ Tép khi giá trị biểu hiện của 2 giống này cao xấp xỉ đạt 500 điểm. Mặt khác, mức độ tích lũy của phân tử này ở các giống có sự đa dạng cao với xu hướng tăng dần sau 24 giờ lây nhiễm, đạt cực đại sau 48 giờ lây nhiễm và mức độ tích lũy sẽ giảm dần quay về trạng thái ổn định sau 72 giờ lây nhiễm trên các giống IR50404, Tẻ Tép, OM9582. Trên một số giống khác trong nhóm chống chịu như RVT và ST5, mức độ tích lũy sau lây nhiễm chỉ gia tăng ở thời điểm 24 giờ và giảm dần ở các thời điểm sau đó. Ngược lại, khuynh hướng biểu hiện của phân tử *osa-miR160a* trên các giống thuộc nhóm mẫn cảm lại chưa rõ ràng, hầu như không có sự gia tăng quá cao ở các giống ở trước và sau các thời điểm lây nhiễm (**Hình 3.22**).

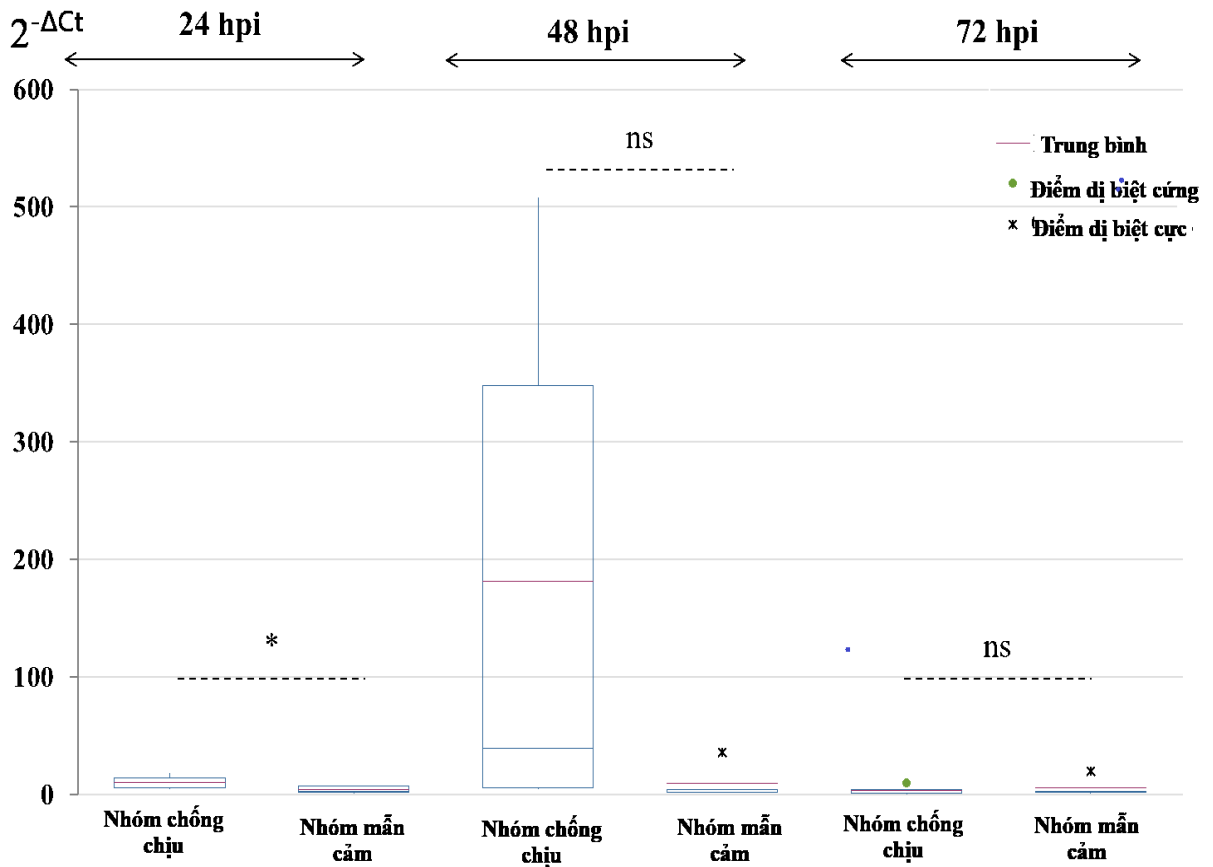
Kết quả này có sự tương đồng so với nghiên cứu trước đây khi tiến hành so sánh mức độ biểu hiện của *osa-miR160a* trên giống lúa kháng (IRBLkm-Ts) và giống lúa mẫn cảm (LTH), nghiên cứu này cũng cho rằng mức độ biểu hiện tăng *osa-miR160a* trên giống lúa kháng (IRBLkm-T) cao hơn gấp 4 lần so với giống lúa mẫn cảm (LTH) ở thời điểm 12 hpi và 24 hpi (Li và ctv., 2014). Biểu hiện của *osa-miR160a* liên quan đến sự điều hoà của gen đích *ARFs* đáp ứng khác nhau với nhân tố auxin và tín hiệu abscisic (Huang & Zhao, 2016; Mallory và ctv., 2004). Các gen đích *ARFs* được giải phóng sẽ kích hoạt hoặc ngăn chặn sự biểu hiện của một tập hợp lớn các gen đáp ứng với auxin bằng cách liên kết với các yếu tố đáp ứng với auxin (AuxRE) trong vùng điều hoà của chúng (Huang & Zhao, 2016); auxin được xem như là một nhân tố ảnh hưởng đến khả năng chống chịu nấm *M. oryzae* của lúa (Li

và ctv., 2014). *Osa-miR160a* có thể điều hòa 6 trên 25 gen đích trong nhóm *ARFs* liên quan đến auxin (Li và ctv., 2014). Trong đó, sự biểu hiện *ARF10*, *ARF16*, *ARF17* đều đã được đánh giá là liên quan đến tính kháng trên lúa (Huang & Zhao, 2016; Mallory và ctv., 2004). Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của các gen mục tiêu khác như *ARF8*, *ARF18*, *ARF22* vẫn chưa được đánh giá là có liên quan đến hệ miễn dịch của cây lúa chống chịu với sự xâm nhiễm của *M. oryzae* và nó cần được điều tra thêm vì các biểu hiện của chúng có thể dao động khác nhau ở cả giống kháng và giống nhiễm. Điều này cũng dẫn đến sự khác nhau về dạng biểu hiện của *osa-miR160a* trên các giống lúa khác nhau ở cả 2 nhóm chống chịu và mẫn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn.



**Hình 3.22.** Kết quả mức độ biểu hiện của *osa-miR160a* trên các giống lúa thuộc nhóm chống chịu và mẫn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn, *M. oryzae*.

Phân tích biểu đồ hộp (Box plot) các giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  của *osa-miR160a* được thực hiện với 10 giống lúa của cả 2 nhóm chống chịu và mẫn cảm với nấm *M. oryzae* ở các thời gian sau nhiễm khác nhau (24, 48 và 72 hpi). Kết quả chỉ ra rằng mức độ biểu hiện của *osa-miR160a* có khuynh hướng tăng ở thời điểm 24 hpi và 48 hpi trên các giống lúa thuộc nhóm chống chịu (Hình 3.23). Tuy nhiên chỉ duy nhất ở thời điểm 24 hpi mới có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ), trong khi đó không có sự khác biệt về mặt thống kê ở 48 và 72 hpi giữa nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm (Hình 3.23).



**Hình 3. 23.** Biểu đồ hộp (box plot) các giá trị biểu hiện của *osa-miR160a* trên 10 giống lúa thuộc hai nhóm chống chịu và mẫn cảm với *M. oryzae* ở các thời điểm sau lây nhiễm khác nhau (24, 48 và 72 hpi). Dấu \* chỉ mức độ khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa 2 nhóm lúa ( $P < 0,05$ ).

Chúng tôi cũng nhận thấy sự tích lũy gia tăng của phân tử *osa-miR160a* thông qua giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  trung bình của *osa-miR160a* trên các giống lúa thuộc nhóm chống chịu bệnh đạo ôn cao hơn 2,6 lần so với giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  trung bình của *osa-miR160a* trên các giống lúa thuộc nhóm mẫn cảm với *M. oryzae* (**Bảng 3.6**). Ở thời điểm 24 hpi, các giống lúa chống chịu và mẫn cảm với *M. oryzae* có giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  của *osa-miR160a* lần lượt là trong khoảng 10,52 – 17,87 và 4,04 – 7,48 (**Bảng 3.6**). Kết quả phân tích này cũng thể hiện sự tương đồng với nghiên cứu trước đây của Li và ctv. (2014) khi cho rằng mức độ tích lũy *osa-miR160a* có sự khác biệt giữa các giống chống chịu và giống mẫn cảm ở 24 hpi. Do đó việc xác định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của giá trị biểu hiện  $2^{-\Delta Ct}$  (*osa-miR160a*) trên các giống lúa thuộc hai nhóm sẽ cung cấp thông tin dữ liệu hữu ích giúp sàng lọc và phân biệt các giống lúa chống chịu hay mẫn cảm với nấm *M. oryzae* ở 24 giờ sau lây nhiễm.

**Bảng 3.6.** Kết quả phân tích biểu đồ hộp (box plot) mức độ biểu hiện của *osa-miR160a* giữa nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với *M. oryzae* ở 24 hpi (*hpi: hour post inoculation*).

Nhóm lúa	hpi	Số lượng	Giá trị trung bình	Giá trị biên gốc	Q1	Trung vị	Q3	Giá trị biên phía ngọn
Chống chịu với <i>M. oryzae</i>	24	5	10,52	4,63	5,79	10,16	14,15	17,87
Mẫn cảm với <i>M. oryzae</i>		5	4,04	1,12	1,76	2,80	7,06	7,48

Như vậy, việc đánh giá mức độ biểu hiện của *osa-miR160a* trong nghiên cứu này đã được thực trên 10 giống lúa thuộc 2 nhóm chống chịu và mẫn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn, *M. oryzae* ở các giai đoạn sau nhiễm bao gồm 24, 48 và 72 hpi. Mức độ biểu hiện của *osa-miR160a* ở các thời điểm 48, 72 hpi không có sự khác biệt về mặt thống kê giữa nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với *M. oryzae* mặc dù khuynh

hướng biểu hiện của phân tử này ở 48 hpi vẫn có xu hướng cao so với nhóm mẫu cảm. Ở thời điểm 24 hpi, mức độ biểu hiện của *osa-miR160a* của nhóm lúa chống chịu *M. oryzae* cao hơn 2,6 lần so với nhóm lúa mẫu cảm *M. oryzae*. Các kết quả đạt được trong nghiên cứu này cho thấy *osa-miR160a* có thể được sử dụng như một chỉ thị liên quan đến tính chống chịu và mẫu cảm với bệnh đạo ôn của lúa nhờ sự khác biệt và mức độ tích lũy cao ở những giống lúa chống chịu được với nấm bệnh đạo ôn qua đó hứa hẹn là một công cụ hữu ích, tiềm năng để hỗ trợ cho các công tác đánh giá và lai tạo lúa ở nước ta hiện nay. Hơn thế, nghiên cứu mới đây của Feng và ctv, (2022) còn cho thấy *osa-miR160a* không chỉ điều hòa tính kháng của cây lúa với bệnh đạo ôn mà còn ở nhiều bệnh khác với cơ chế tương tự là nhằm đến mục tiêu là các gen thuộc họ *ARFs* và *ARF8* là gen được làm giàu chủ chốt cho sự điều hòa đa mục tiêu này. Điều này cho thấy sự tăng biểu hiện *osa-miR160a* có khả năng điều hòa phổ rộng chống lại các tác nhân gây bệnh với cây lúa. Cụ thể, *osa-miR160a* điều hòa tính kháng phổ rộng của lúa khi nhắm vào gen *ARF18*, *ARF22*, *ARF8*, *ARF10*. Trong đó sự giảm biểu hiện của cả 4 gen này đều làm tăng cường tính kháng đối với nấm *M. oryzae*, *ARF18* nhạy cảm hơn với *R. solani* và *ARF10* nhạy cảm hơn với *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae (Xoo)*. Ngoài ra, sự điều hòa của *osa-miR160a* còn kiểm soát các phản ứng phòng thủ cơ bản của cây lúa như hệ thống tín hiệu phòng thủ PTI, điều hòa mức độ tích lũy  $H_2O_2$ , kích thích hình thành mô sẹo và nhóm gen *PR* mà không cần trải qua điều trị. Như vậy, giá trị biểu hiện của *osa-miR160a* trong nghiên cứu này không chỉ là một chỉ thị tiềm năng để hỗ trợ cho việc lai tạo các giống lúa chống chịu với bệnh đạo ôn mà còn là các bệnh khác như khô vằn hay bệnh cháy bìa lá lúa. Công cuộc chọn giống chống chịu sâu bệnh vẫn còn nhiều hạn chế trong nước, kết quả của nghiên cứu này sẽ là một đóng góp mang tính ứng dụng đầy tiềm năng trong tương lai.

### **3.7. Đánh giá biểu hiện của phân tử *osa-miR169a* trên các giống lúa chống chịu và mẫu cảm với nấm gây bệnh đạo ôn, *Magnaporthe oryzae*.**

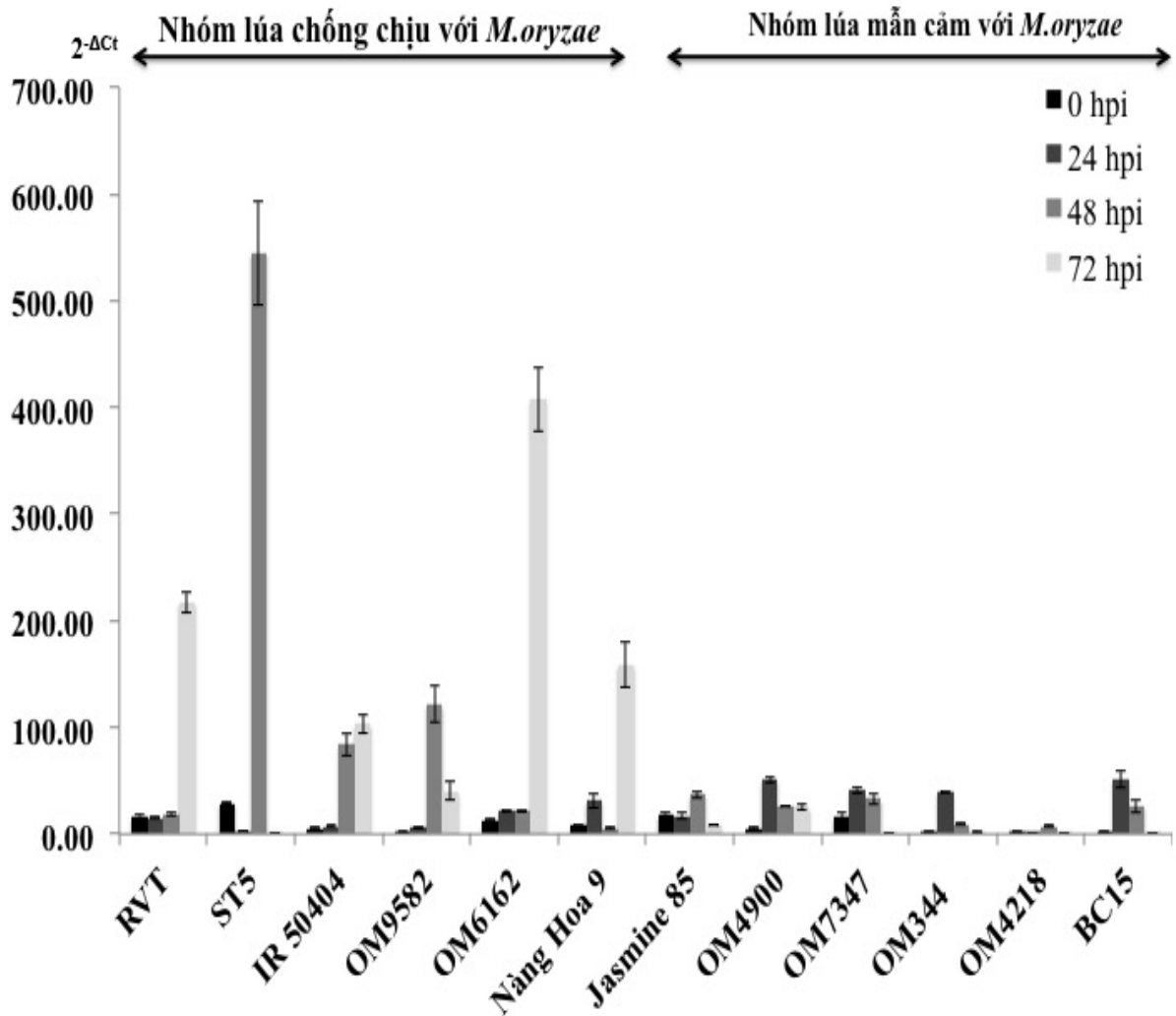
Vai trò của microRNA liên quan đến khả năng chống chịu của lúa đối với nấm *M. oryzae* ngoài *osa-miR7695* còn có rất nhiều miRNA khác như *osa-miR160a*, *osa-*

*miR162a*, *osa-miR164a*, *osa-miR169a*, *osa-miR398b*, *osa-miR319b* (Huang và ctv., 2016; Li và ctv., 2020; Li và ctv., 2017; Li và ctv., 2019a; Wang và ctv., 2021; Wang và ctv., 2018). Nếu như *osa-miR7695* được mô tả là biểu hiện tăng đối với tính kháng *M. oryzae* của lúa bằng cách giảm sự biểu hiện của một số biến thể phiên mã gen *OsNramp6* (Campo và ctv., 2013; Peris-Peris và ctv., 2017) thì ngược lại một số miRNA như *osa-miR169a* lại được mô tả là biểu hiện giảm đối với tính kháng của lúa (Li và ctv., 2017). Biểu hiện quá mức *osa-miR169a* sẽ dẫn đến giảm biểu hiện của gen phòng thủ trong họ gen *NF-YA* ở mức độ phiên mã và dịch mã làm cây lúa trở nên nhạy cảm với các chủng nấm *M. oryzae* (Li và ctv., 2017). Tuy nhiên, việc đánh giá mang tính ứng dụng mức độ biểu hiện của *osa-miR169a* trên các giống lúa thuộc nhóm miễn cảm và chống chịu với *M. oryzae* vẫn còn chưa rõ. Trong nghiên cứu này mức độ biểu hiện của *osa-miR169a* được đánh giá trên 12 giống lúa với 6 giống lúa đại diện cho mỗi nhóm lúa chống chịu và miễn cảm với nấm *M. oryzae* ở các thời gian sau lây nhiễm khác nhau (24 hpi, 48 hpi, 72 hpi) bằng phương pháp qRT-PCR. Kết quả cho thấy sự biểu hiện tăng của *osa-miR169a* được quan sát trên 3/6 (ST5, IR50404, OM9582) và 5/6 (RVT, IR50404, OM9582, OM6162, Nàng Hoa 9) giống lúa chống chịu *M. oryzae* ở các thời điểm lần lượt là 48 hpi và 72 hpi (**Hình 3.24**). Đồng thời, mức độ tích lũy của *osa-miR169a* trên các giống chống chịu không được tích lũy lớn ở các thời điểm 0 hpi và 24 hpi và không có sự khác biệt so với mức độ tích lũy trên các giống lúa miễn cảm. Ngược lại, trên các giống lúa miễn cảm mặc dù có sự đa dạng trong mức độ tích lũy biểu hiện của *osa-miR169a* trên mỗi giống song nhìn chung mức độ biểu hiện lại có khuynh hướng giảm sau thời điểm 24 hpi.

Kết quả này có sự khác biệt so với các nghiên cứu trước đây khi biểu hiện tăng quá mức *osa-miR169a* sẽ dẫn đến ức chế biểu hiện của các gen đích *NF-YAs* làm gia tăng tính nhạy cảm với nấm *M. oryzae* của lúa (Li và ctv., 2017). Sự biểu hiện của *osa-miR169a* liên quan đến sự điều hoà của bảy gen đích đáp ứng khác nhau với quá trình nhiễm *M. oryzae* trên lúa. Bảy gen đích này của *osa-miR169a* thuộc nhiều nhóm khác nhau trên cây phát sinh loài và đóng nhiều vai trò khác nhau trong khả năng miễn dịch của lúa đối với *M. oryzae* (Li và ctv., 2017). Sự biểu hiện giảm của gen



*NF-YA1* hay biểu hiện tăng của gen *NF-YA1*, *NF-YA2* và *NF-YA6* đều liên quan đến khả năng chống chịu sự xâm nhiễm của *M. oryzae* trên lúa (Li và ctv., 2017). Hơn nữa mức độ biểu hiện của các gen mục tiêu khác như *NF-YA4*, *NF-YA3* và *NF-YA10* vẫn chưa được đánh giá là có liên quan đến hệ miễn dịch của cây lúa chống chịu với sự xâm nhiễm của *M. oryzae*, và cần được điều tra thêm vì các biểu hiện của chúng có thể dao động khác nhau ở cả giống chống chịu và giống mẫn cảm (Li và ctv., 2017). Điều này cũng dẫn đến sự khác nhau về dạng biểu hiện của *osa-miR169a* trên các giống lúa khác nhau ở cả 2 nhóm chống chịu và mẫn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn.

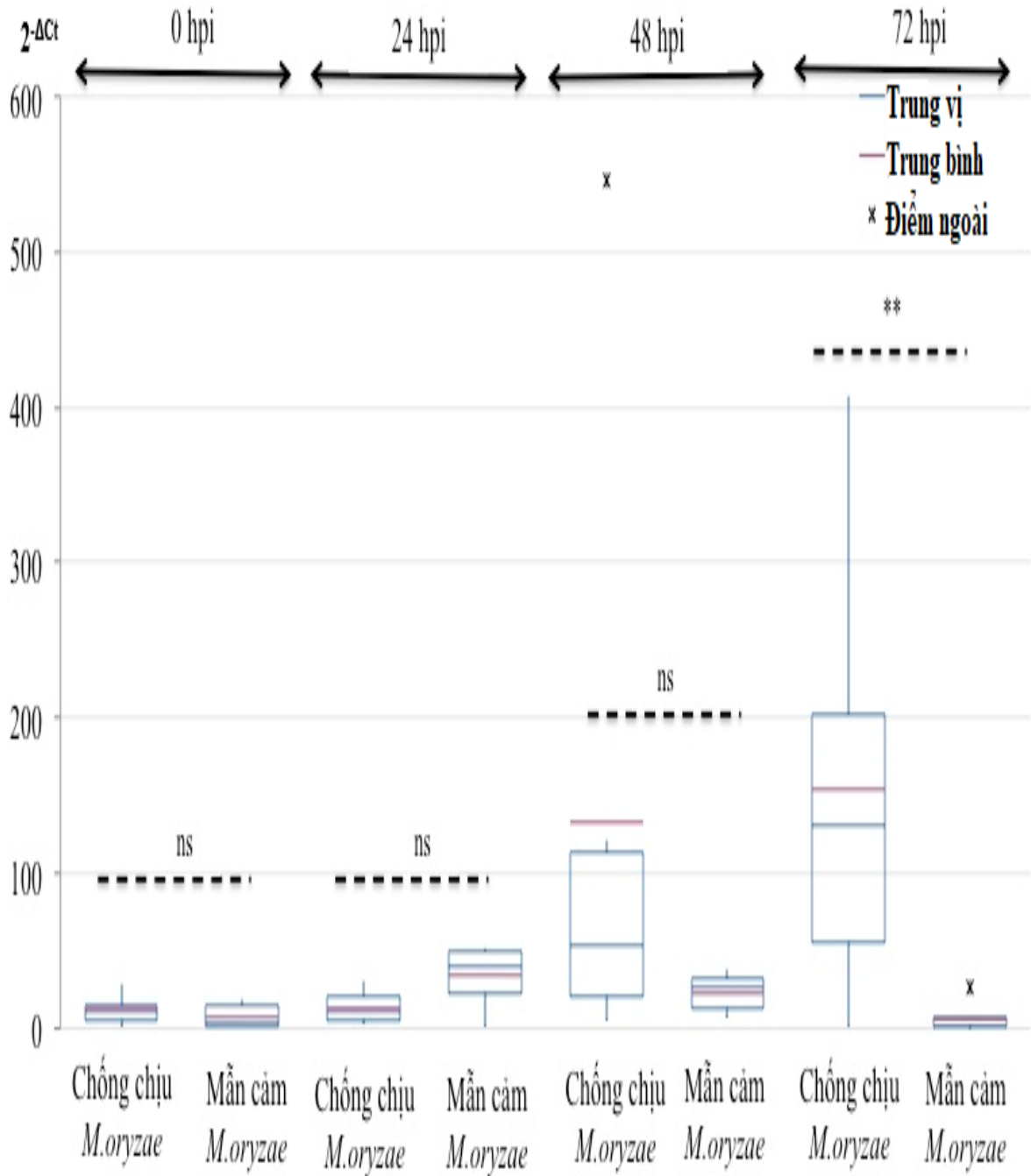


**Hình 3.24.** Mức độ biểu hiện của *osa-miR169a* trên các giống lúa thuộc nhóm chống chịu và mẫn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn, *M. oryzae* (hpi: giờ sau lây nhiễm)

Để làm rõ hơn sự khác biệt về mức độ biểu hiện của *osa-miR169a* trên các giống lúa thuộc hai nhóm chống chịu và mẫn cảm với nấm *M. oryzae*, phân tích biểu đồ hộp (box plot) được thực hiện dựa trên giá trị (*osa-miR169a*) của 12 giống lúa. Kết quả chỉ ra rằng sự tăng biểu hiện của *osa-miR169a* được quan sát ở 48 hpi và 72 hpi trên các giống lúa thuộc nhóm chống chịu (**Hình 3.25**). Tuy nhiên sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mức độ biểu hiện của *osa-miR169* giữa các giống lúa thuộc hai nhóm chỉ thể hiện ở 72 hpi trong khi đó sự khác biệt không có ý nghĩa giữa hai nhóm được quan sát ở 0, 24 và 48 hpi (**Hình 3.25, Phụ lục 6**). Hơn nữa, sự gia tăng

của giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  (*osa-miR169a*) trung bình trên các giống lúa thuộc nhóm chống chịu với *M. oryzae* cao hơn 25 lần so với các giống lúa thuộc nhóm mẫn cảm với *M. oryzae* (**Bảng 3.7**). Ở 72 hpi, các giống lúa chống chịu và mẫn cảm với *M. oryzae* có giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  (*osa-miR169a*) lần lượt là 56,15 - 202,93 và 0,72 – 6,4 (**Bảng 3.7**).

Mặc dù biểu hiện tăng của *osa-miR169a* cũng được quan sát ở 48 hpi trên các giống lúa thuộc nhóm chống chịu *M. oryzae* so với biểu hiện của phân tử microRNA này trên các giống lúa mẫn cảm với *M. oryzae*, phân tích box plot chỉ ra rằng không có sự khác biệt có ý nghĩa về biểu hiện của *osa-miR169a* giữa hai nhóm lúa này. Điều này cũng tương tự khi quan sát sự biểu hiện của *osa-miR169a* ở 0 hpi và 24 hpi giữa các giống lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn (**Hình 3.25**). Kết quả phân tích này cũng thể hiện tính tương đồng với nghiên cứu trước đây của Li và ctv. (2017) khi mức độ tích lũy biểu hiện của các thành viên *miR169* không có sự khác biệt về mặt thống kê giữa lúa chống chịu và lúa mẫn cảm ở các thời điểm 0, 12, 24, và 48 hpi. Do đó việc xác định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giá trị biểu hiện  $2^{-\Delta Ct}$  của *osa-miR169a* trên các giống lúa thuộc hai nhóm sẽ cung cấp thông tin dữ liệu hữu ích giúp sàng lọc và phân biệt các giống lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm *M. oryzae* ở 72 hpi.



**Hình 3.25.** Biểu đồ hộp (box plot) các giá trị biểu hiện của *osa-miR169a* trên 12 giống lúa thuộc hai nhóm chống chịu và mẫn cảm với *M. oryzae* ở các thời điểm sau nhiễm khác nhau (0, 24, 48 và 72 hpi). Dấu \*\* chỉ mức độ khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa 2 nhóm lúa ( $P \leq 0,01$ ).

**Bảng 3.7.** Phân tích biểu đồ hộp (box plot) mức độ biểu hiện của *osa-miR169a* giữa nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với *M. oryzae* ở 72 hpi.

Nhóm lúa	hpi	SL	Giá trị trung bình	Giá trị nhỏ nhất	Giá trị biên gốc	Q1	Trung vị	Q3	Giá trị biên phía ngọn	Giá trị lớn nhất
Chống chịu với <i>M. oryzae</i>	72	6	154,76	0,47	0,47	56,15	131,18	202,93	407,76	407,76
Mẫn cảm với <i>M. oryzae</i>		6	6,15	0,18	0,18	0,72	1,25	6,40	8,03	25,55

Chú thích: SL: số lượng, hpi: giờ sau khi lây nhiễm *M. oryzae*

Kết quả nghiên cứu cho thấy *osa-miR169a* điều hòa tăng khả năng kháng nấm *M. oryzae* trên lúa ở thời điểm 72 hpi. Kết quả này có sự khác biệt so với nghiên cứu trước đây về dạng biểu hiện của *osa-miR169a*, vốn được báo cáo rằng biểu hiện giảm đối với tính kháng nấm *M. oryzae* ở lúa, thông qua sự ức chế gen *NF-YA* (Li và ctv., 2017). Trong nghiên cứu trước đây, Li và ctv. (2017) tiến hành thí nghiệm phân tích tác động của *osa-miR169a* so sánh giữa 01 giống lúa chống chịu (IRBLkm-Ts) và 01 giống lúa nhiễm (LTH) để đưa ra kết luận *osa-miR169a* biểu hiện giảm và chỉ tiến hành đến 48 hpi. Bên cạnh đó, thí nghiệm để kết luận *osa-miR169a* làm giảm khả năng kháng nấm *M. oryzae* được tiến hành thông qua sự bắt giữ *osa-miR169a* bằng gen đích giả (Li và ctv., 2017). Có thể thấy rằng các kết quả Li và ctv. (2017) được tiến hành hầu hết ở mức độ *in vitro*. Trong khi thực tế, ở mức độ di truyền biểu sinh, các tác động của microRNA còn chịu ảnh hưởng của khá nhiều yếu tố khác như: RNA vòng, nhân tố đích giả từ lúa và từ nấm *M. oryzae* (Fan và ctv., 2020; Yuan và ctv., 2018). Do vậy, kết quả khi tiến hành đánh giá mức độ biểu hiện *osa-miR169a* trên nhiều giống lúa sẽ có thể khác so với thí nghiệm chỉ tiến hành so sánh giữa 01 giống lúa chống chịu và 01 giống lúa mẫn cảm. Tóm lại, biểu hiện tăng *osa-miR169a* làm tăng khả năng kháng nấm *M. oryzae* ở thời điểm 72 hpi. Kết quả về mức độ biểu hiện khác biệt giữa nhóm chống chịu và nhóm mẫn cảm với nấm *M. oryzae* cho thấy *osa-*

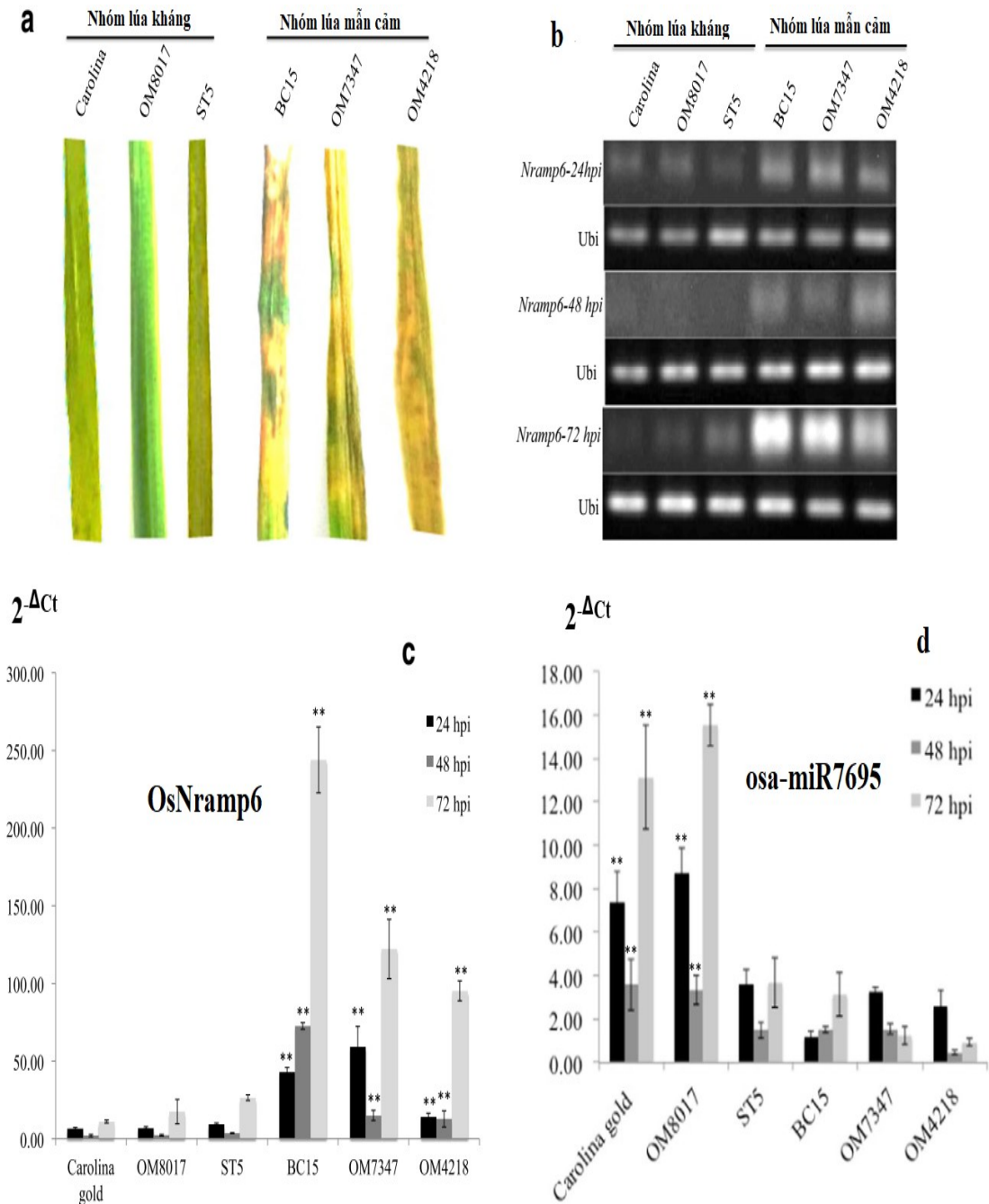
*miR169a* là một chi thị tiềm năng trong việc ứng dụng trong công tác lai tạo, phân biệt giống lúa chống chịu nấm *M. oryzae* bằng sinh học phân tử.

### **3.8. Đánh giá mức độ biểu hiện của *OsNramp6* trên các giống lúa chống chịu và miễn cảm với nấm *M. oryzae*.**

Phân tử *osa-miR7695* có vai trò điều hòa cây lúa chống chịu lại nấm gây bệnh đạo ôn *M. oryzae* thông qua sự ức chế gen đích là *OsNramp6*, cụ thể là biến thể phiên mã *OsNramp6.8* (*s-Nramp6*) (Campo và ctv., 2013) và *OsNramp6.1* (*l-Nramp6*) (Peris-Peris và ctv., 2017). *OsNramp6* là một thành viên trong họ gen *Nramp* được báo cáo rằng đóng vai trò trong việc vận chuyển Fe và Mn, và có liên quan đến tính kháng nấm *M. oryzae* ở lúa (Campo và ctv., 2013; Peris-Peris và ctv., 2017). *OsNramp6* có 8 biến thể phiên mã bao gồm *OsNramp6.1* đến *OsNramp6.8*, trong đó *OsNramp6.1* là biến thể phiên mã dài nhất (*l-Nramp6*) và *OsNramp6.8* là biến thể ngắn nhất (*s-Nramp6*). Trong nghiên cứu trước đây của Campo và ctv. (2013) cho rằng *osa-miR7695* chỉ ức chế biến thể phiên mã *OsNramp6.8* (*s-Nramp6*) và trong nghiên cứu tiếp theo của Peris-Peris và ctv. (2017) cho rằng *osa-miR7695* còn tác động đến biến thể phiên mã *OsNramp6.1*. Nghiên cứu cho thấy *osa-miR7695* ức chế gen đích *OsNramp6*, từ đó làm tăng nồng độ sắt ở màng tế bào (plasma membrane) (Peris-Peris và ctv., 2017). Sự tích lũy cao nồng độ Fe dẫn đến làm tăng sản xuất H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> từ đó kích thích sự biểu hiện của gen kháng *OsPRIa* và các gen liên quan đến sự cân bằng nồng độ sắt ở lúa (Liu và ctv., 2007; Peris-Peris và ctv., 2017). Nồng độ sắt tăng cao ở vị trí xâm nhiễm của nấm *M. oryzae* tạo thành “chất độc” và hạn chế sự xâm nhiễm của nấm *M. oryzae* ở lá lúa (Peris-Peris và ctv., 2017). Nghiên cứu cấu trúc của protein OsNRAMP6 cho thấy protein OsNRAMP6 đóng vai trò vận chuyển Fe và Mn ở trên màng tế bào, protein OsNRAMP6 có cấu trúc 3 chiều tương đồng (28,34%) với protein ScaDMT ở vi khuẩn *Staphylococcus capitis* DMT, và tương đồng với protein AtNRAMP1 và AtNRAMP6 ở cây *Arabidopsis* (Peris-Peris và ctv., 2017). Đột biến mất chức năng gen *OsNramp6* (*nramp6*) cho thấy biến thể *OsNramp6.1* không hiện diện, trong khi biến thể *OsNramp6.8* hiện diện và có mức độ biểu hiện tương đương so với giống lúa đối chứng (Peris-Peris và ctv., 2017). Khi

phân tích cấu trúc vị trí bắt cặp giữa *osa-miR7695* và các biến thể phiên mã *OsNramp6* cho thấy chỉ duy nhất biến thể phiên mã *OsNramp6.8* có vị trí bắt cặp với *osa-miR7695* ở đầu 3'UTR (Campo và ctv., 2013).

Để đánh giá mức độ biểu hiện của *OsNramp6* trên các giống lúa thuộc hai nhóm chống chịu và mẫn cảm với *M. oryzae*, phương pháp RT-PCR và realtime PCR được sử dụng trên 3 giống lúa đại diện cho mỗi nhóm. Kết quả chủng bệnh ban đầu cho thấy mức độ biểu hiện bệnh giữa 03 giống lúa chống chịu thấp hơn so với 03 giống lúa mẫn cảm một cách rõ rệt khi tỉ lệ vết bệnh trên lá thấp (**Hình 3.26a**). Khi đánh giá biểu hiện tương đối của phân tử này thì kết quả phân tích RT-PCR cho thấy gen *OsNramp6* hiện diện ở tất cả các giống lúa và rõ nhất ở thời điểm 24 hpi (**Hình 3.26b**). Ở ba mốc thời gian sau lây nhiễm, các băng điện di (*OsNramp6*) ở nhóm lúa chống chịu mờ hơn so với nhóm lúa mẫn cảm, thậm chí là không có ở thời điểm 48 hpi (**Hình 3.26b**). Điều này minh chứng thêm cho giả thuyết rằng gen *OsNramp6* có liên quan đến tính kháng của các giống lúa trong nghiên cứu và được điều hòa giảm ở các giống chống chịu với nấm *M. oryzae*. Hơn nữa, khi đánh giá biểu hiện của gen *OsNramp6* bằng realtime PCR cho thấy mức độ biểu hiện của gen *OsNramp6* ở nhóm lúa chống chịu thấp hơn so với nhóm lúa mẫn cảm, đặc biệt ở thời điểm 72 hpi (**Hình 3.26c**). Giá trị biểu hiện trung bình của gen *OsNramp6* ở các giống chống chịu dao động từ 10-30, trong khi con số này ở nhóm lúa mẫn cảm dao động từ: 20 - 60 ở 24 hpi; 20 - 80 ở 48 hpi và 100 - 240 ở 72 hpi sau lây nhiễm (**Hình 3.26c**). Như vậy, so sánh mức độ biểu hiện giữa *osa-miR7695* và gen *OsNramp6* trên 06 giống lúa đại diện, kết quả cho thấy xu hướng biểu hiện trái ngược nhau (**Hình 3.26c,d**). Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu trước đây của Campo và ctv. (2013) vốn cho rằng biểu hiện của gen *OsNramp6* được điều hòa giảm ở nhóm lúa chống chịu bởi *osa-miR7695* từ đó làm tăng khả năng chống chịu nấm *M. oryzae* ở lúa.



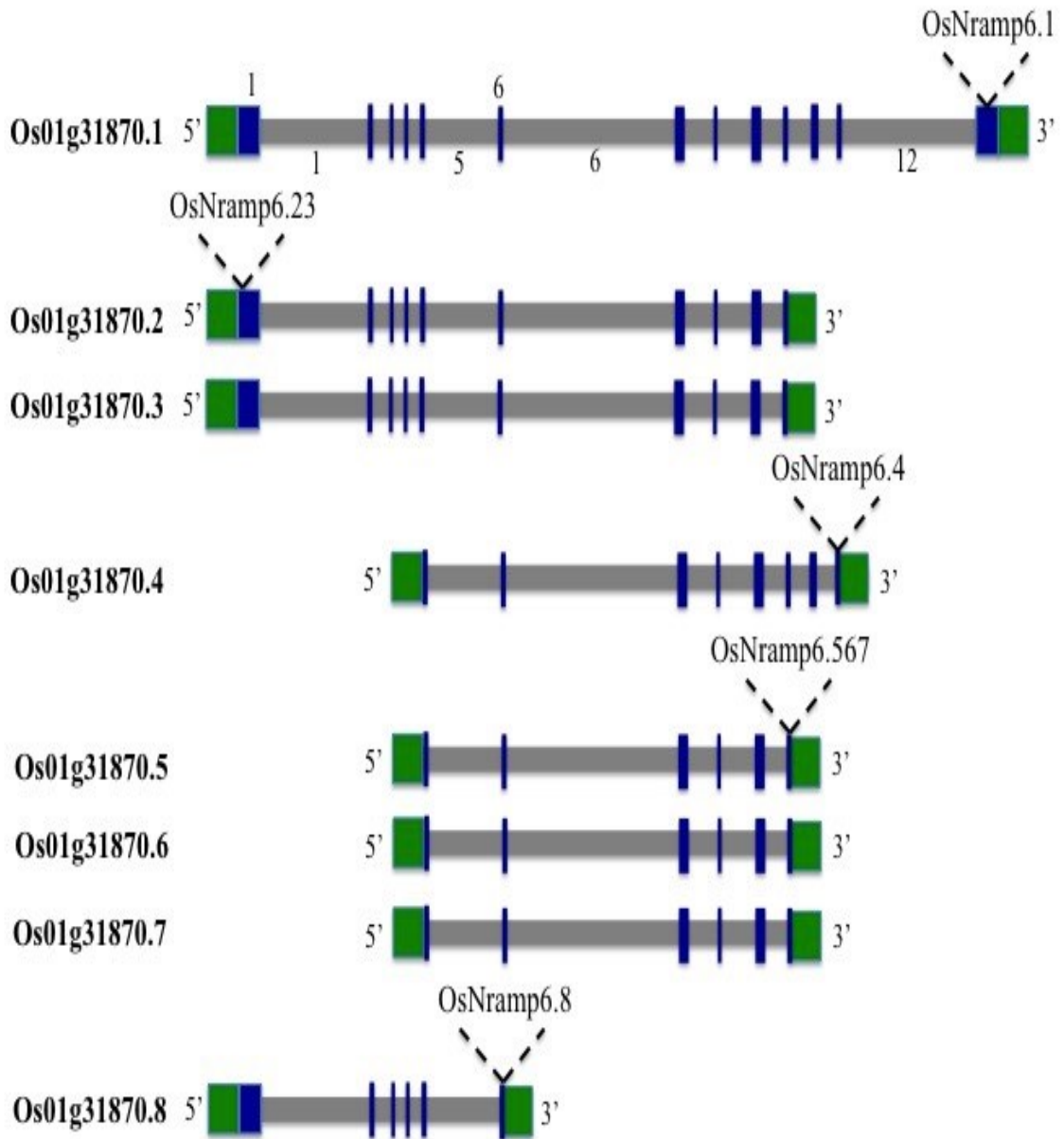
**Hình 3.26.** Biểu hiện của gen *OsNramp6* ở 06 giống lúa tiêu biểu (03 giống lúa chống chịu, 03 giống lúa mẫn cảm).

(a) Thí nghiệm chủng bệnh ở nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm; (b) Kết quả RT-PCR kiểm tra sự hiện diện của gen *Nramp6*; (c) Kết quả Realtime PCR đánh giá biểu hiện của *OsNramp6* trên nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm với nấm *M. oryzae*; (d) Mức độ biểu hiện của *osa-miR7695* trên nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm *M. oryzae*. (\*\*:  $P \leq 0,01$ ; hpi: giờ sau lây nhiễm)



### 3.9. Phân tích mức độ và giá trị biểu hiện của các biến thể phiên mã *OsNramp6* ở nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm với nấm *M. oryzae*.

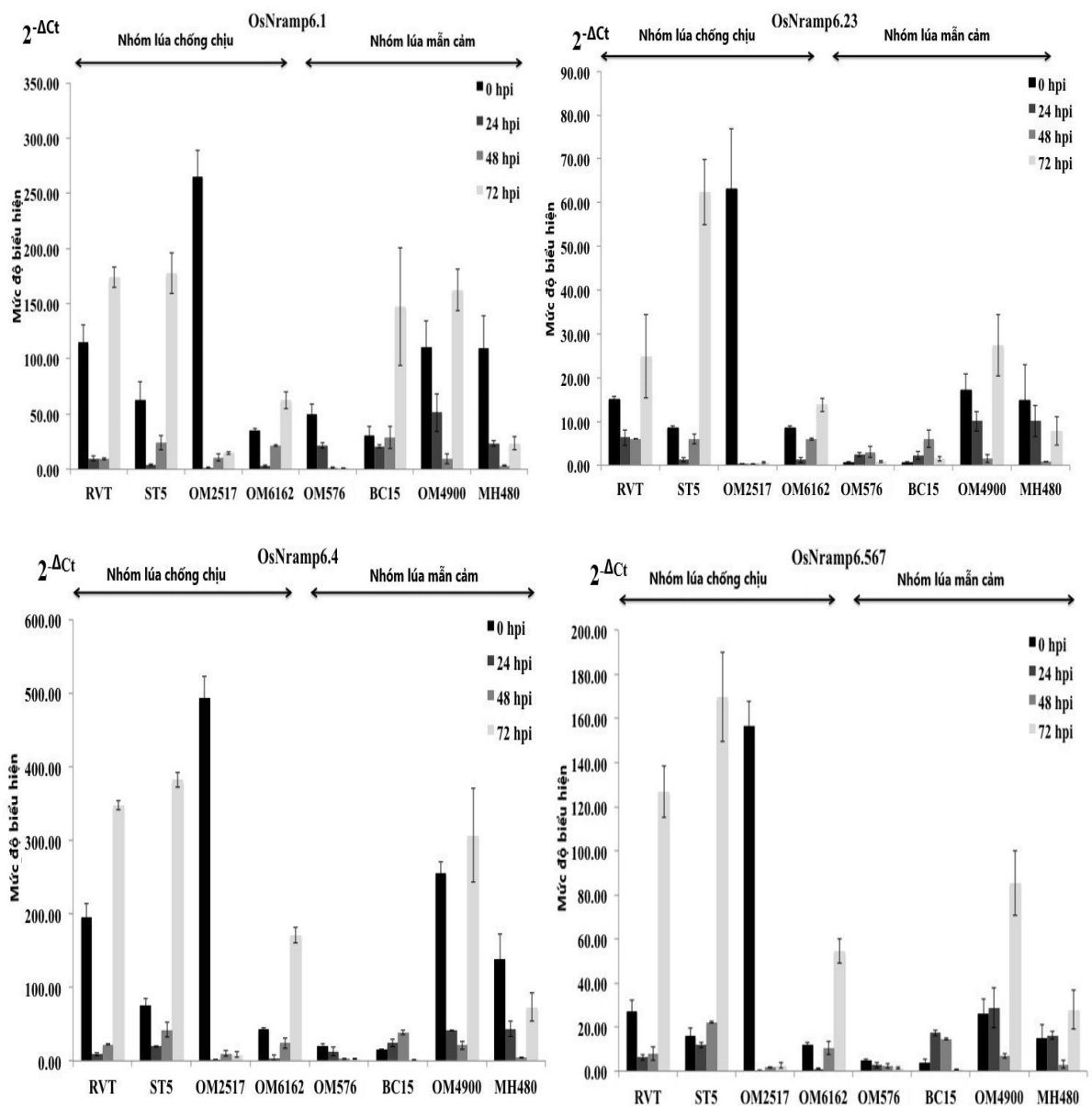
Tổng cộng có 8 biến thể phiên mã *OsNramp6* với các kích thước khác nhau đã được mô tả trong nghiên cứu trước đây (Campo và ctv., 2013). Như mô tả trong **Hình 3.27**, *OsNramp6.1* (*Os01g31870.1*) là biến thể dài nhất mã hóa protein có kích thước là 550 axit amin trong khi đó *OsNramp6.8* (*Os01g31870.8*) được mô tả là biến thể ngắn nhất do bị cắt ở vùng intron số 6 mã hóa ra protein có kích thước là 210 axit amin (Campo và ctv., 2013; Peris-Peris và ctv., 2017). Biến thể *OsNramp6.4* (*Os01g31870.4*) được hình thành do bị cắt hai vùng intron 1-4 và 12 so với 3 biến thể *OsNramp6.567* (*Os01g31870.567*) cùng bị cắt vùng intron 1-4 và 10-12. Hai biến thể này sẽ mã hóa ra protein lần lượt có kích thước là 353 axit amin và 251 axit amin. Hai biến thể cuối cùng *OsNramp6.23* (*Os01g31870.23*) được hình thành do bị cắt vùng intron 10-12 mã hóa kích thước giống nhau là 390 axit amin. Dựa trên kết quả giống chuỗi các biến thể *OsNramp6* và sự tương đồng về trình tự giữa các biến thể, vị trí thiết kế các primer realtime PCR cho các biến thể này được thể hiện trên **Hình 3.27** với tổng cộng 5 cặp primer trong đó có 2 cặp primer chung cho 2 nhóm biến thể *OsNramp6.23* và *OsNramp6.567*.

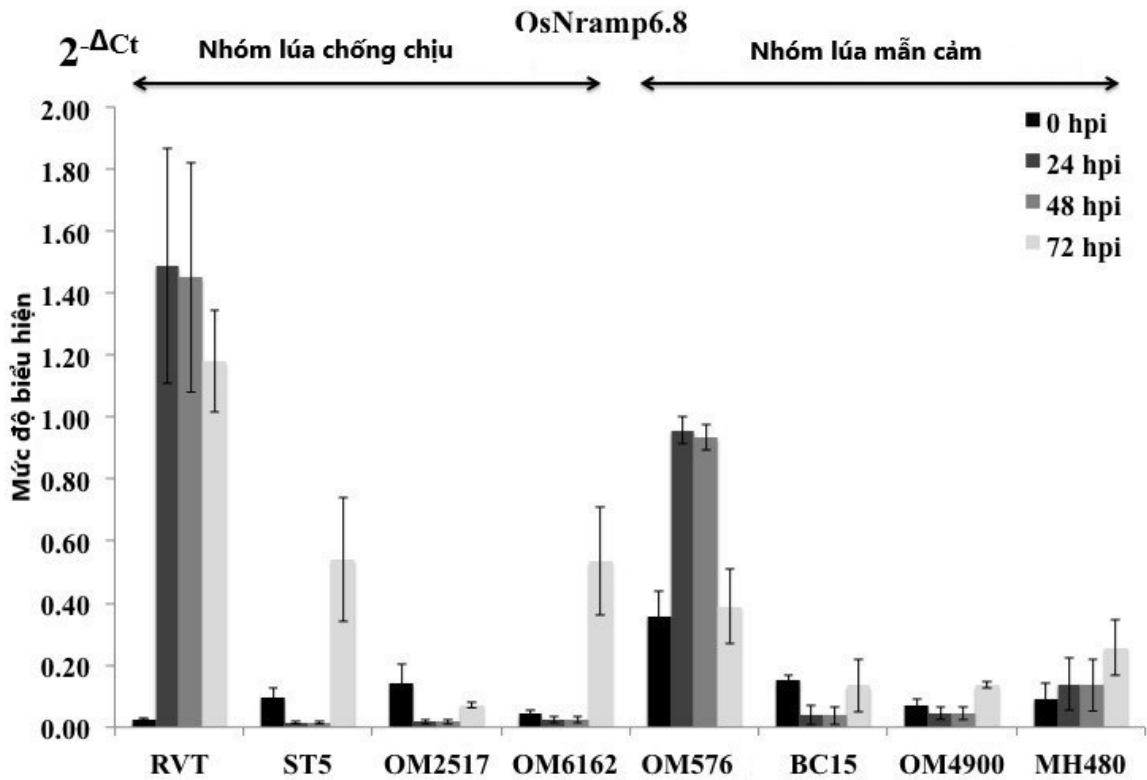


**Hình 3.27.** Cấu trúc gen của các biến thể phiên mã *OsNramp6* và vị trí thiết kế primer realtime-PCR.

Để đánh giá mức độ biểu hiện của các biến thể phiên mã *OsNramp6* ở nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm *M. oryzae*, kỹ thuật real-time PCR được sử dụng trên các mẫu lá lúa bị nhiễm *M. oryzae* ở các thời điểm lây nhiễm khác nhau (24 hpi, 48 hpi, 72 hpi). Kết quả cho thấy trong số 08 biến thể phiên mã *OsNramp6*, biến thể phiên mã *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* có biểu hiện khác biệt về mặt thống kê ở thời điểm 24 hpi, biểu hiện giảm ở nhóm lúa chống chịu và không thay đổi ở nhóm lúa

mẫn cảm với nấm *M. oryzae* (**Phụ lục 6**)(**Hình 3.28**). Ở thời điểm 48 hpi và 72 hpi, kết quả cho thấy không có sự khác biệt về mức độ biểu hiện của biến thể phiên mã *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* trên nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với *M. oryzae* trồng ở Việt Nam (**Phụ lục 6**)(**Hình 3.28**). Kết quả này có một phần tương đồng với kết quả nghiên cứu trước đây của Peris-Peris và ctv. (2017) vốn cho rằng duy nhất biến thể phiên mã *OsNramp6.8* (*s-Nramp6*) tăng ở thời điểm 24 hpi và trở về bình thường ở thời điểm 48 hpi và 72 hpi trên giống lúa *O.sativa* “*Nipponbare*”.

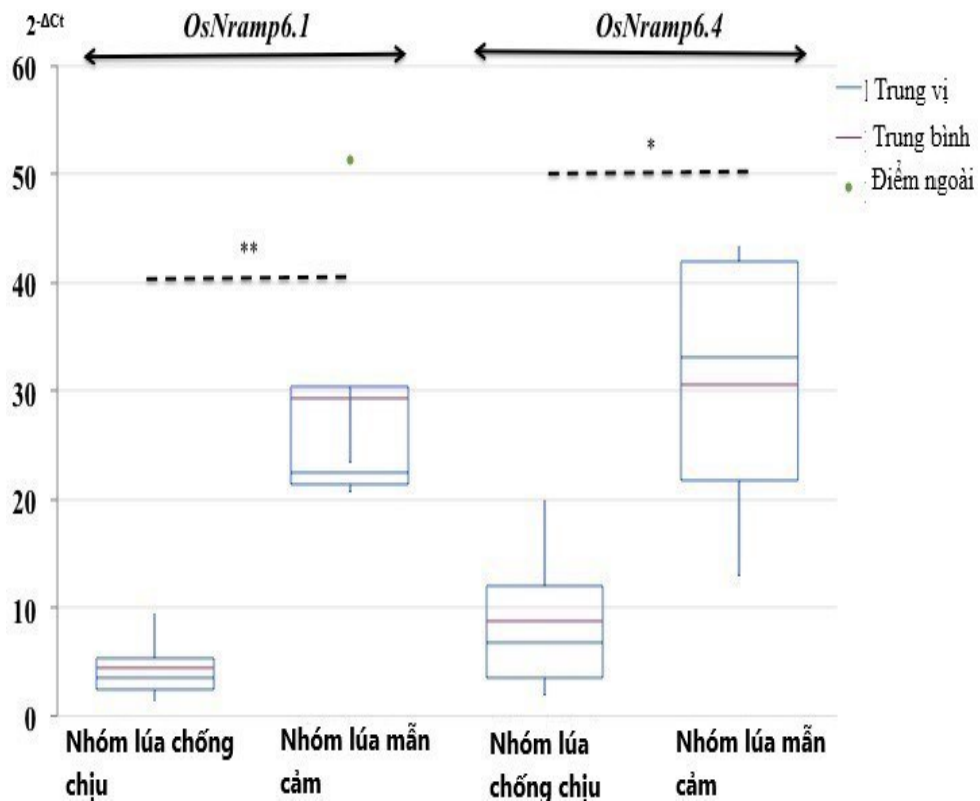




**Hình 3.28.** Mức độ biểu hiện của các biến thể phiên mã *OsNramp6* giữa nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm *M. oryzae* trồng ở Việt Nam, ở các thời điểm nhiễm nấm *M.oryzae* khác nhau. Mức độ ý nghĩa thống kê,  $P \leq 0,01$  (\*\*),  $P \leq 0,05$  (\*); hpi: giờ sau nhiễm.

Phân tích biểu đồ hộp (box plot) giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  của biến thể phiên mã *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* (gọi tắt *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4*) trên 08 giống lúa, ở các thời điểm 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi. Kết quả cho thấy cả 2 biến thể phiên mã đều có sự biểu hiện khác nhau trên nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm (**Hình 3.29**). Đặc biệt, mức độ biểu hiện của *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* có sự khác biệt về mặt thống kê ở thời điểm 24 hpi, khi so sánh giữa nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm (**Phụ lục 6**) (**Hình 3.29**). Kết quả cho thấy, ở thời điểm 24 hpi mức độ biểu hiện của *OsNramp6.1* trên nhóm lúa mẫn cảm gấp **6,5 lần** so với nhóm lúa chống chịu; và mức độ biểu hiện của *OsNramp6.4* trên nhóm lúa mẫn cảm gấp **3,6 lần** so với nhóm lúa chống chịu (**Bảng 3.8**). Ở thời điểm 24 hpi, giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  của *OsNramp6.1* nằm trong khoảng **2,49 – 5,4** (nhóm lúa chống chịu) và **21,33 – 30,34** (nhóm lúa mẫn cảm).

Trong khi đó, giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  của *OsNramp6.4* nằm trong khoảng **3,53 – 12,02** (nhóm lúa chống chịu) và **21,77 – 41,96** (nhóm lúa mẫn cảm) (**Bảng 3.8**). Kết quả này chỉ ra rằng bên cạnh biến thể *OsNramp6.8* cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa trong nghiên cứu của Peris-Peris và ctv. (2017) thì trên các giống lúa đang canh tác ở nước ta hai biến thể *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* cũng cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa giữa hai nhóm giống lúa chống chịu và mẫn cảm. Qua đó cho thấy, hai biến thể *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* có thể được sử dụng làm các chỉ thị sinh học trong việc phân biệt và chọn lọc các giống có tính kháng với nấm gây bệnh đạo ôn ở giai đoạn sau phiên mã.



**Hình 3.29.** Biểu đồ hộp (Box plot) thể hiện mức độ biểu hiện của biến thể phiên mã *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* của 08 giống lúa trồng ở Việt Nam, thời điểm 24 hpi.

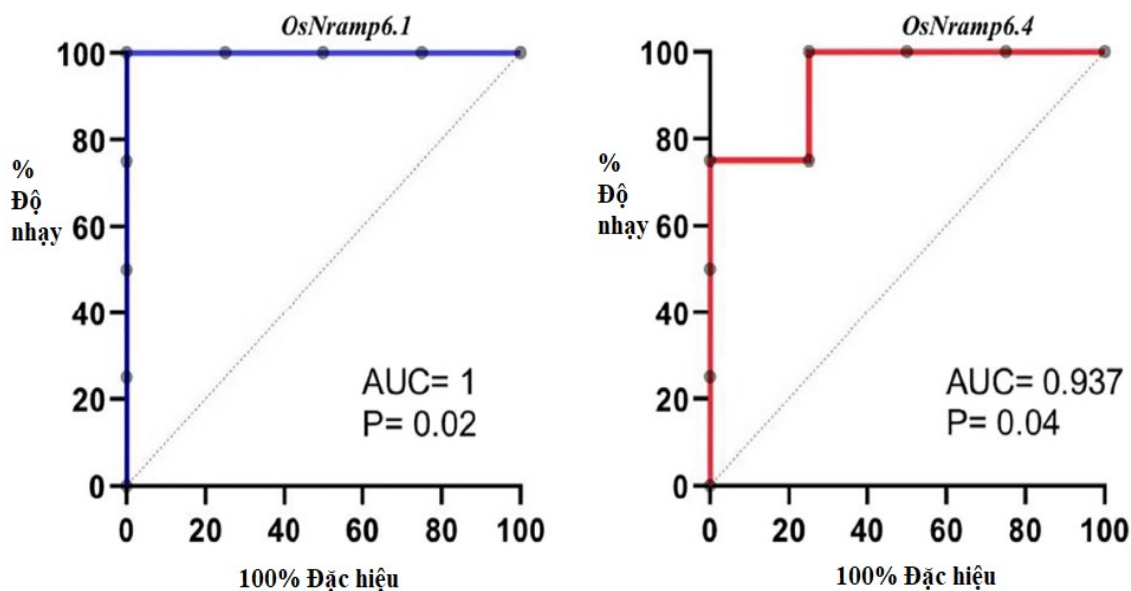
Mức độ ý nghĩa  $P \leq 0,01$  (\*\*),  $P \leq 0,05$  (\*).

**Bảng 3.8.** Giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  trong biểu đồ hộp (Box plot) thể hiện mức độ biểu hiện của *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* ở nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm với nấm *M. oryzae*, thời điểm 24 hpi.

Biến thể phiên mã <i>OsNramp6</i>	Thời điểm lấy mẫu	Nhóm lúa	Số mẫu	Giá trị trung bình	Giá trị phân vị 1	Giá trị phân vị 3
<i>OsNramp6.1</i>	24 hpi	Nhóm lúa chống chịu	4	4,43	2,49	5,4
	24 hpi	Nhóm lúa mẫn cảm	4	29,22	21,33	30,34
<i>OsNramp6.4</i>	24 hpi	Nhóm lúa chống chịu	4	8,79	3,53	12,02
	24 hpi	Nhóm lúa mẫn cảm	4	30,63	21,77	41,96

Để xác định mức độ đặc hiệu và độ nhạy đặc trưng cho khả năng phân biệt dương tính thật và âm tính thật của hai biến thể *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* trong việc phân biệt nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm, phương pháp phân tích mô hình đường cong ROC được tiến hành bằng phần mềm Graphpad Prism 8.3.4 dựa trên giá trị  $2^{-\Delta Ct}$ . Kết quả cho thấy, mô hình xây dựng dựa trên biến thể *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* thể hiện mức độ hiệu quả rất cao với diện tích bên dưới đường cong AUC lần lượt là 1 và 0,937 với mức ý nghĩa thống kê đạt hơn 95% (**Hình 3.30, Bảng 3.9**). Điều này cho thấy độ nhạy và độ đặc hiệu cao của hai biến thể *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* trong việc phân biệt nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm, hứa

hện sẽ là các chỉ thị phân tử tiềm năng cho việc phát triển các quy trình, công cụ và giải pháp phục vụ cho việc phân biệt nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm với nấm *M. oryzae* ở Việt Nam.



**Hình 3.30.** Đường cong ROC của *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4*. Diện tích dưới đường cong (AUC) của *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* tương ứng là 1 và 0,937 ( $P \leq 0,05$ ).

**Bảng 3.9.** Kết quả phân tích thống kê đường cong ROC của *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4*

	<i>OsNramp6.1</i>	<i>OsNramp6.4</i>
<b>Diện tích dưới đường cong (AUC)</b>	1	0,937
<b>Độ lệch chuẩn (Std. Error)</b>	0	0,08376
<b>Độ tin cậy 95%</b>	1,00 đến 1,00	0,764 đến 1.00
<b>Giá trị P</b>	0,02	0,04

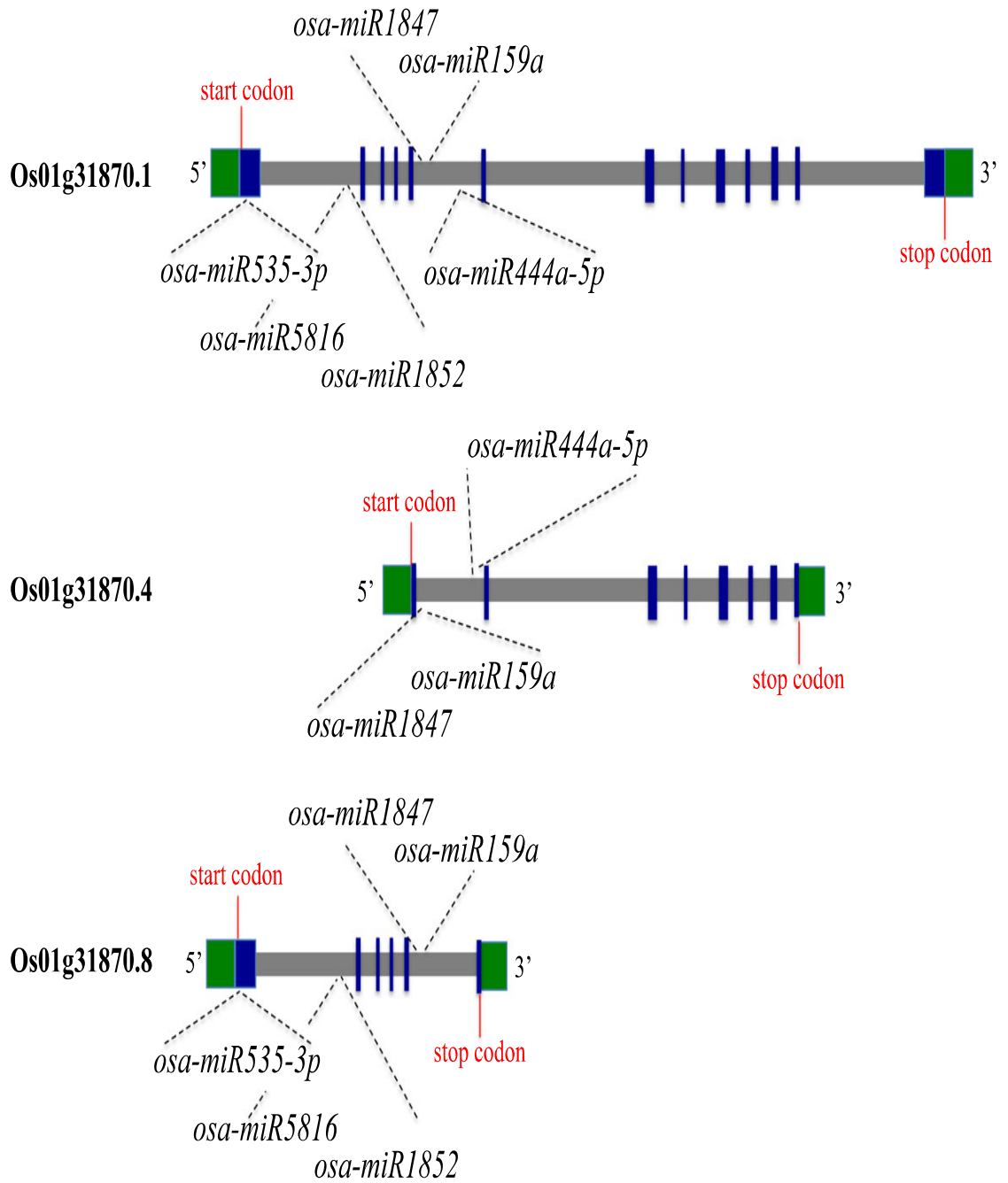
Các nghiên cứu trước đây ở mức độ *in vitro* cho thấy *osa-miR7695* có liên quan đến gen *OsNramp6* đặc biệt là biến thể phiên mã *OsNramp6.1* và *OsNramp6.8* (Campo và ctv., 2013; Peris-Peris và ctv., 2017) trong các giống lúa thuộc nhóm *japonica*. Mức độ tích lũy của biến thể *OsNramp6.1* cũng được xác định là cao hơn rất nhiều lần so với *OsNramp6.8* ở trạng thái bình thường bên trong tế bào và cao hơn khi so với các giống lúa thuộc nhóm *indica*. Tuy nhiên phân tích vị trí bắt cặp trên gen cho thấy *osa-miR7695* chỉ bắt cặp duy nhất ở đầu 3'UTR của biến thể *OsNramp6.8* (Campo và ctv., 2013). Phân tích đột biến chức năng *OsNramp6* cho thấy biến thể *OsNramp6.1* có liên quan đến khả năng kháng nấm *M. oryzae* trên lúa (Peris-Peris và ctv., 2017). Do đó có thể thấy, *OsNramp6.1* là biến thể đóng vai trò quan trọng liên quan đến tính kháng bệnh đạo ôn trong số các biến thể của *OsNramp6*, tuy nhiên biến thể này lại không bị điều hòa bởi *osa-miR7695*. Hơn thế, trong nghiên cứu này, kết quả phân tích giá trị biểu hiện của *OsNramp6* trên các nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm tại Việt Nam vốn phần lớn là thuộc nhóm *indica* lại cho thấy bên cạnh biến thể phiên mã *OsNramp6.1* còn có thêm biến thể *OsNramp6.4* liên quan đến tính kháng nấm *M. oryzae* trên lúa, song biến thể *OsNramp6.8* lại không cho thấy sự khác biệt. Kết quả của nghiên cứu này đã bổ sung thêm về biểu hiện của biến thể *OsNramp6.4* đối với khả năng điều hòa tính kháng bệnh đạo ôn của cây lúa và cũng cho thấy mức độ tích lũy của các biến thể trên các loài phụ của *Oryza sativa* có thể là khác nhau. Do vậy, giả thuyết đặt ra là các biến thể phiên mã *OsNramp6* đặc biệt là *OsNramp6.1* có thể còn bị tác động không chỉ bởi *osa-miR7695* mà còn có thể do các microRNAs khác. Do vậy, cần có nghiên cứu tiếp theo để nhận diện các microRNAs tiềm năng trong việc điều hòa các biến thể phiên mã *OsNramp6* ở lúa.

### **3.10. Nhận diện các microRNAs tiềm năng trong việc điều hòa *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* ở lúa.**

Ở lúa, có 8 biến thể phiên mã cho gen *OsNramp6* tham gia vào điều hòa các con đường tín hiệu liên quan đến tăng trưởng và khả năng phòng thủ trước tác nhân gây bệnh. Trong đó, biến thể phiên mã *OsNramp6.1*, *OsNramp6.8* đã được công bố là được điều hòa bởi phân tử *osa-miR7695* (Campo và ctv., 2013; Peris-Peris và ctv.,



2017). Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của các biến thể phiên mã khác vẫn chưa được nghiên cứu rõ ràng trên nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm. Điều đó cho thấy có thể còn có một số nhân tố khác điều hòa sự biểu hiện của các biến thể phiên mã *OsNramp6* ở các thời điểm khác nhau sau khi nhiễm *M. oryzae* trên lúa. Hơn nữa, về mặt phân tử thì một đoạn mRNA mục tiêu khi tham gia vào những con đường tín hiệu thực hiện một chức năng khác nhau có thể sẽ bị điều hòa bởi nhiều miRNA khác nhau khiến khuynh hướng biểu hiện sẽ phụ thuộc vào tín hiệu môi trường nội bào. Do vậy, bên cạnh *osa-miR7695* sẽ có thể còn có những miRNA khác tham gia điều hòa sự biểu hiện của các biến thể phiên mã khác của *OsNramp6* bên cạnh *OsNramp6.1*, *OsNramp6.8* cần được xác định. Phương pháp phân tích các microRNAs tiềm năng bằng phần mềm psRNATarget V2 được sử dụng theo mô tả trước đây (Dai và ctv., 2018) bằng cách sử dụng thuật toán phân tích chuỗi trình tự và khả năng tương tác bắt cặp của các miRNA với các phân tử mục tiêu tiềm năng qua đó có thể xác định được các miRNA khác có khả năng điều hòa các biến thể khác của *OsNramp6*. Kết quả cho thấy có 6 microRNAs tiềm năng (*osa-miR5816*, *osa-miR159a*, *osa-miR1847*, *osa-miR444a-5p*, *osa-miR1852*, *osa-miR535-3p*) được tìm thấy có liên quan đến sự điều hòa các biến thể phiên mã *OsNramp6* (*OsNramp6.1*, *OsNramp6.4* và *OsNramp6.8*) (**Bảng 3.10**) (**Hình 3.31**). Trong đó, 2 microRNAs (*osa-miR1847* và *osa-miR159a*) có thể tham gia điều hòa sự biểu hiện cả 3 biến thể phiên mã, còn 4 microRNAs còn lại (*osa-miR5816*, *osa-miR444a-5p*, *osa-miR1852*, *osa-miR535-3p*) có thể chỉ điều hòa sự biểu hiện được 2/3 biến thể phiên mã *OsNramp6* (**Hình 3.31**) (**Bảng 3.10**). Kết quả cũng cho thấy ngoài *osa-miR7695* có thể điều hòa *OsNramp6.8*, còn có các microRNAs (*osa-miR5816*, *osa-miR159a*, *osa-miR1847*, *osa-miR1852*, *osa-miR535-3p*) có thể tham gia vào việc điều hòa mức độ biểu hiện của biến thể *OsNramp6.8*. Các kết quả này cho thấy số lượng miRNA có thể tác động đến biểu hiện của *OsNramp6* là không nhỏ, mỗi biến thể khác nhau lại có thể bị cắt bởi các miRNA khác nhau và các miRNA này cũng có thể điều hòa không chỉ một biến thể. Do vậy, tính ổn định trong khuynh hướng biểu hiện của các biến thể này là một điều quan trọng cần được đánh giá trên một phổ rộng một cách tổng quan.



**Hình 3.31.** Sơ đồ vị trí bất cặp của 06 microRNA tiềm năng trên 03 biến thể phiên mã *OsNramp6.1*, *OsNramp6.4* và *OsNramp6.8*

**Bảng 3.10.** Các miRNAs tiềm năng trong việc điều hòa biến thể phiên mã *OsNramp6.1*, *OsNramp6.4* và *OsNramp6.8*

<b>Biến thể</b>	<b>miRNA tiềm năng</b>	<b>Kiểu tác động</b>	<b>Mức kỳ vọng</b>	<b>Trình tự bắt cặp (trình tự miRNA nằm trên)</b>
<i>OsNramp6.1</i>	<i>osa-miR5816</i>	<i>Cắt</i>	4.0	24 CACCGCGAGGAUGUUUGAGGAU 1 ..... 310 UAUUCGUUGCUAUGGGUACUCCUA 333
	<i>osa-miR159a</i>	<i>Cắt</i>	4.5	21 ACGUCGAGGACCCCGUACGUU 1 ..... 558 CCUAGCAUGUGGGGCAUGCAC 578
	<i>osa-miR1847</i>	<i>Cắt</i>	4.5	24 CAACACCGUGAUUGUACACCCGGU 1 ..... 550 GCCGGUGUCCUAGCAUGUGGGGCA 573
	<i>osa-miR444a-5p</i>	<i>Cắt</i>	4.5	21 AUACGUCAACGGUGGAGAUCG 1 ..... 757 GAUCGGUUGCUAUGUUUGGU 777
	<i>osa-miR1852</i>	<i>Cắt</i>	5.0	21 UGGACGUAAGACUUAGGUAUA 1 ..... 326 UACUCCUAUUUGGGUUCAUAU 346
	<i>osa-miR535-3p</i>	<i>Cắt</i>	5.0	21 UCACUGUUGCCCUCUUUCGUG 1 ..... 13 GCGAAGAUCGGGAGGGAGCAC 33

<i>OsNramp6.4</i>	<i>osa-miR159a</i>	<i>Cắt</i>	4.5	21 ACGUCGAGGACCCCGUACGUU 1 ..... 141 CCUAGCAUGUGGGGCAUGCAC 161
	<i>osa-miR1847</i>	<i>Cắt</i>	4.5	24 CAACACCGUGAUUGUACACCCGGU 1 ..... 133 GCCGGUGUCCUAGCAUGUGGGGCA 156
	<i>osa-miR444a-5p</i>	<i>Cắt</i>	4.5	21 AUACGUCAACGGUGGAGAUCG 1 ..... 340 GAUGC GGUUGCUAUGUUUGGU 360
<i>OsNramp6.8</i>	<i>osa-miR5816</i>	<i>Cắt</i>	4.0	24 CACCGCGAGGAUGUUUGAGGAU 1 ..... 310 UAUUCGUUGCUAUGGGUACUCCUA 333
	<i>osa-miR159a</i>	<i>Cắt</i>	4.5	21 ACGUCGAGGACCCCGUACGUU 1 ..... 558 CCUAGCAUGUGGGGCAUGCAC 578
	<i>osa-miR1847</i>	<i>Cắt</i>	4.5	24 CAACACCGUGAUUGUACACCCGGU 1 ..... 550 GCCGGUGUCCUAGCAUGUGGGGCA 573

	<i>osa-miR1852</i>	Cắt	5.0	21 UGGACGUAAGACUUAGGUAUA 1 ..... 326 UACUCCUAUUUGGGUUCAUAU 346
	<i>osa-miR535-3p</i>	Cắt	5.0	21 UCACUGUUGCCCUUUUCGUG 1 ..... 13 GCGAAGAUCGGGAGGGAGCAC 33

Trong số 6 microRNAs tiềm năng kê trên, ngoại trừ *osa-miR5816* và *osa-miR1852* chưa được mô tả chức năng, còn lại 4 microRNAs (*osa-miR159a*, *osa-miR444b*, *osa-miR535*, *osa-miR1847*) đã được mô tả chức năng (Chen và ctv., 2021; Li và ctv., 2014; Li và ctv., 2019b; Xiao và ctv., 2017). Trong đó, *osa-miR159a* điều hòa tăng khả năng kháng nấm *M. oryzae*, gen đích tác động là *OsGAMYB*, *OsGAMYBL*, và *OsZF* (Chen và ctv., 2021); *osa-miR444b* điều hòa giảm khả năng kháng nấm *M. oryzae* bằng cách tấn công vào gen đích *MADS27b* và *MADS57* (Xiao và ctv., 2017). Các microRNAs *osa-miR535* và *osa-miR1847* tác động đến chiều cao cây lúa, cấu trúc hoa lúa, độ dài hạt và sự cảm lạnh gen (Baldrich và ctv., 2015; Sun và ctv., 2019), tuy nhiên vẫn chưa có nghiên cứu đối với (*osa-miR535* và *osa-miR1847*) trong việc tham gia vào hệ miễn dịch chống lại sự xâm nhiễm nấm *M. oryzae* ở lúa.

Tóm lại, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cung cấp các dữ liệu về giá trị biểu hiện và tỷ lệ tăng của biến thể phiên mã *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4*, khi so sánh giữa nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm với nấm *M. oryzae* trồng ở Việt Nam. Do vậy, các biến thể phiên mã *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* có thể được coi là các chỉ thị phân tử tiềm năng cho công tác lai tạo giống ở Việt Nam. Đây cũng là báo cáo đầu tiên trong việc mô tả mức độ biểu hiện của các biến thể phiên mã *OsNramp6* trên nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm *M. oryzae*. Tỷ lệ biến đổi cao của (*OsNramp6.1* và *OsNramp6.4*) giữa nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm *M. oryzae* sẽ là một công cụ triển vọng trong việc phân loại, đánh giá nhóm lúa chống

chịu và nhóm lúa miễn cảm với nấm *M. oryzae* ở Việt Nam dựa trên biểu hiện. Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng chỉ ra thêm được các microRNAs tiềm năng liên quan đến mức độ biểu hiện của các biến thể phiên mã *OsNramp6* này, song mối tương tác thực tế giữa các phân tử này vẫn cần được làm sáng tỏ bằng các nghiên cứu thực nghiệm trong tương lai.

## Chương 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1. Kết luận

- Phân tử *osa-miR7695* là một microRNA chỉ có ở trên lúa, có vai trò điều hòa tăng khả năng kháng nấm gây bệnh đạo ôn *M. oryzae* thông qua sự ức chế gen đích *OsNramp6*.

- Phân tử *osa-miR7695* hiện diện trên cả giống lúa *japonica* và *indica*.

- Mức độ biểu hiện của *osa-miR7695* có sự khác biệt giữa nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm *M. oryzae* ở các thời điểm 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi.

- Mức độ biểu hiện của *osa-miR169a* và *osa-miR160a* trên nhóm lúa chống chịu cao gấp 25 lần và 2,6 lần so với nhóm lúa mẫn cảm ở thời điểm 72 hpi và 24hpi.

- Phân tử *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* có mức độ biểu hiện tăng cao ở thời điểm 24 hpi khi so sánh giữa nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm.

- Phân tích *in silico* xác định được 6 microRNAs có thể liên quan đến việc điều hòa các biến thể phiên mã *OsNramp6*. Trong đó, có 2 microRNAs đã được mô tả chức năng trong việc điều hòa lúa chống lại nấm *M. oryzae* là *osa-miR159a* và *osa-miR444b*.

- Phân tử *osa-miR7695*, *osa-miR169a*, *osa-miR160a*, *OsNramp6.1*, và *OsNramp6.4* là các chỉ thị phân tử tiềm năng cho việc xác định các giống lúa có khả năng kháng với nấm gây bệnh đạo ôn, góp phần hỗ trợ cho công tác, chương trình lai tạo giống lúa tại Việt Nam.

### 4.2. Đề nghị

Đánh giá mức độ biểu hiện của 06 phân tử miRNAs liên quan đến điều hòa 02 biến thể phiên mã *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* trên các giống lúa trồng tại Việt Nam cũng như các gen đích khác mà chúng kiểm soát.

## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CÓ LIÊN QUAN ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Phi N.B.**, Phuong N.D.N., Dat V.H.X., Chau N.N.B., và Quoc N.B., 2021.  
Expression profiles of *OsNramp6* transcript variants involving in *Magnaporthe oryzae* resistance and non-resistance of Vietnamese rice cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, 1–10.  
<https://doi.org/10.1007/s10658-021-02375-9>.
2. Quoc N.B, Phuong N.D.N., Trang H.T.T., **Phi N.B.**, và Chau N.N.B., 2019.  
Expression of *osa-miR7695* against the blast fungus *Magnaporthe oryzae* in Vietnamese rice cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, 155(1): 307–317. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01772-5>.
3. **Nguyễn Bằng Phi**, Nguyễn Đoàn Nguyên Phương, Nguyễn Ngọc Bảo Châu, Nguyễn Bảo Quốc, 2021. Đánh giá biểu hiện của phân tử microRNA *osa-miR169a* trên các giống lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn, *Magnaporthe oryzae*. Trong *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc 2021*, 24/10/2021, Đại học Thái Nguyên, trang 915-920, ISBN: 9786049987885.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agbowuro G.O., Afolabi M.S., Olamiriki E.F., and Awoyemi S.O., 2020. Rice blast disease (*Magnaporthe oryzae*): A menace to rice production and humanity. *International Journal of Pathogen Research*, 4(3): 32-39.
2. Arumuganathan K., and Earle E.D., 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(3): 208–218.
3. Ashkani S., Rafii M.Y., Shabanimofrad M., Ghasemzadeh A., Ravanfar S.A., and Latif M.A., 2016. Molecular progress on the mapping and cloning of functional genes for blast disease in rice (*Oryza sativa* L.): Current status and future considerations. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2): 353–367.
4. Baldrich P., Campo S., Wu M.T., Liu T.T., Hsing Y.I.C., and Segundo B.S., 2015. MicroRNA-mediated regulation of gene expression in the response of rice plants to fungal elicitors. *RNA Biology*, 12(8): 847–863.
5. Baldrich P., and San Segundo B., 2016. MicroRNAs in rice innate immunity. *Rice*, 9(1): 6.
6. Baulcombe D., 2004. RNA silencing in plants. *Nature*, 431(7006): 356–363.
7. Belouchi A., Kwan T., and Gros P., 1997. Cloning and characterization of the *OsNramp* family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. *Plant Molecular Biology*, 33(6): 1085–1092.
8. Brodersen P., Sakvarelidze-Achard L., Bruun-Rasmussen M., Dunoyer P., Yamamoto Y.Y., Sieburth L., and Voinnet O., 2008. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320(5880): 1185–1190.
9. Cailliatte R., Lapeyre B., Briat J.F., Mari S., and Curie C., 2009. The *NRAMP6* metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochemical Journal*, 422(2): 217–228.

10. Campo S., Peris-Peris C., Siré C., Moreno A.B., Donaire L., Zytnicki M., Notredame C., Llave C., and San Segundo B, 2013. Identification of a novel microRNA (miRNA) from rice that targets an alternatively spliced transcript of the *Nramp6* (Natural resistance-associated macrophage protein 6) gene involved in pathogen resistance. *New Phytologist*, 199(1): 212–227.
11. Campo S., Sánchez-Sanuy F., Camargo-Ramírez R., Gómez-Ariza J., Baldrich P., Campos-Soriano L., Soto-Suárez M., and San Segundo B., 2021. A novel transposable element-derived microRNA participates in plant immunity to rice blast disease. *Plant Biotechnology Journal*, 19(9): 1798-1811.
12. Campos-Soriano L., Bundó M., Bach-Pages M., Chiang S., Chiou T., and San Segundo B., 2020. Phosphate excess increases susceptibility to pathogen infection in rice. *Molecular Plant Pathology*, 21(4): 555–570.
13. Chandran V., Wang H., Gao F., Cao X.L., Chen Y.P., Li G.B., Zhu Y., Yang X.M., Zhang, L.L., and Zhao, Z.X., 2019. *miR396-OsGRFs* module balances growth and rice blast disease-resistance. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1999.
14. Chen J.F., Zhao Z.X., Li Y., Li T.T., Zhu Y., Yang X.M., Zhou S.X., Wang H., Zhao J.Q., and Pu M., 2021. Fine-tuning roles of *osa-miR159a* in rice immunity against *Magnaporthe oryzae* and development. *Rice*, 14(1): 1–11.
15. Chen S., Cao Y., Li T., Wu X., Li K., and Wang H., 2014. The development of a SCAR marker for Chinese Race 21C3CTH of *Puccinia graminis f. sp. tritici*. *Journal of Triticeae Crops*, 6: 3.
16. Cheng W., Song X., Li H., Cao L., Sun K., Qiu X., Xu Y., Yang P., Huang T., and Zhang J., 2015. Host-induced gene silencing of an essential chitin synthase gene confers durable resistance to *Fusarium* head blight and seedling blight in wheat. *Plant biotechnology journal*, 13(9): 1335–1345.
17. Chiu T., Lee Y., Huang S., and Yu H., 2002. Polymorphic microsatellite markers for stock identification in Japanese anchovy (*Engraulis japonica*). *Molecular*

*Ecology Notes*, 2(1): 49–50.

18. Clergeot P.H., Gourgues M., Cots J., Laurans F., Latorse M.P., Pépin R., Tharreau D., Notteghem J.L., and Lebrun M.H., 2001. *PLSI*, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *PNAS*, 98(12): 6963–6968.
19. Couch B.C., and Kohn L.M., 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia*, 94(4): 683–693.
20. Curie C., Alonso J.M., Jean M.L.E., Ecker J.R., and Briat J.F., 2000. Involvement of *NRAMP1* from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochemical Journal*, 347(3): 749–755.
21. Dagdas Y.F., Yoshino K., Dagdas G., Ryder L.S., Bielska E., Steinberg G., and Talbot N.J., 2012. Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Science*, 336(6088): 1590–1595.
22. Dai X., Zhuang Z., and Zhao P.X., 2018. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Research*, 46(W1): W49–W54.
23. De la Concepcion J.C., Maidment J.H.R., Longya A., Xiao G., Franceschetti M., and Banfield M.J., 2021. The allelic rice immune receptor *Pikh* confers extended resistance to strains of the blast fungus through a single polymorphism in the effector binding interface. *PLoS Pathogens*, 17(3): e1009368.
24. Dean R.A., Talbot N.J., Ebbole D.J., Farman M.L., Mitchell T.K., Orbach M.J., Thon M., Kulkarni R., Xu, J.R., and Pan H., 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, 434(7036): 980–986.
25. Deng Y, Wang J., Tung J., Liu D., Zhou Y., He S., Du Y., Baker B., and Li F., 2018. A role for small RNA in regulating innate immunity during plant growth. *PLoS Pathogens*, 14(1): e1006756.
26. Ding Y., Gong S., Wang Y., Wang F., Bao H., Sun J., Cai C., Yi K., Chen Z., and

- Zhu C., 2018. *MicroRNA166* modulates cadmium tolerance and accumulation in rice. *Plant Physiology*, 177(4): 1691–1703.
27. Ding Y., Ye Y., Jiang Z., Wang Y., and Zhu C., 2016. *MicroRNA390* is involved in cadmium tolerance and accumulation in rice. *Frontiers in Plant Science*, 7: 235.
28. Dong H., Lei J., Ding L., Wen Y., Ju H., and Zhang X., 2013. MicroRNA: function, detection, and bioanalysis. *Chemical Reviews*, 113(8): 6207–6233.
29. Dong S., Zhang J., Sun D., Liu H., Yang Q., Wang H., Chen Z., and Wang J., 2018. Identification of *Magnaporthe oryzae*-elicited rice novel miRNAs and their targets by miRNA and degradome sequencing. *European Journal of Plant Pathology*, 151(3): 629–647.
30. Du P., Wu J., Zhang J., Zhao S., Zheng H., Gao G., Wei L., and Li Y., 2011. Viral infection induces expression of novel phased microRNAs from conserved cellular microRNA precursors. *PLoS Pathogens*, 7(8): e1002176.
31. Duan P., Ni S., Wang J., Zhang B., Xu R., Wang Y., Chen H., Zhu X., and Li Y., 2015. Regulation of *OsGRF4* by *OsmiR396* controls grain size and yield in rice. *Nature Plants*, 2(1): 1–5.
32. Fan J., Quan W., Li G.B., Hu X.H., Wang Q., Wang H., Li X.P., Luo X., Feng Q., and Hu Z.J., 2020. circRNAs are involved in the rice-*Magnaporthe oryzae* interaction. *Plant Physiology*, 182(1): 272–286.
33. Fang Y., Xie K., and Xiong L., 2014. Conserved *miR164*-targeted *NAC* genes negatively regulate drought resistance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 65(8): 2119–2135.
34. Fang Y., Zheng Y., Lu W., Li J., Duan Y., Zhang S., and Wang Y., 2021. Roles of *miR319*-regulated TCPs in plant development and response to abiotic stress. *The Crop Journal*, 9(1): 17–28.
35. Fawcett T., 2006. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters*,

- 27(8): 861–874.
36. Feng Q., Li Y., Zhao Z.X., and Wang W.M., 2021. Contribution of small RNA pathway to interactions of rice with pathogens and insect pests. *Rice*, 14(1): 1–15.
  37. Feng Q., Wang H., Yang X., Hu Z., Zhou X., Xiang L., Xiong X., He X., Zhu Y., and Li G., 2022. *Osa-miR160a* confers broad-spectrum resistance to fungal and bacterial pathogens in rice. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.18491>.
  38. Fernandez J., and Orth K., 2018. Rise of a cereal killer: the biology of *Magnaporthe oryzae* biotrophic growth. *Trends in Microbiology*, 26(7): 582–597.
  39. Filippi M.C.C., Da Silva G.B., Silva-Lobo V.L., Côrtes M.V.C.B., Moraes A.J.G., and Prabhu A.S., 2011. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by *rhizobacteria* on aerobic rice in Brazil. *Biological Control*, 58(2): 160–166.
  40. Fu H.J., Zhu J., Yang M., Zhang Z.Y., Tie Y., Jiang H., Sun Z.X., and Zheng X.F., 2006. A novel method to monitor the expression of microRNAs. *Mol Biotechnol*, 32(3): 197–204.
  41. Fu J., Liu H., Li Y., Yu H., Li X., Xiao J., and Wang S., 2011. Manipulating broad-spectrum disease resistance by suppressing pathogen-induced auxin accumulation in rice. *Plant Physiology*, 155(1): 589–602.
  42. Fukudome A., and Fukuhara T., 2017. Plant dicer-like proteins: double-stranded RNA-cleaving enzymes for small RNA biogenesis. *Journal of Plant Research*, 130(1): 33–44.
  43. Gao F., Wang K., Liu Y., Chen Y., Chen P., Shi Z., Luo J., Jiang D., Fan F., and Zhu Y., 2015. Blocking *miR396* increases rice yield by shaping inflorescence architecture. *Nature Plants*, 2(1): 1–9.
  44. Goff S.A., Ricke D., Lan T.H., Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J.,

- Sessions A., Oeller P., and Varma H., 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*, 296(5565): 92–100.
45. Griffiths-Jones S., Saini H.K., van Dongen S., and Enright A.J., 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research*, 36(suppl 1): D154–D158.
46. Gross J., Stein R.J., Fett-Neto A.G., and Fett J.P., 2003. Iron homeostasis related genes in rice. *Genetics and Molecular Biology*, 26(4): 477–497.
47. Gu S., and Kay M.A., 2010. How do miRNAs mediate translational repression? *Silence*, 1(1): 1–5.
48. Guo M., Chen Y., Du Y., Dong Y., Guo W., Zhai S., Zhang H., Dong S., Zhang Z., and Wang Y., 2011. The *bZIP* transcription factor *MoAPI* mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS pathogens*, 7(2): e1001302.
49. Guo X., Li Y., Fan J., Xiong H., Xu F., Shi J., Shi Y., and Wang W., 2019. Host-induced gene silencing of *MoAPI* confers increased resistance to *Magnaporthe oryzae*. *Frontiers in plant science*, 10: 433.
50. Han S.W., and Jung H.W., 2013. Molecular sensors for plant immunity; pattern recognition receptors and race-specific resistance proteins. *Journal of Plant Biology*, 56(6): 357–366.
51. Harmon P.F., Dunkle L.D., and Latin R., 2003. A rapid PCR-based method for the detection of *Magnaporthe oryzae* from infected perennial ryegrass. *Plant disease*, 87(9): 1072–1076.
52. Hamer J.E., Howard R.J., Chumley F.G., & Valent B. (1988). A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science*, 239(4837): 288-290.
53. Đoàn Thị Hòa, Võ Thị Ngọc Linh, Trương Thành Nhật, Nguyễn Bằng Phi, Nguyễn Ngọc Bảo Châu và Nguyễn Bảo Quốc., 2016. Ứng dụng phương pháp

- PCR trong việc xác định nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa, *Magnaporthe oryzae*. *Tạp chí Khoa học Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh*, 11(1): 12-18.
54. Hori K., Yamamoto T., and Yano M., 2017. Genetic dissection of agronomically important traits in closely related temperate *japonica* rice cultivars. *Breeding Science*, 67(5): 427-434.
55. Huang J., Li Z., and Zhao D., 2016. Deregulation of the *OsmiR160* target gene *OsARF18* causes growth and developmental defects with an alteration of auxin signaling in rice. *Scientific Reports*, 6(1): 1–14.
56. Ishimaru Y., Takahashi R., Bashir K., Shimo H., Senoura T., Sugimoto K., Ono K., Yano M., Ishikawa S., and Arao T., 2012. Characterizing the role of rice *NRAMP5* in manganese, iron and cadmium transport. *Scientific Reports*, 2(1): 1–8.
57. Iwamoto M., and Tagiri A., 2016. Micro RNA-targeted transcription factor gene RDD1 promotes nutrient ion uptake and accumulation in rice. *The Plant Journal*, 85(4): 466–477.
58. Jeong J.S., Kim Y.S., Baek K.H., Jung H., Ha S.H., Do Choi Y., Kim M., Reuzeau C., and Kim J.K., 2010. Root-specific expression of *OsNAC10* improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant Physiology*, 153(1): 185–197.
59. Junhua L., Xuemei Y., Jinfeng C., Tingting L., Zijin H., Ying X., Jinlu L., Jiqun Z., Mei P., and Hui F., 2021. *Osa-miR439* negatively regulates rice immunity against *Magnaporthe oryzae*. *Rice Science*, 28(2): 156–165.
60. Kaneda T., Taga Y., Takai R., Iwano M., Matsui H., Takayama S., Isogai A., and Che F., 2009. The transcription factor *OsNAC4* is a key positive regulator of plant hypersensitive cell death. *The EMBO Journal*, 28(7): 926–936.
61. Kapoor M., Arora R., Lama T., Nijhawan A., Khurana J.P., Tyagi A.K., and Kapoor S., 2008. Genomewide identification, organization and phylogenetic

- analysis of dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families and their expression analysis during reproductive development and stress in rice expression analysis during reproduct. *BMC Genomics*, 9: 451.
62. Kachroo P., Leong S.A., & Chattoo B.B. (1994). Pot2, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular and General Genetics MGG*, 245(3), 339-348. *Genomics*, 9(1): 1–17.
  63. Katiyar-Agarwal S., and Jin H., 2007. Discovery of pathogen-regulated small RNAs in plants. *Methods in Enzymology*, 427(07): 215–227.
  64. Khraiwesh B., Zhu J.K., and Zhu J., 2012. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819(2): 137–148.
  65. Kim B., 2018. Classifying Asian rice cultivars (*Oryza sativa* L.) into *indica* and *japonica* using logistic regression model with publicly available phenotypic data. *BioRxiv*, 470351.
  66. Komal T., Mustafa M., Ali Z., and Kazi A.G., 2015. Heavy metal uptake and transport in plants. In *Heavy metal contamination of soils*. Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, pp.181–194.
  67. Lamari L., 2008. Assess 2.0 [recurso electrónico]: image analysis software for plant disease quantification. *APS Press*, 632(3): L215a.
  68. Lanquar V., Ramos M.S., Lelièvre F., Barbier-Brygoo H., Krieger-Liszkay A., Krämer U., and Thomine S., 2010. Export of vacuolar manganese by *AtNRAMP3* and *AtNRAMP4* is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency. *Plant Physiology*, 152(4): 1986–1999.
  69. Lee S., Jia Y., Jia M., Gealy D.R., Olsen K.M., and Caicedo A.L., 2011. Molecular evolution of the rice blast resistance gene *Pi-ta* in invasive weedy rice in the USA. *PLoS One*, 6(10): e26260.
  70. Lee T.J., Yuan X., Kerr K., Yoo J.Y., Kim D.H., Kaur B., and Eltzschig H.K.,



2020. Strategies to modulate microRNA functions for the treatment of cancer or organ injury. *Pharmacological reviews*, 72(3): 639–667.
71. Li H., Hu B., Wang W., Zhang Z., Liang Y., Gao X., Li P., Liu Y., Zhang L., and Chu C., 2016c. Identification of microRNAs in rice root in response to nitrate and ammonium. *Journal of Genetics and Genomics*, 43(11): 651–661.
72. Li S.B., Xie Z.Z., Hu C.G., and Zhang J.Z., 2016a. A review of auxin response factors (ARFs) in plants. *Frontiers in Plant Science*, 7: 47.
73. Li X.P., Ma X.C., Wang H., Zhu Y., Liu X.X., Li T.T., Zheng Y.P., Zhao J.Q., Zhang J.W., and Huang Y.Y., 2020. *Osa-miR162a* fine-tunes rice resistance to *Magnaporthe oryzae* and yield. *Rice*, 13(1): 1–13.
74. Li X., Xie X., Li J., Cui Y., Hou Y., Zhai L., Wang X., Fu Y., Liu R., & Bian S. (2017). Conservation and diversification of the miR166 family in soybean and potential roles of newly identified *miR166s*. *BMC Plant Biology*, 17(1): 1–18.
75. Li Y, Cao X., Zhu Y., Yang X., Zhang K., Xiao Z., Wang H., Zhao J., Zhang L., and Li G., 2019a. *Osa-miR398b* boosts H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and rice blast disease-resistance via multiple superoxide dismutases. *New Phytologist*, 222(3): 1507–1522.
76. Li Y, Jeyakumar J.M.J., Feng Q., Zhao Z.X., Fan J., Khaskheli M.I., and Wang W.M., 2019b. The roles of rice microRNAs in rice-*Magnaporthe oryzae* interaction. *Phytopathology Research*, 1(1): 33.
77. Li Y., Lu Y.G., Shi Y., Wu L., Xu Y.J., Huang F., Guo X.Y., Zhang Y., Fan J., Zhao J.Q., Zhang H.Y., Xu P.Z., Zhou J.M., Wu X.J., Wang P.R., and Wang W.M., 2014. Multiple rice microRNAs are involved in immunity against the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Physiology*, 164(2): 1077–1092.
78. Li Y, Wang L.F., Bhutto S.H., He X.R., Yang X.M., Zhou X.H., Lin X.Y., Rajput A.A., Li G.B., and Zhao J.H., 2021. Blocking *miR530* improves rice resistance, yield, and maturity. *Frontiers in Plant Science*, 12: 729560.

79. Li Y, Zhao S.L., Li J.L., Hu X.H., Wang H., Cao X.L., Xu Y.J., Zhao Z.X., Xiao Z.Y., and Yang N., 2017. *Osa-miR169* negatively regulates rice immunity against the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Frontiers in Plant Science*, 8: 2.
80. Li Z.Y., Xia J., Chen Z., Yu Y., Li Q.F., Zhang Y.C., Zhang J.P., Wang C.Y., Zhu X.Y., and Zhang W., 2016b. Large-scale rewiring of innate immunity circuitry and microRNA regulation during initial rice blast infection. *Scientific Reports*, 6(1): 1–10.
81. Lin W., Lin Y., Chiang S., Syu C., Hsieh L., and Chiou T., 2018. Evolution of *microRNA827* targeting in the plant kingdom. *New Phytologist*, 217(4): 1712–1725.
82. Linares O.F., 2002. African rice (*Oryza glaberrima*): history and future potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25): 16360–16365.
83. Liu G., Greenshields D.L., Sammynaiken R., Hirji R.N., Selvaraj G., and Wei Y., 2007. Targeted alterations in iron homeostasis underlie plant defense responses. *Journal of Cell Science*, 120(4): 596–605.
84. Liu H., Jia S., Shen D., Liu J., Li J., Zhao H., Han S., and Wang Y., 2012. Four auxin response factor genes downregulated by *microRNA167* are associated with growth and development in *Oryza sativa*. *Functional Plant Biology*, 39(9): 736–744.
85. Llave C., 2004. MicroRNAs: more than a role in plant development?. *Molecular Plant Pathology*, 5(4): 361–366.
86. Londo J.P., Chiang Y.C., Hung K.H., Chiang T.Y., and Schaal B.A., 2006. Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(25): 9578–9583.
87. Lopez J.A., Sun Y., Blair P.B., and Mukhtar M.S., 2015. TCP three-way handshake: linking developmental processes with plant immunity. *Trends in*

- Plant Science*, 20(4): 238–245.
88. Lu C., Jeong D.H., Kulkarni K., Pillay M., Nobuta K., German R., Thatcher S.R., Maher C., Zhang L., and Ware D., 2008. Genome-wide analysis for discovery of rice microRNAs reveals natural antisense microRNAs (nat-miRNAs). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(12): 4951–4956.
  89. Lu, Y., Feng, Z., Bian, L., Xie, H., & Liang, J. (2011). *miR398* regulation in rice of the responses to abiotic and biotic stresses depends on *CSD1* and *CSD2* expression. *Functional Plant Biology*, 38(1): 44–53.
  90. Lu Y., Feng Z., Liu X., Bian L., Xie H., Zhang C., Mysore K.S., and Liang J., 2018. *MiR393* and *miR390* synergistically regulate lateral root growth in rice under different conditions. *BMC Plant Biology*, 18(1): 261.
  91. Maciel J.L.N., 2018. Diseases affecting wheat: wheat blast. In integrated disease management of wheat and barley. Burleigh Dodds *Science Publishing*, Cambridge, United Kingdom, pp.175–190.
  92. Maestri E., Marmiroli M., Visioli G., and Marmiroli N., 2010. Metal tolerance and hyperaccumulation: costs and trade-offs between traits and environment. *Environmental and Experimental Botany*, 68(1): 1–13.
  93. Mahesh H.B., Shirke M.D., Wang G.L., and Gowda M., 2021. In planta transcriptome analysis reveals tissue-specific expression of pathogenicity genes and microRNAs during rice-*Magnaporthe* interactions. *Genomics*, 113(1): 265–275.
  94. Mallory A.C., Reinhart B.J., Jones-Rhoades M.W., Tang G., Zamore P.D., Barton M.K., and Bartel D.P., 2004. MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *The EMBO Journal*, 23(16): 3356–3364.
  95. Mantovani R., 1999. The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene*, 239(1): 15–27.

96. Margis R., Fusaro A.F., Smith N.A., Curtin S.J., Watson J.M., Finnegan E.J., and Waterhouse P.M., 2006. The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Letters*, 580(10): 2442–2450.
97. Martin-Urdiroz M., Oses-Ruiz M., Ryder L.S., and Talbot N.J., 2016. Investigating the biology of plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 90: 61–68.
98. Millar A.A., Lohe A., and Wong G., 2019. Biology and function of *miR159* in plants. *Plants*, 8(8): 255.
99. Moreira S.I., Ceresini P.C., and Alves E., 2015. Sexual reproduction in *Pyricularia oryzae*. *Summa Phytopathologica*, 41(3): 175–182.
100. Nevo Y., and Nelson N., 2006. The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(7): 609–620.
101. Nguyen Q.B., Itoh K., Vu V.B., Tosa Y., and Nakayashiki H., 2011. Simultaneous silencing of endo- $\beta$ -1, 4 xylanase genes reveals their roles in the virulence of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Microbiology*, 81(4): 1008–1019.
102. Nosaka M., Itoh J.I., Nagato Y., Ono A., Ishiwata A., and Sato Y., 2012. Role of transposon-derived small RNAs in the interplay between genomes and parasitic DNA in rice. *PLoS Genet*, 8(9): e1002953.
103. Obuchowski N.A., and Bullen J.A., 2018. Receiver operating characteristic (ROC) curves: review of methods with applications in diagnostic medicine. *Physics in Medicine & Biology*, 63(7): 07TR01.
104. Padmanabhan C., Zhang X., and Jin H., 2009. Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4): 465–472.
105. Pandey C., Raghuram B., Sinha A.K., and Gupta M., 2015. miRNA plays a role in the antagonistic effect of selenium on arsenic stress in rice seedlings.

- Metallomics*, 7(5): 857–866.
106. Panigrahi S., Panigrahy M., Kariali E., Dash S.K., Sahu B.B., Sahu S.K., Mohapatra P.K., and Panigrahi K.C.S., 2021. MicroRNAs modulate ethylene induced retrograde signal for rice endosperm starch biosynthesis by default expression of transcriptome. *Scientific Reports*, 11(1): 1–17.
  107. Panwar V., McCallum B., and Bakkeren G., 2013. Host-induced gene silencing of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* pathogenicity genes mediated by the barley stripe mosaic virus. *Plant Molecular Biology*, 81(6): 595–608.
  108. Penn T.J., Wood M.E., Soanes D.M., Csukai M., Corran A.J., and Talbot N.J., 2015. Protein kinase C is essential for viability of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular microbiology*, 98(3): 403–419.
  109. Peris-Peris C., Serra-Cardona A., Sánchez-Sanuy F., Campo S., Ariño J., and San Segundo B., 2017. Two *NRAMP6* isoforms function as iron and manganese transporters and contribute to disease resistance in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(5): 385–398.
  110. Petroni K., Kumimoto R.W., Gnesutta N., Calvenzani V., Fornari M., Tonelli C., Holt B.F., and Mantovani R., 2012. The promiscuous life of plant nuclear factor Y transcription factors. *The Plant Cell*, 24(12): 4777–4792.
  111. Phansak P., Siritwong S., Sangpueak R., Kanawapee N., Thumanu K., and Buensanteai N., 2021. Screening rice blast-resistant cultivars via synchrotron Fourier transform infrared (SR-FTIR) microspectroscopy. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 33(9): 726–741.
  112. Pliego C., Nowara D., Bonciani G., Gheorghe D.M., Xu R., Surana P., Whigham E., Nettleton D., Bogdanove A.J., and Wise R.P., 2013. Host-induced gene silencing in barley powdery mildew reveals a class of ribonuclease-like effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(6): 633–642.
  113. Pottier M., Roux C., Roschztardt H., Lanquar V., Oomen R., Giraudat J., Curie

- C., and Thomine S., 2013. The iron and manganese transporter AtNRAMP5 contributes to male fertility in *Arabidopsis thaliana*. In *16th Symposium International Iron Nutrition and Interactions in Plants (IWPMB2013)*. Amherst, Massachussets, USA, 17-21 June, 2013.
114. Prabhu AS, and Filippi M.C., 1995. Age-mediated resistance and fungicide application for leaf blast control in upland rice. *International Journal of Pest Management*, 41(1): 8–13.
115. Prabhu A.S., Filippi M.C., Silva G.B., Silva Lobo V.L., and Morais O.P., 2009. An unprecedented outbreak of rice blast on a newly released cultivar BRS Colosso in Brazil. In *Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease*. Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, pp.257–266.
116. Project R.A., 2007. The rice annotation project database (RAP-DB): 2008 update. *Nucleic Acids Research*, 36(suppl\_1): D1028–D1033.
117. Qin S., Jin P., Zhou X., Chen L., and Ma F., 2015. The role of transposable elements in the origin and evolution of microRNAs in human. *PLoS One*, 10(6): e0131365.
118. Qu L., Lin L., and Xue H., 2019. Rice miR394 suppresses leaf inclination through targeting an F-box gene, LEAF INCLINATION 4. *Journal of Integrative Plant Biology*, 61(4): 406–416.
119. Quoc N.B, Phuong N.D.N., Trang H.T.T., Phi N.B., and Chau N.N.B., 2019. Expression of *osa-miR7695* against the blast fungus *Magnaporthe oryzae* in Vietnamese rice cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, 155(1): 307–317.
120. Quoc N.B., Trang H.T.T., Phuong N.D.N., Chau N.N.B., and Jantasuriyarat C., 2021. Development of a SCAR marker linked to fungal pathogenicity of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *International Microbiology*, 24(2): 149–156.
121. Rhoades M.W., Reinhart B.J., Lim L.P., Burge C.B., Bartel B., and Bartel D.P.,

2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110(4): 513–520.
122. Ribot C., Hirsch J., Balzergue S., Tharreau D., Nottéghem J.L., Lebrun M.H., and Morel J.B., 2008. Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Journal of Plant Physiology*, 165(1): 114–124.
123. Rogers K., and Chen X., 2013. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell*, 25(7): 2383–2399.
124. Salvador-Guirao R., Baldrich P., Tomiyama S., Hsing Y.I., Okada K., and San Segundo B., 2019. *OsDCL1a* activation impairs phytoalexin biosynthesis and compromises disease resistance in rice. *Annals of Botany*, 123(1): 79–93.
125. Salvador-Guirao R., Hsing Y., and San Segundo B., 2018. The polycistronic miR166k-166h positively regulates rice immunity via post-transcriptional control of *EIN2*. *Frontiers in Plant Science*, 9: 337.
126. Sasaki A., Yamaji N., Yokosho K., and Ma J.F., 2012. *NRAMP5* is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. *The Plant Cell*, 24(5): 2155–2167.
127. Schmittgen T.D., Lee E.J., Jiang J., Sarkar A., Yang L., Elton T.S., and Chen C., 2008. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods*, 44(1): 31–38.
128. Šečić E., Kogel K.H., and Ladera-Carmona M.J., 2021. Biotic stress-associated microRNA families in plants. *Journal of Plant Physiology*, 263: 153451.
129. Sharma T.R., Rai A.K., Gupta S.K., Vijayan J., Devanna B.N., and Ray S., 2012. Rice blast management through host-plant resistance: retrospect and prospects. *Agricultural Research*, 1(1): 37–52.
130. Shim J.S., Oh N., Chung P.J., Kim Y.S., Choi Y.Do, and Kim J.K., 2018. Overexpression of *OsNAC14* improves drought tolerance in rice. *Frontiers in Plant Science*, 9: 310.

131. Song X., Li Y., Cao X., and Qi Y., 2019. MicroRNAs and their regulatory roles in plant–environment interactions. *Annual Review of Plant Biology*, 70: 489–525.
132. Song X., Wang D., Ma L., Chen Z., Li P., Cui X., Liu C., Cao S., Chu C., and Tao Y., 2012. Rice RNA-dependent RNA polymerase 6 acts in small RNA biogenesis and spikelet development. *The Plant Journal*, 71(3): 378–389.
133. Sriwana K. (2022). Weather-based rice blast disease forecasting. *Computers and Electronics in Agriculture*, 193: 106685.
134. Srivastava D., Shamim M., Kumar M., Mishra A., Pandey P., Kumar D., Yadav P., Siddiqui M.H., and Singh K.N., 2017. Current status of conventional and molecular interventions for blast resistance in rice. *Rice Science*, 24(6): 299–321.
135. Stein J.C., Yu Y., Copetti D., Zwickl D.J., Zhang L., Zhang, C., Chougule K., Gao D., Iwata A., and Goicoechea J.L., 2018. Genomes of 13 domesticated and wild rice relatives highlight genetic conservation, turnover and innovation across the genus *Oryza*. *Nature Genetics*, 50(2): 285–296.
136. Sun M., Shen Y., Li H., Yang J., Cai X., Zheng G., Zhu Y., Jia B., and Sun X., 2019. The multiple roles of *OsmiR535* in modulating plant height, panicle branching and grain shape. *Plant Science*, 283: 60–69.
137. Sun M., Shen Y., Yang J., Cai X., Li H., Zhu Y., Jia B., and Sun X., 2020. *miR535* negatively regulates cold tolerance in rice. *Molecular Breeding*, 40(1): 1–12.
138. Talbot N.J., Kershaw M.J., Wakley G.E., De Vries, O.M.H., Wessels J.G H., and Hamer J.E., 1996. *MPG1* encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development of *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, 8(6): 985–999.
139. Tang J., and Chu C., 2017. MicroRNAs in crop improvement: fine-tuners for complex traits. *Nature Plants*, 3(7): 1–11.



140. Thomine S., Lelièvre F., Debarbieux E., Schroeder J.I., and Barbier-Brygoo H., 2003. *AtNRAMP3*, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *The Plant Journal*, 34(5): 685–695.
141. Thomine S., Wang R., Ward J.M., Crawford N.M., and Schroeder J.I., 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *PNAS*, 97(9): 4991–4996.
142. Tian C., Zuo Z., Qiu J.L., 2015. Identification and characterization of ABA-responsive microRNAs in rice. *Journal of genetics and genomics*, 42(7): 393–402.
143. Tiwari M., Sharma D., Dwivedi S., Singh M., Tripathi R.D., and Trivedi P.K., 2014. Expression in *Arabidopsis* and cellular localization reveal involvement of rice NRAMP, *OsNramp1*, in arsenic transport and tolerance. *Plant, Cell and Environment*, 37(1): 140–152.
144. Vale F.X.R., Parlevliet J.E., and Zambolim L., 2001. Concepts in plant disease resistance. *Fitopatologia Brasileira*, 26(3): 577–589.
145. Vu V.B., Itoh K., Nguyen Q.B, Tosa Y., and Nakayashiki H., 2012. Cellulases belonging to glycoside hydrolase families 6 and 7 contribute to the virulence of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(9): 1135–1141.
146. Vidal S.M., Malo D., Vogan K., Skamene E., and Gros P., 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell*, 73(3): 469–485.
147. Voinnet O., 2009. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 136(4): 669–687
148. Wang D., Pajerowska-Mukhtar K., Culler A.H., & Dong X. (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology*, 17(20): 1784–1790.
149. Wang H, Li Y., Chern M., Zhu Y., Zhang L.L., Lu J.H., Li X.P., Dang W.Q.,

- Ma X.C., and Yang Z.R., 2021a. Suppression of rice *miR168* improves yield, flowering time and immunity. *Nature Plants*, 7(2): 129–136.
150. Wang R., Yang X., Guo S., Wang Z., Zhang Z., and Fang Z., 2021b. *MiR319*-targeted *OsTCP21* and *OsGAMYB* regulate tillering and grain yield in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(7): 1260-1272.
151. Wang S., Sun X., Hoshino Y., Yu Y., Jia B., Sun Z., Sun M., Duan X., and Zhu Y., 2014. MicroRNA319 positively regulates cold tolerance by targeting *OsPCF6* and *OsTCP21* in rice (*Oryza sativa* L.). *PloS One*, 9(3): e91357.
152. Wang Z., Xia Y., Lin S., Wang Y., Guo B., Song X., Ding S., Zheng L., Feng R., and Chen S., 2018. *Osa-miR164a* targets *OsNAC60* and negatively regulates rice immunity against the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Journal*, 95: 584–597.
153. Weiberg A. and Jin H., 2015. Small RNAs—the secret agents in the plant–pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 26: 87–94.
154. Weiberg A., Wang M., Lin F.M., Zhao H., Zhang Z., Khaloshian I., Huang H.D., and Jin H., 2014. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host. *Science*, 342(6154): 118-23.
155. Were V.M., 2018. Investigating the role of effector proteins in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Thesis PhD, University of Exeter, England*.
156. Wu L., Zhang Q., Zhou H., Ni F., Wu X., and Qi Y., 2009. Rice microRNA effector complexes and targets. *The Plant Cell*, 21(11): 3421–3435.
157. Wu L., Zhou H., Zhang Q., Zhang J., Ni F., Liu C., and Qi Y., 2010. DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Molecular Cell*, 38(3): 465–475.
158. Xiao W., Luo L., Hui W., Tao G.U.O., Liu Y., Zhou J., Zhu X., Yang Q., and Chen Z., 2016. Pyramiding of *Pi46* and *Pita* to improve blast resistance and to evaluate the resistance effect of the two R genes. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(10): 2290–2298.

159. Xiao Z.Y., Wang Q.X., Zhao S.L., Wang H., Li J.L., Huang F., Fan J., Li Y., and Wang W.M., 2017. *MiR444b.2* regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and tillering in rice. *Acta Phytopathol Sin*, 47: 511–522.
160. Xie M., Zhang S., and Yu B., 2015. MicroRNA biogenesis, degradation and activity in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(1): 87–99.
161. Xie Z., Allen E., Fahlgren N., Calamar A., Givan S.A., and Carrington, J.C., 2005. Expression of Arabidopsis MIR genes. *Plant physiology*, 138(4): 2145–2154.
162. Xue C., Park G., Choi W., Zheng L., Dean R.A., and Xu J.R., 2002. Two novel fungal virulence genes specifically expressed in appressoria of the rice blast fungus. *The Plant Cell*, 14(9): 2107–2119.
163. Yan X., and Talbot N.J., 2016. Investigating the cell biology of plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Current Opinion in Microbiology*, 34: 147–153.
164. Yan Y., Wei M., Li Y., Tao H., Wu H., Chen Z., Li C., and Xu J.H., 2021. MiR529a controls plant height, tiller number, panicle architecture and grain size by regulating SPL target genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, 302: 110728.
165. Yang M., Zhang W., Dong H., Zhang Y., Lv K., Wang D., and Lian X., 2013. *OsNRAMP3* is a vascular bundles-specific manganese transporter that is responsible for manganese distribution in rice. *PLoS One*, 8(12): e83990.
166. Yokotani N., Tsuchida-Mayama T., Ichikawa H., Mitsuda N., Ohme-Takagi M., Kaku H., Minami E., and Nishizawa Y., 2014. *OsNAC111*, a blast disease-responsive transcription factor in rice, positively regulates the expression of defense-related genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(10): 1027–1034.
167. Yuan J., Wang Z., Xing J., Yang Q., and Chen X.L., 2018. Genome-wide

- Identification and characterization of circular RNAs in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Scientific Reports*, 8(1): 1–8.
168. Yuan X., Wang H., Cai J., Bi Y., Li D., and Song F., 2019. Rice NAC transcription factor *OsNAC066* functions as a positive regulator of drought and oxidative stress response. *BMC Plant Biology*, 19(1): 1–19.
169. Yuan, X., Wang, H., Cai, J., Li, D., & Song, F. (2019). NAC transcription factors in plant immunity. *Phytopathology Research*, 1(1): 1–13
170. Zhang C., Ding Z., Wu K., Yang L., Li Y., Yang Z., Shi S., Liu X., Zhao S., and Yang Z., 2016a. Suppression of jasmonic acid-mediated defense by viral-inducible *microRNA319* facilitates virus infection in rice. *Molecular Plant*, 9(9): 1302–1314.
171. Zhang D., Liu M., Tang M., Dong B., Wu D., Zhang Z., and Zhou B., 2015. Repression of microRNA biogenesis by silencing of *OsDCL1* activates the basal resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice. *Plant Science*, 237: 24-32.
172. Zhang H, Zheng X., and Zhang Z., 2016b. The *Magnaporthe grisea* species complex and plant pathogenesis. *Molecular Plant Pathology*, 17(6): 796-804.
173. Zhang H, Hu J., Qian Q., Chen H., Jin J., and Ding Y., 2016c. Small RNA profiles of the rice PTGMS line Wuxiang S reveal miRNAs involved in fertility transition. *Frontiers in Plant Science*, 7: 514.
174. Zhang X, Bao, Y., Shan D., Wang Z., Song X., Wang Z., Wang J., He L., Wu L., and Zhang Z., 2018. *Magnaporthe oryzae* induces the expression of a microRNA to suppress the immune response in rice. *Plant Physiology*, 177(1): 352–368.
175. Zhao H., Wu D., Kong F., Lin K., Zhang H., and Li G., 2017. The *Arabidopsis thaliana* nuclear factor Y transcription factors. *Frontiers in Plant Science*, 7: 2045.
176. Zhao J., Yang W., Zhang S., Yang T., Liu Q., Dong J., Fu H., Mao X., and Liu

- B., 2018. Genome-wide association study and candidate gene analysis of rice cadmium accumulation in grain in a diverse rice collection. *Rice*, 11(1): 1–15.
177. Zhao Z., Feng Q., Cao X., Zhu Y., Wang H., Chandran V., Fan J., Zhao J., Pu M., and Li Y., 2019. *Osa-miR167d* facilitates infection of *Magnaporthe oryzae* in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(5): 702-715.
178. Zhou M., Gu L., Li P., Song X., Wei L., Chen Z., and Cao X., 2010. Degradome sequencing reveals endogenous small RNA targets in rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Frontiers in Biology*, 5(1): 67–90.
179. Zhou S., Zhu Y., Wang L., Zheng Y., Chen J., Li T., Yang X., Wang H., Li X., and Ma X., 2020. *Osa-miR1873* fine-tunes rice immunity against *Magnaporthe oryzae* and yield traits. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(8): 1213–1226.
180. Zhu Q.H., Upadhyaya N.M., Gubler F., and Helliwell C.A., 2009. Over-expression of miR172 causes loss of spikelet determinacy and floral organ abnormalities in rice (*Oryza sativa*). *BMC Plant Biology*, 9(1): 149.
181. Zuo J., Wang Y., Liu H.H., Ma Y.Y., Ju Z., Zhai B., Fu D., Zhu Y., Luo Y., Zhu B., Zhu F., Xu J.J.J., Palli R., Ferguson J., Palli S.R., Zhou M., Luo H., Zhou G., Wang T., and Me S., 2014. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Methods*, 7(1): 1–16.

## PHỤ LỤC

**Phụ lục 1.** Danh sách các microRNAs ở lúa liên quan đến tính kháng, miễn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn, *Magnaporthe oryzae*

STT	miRNA	Kích thước miRNA hoàn chỉnh (nu)	Số lượng miRNA trưởng thành	Gen đích	Tác động của miRNA đến tính trạng của lúa	Tài liệu tham khảo
1.	<i>osa-miR156</i>	21 nu	<b>3</b>	<i>SPL13</i> ( <i>LOC_Os07g32170</i> );  <i>SPL18</i> ( <i>LOC_Os09g32944</i> );  <i>SPL19</i> ( <i>LOC_Os11g30370</i> );  <i>SPL14</i> ( <i>LOC_Os08g39890</i> );  <i>SPL3</i> ( <i>LOC_Os02g04680</i> );  <i>SPL4</i> ( <i>LOC_Os02g07780</i> )	Tác động đến sản lượng lúa, bông lúa, chiều cao lúa.	(Baldrich và ctv., 2015; Campo và ctv., 2013; Katiyar-Agarwal và Jin, 2007; Li và ctv., 2014; Li và ctv., 2016b; Zhang và ctv., 2015)
2.	<i>osa-miR159</i>	21 nu	<b>6</b>	<i>GAMYB</i> , <i>GAMYBL</i> ( <i>LOC_Os01g59660</i> ,	Tác động đến sự ra hoa, phát triển thân cây lúa.	(Chen và ctv., 2021; Li và ctv.,

				<i>LOC_Os06g4033</i> 0);  <i>OsZF</i>	Biểu hiện tăng <i>osa-miR159a</i> làm tăng khả năng kháng nấm <i>M.</i> <i>oryzae</i> trên lúa.  Gen đích tác động của <i>osa-miR159</i> là <i>OsGAMYB</i> , <i>OsGAMYBL</i> , và <i>OsZF</i> .	2014; Li và ctv.,2016)
3.	<b><i>osa-</i></b> <b><i>miR160</i></b>	21 nu	<b>3</b>	<i>ARF8</i> ( <i>LOC_Os02g4180</i> 0); <i>ARF10</i> ( <i>LOC_Os04g4391</i> 0); <i>ARF13</i> ( <i>LOC_Os04g5943</i> 0); <i>ARF18</i> ( <i>LOC_Os06g4715</i> 0); <i>ARF22</i> ( <i>LOC_</i> <i>Os10g33940</i> )	Biểu hiện tăng <i>osa-miR160</i> làm tăng khả năng kháng nấm <i>M.</i> <i>oryzae</i> trên cây lúa thông qua việc ức chế biểu hiện của gen đích, <i>ARFs</i>  Tác động đến hệ thống miễn dịch, sinh trưởng và phát triển của lúa.	(Campo và ctv.,2013; Huang và ctv.,2016; Li và ctv.,2019b)
4.	<b><i>osa-</i></b> <b><i>miR162</i></b>	21 nu	<b>2</b>	<i>OsDCL1a</i> ( <i>LOC_Os03g0297</i> 0)	Biểu hiện tăng <i>osa-miR162</i> làm tăng khả năng kháng nấm <i>M.</i> <i>oryzae</i> trên lúa thông qua sự kích thích các gen kháng và tích lũy tăng H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	(Li và ctv., 2020; Li và ctv., 2014; Zhang và ctv., 2015)

					<i>Osa-miR162</i> cân bằng khả năng kháng nấm <i>M. oryzae</i> và sản lượng lúa.	
5.	<i>osa-miR164</i>	21 nu	4	<i>OsNAC</i>	<p>Biểu hiện tăng <i>osa-miR164</i> làm giảm khả năng kháng nấm <i>M. oryzae</i> ở lúa.</p> <p>Biểu hiện tăng <i>osa-miR164</i> làm giảm khả năng chịu hạn ở lúa.</p>	(Tang và Chu, 2017; Wang và ctv., 2018)
6.	<i>osa-miR166</i>	21 nu	6	<p>START domain-containing protein (LOC_Os03g01890);</p> <p>Homeobox-leucine zipper protein (LOC_Os03g43930, LOC_Os10g33960, LOC_Os12g41860);</p> <p>Vacuolar protein 8 (LOC_Os06g01304)</p>	<p>Điều hòa cây lúa chống lại các căng thẳng phi sinh học (abiotic stress)</p> <p>Biểu hiện tăng <i>osa-miR166</i> làm tăng cường khả năng miễn dịch ở cây lúa thông qua sự điều hòa gene <i>ethylene-insensitive 2 (EIN2)</i>.</p>	(Ding và ctv., 2018; Iwamoto và Tagiri, 2016; Salvador-Guirao và ctv., 2018; Zhang và ctv., 2018)



				<i>RDD1</i> gene		
7.	<i>osa-miR167</i>	21 nu	2	<i>ARF6</i> ( <i>LOC_Os02g06910</i> ); <i>ARF12</i> ( <i>LOC_Os04g57610</i> ); <i>ARF17</i> ( <i>LOC_Os06g46410</i> ); <i>ARF25</i> ( <i>LOC_Os12g41950</i> ); <i>RETInol</i> dehydrogenase 14 ( <i>LOC_Os06g03830</i> ); Zinc finger protein 207 ( <i>LOC_Os09g38790</i> )	Biểu hiện tăng <i>osa-miR167d</i> làm giảm khả năng kháng nấm <i>M. oryzae</i> trên lúa  Điều hòa tín hiệu auxin, từ đó điều hòa sự sinh trưởng, phát triển của cây lúa.	(Liu và ctv., 2012a; Zhao và ctv., 2019)
8.	<i>osa-miR168</i>	21,24 nu	3	<i>AGO1a</i> ( <i>LOC_Os02g45070</i> ); <i>AGO1b</i> ( <i>LOC_Os04g47870</i> ); <i>AGO1c</i> ( <i>LOC_Os02g58490</i> ); <i>AGO1d</i> ( <i>LOC_Os06g51310</i> )	Biểu hiện giảm <i>osa-miR168</i> làm tăng cường sản lượng lúa, giảm thời gian ra hoa và khả năng miễn dịch.  Mô-đun <i>osa-miR168-AGO</i> kiểm soát <i>osa-miR535</i> để tăng số lượng bông lúa, kiểm soát <i>osa-miR164</i> để giảm thời gian ra hoa, và kiểm soát <i>osa-miR1320</i> để tăng cường khả năng	(Li và ctv., 2014; Li và ctv., 2016b; Wang và ctv., 2021a)

					miễn dịch với nấm gây bệnh đạo ôn <i>M. oryzae</i>	
9.	<b><i>osa-miR169</i></b>	21,22 nu	<b>9</b>	<i>NF-YC1</i> ( <i>LOC_Os02g07450</i> ); <i>NF-YC2</i> ( <i>LOC_Os03g14669</i> ); <i>NF-YC3</i> ( <i>LOC_Os04g58680</i> ); <i>NF-YC4</i> ( <i>LOC_Os06g45640</i> ); <i>NF-YA11</i> ( <i>LOC_Os02g53620</i> ); <i>NF-YA10</i> ( <i>LOC_Os12g42400</i> )	Biểu hiện tăng <i>osa-miR169</i> làm giảm khả năng kháng nấm <i>M. oryzae</i> ở lúa thông qua sự kìm hãm mức độ biểu hiện của gen <i>NF-YA</i> .	(Li và ctv., 2017)
10	<b><i>osa-miR171</i></b>	21 nu	<b>10</b>	<i>SCARECROW</i> gene regulator ( <i>LOC_Os06g01620</i> , <i>LOC_Os04g44360</i> , <i>LOC_Os04g46860</i> ); <i>AP2</i> domain containing TF	<i>osa-miR171</i> đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển rễ cây và lá; <i>osa-miR171</i> có liên quan đến con đường tín hiệu hormon, tác động đến sự hình thành mô phân sinh và mạch cây.  Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR171</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Baldrich và ctv., 2015; Li và ctv., 2014)

11	<i>osa-miR172</i>	20,21 nu	4	Retrotransposon protein (LOC_Os05g43220); <i>SSH1</i> (LOC_Os07g13170); <i>ARF9</i> (LOC_Os04g36054); <i>AP2-like factor</i> (LOC_Os03g60430, LOC_Os04g55560, LOC_Os05g03040, LOC_Os07g13170); Putative zinc-finger motif (LOC_Os09g21770)	<i>osa-miR172</i> kích thích ra hoa bằng cách ức chế biểu hiện gen <i>OsIDS1</i> , <i>SNB</i> và <i>AP2</i> . Các gen này đóng vai trò điều hòa giảm <i>Ehd1</i> và hormon kích thích nở hoa. Do đó, biểu hiện tăng <i>osa-miR172</i> sẽ làm giảm bông lúa non. Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR172</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Baldrich và ctv., 2015; Li và ctv., 2014; Li và ctv., 2016b; Zhu và ctv., 2009)
12	<i>osa-miR319</i>	20,21 nu	1	<i>TCP21</i> (LOC_Os12g07480); <i>myb proto-oncogene</i> (LOC_Os01g59660)  LOX2/LOX5	Biểu hiện tăng <i>osa-miR319</i> làm giảm khả năng kháng nấm <i>M. oryzae</i> ở lúa thông qua sự ức chế gen <i>OsTCP21</i> và <i>LOX2/5</i>	(Baldrich và ctv., 2015; Zhang và ctv., 2018)
13	<i>osa-miR390</i>	20,21 nu	2	<i>STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY 6 (SRF)</i>	Biểu hiện tăng <i>osa-miR390</i> làm tăng cường sự	(Baldrich và ctv., 2015; Ding và ctv.,

				<p>(<i>LOC_Os03g51040</i>);  <i>Wallassociated receptor kinase-like 10</i>  (<i>LOC_Os04g30060</i>); <i>Leucinerich repeat family</i>  (<i>LOC_Os04g45170</i>)  <i>ARF3/4</i></p>	<p>phát triển của rễ phụ (lateral roots) ở lúa thông qua sự ức chế gen <i>ARF3</i>. Biểu hiện tăng <i>osa-miR390</i> giúp cây lúa tăng khả năng chống chịu Cadmium</p> <p>Bên cạnh đó <i>osa-miR390</i> được điều hòa linh động bởi <i>osa-miR393</i> thông qua sự ức chế phân tử thụ quan auxin <i>OsTIR1</i> và <i>OsAFB2</i>. Tổ hợp <i>osa-miR390-osa-miR393</i> giúp cây lúa thích ứng với các căng thẳng phi sinh học.</p> <p>Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR390</i> có sự thay đổi khi lúa bị nhiễm nấm <i>M. oryzae</i></p>	2016; Lu và ctv., 2018)
14	<i>osa-miR393</i>	21,22 nu	2	<p>Thụ quan auxin <i>TIR1</i>  (<i>LOC_Os05g05800</i>); Thụ quan auxin <i>AFB2</i>  (<i>LOC_Os04g32460</i>)</p>	<p><i>osa-miR393</i> điều hòa linh động sự phát triển của rễ phụ ở lúa thông qua việc điều hòa <i>osa-miR390</i>. Tổ hợp <i>osa-miR390-osa-miR393</i> giúp</p>	(Baldrich và ctv., 2015; Ding và ctv., 2016; Lu và ctv., 2018)

					<p>cây lúa thích ứng với các căng thẳng phi sinh học. Tuy nhiên, cơ chế cụ thể chưa được làm sáng tỏ.</p> <p>Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR393</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i></p>	
15	<i>osa-miR394</i>	20 nu	<b>1</b>	Gen <i>LC4</i> (leaf inclination 4)	<p><i>osa-miR394</i> điều chỉnh độ cong của lá lúa thông qua ức chế gen đích <i>LC4</i>. Biểu hiện giảm <i>osa-miR394</i> làm tăng cường góc của lá lúa và bẹ lúa.</p>	(Qu và ctv.,2019)
16	<i>osa-miR395</i>	21,22 nu	<b>10</b>	<p>Cytochrome b5-like Heme/steroid binding domain containing protein (<i>LOC_Os10g35870</i>);</p> <p>Bifunctional 3-phosphoadenosine 5-phosphosulfate synthetase (<i>LOC_Os03g53230</i>); Protein kinase</p>	<p>Khi cây lúa có sự hiện diện của As hoặc (As và Se) thì <i>osa-miR395</i> có biểu hiện tăng. Tuy nhiên khi chỉ có Se thì <i>osa-miR395</i> có biểu hiện giảm.</p> <p>Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR395</i> có sự thay đổi khi</p>	(Campo và ctv., 2013; Li và ctv., 2019b; Pandey và ctv., 2015)

				domain containing protein ( <i>LOC_Os05g44290</i> )	lúa bị nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	
17	<i>osa-miR396</i>	21,22 nu	5	<i>GRF6</i> ( <i>LOC_Os03g51970</i> ); <i>GRF7</i> ( <i>LOC_Os12g29980</i> ); <i>GRF8</i> ( <i>LOC_Os11g35030</i> ); <i>GRF9</i> ( <i>LOC_Os03g47140</i> ); <i>GRF2</i> ( <i>LOC_Os06g10310</i> ); <i>GRF6</i> ( <i>LOC_Os03g51970</i> ); Deaminase ( <i>LOC_Os06g29430</i> )	Biểu hiện <i>osa-miR396</i> tăng làm giảm khả năng kháng nấm <i>M. oryzae</i> thông qua sự kìm hãm các gen <i>OsGRFs</i> .  Tổ hợp <i>osa-miR396-OsGRFs</i> điều chỉnh sự cân bằng giữa sản lượng lúa và khả năng kháng nấm <i>M. oryzae</i> .	(Chandran và ctv., 2019; Mahesh và ctv., 2021)
18	<i>osa-miR398</i>	21 nu	2	<i>CSD1</i> ( <i>LOC_Os03g22810</i> ); <i>CSD2</i> ( <i>LOC_Os07g46990</i> );	Biểu hiện <i>osa-miR398b</i> làm khả năng kháng nấm <i>M. oryzae</i> thông qua sự tăng cường nồng độ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ở lá .	(Li và ctv., 2014; Li và ctv., 2019a)

				<p><i>CSD3</i> (<i>LOC_Os03g11960</i>):</p> <p><i>CSD4</i> (<i>LOC_Os08g44770</i>)</p> <p>Gen <i>SODX</i> (<i>Superoxide Dismutase X</i>)</p>		
19	<b><i>osa-miR399</i></b>	21 nu	<b>9</b>	Gen <i>PHOSPHATE 2</i> ( <i>PHO2</i> )	<p>Biểu hiện <i>osa-miR399</i> tăng làm giảm khả năng kháng nấm <i>M.oryzae</i>. Trong số các dạng miRNA isoforms (miRNA đồng dạng) của <i>osa-miR399</i>, <i>osa-miR399f</i> khi biểu hiện tăng sẽ dẫn đến tăng nồng độ phosphate ở lá, từ đó dẫn đến tăng mức độ miễn cảm với nấm <i>M.oryzae</i>. Nghiên cứu cũng cho thấy khi bón phân lân quá nhiều sẽ làm tăng mức độ miễn cảm với nấm <i>M.oryzae</i> ở lúa.</p>	(Campos-Soriano và ctv., 2020)
20	<b><i>osa-miR435</i></b>	20	<b>1</b>	<i>COBRA-like protein precursor</i>	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR435</i> trên giống lúa	(Campo và ctv., 2013;

				( <i>LOC_Os07g41320</i> )	mẫn cảm cao hơn so với giống lúa kháng nấm <i>M. oryzae</i> ở các thời điểm (0h, 12hpi, 24 hpi): đặc biệt ở thời điểm 12hpi mức độ biểu hiện của <i>osa-osa-miR435</i> trên giống lúa mẫn cảm cao gấp 4.8 lần so với giống kháng. Tuy nhiên chưa xác định được cơ chế tác động đến khả năng kháng với nấm <i>M. oryzae</i> ở lúa	Li và ctv., 2014)
21	<i>osa-miR439</i>	21 nu	<b>1</b>	<i>Ch19</i> ( <i>LOC_Os03g36540</i> ); <i>Cyclin-dependent kinase G-1</i> ( <i>LOC_Os02g39010</i> ) Gen <i>OsNAC4</i> , <i>OsMAS1</i>	Biểu hiện <i>osa-miR439</i> tăng làm giảm khả năng kháng nấm <i>M. oryzae</i> ở lúa thông qua sự ức chế các gen kháng và giảm nồng độ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	(Junhua và ctv., 2021; Li và ctv., 2016b)
22	<i>osa-miR444</i>	21 nu	<b>6</b>	<i>OsMADS23</i> ( <i>LOC_Os08g33488</i> );	Biểu hiện tăng <i>osa-miR444b</i> làm giảm khả năng kháng nấm <i>M. oryzae</i> thông qua sự ức chế gen	(Li và ctv., 2014; Li và ctv., 2019b; Tang và Chu, 2017)



				<p><i>OsMADS27</i> (<i>LOC_Os02g36924</i>);</p> <p><i>OsMADS57</i> (<i>LOC_Os02g49840</i>)</p>	đích <i>OsMADS27</i> và <i>OsMADS57</i>	
23	<i>osa-miR528</i>	21 nu	<b>2</b>	<p>Gen RED AND FAR-RED INSENSITIVE 2 (<i>OsRFI2</i>)</p> <p>Ascorbate Oxidase (<i>AO</i>)</p>	<p><i>osa-miR528</i> ức chế gen Ascobate oxidase, có vai trò trong việc chống lại <i>Rice stripe virus</i> (<i>RSV</i>). Biểu hiện giảm <i>osa-miR528</i> làm tăng cường khả năng kháng <i>RSV</i>.</p> <p>Ngoài ra, <i>osa-miR528</i> có vai trò điều chỉnh thời gian ra bông ở lúa thông qua sự ức chế gen <i>OsRFI2</i></p> <p>Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR528</i> có sự thay đổi khi lúa bị nhiễm nấm <i>M. oryzae</i></p>	(Campo và ctv., 2013; Dong và ctv., 2018; Li và ctv., 2014)
24	<i>osa-miR529</i>	21,22 nu	<b>2</b>	<p><i>SBP-box gene family member</i> (<i>LOC_Os02g07780</i>)</p> <p><i>SPL14, SPL17</i></p>	<p><i>osa-miR529a</i> tham gia điều khiển chiều cao, số lượng chồi, kích thước hạt lúa</p>	(Campo và ctv., 2013; Li và ctv., 2019b; Yan và ctv., 2021)

					thông qua ức chế gen đích <i>SPL</i> .  Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR529</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	
25	<i>osa-miR530</i>	21 nu	<b>1</b>	Gen <i>OSPL3</i>	Biểu hiện tăng <i>osa-miR530</i> làm giảm khả năng kháng nấm <i>M. oryzae</i> thông qua ức chế gen đích <i>OSPL3</i>	(Li và ctv., 2021)
26	<i>osa-miR535</i>	21 nu	<b>2</b>	Gen <i>SPL</i> (Squamosa promoter-binding-like)  Gen <i>Squamosa promoter-binding-like protein 11</i> ( <i>LOC_Os06g45310</i> )	Biểu hiện tăng <i>osa-miR535</i> làm giảm khả năng chống chịu lạnh ở lúa thông qua sự ức chế gen <i>SPL</i> và điều hòa gen <i>OsCBL</i> .  Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR535</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Li và ctv., 2014; Sun và ctv., 2020; Wang và ctv., 2021a)
27	<i>osa-miR810b</i>	21	<b>3</b>	Gen <i>FBX160</i> ( <i>LOC_Os05g07950</i> );  Gen <i>Zmet3-like</i>	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR810</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm <i>M. oryzae</i>	(Campo và ctv., 2013; Li và ctv., 2019b; Lu và ctv., 2008)

28	<b><i>osa-miR812</i></b>	21,22,24 nu	<b>22</b>	<p><i>Calcium/calmodulin dependent protein kinase</i> (<i>LOC_Os03g22050</i>)</p> <p><i>ACO3</i> (<i>LOC_Os02g53180.1</i>)</p> <p><i>CIPK1</i> (<i>LOC_Os01g18800</i>)</p> <p><i>LRR</i></p>	<p>Biểu hiện tăng <i>osa-miR812w</i> làm tăng khả năng kháng với nấm <i>M. oryzae</i> ở lúa.</p> <p><i>osa-miR812w</i> chuyển hóa từ Stowaway type MITEs (Miniature Inverted-Repeat Transposable Elements). Mức độ tích lũy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ở lúa tăng cao khi <i>osa-miR812w</i> biểu hiện tăng.</p> <p><i>osa-miR812w</i> có chức năng trong việc methyl hóa gen đích (<i>ACO3</i>, <i>CIPK10</i>, <i>LRR</i>) và cho chính bản thân của <i>osa-miR812w</i>. Mức độ tích lũy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cao và methyl hóa gen MIR giúp cây lúa chống lại nấm <i>M. oryzae</i></p>	(Campo và ctv., 2013, 2021)
29	<b><i>osa-miR818</i></b>	21,22 nu	<b>6</b>	<i>RDR2</i> ( <i>LOC_Os04g39160</i> )	<i>osa-miR818</i> tham gia điều hòa quá trình tạo <i>hc-siRNA</i> thông qua	(Baldrich và ctv., 2015; Li và ctv., 2019b)

					<p>sự ức chế gen đích <i>RDR2</i>.</p> <p>Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR818</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>.</p>	
30	<i>osa-miR820</i>	21 nu	<b>1</b>	<p><i>OsDRM2</i> (<i>LOC_Os03g02010</i>);</p> <p><i>Cellulose synthase like C12</i> (<i>LOC_OS11g13650</i>)</p>	<p><i>osa-miR820</i> tác động đến quá trình sinh trưởng và phát triển của lúa thông qua sự ức chế gen <i>OsDRM2</i>.</p> <p>Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR820</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i></p>	(Campo và ctv., 2013; Nosaka và ctv., 2012; Tang và Chu, 2017)
31	<i>osa-miR827</i>	21 nu	<b>2</b>	<p><i>OsSPX-MFS1</i> (<i>LOC_Os04g48390</i>);</p> <p><i>OsSPX-MFS2</i> (<i>LOC_Os02g45520</i>);</p> <p><i>WAK receptor-like protein kinase</i> (<i>LOC_Os02g56370</i>)</p>	<p><i>osa-miR827</i> ức chế gen đích là <i>OsSPX-MFS1</i> và <i>OsSPX-MFS2</i>.</p> <p><i>osa-miR827</i> được kích thích rất mạnh khi lúa thiếu Phosphate ở chồi và rễ.</p> <p>Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR827</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>.</p>	(Campo và ctv., 2013; Lin và ctv., 2018)

32	<i>osa-miR1319</i>	24 nu	2	Gen <i>DHX36</i> ( <i>LOC_Os03g53760</i> )  Gen <i>LTPL6</i> ( <i>LOC_Os10g05720</i> )	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1319</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Campo và ctv., 2013; Li và ctv., 2019b)
33	<i>osa-miR1320</i>	21 nu	1	<i>Ethylene-responsive transcription factor</i> ( <i>LOC_Os10g41330</i> );  <i>ANTHOCYANIDI N 3-O-glucosyltransferase</i>	Biểu hiện tăng <i>osa-miR1320</i> làm tăng khả năng kháng nấm <i>M. oryzae</i> ở lúa thông qua <i>osa-miR168</i>	(Li và ctv., 2014; Wang và ctv., 2021a; Wang và ctv., 2018)
34	<i>osa-miR1423</i>	21,24 nu	2	Expressed protein ( <i>LOC_Os11g28540</i> );  <i>Heat shock protein DnaJ 34</i> ( <i>LOC_Os06g09560</i> )  <i>EF hand family protein</i> ( <i>Os06g01205</i> )	<i>osa-miR1423</i> ức chế gen đích <i>EF hand</i> , từ đó tác động đến việc truyền tín hiệu Canxi  Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1423</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Baldrich và ctv., 2015; Li và ctv., 2019b; Wu và ctv., 2009)

35	<i>osa-miR1425</i>	21 nu	<b>1</b>	<i>Rf4 mitochondrial precursor (LOC_Os10g3524 0); Rf6 mitochondrial precursor (LOC_Os10g3543 6);</i>  Glyoxylase protein family gene	<i>osa-miR1425</i> ức chế gen đích <i>GLY (Glyoxylase gene)</i> : có vai trò giải độc tổ methylglyoxal ( <i>MG</i> ) thành D-lactate ở cây trồng.  Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1425</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Baldrich và ctv., 2015; Campo và ctv., 2013; Li và ctv., 2014)
36	<i>osa-miR1427</i>	21 nu	<b>1</b>	<i>YGL8 (LOC_Os01g1717 0)</i>	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1427</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Campo và ctv., 2013; Li và ctv., 2019b; Salvador-Guirao và ctv., 2018)
37	<i>osa-miR1430</i>	21 nu	<b>1</b>	<i>ASYMMETRIC LEAVES 2 (LOC_Os05g3445 0);</i>  myb/SANT domain protein ( <i>LOC_Os03g1379 0</i> )	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1430</i> có sự biến đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Campo và ctv., 2013; Li và ctv., 2016b)
38	<i>osa-miR1433</i>	21 nu	<b>1</b>	<i>NAD dependent epimerase/dehydr</i>	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1433</i> có sự thay đổi khi	(Li và ctv., 2014)

				<p><i>atase family protein</i></p> <p>(<i>LOC_Os09g15420</i>):</p> <p><i>Retrotransposon protein</i></p> <p>(<i>LOC_Os04g17640</i>)</p> <p>(dự đoán)</p>	lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	
39	<b><i>osa-miR1437</i></b>	21,22,24 nu	<b>3</b>	<p><i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase domain containing protein</i></p> <p>(<i>LOC_Os06g0184300</i>);</p> <p><i>FAD2-1</i></p> <p>(<i>LOC_Os02g48560</i>)</p>	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1437</i> có sự biến đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Campo và ctv., 2013; Li và ctv., 2019b)
40	<b><i>osa-miR1846</i></b>	20,21,22 nu	<b>3</b>	<p>Expression protein</p> <p>(<i>LOC_Os08g10350</i>);</p> <p><i>Anther-specific prolinerich protein</i></p> <p>(<i>LOC_Os02g18870</i>);</p> <p>Nhân tố phiên mã có chứa domain Zinc-finger, C<sub>3</sub>H<sub>4</sub> type</p>	<p><i>osa-miR1846</i> tham gia điều hòa tín hiệu ethylen thông qua sự tác động đến gen <i>ACO</i> (Aminocyclopropanecarboxylate oxidase)</p> <p>Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1846</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i></p>	(Baldrich và ctv., 2015; Li và ctv., 2019b; Panigrahi và ctv., 2021)

41	<i>osa-miR1847</i>	20,24 nu	2	<i>AGO4b</i> ( <i>LOC_Os04g06770</i> )	Tổ hợp <i>osa-miR1847/AGO4</i> điều chỉnh quá trình sinh tổng hợp <i>hc-siRNA</i>  Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1847</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M.oryzae</i>	(Baldrich và ctv., 2015; Li và ctv., 2016b)
42	<i>osa-miR1850</i>	21,22 nu	3	<i>Pectinesterase inhibitor domain</i> ( <i>LOC_Os08g04650</i> );  <i>RDR2</i> ( <i>LOC_Os04g39160.1</i> )  <i>NB-ARC</i> ( <i>Os07g29820-like protein</i> )	<i>osa-miR1850</i> và <i>osa-miR818</i> cùng tác động đến gen <i>RDR2</i> trong quá trình sinh tổng hợp <i>hc-siRNA</i> .  Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1850</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M.oryzae</i>	(Campo và ctv., 2013; Li và ctv., 2016b)
43	<i>osa-miR1861</i>	22 nu	8	Starch binding domain containing protein ( <i>LOC_Os01g63810</i> );  <i>ATP binding protein</i> ( <i>LOC_Os05g5179</i> )  Gen <i>Glyoxalase</i>	Biểu hiện tăng <i>osa-miR1861</i> làm tăng khả năng chống chịu arsen ở lúa.  Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1861</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M.oryzae</i>	(Baldrich và ctv., 2015; Li và ctv., 2014; Li và ctv., 2016b)



				( <i>LOC_Os05g2297</i> 0.1)		
44	<i>osa-miR1862</i>	20,24 nu	4	<i>SART-1 family protein</i> ( <i>LOC_Os02g3073</i> 0)	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1862</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Campo và ctv., 2013; Li và ctv., 2016b)
45	<i>osa-miR1863</i>	23,24 nu	4	Protein dự đoán ( <i>LOC_Os05g1380</i> 4)	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1863</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Campo và ctv., 2013; Li và ctv., 2019b)
46	<i>osa-miR1865</i>	24 nu	2	<i>Aspartate aminotransferase</i> ( <i>LOC_Os02g1411</i> 0)	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1865</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Campo và ctv., 2013)
47	<i>osa-miR1867</i>	24 nu	1	<i>tRNA methyltransferase</i> ( <i>LOC_Os10g3055</i> 0)	Mức độ của <i>osa-miR1867</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Li và ctv., 2019b)
48	<i>osa-miR1871</i>	24 nu	1	<i>Ribosomal protein L7Ae</i> ( <i>LOC_Os09g3297</i> 6)	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1871</i> có sự thay đổi khi	(Li và ctv., 2014; Li và ctv., 2019b)

					lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	
49	<i>osa-miR1873</i>	24 nu	<b>1</b>	<i>LOC_Os05g01790</i>  <i>LOC_Os08g29660</i>	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1873</i> tăng làm giảm khả năng kháng nấm <i>M. oryzae</i> ở lúa thông qua sự ức chế các gen kháng và giảm nồng độ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  <i>osa-miR1873</i> cân bằng giữa khả năng kháng nấm <i>M. oryzae</i> và sản lượng lúa.	(Zhou và ctv., 2020)
50	<i>osa-miR1874</i>	24 nu	<b>2</b>	Expression protein ( <i>LOC_Os02g20950</i> )	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1874</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Li và ctv., 2019b)
51	<i>osa-miR1876</i>	24 nu	<b>1</b>	<i>Esterase/lipase/thioesterase</i> ( <i>LOC_Os02g31200</i> )	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1876</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Campo và ctv., 2013; Li và ctv., 2019b)
52	<i>osa-miR1879</i>	24 nu	<b>1</b>	<i>Catalase isozyme B</i> ( <i>LOC_Os06g51150</i> )	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1879</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Campo và ctv., 2013; Li và ctv., 2019b)

53	<i>osa-miR1882</i>	24 nu	2	<i>ABC transporter, ATP-binding protein (LOC_Os11g39020)</i>	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR1882</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Baldrich và ctv., 2015; Campo và ctv., 2013)
54	<i>osa-miR2871</i>	21 nu	1	<i>GLYcosyltransferase family 43 protein (LOC_Os10g13810); Zinc finger domain C3HC4 type, domain containing TF</i>	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR2871</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Baldrich và ctv., 2015; Li và ctv., 2019b).
55	<i>osa-miR2873</i>	21, 24 nu	3	<i>TKL_IRAK_CrRL KIL_1.4 (LOC_Os01g06280)</i>	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR2873</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Li và ctv., 2019b)
56	<i>osa-miR2878</i>	24 nu	2	<i>Plastocyanin-like domain containing protein (LOC_Os08g37670)</i>	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR2878</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Li và ctv., 2019b)
57	<i>osa-miR5150</i>	24 nu	2	<i>Receptor-like protein kinase 2 precursor (LOC_Os01g70260)</i>	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR5150</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Li và ctv., 2019b)

58	<i>osa-miR5153</i>	24 nu	1	<i>NHX1</i> ( <i>LOC_Os07g4710</i> 0);  <i>Chloroplast ribonuclease III domain protein</i> ( <i>LOC_Os01g5951</i> 0)	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR5153</i> có sự thay đổi khi lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Li và ctv., 2019b; Wang và ctv., 2018)
59	<i>osa-miR5794</i>	21 nu	1	<i>Rapid Alkalinization Factor14</i> ( <i>RALF14</i> ) ( <i>LOC_Os11g268</i> 80);  <i>RALF4</i> ( <i>LOC_Os12g3567</i> 0)	Mức độ biểu hiện của <i>osa-miR5794</i> giảm ở mẫu cỏ bông lúa nhiễm nấm <i>M. oryzae</i>	(Li và ctv., 2016b; Mahesh và ctv., 2021)
60	<i>osa-miR7695</i>	21,24 nu	5	<i>OsNramp6</i> ( <i>LOC_Os01g3187</i>	Biểu hiện của <i>osa-miR7695</i> tăng làm tăng khả năng kháng nấm <i>M.oryze</i> ở lúa thông qua sự ức chế gen <i>OsNramp6</i> .	(Campo và ctv., 2013; Quoc và ctv., 2019)

## **Phụ lục 2.** Quy trình ly trích DNA, RNA tổng số và PCR bằng primer Pot2

### 2.1. Quy trình ly trích DNA và định danh nấm bằng primer Pot2

DNA được chiết xuất và tinh sạch từ các mẫu nấm gây bệnh đạo ôn và nấm gây bệnh khác trên lúa dùng làm đối chứng. Cho khoảng 100 mg bột sợi nấm sau khi nghiền trong nitơ lỏng vào ống eppendorf 1,5 ml. Bổ sung 700 $\mu$ L dung dịch lysis buffer (50mM Tris HCl + 50mM EDTA +3% SDS+ 1%  $\beta$ -mercaptoethanol) vào ống, ủ qua đêm ở nhiệt độ 65<sup>0</sup>C. Ống đựng mẫu được ly tâm 13,000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Thu hồi phần dung dịch phía trên cho vào trong ống eppendorf 1,5 ml mới và loại bỏ phần cặn. Các tạp chất của mẫu chiết xuất được loại bỏ bằng cách thêm 700  $\mu$ l phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1 v/v/v), lắc đều ống và ly tâm với vận tốc 13,000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Phần dịch nổi thu được tiếp tục rửa bằng chloroform theo tỷ lệ thể tích (1:1 v/v) và ly tâm với cùng thông số như các bước trên. Lắng tủa DNA bằng phương pháp ethanol (cho tỷ lệ 1/10 thể tích mẫu DNA bằng dung dịch 3M sodium acetate, pH 5.2 và 3 lần thể tích mẫu DNA bằng dung dịch 100% ethanol, sau đó ủ mẫu ở -20<sup>0</sup>C trong 2 tiếng đồng hồ và ly tâm ở tốc độ 15,000 vòng/phút trong thời gian 20 phút). Loại bỏ dung dịch phía trên và rửa kết tủa bằng ethanol 70%, ly tâm mẫu ở tốc độ 15,000 vòng/phút trong thời gian 5 phút, loại bỏ dung dịch phía trên, làm khô cặn và hòa tan DNA bằng 100 $\mu$ l TE buffer. DNA của các mẫu nấm bệnh được chạy điện di kiểm tra trước khi thực hiện phản ứng PCR. DNA của mẫu lá, cỏ bông lúa nhiễm đạo ôn được ly trích bằng GeneJET Plant Genomic DNA purification kit (Cat#K0791, Thermo) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Trình tự đoạn primer trong nghiên cứu này (Pot2-F: 5' CGTCACACGTTCTTCAACC 3' và Pot2-R: 5' CGTTTCACGCTTCTCCG 3') được sử dụng để khuếch đại một vùng có chiều dài 687 bp của Pot2 transposon. Phản ứng PCR được thực hiện trong 50 $\mu$ l hỗn hợp phản ứng/mẫu với DNA Taq polymerase (Cat#200403, Qiagen) và genomic DNA từ các mẫu nấm và lá, cỏ bông nhiễm đạo ôn thông qua máy khuếch đại DNA (Model Nexus Cyclor, Eppendorf). Thành phần phản ứng PCR như sau (25  $\mu$ l Toptaq Master Mix; 0,2  $\mu$ M cho mỗi primer, < 1  $\mu$ g

mẫu DNA và điều chỉnh bằng nước cất đã khử trùng sạch RNase/DNase lên đến 50  $\mu$ l). Chu trình phản ứng PCR được thực hiện như sau:

Bước 1 khởi đầu: 94  $^{\circ}$ C trong 3 phút;

Bước 2 biến tính: 94  $^{\circ}$ C trong 30 giây;

Bước 3 gắn primer: 53  $^{\circ}$ C trong 30 giây;

Bước 4 kéo dài: 72  $^{\circ}$ C trong 1 phút trong 40 chu kì

Bước kéo dài cuối cùng: 72  $^{\circ}$ C trong 10 phút. Dừng phản ứng và giữ mẫu ở nhiệt độ là 4  $^{\circ}$ C. Sản phẩm PCR được nhuộm bằng thuốc nhuộm DNA (Cat# PCR-255-bl, Jena Bioscience) và được điện di trong 1% gel agarose. Các vạch DNA trên gel được quan sát dưới đèn UV bằng máy chụp ảnh gel chuyên dụng (UVP Biodoc-It Imaging system, Hoa Kỳ). Các vạch DNA của sản phẩm PCR mong đợi sẽ được tinh sạch bằng GeneJET Gel Extraction Kit (Cat#K0691, Thermo) và được gửi giải trình tự để xác định nấm gây bệnh đạo ôn và lá nhiễm bệnh bằng các công cụ tin sinh học như BLAST.

## 2.2. Quy trình ly trích RNA tổng số

1. Cắt nhỏ 1g mẫu lá cho vào Eppendorf 1.5 ml	
2. Thêm 1ml Trizol reagent và nghiền mẫu	Ủ đông 10 phút
3. Thêm 200 $\mu$ l chloroform ủ đông 10 phút, và ly tâm 10.000 vòng/ 10 phút	
4. Hút dịch nổi chuyển sang Eppendorf 1.5 ml mới. Thêm 600 $\mu$ l isopropanol và cho kết tủa ở -20 $^{\circ}$ C	Ủ qua đêm
5. Ly tâm 10.000 vòng/ 20 phút và lấy phần kết tủa	
6. Đổ bỏ dịch nổi, rửa bằng diethyl pyrocarbonate (DEPC) ethanol 2 lần (tổng khoảng 1000 $\mu$ l) và ly tâm 10.000 vòng/phút trong 20 phút.	Để khô 45 phút ở nhiệt độ phòng
7. Thêm 100 $\mu$ l nước không chứa nuclease và đo mức độ tinh khiết của RNA bằng máy NanoDrop™ 1000	Trữ đông

### 2.3. Kiểm tra chất lượng RNA tổng số

Sau khi ly trích, RNA được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch dựa trên tỷ lệ hấp thụ ở bước sóng 260nm và 280nm (A<sub>260/280</sub>) bằng máy NanoDrop™, nhằm đảm bảo chất lượng RNA và điều chỉnh cho phù hợp với từng phản ứng PCR. Thông thường tỷ lệ A(260/280) của RNA tinh khiết là ~ 2.0 (Thermo Scientific, USA)

Bảng 2.2 – Kết quả đo tỷ lệ A(260/280) của các giống lúa thí nghiệm

STT	Tên giống	A(260/280)
1	ST5	2.034
2	Caroline gold	2.041
3	RVT	1.999
4	OM8017	2.031
5	OM5451	2.095
6	IR50404	2.96
7	OM2517	1.989
8	OM6162	2.041
9	OM9582	2.087
10	OM9921	2.887
11	Nang Hoa 9	2.036
12	Jasmine85	1.996
13	OM4900	1.998
14	OM576	2.428
15	OM7347	2.194
16	BC15	1.989
17	OM344	2.322
18	OM4218	2.251
19	OM6976	2.385

#### 2.4. Xử lý RNA tổng số với DNase I để loại bỏ DNA dư thừa.

Sau khi ly trích thì trong mẫu vẫn còn một lượng nhỏ genomic DNA, gây ảnh hưởng đến kết quả phản ứng PCR, dẫn đến dương tính giả. Do vậy, mẫu RNA tổng số cần được xử lý với DNase I để loại bỏ các DNA thừa. Chúng tôi sử dụng bộ kit RTS DNase<sup>TM</sup> chứa enzyme DNase I có hoạt độ cao, bền ở nhiệt độ phòng. Sau đó DNase I còn sót lại sẽ được xử lý với (EDTA + nhiệt) để chuẩn bị mẫu RNA tinh sạch cho phản ứng RT-PCR và tổng hợp cDNA.

Các bước tiến hành như sau:

1. Cho một lượng dung dịch chứa tương đương 1µg RNA tổng vào trong dung dịch đệm phản ứng DNaseI 1X	Tổng thể tích đạt được: 50 µL
2. Thêm 2 đơn vị của DNase I (200 U/ml, gần bằng 1µl)	
3. Trộn hỗn hợp, ủ ở 37 °C trong 10 phút	
4. Thêm 1µl EDTA 0.5M để bất hoạt DNase I	
5. Bất hoạt DNase I ở 75 °C trong 10 phút	

Bảng 2.3 - Số liệu đo OD và xử lý DNase I của các giống lúa thí nghiệm

STT	Ký hiệu	Tên giống	Đo OD			Trung bình (µg/ml)	Xử lý DNase I		
			Lần 1	Lần 2	Lần 3		RNA (µl)	DNase I buffer(µl)	Nồng độ (µg/µl)
1	Rice 1	OM6976	475	478,3		476,7	2,6	47,4	0,025
2	Rice 2	OM2517	206,6	206,1		206,4	6,1	43,9	0,025
3	Rice 3	Carolina Gold	349,4	350,6		350	3,6	46,4	0,025
4	Rice 4	OM8017	186,8	163,2	172	173,9	7,2	42,8	0,025



5	Rice 5	OM7347	124,8	137,8		131,3	9,5	40,5	0,025
6	Rice 6	OM5451	273,7	265,8		269,8	4,6	45,4	0,025
7	Rice 7	OM344	131	129,9		130,5	9,6	40,4	0,025
8	Rice 8	OM9582	227,5	249,9	248	241,7	5,2	44,8	0,025
9	Rice 9	OM4218	348,1	342,6		345,4	3,6	46,4	0,025
10	Rice 10	Nàng Hoa 9	329,9	385,7		357,8	3,5	46,5	0,025
11	Rice 11	OM4900	237,4	228,1		232,8	5,4	44,6	0,025
12	Rice 12	OM9921	165,2	175		170,1	7,3	42,7	0,025
13	Rice 13	BC15	137,3	136,2		136,8	9,1	40,9	0,025
14	Rice 14	Jasmine 85	240,7	263,6		252,2	5	45	0,025
15	Rice 15	Tẻ tếp	401,5	398,3		399,9	3,1	46,9	0,025
16	Rice 16	ST5	249	245,1		247,3	5,1	44,9	0,025
17	Rice 17	OM6162	496	543,6		519,8	2,4	47,6	0,025
18	Rice 18	Kushikiara	65,5	67,44		66,5	18,8	31,2	0,025
19	Rice 19	Non- GMO	60,2	59,6		59,9	20,9	29,1	0,025
20	Rice 20	J-short	60,2	59,6		59,9	20,9	29,1	0,025

**Phụ lục 3.** Quy trình kiểm tra sự hiện diện của *osa-miR7695* ở các giống lúa thí nghiệm

3.1. Tổng hợp cDNA từ RNA tổng số bằng kỹ thuật RT- PCR sử dụng oligodT

Trước khi thực hiện phản ứng Nested RT-PCR để kiểm tra sự hiện diện của *osa-miR7695*, phân tử RNA cần được chuyển thành cDNA

Bảng 3.1.1 - Các thành phần hóa chất tổng hợp cDNA

Thành phần	Thể tích
5X Buffer	4 $\mu$ l
Enzyme Reverse transcriptase	1 $\mu$ l
RNA (1 $\mu$ g)	10 $\mu$ l
Water- DEPC treated	5 $\mu$ l
Tổng thể tích	20 $\mu$ l

Bảng 3.1.2 - Chu trình nhiệt tổng hợp cDNA (Bioline, UK)

	Nhiệt độ	Thời gian
Bắt cặp (Primer annealing)	25 °C	10 phút
Phiên mã ngược (Reverse transcription)	42 °C	15 phút
Bất hoạt phản ứng (Inactivation)	85 °C	5 phút

Sau khi tổng hợp cDNA hoàn tất, pha loãng với 10 mM Tris-HCl và 0.1 mM EDTA với tỷ lệ 1:1, để bảo quản mẫu.

3.2. Kiểm tra sự hiện diện của phân tử precursor *osa-miR7695* (487 bp) trên các giống lúa.

Sau khi đã đạt được quy trình tối ưu của phản ứng Nested RT-PCR, chúng tôi tiến hành thực hiện kiểm tra sự hiện diện của phân tử precursor *osa-miR7695* trên các giống lúa thí nghiệm.

Thành phần phản ứng Nested PCR gồm có: cDNA (đã tổng hợp); 02 cặp primer (P1, P2) và (P3, P4); dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); Enzyme DNA polymerase chịu nhiệt; MgCl<sub>2</sub>; Dung dịch đệm; Nước cất; Taq DNA polymerase.

Chu trình nhiệt phản ứng Nested PCR: gồm 3 bước chính và được lặp lại 35 chu kỳ

1. Biến tính (Denaturation): 92-96 °C
  2. Bắt cặp (Annealing): 45-55 °C
  3. Kéo dài (Extension): 72 °C
- } Lặp lại 35 chu kỳ.

Sau khi phản ứng PCR kết thúc, lấy sản phẩm Nested PCR điện di kiểm tra trên gel agarose 1,5%.

### 3.3. Điện di trên gel agarose

Sản phẩm sau khi chạy phản ứng Nested PCR được tiến hành điện di trên gel agarose nhằm phân tách các phân tử cDNA theo kích thước dưới tác dụng của điện trường, để từ đó có thể xác định được kích thước của sản phẩm precursor *osa-miR7695* có đúng với kết quả đã dự kiến (487 bp).

*Các bước thực hiện:*

#### Bước 1: Đổ gel

- Cân 1g agarose cho vào bình tam giác với 100ml dung dịch đệm TBE 0,5X, lắc nhẹ cho agarose hòa lẫn dung dịch đệm.

- Đặt bình tam giác vào lò vi sóng đun khoảng 1-2 phút. Dung dịch trong sôi lên và thành màu trắng trong.

- Lấy bình tam giác ra, đợi 15 phút, sờ thấy vừa nóng (60 °C) thì đổ dung dịch vào khuôn điện di. Khoảng 45 phút thì agarose đặc lại, có màu trắng đục.

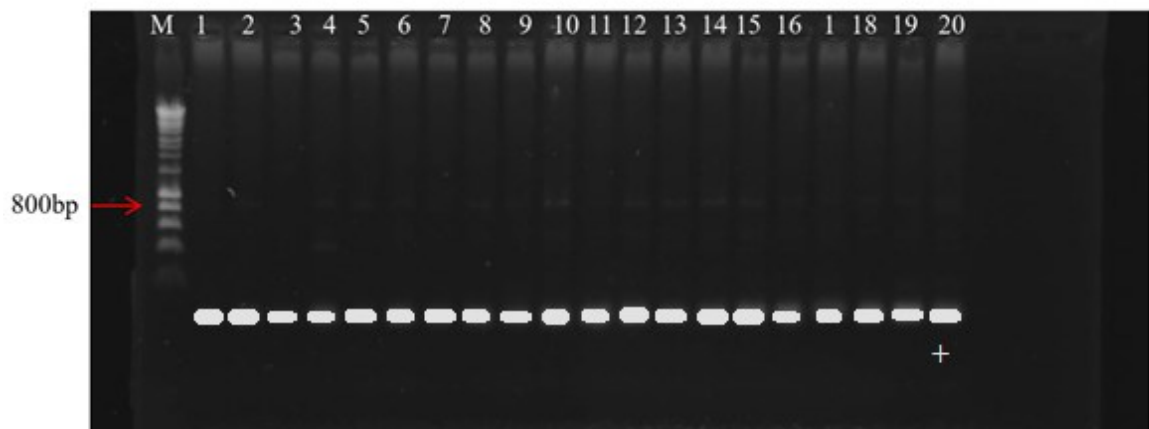
## Bước 2. Chạy gel

- Lấy lược ra, đặt khuôn vào bể điện di, hạn chế tác động đến gel.
- Thêm dung dịch đệm điện di phủ mặt gel khoảng 3-5 mm.
- Trước khi bơm mẫu vào giếng gel điện di cần trộn đều mẫu với dung dịch nhuộm mẫu theo tỉ lệ 1 : 5 (1 phần dung dịch tải, 5 phần mẫu) sau đó dùng micropipette hút khoảng 10 – 20  $\mu$ l dung dịch mẫu vào giếng. Giếng đầu tiên bơm thang đo (ladder) 1kb.
- Khởi động nguồn điện, chỉnh đến 50 Volt, và nhấn nút Run.
- Mẫu được chạy khoảng 25 - 30 phút khi nhìn thấy vạch dung dịch tải mẫu chạy đến gần cuối bản gel thì dừng lại, lấy khuôn điện di ra.

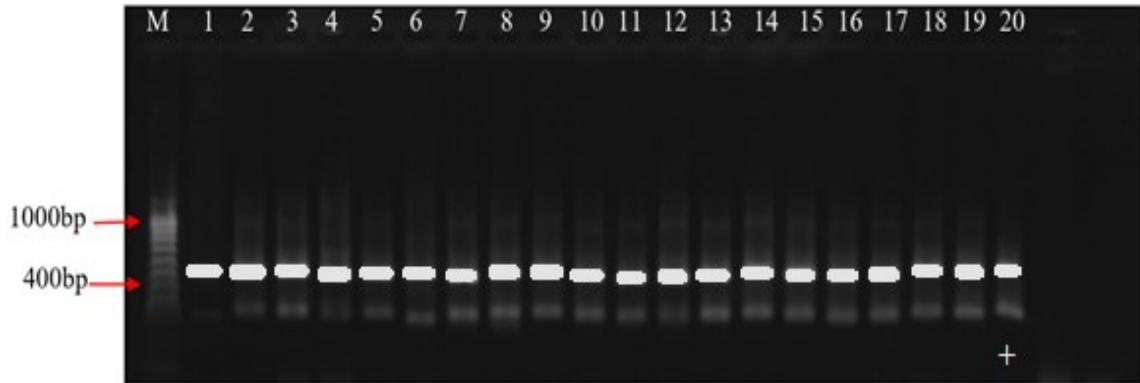
## Bước 3. Xem gel dưới đèn UV.

Bước 4. Đọc kết quả dựa trên thang đo (ladder 1kb) để xác định kích thước của sản phẩm Nested PCR.

Kết quả cho thấy có sự hiện diện của phân tử precursor *osa-miR7695* trên tất cả các giống lúa thí nghiệm



Hình 3.3.1 - Kết quả điện di PCR1 sử dụng cặp đoạn primer (P1,P2)  
 (1): ST5; (2): Carolina Gold; (3): RVT; (4): OM8017; (5): OM5451; (6): IR50404;  
 (7): OM2517; (8): OM6162; (9): OM9528; (10): OM9921; (11): Nang Hoa 9; (12):  
 Jasmine85; (13): OM4900; (14): OM576; (15): OM7347; (16): BC15; (17):  
 OM344; (18): OM4218; (19): OM6976; (20): J-short

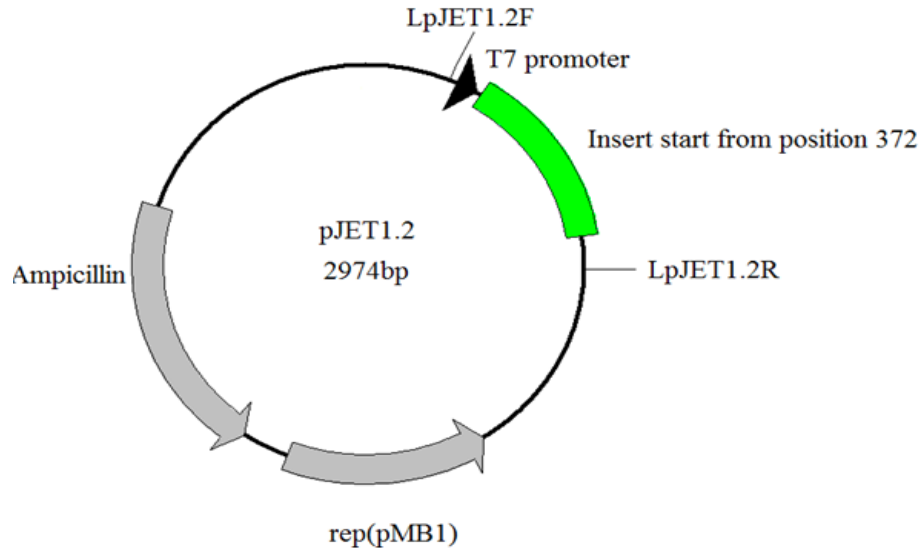


Hình 3.3.2 - Kết quả điện di PCR2 sử dụng cặp primer (P3,P4)  
 (1): ST5; (2): Carolina Gold; (3): RVT; (4): OM8017; (5): OM5451; (6): IR50404;  
 (7): OM2517; (8): OM6162; (9): OM9528; (10): OM9921; (11): Nang Hoa 9; (12):  
 Jasmine85; (13): OM4900; (14): OM576; (15): OM7347; (16): BC15; (17):  
 OM344; (18): OM4218; (19): OM6976; (20): J-short, đối chứng

#### 3.4. Giải trình tự của sản phẩm Nested RT-PCR

Để kiểm tra trình tự của sản phẩm nested RT-PCR có đúng với trình tự của precursor *osa-miR7695* đã được công bố trên miRBase. Chúng tôi tiến hành nhân dòng sản phẩm của nested RT-PCR vào tế bào *E.coli DH5α* và giải trình tự. Sau đó chúng tôi dùng công cụ BLAST để kiểm tra trình tự. Các bước được tiến hành như sau: RNA tổng (Total RNA) được phiên mã ngược thành cDNA bằng kit SensiFAST cDNA Synthesis (Bioline, UK) (Quoc và ctv., 2019). Sản phẩm sau khi chạy Nested RT-PCR của phân tử precursor *osa-miR7695* được nhân dòng (clone) vào trong vector *pJET1.2* và chuyển vào tế bào *E.coli DH5α* bằng phương pháp sốc nhiệt (Thermo Fisher Scientific, USA). Những dòng dương tính (positive clones) được chọn lựa và kiểm tra bằng phương pháp PCR với đoạn primer *LpJET1.2F* (5'CTGCTTTAACACTTGTGCCTGA 3') và *LpJET1.2R* (5'TTCCTGATGAGGTGGTTAGCAT 3'). Các đoạn chèn được giải trình tự tại công ty First Base, Malaysia. So sánh trình tự của các đoạn chèn bằng công cụ BLAST với cơ sở dữ liệu miRBase. Kết quả cho thấy trình tự sản phẩm nested RT-PCR khớp với trình tự precursor *osa-miR7695* đã được công bố. Chứng tỏ, phân tử precursor *osa-*

*miR7695* hiện diện trên tất cả các giống lúa thí nghiệm (hầu hết đều là giống lúa *indica*)



Hình 3.4.1 - Vector *pJET1.2* chứa đoạn gen chèn

**Phụ lục 4.** Quy trình phân tích mức độ biểu hiện của *osa-miR7695*, *OsNramp6.8* bằng kỹ thuật qPCR

#### 4.1. Thiết kế các cặp primer

Tên đoạn mồi (Primer)	Trình tự	Tài liệu tham khảo
qPCR- <i>OsUbi1</i> -F	5' CACCTTGGCTGACTACAACATCCA 3'	Campo và ctv., 2013
qPCR- <i>OsUbi1</i> -R	5' TGCTTACCAGCAAAGATCAGACGC 3'	
<i>Osa-miR7695</i> -F	5' CGCGGATCCCACCGCCTGTAAAGAG GAGATGT 3'	
<i>Osa-miR7695</i> -R	5' CGCCCCGGGCGTTTTTGGGGTCACTACT GGA 3'	
<i>OsNramp6.8</i> -F	5' GCTACTCCACATCCCTTTCTG 3'	

<i>OsNramp6.8-R</i>	5' GCAGAGAAAAATTCTTACCCCATATA 3'	
---------------------	----------------------------------	--

Theo nghiên cứu trước của Campo và ctv. (2013) phân tử *osa-miR7695* có gen đích là *OsNramp6*, cụ thể là biến thể phiên mã *OsNramp6.8* (*s-Nramp6*). Do vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định mức độ biểu hiện của *osa-miR7695* và gen *OsNramp6* trên các giống lúa thí nghiệm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp định lượng tương đối (Schmittgen và ctv., 2008) sử dụng gen đối chứng nội *OsUbi1*. Kết quả nghiên cứu sẽ góp phần tạo dựng hồ sơ biểu hiện của *osa-miR7695* trên các giống lúa trồng tại Việt Nam, từ đó có thể ứng dụng cho công tác lai tạo giống lúa chống chịu lại nấm gây bệnh đạo ôn *M. oryzae* trên các giống lúa trồng tại Việt Nam.

#### 4.2. Thực hiện phản ứng qPCR

Quy trình Real-time PCR được thực hiện theo kit SensiFAST SYBR No-ROX của hãng Bioline.

Bảng 4.2.1 - Thành phần phản ứng Real-time PCR

Hóa chất	Thể tích
2x SensiFAST SYBR No-ROX mix	10 µl
Primer xuôi (10 µM)	1 µl
Primer ngược (10 µM)	1 µl
cDNA (pha loãng 10 lần với Tris-HCL:EDTA=1:1)	2 µl
Nước	2 µl

Bảng 4.2.2 - Chu trình nhiệt cho phản ứng qPCR, xác định mức độ biểu hiện của *osa-miR7695* và *OsNramp6*

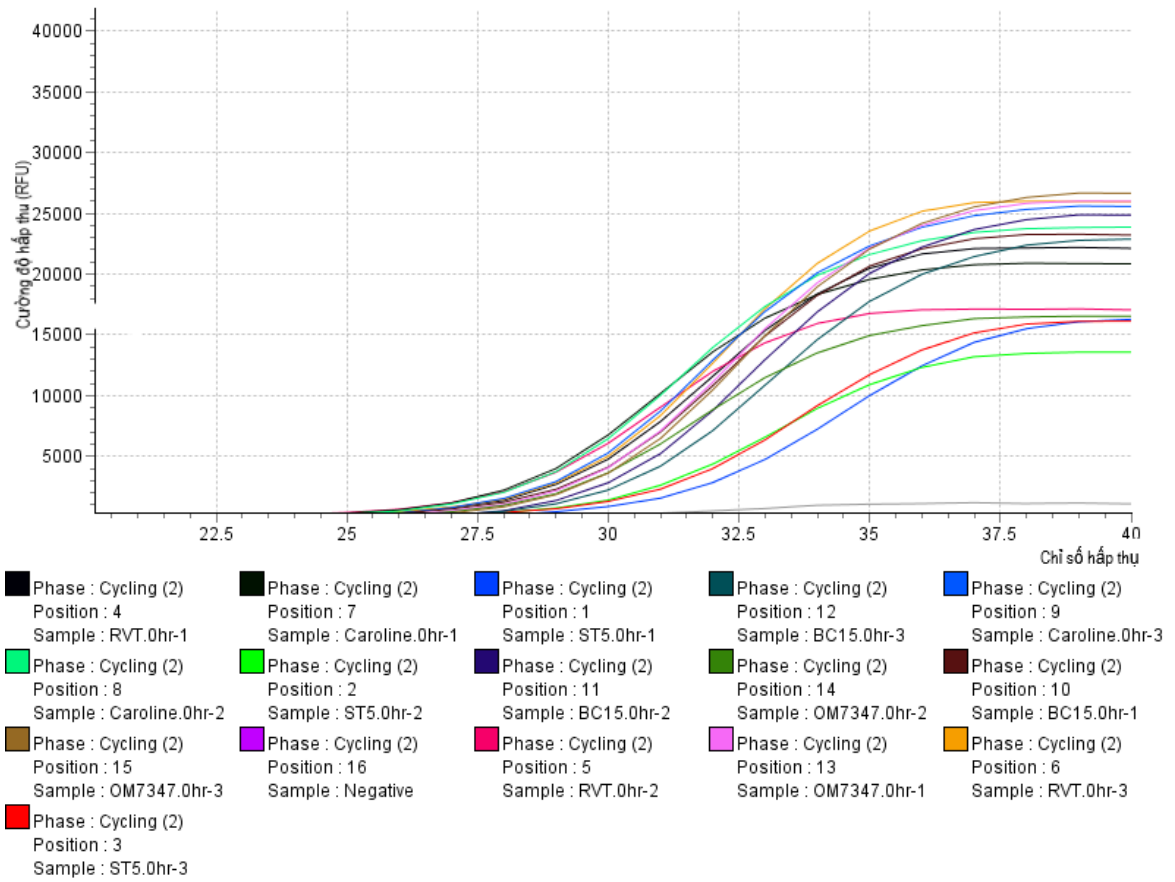
Giai đoạn	Nhiệt độ	Thời gian	Chu kỳ
Tiền biến tính	95 °C	2 phút	1
Biến tính	95 °C	5 giây	40
Bắt cặp	60-65 °C	10 giây	40
Kéo dài	72 °C	5-20 giây	40

4.3. Kết quả qPCR đối với mức độ biểu hiện của *osa-miR7695*, *OsNramp6*, *OsUbi1* trên các giống lúa thí nghiệm.

Pos.	Note	Sample	SYBR Green I	Type	Cq	+
1		 actin cory-12	 Target 1		30.96	✓
2		 actin cory-19	 Target 2		30.78	✓
3		 osbill-rice 34	 Target 3		45	✓
4		 osbill-rice 35	 Target 4		35.1	✓
5		 miR7695-rice 34	 Target 5		34.59	✓
6		 miR7695-rice 35	 Target 6		33.35	✓
7		 6.04-rice 34	 Target 7		34.01	✓
8		 6.04-rice 35	 Target 8		32.45	✓
9		 6.08-rice 34	 Target 9		35.41	✓
10		 6.08-rice 35	 Target 10		33.54	✓

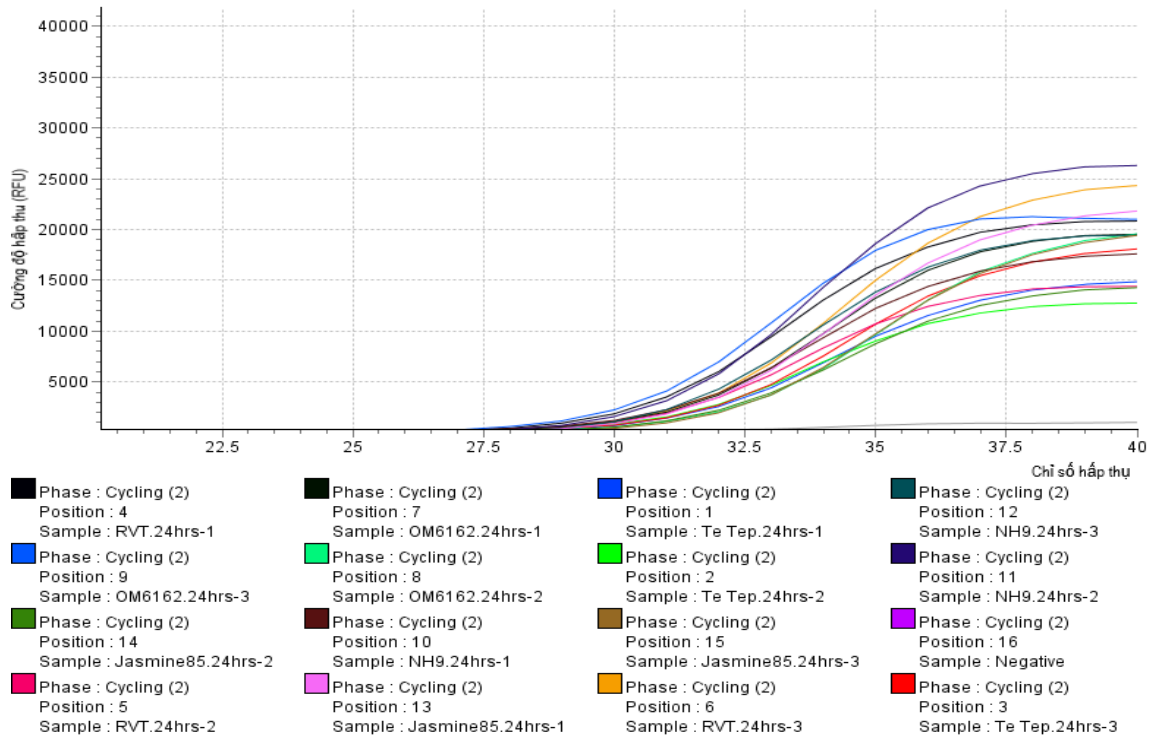
Hình 4.3.1 – Mức độ biểu hiện của *osa-miR7695* và *OsNramp6*



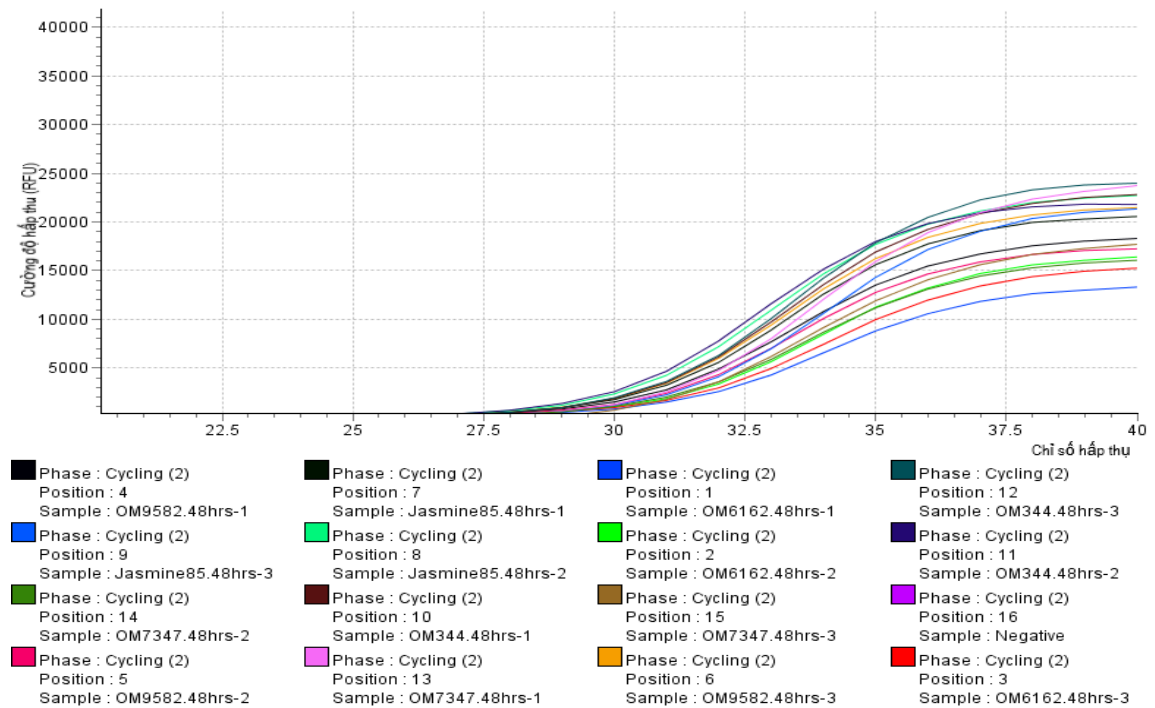


Hình 4.3.2 – Mức độ biểu hiện của *osa-miR7695* trên các giống lúa ở thời điểm

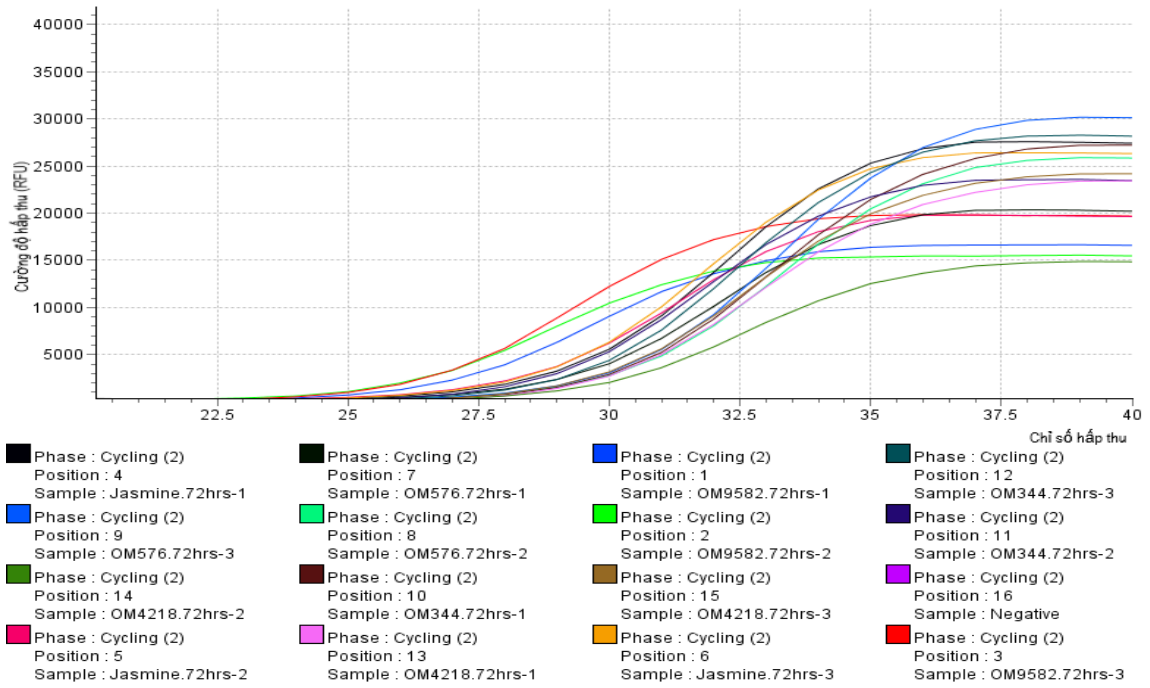
Ohpi



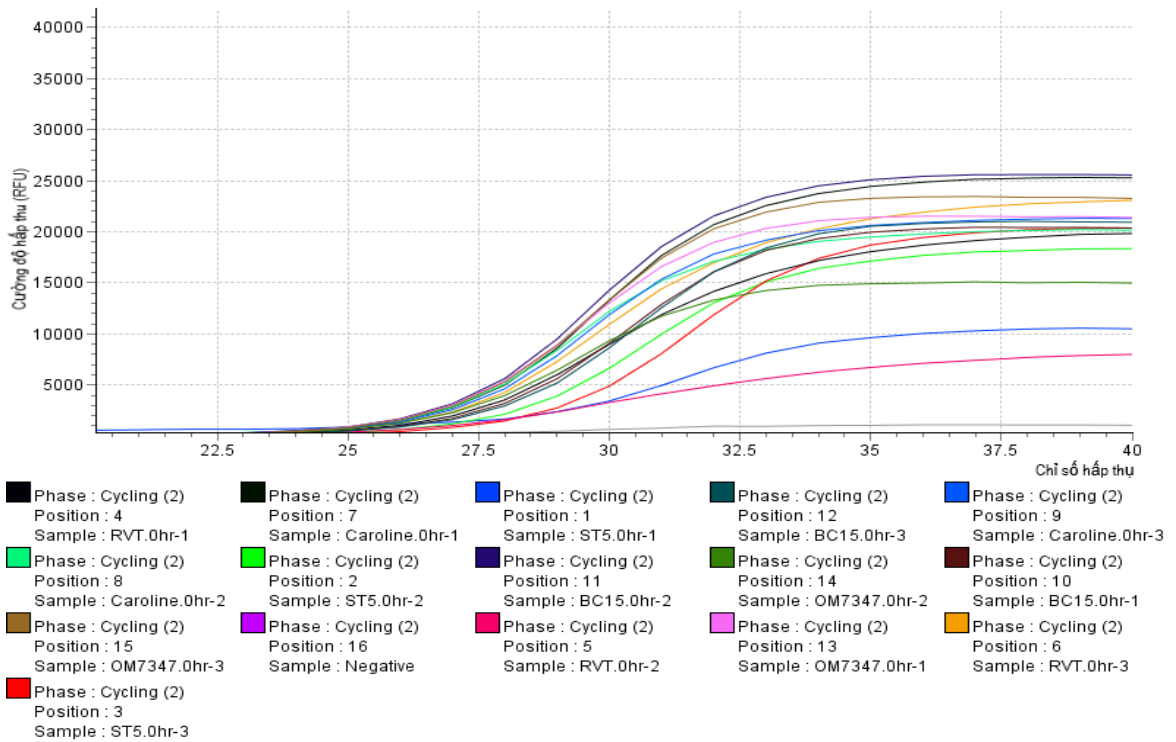
Hình 4.3.3 – Mức độ biểu hiện của *osa-miR7695* trên các giống lúa thí nghiệm ở thời điểm 24 hpi.



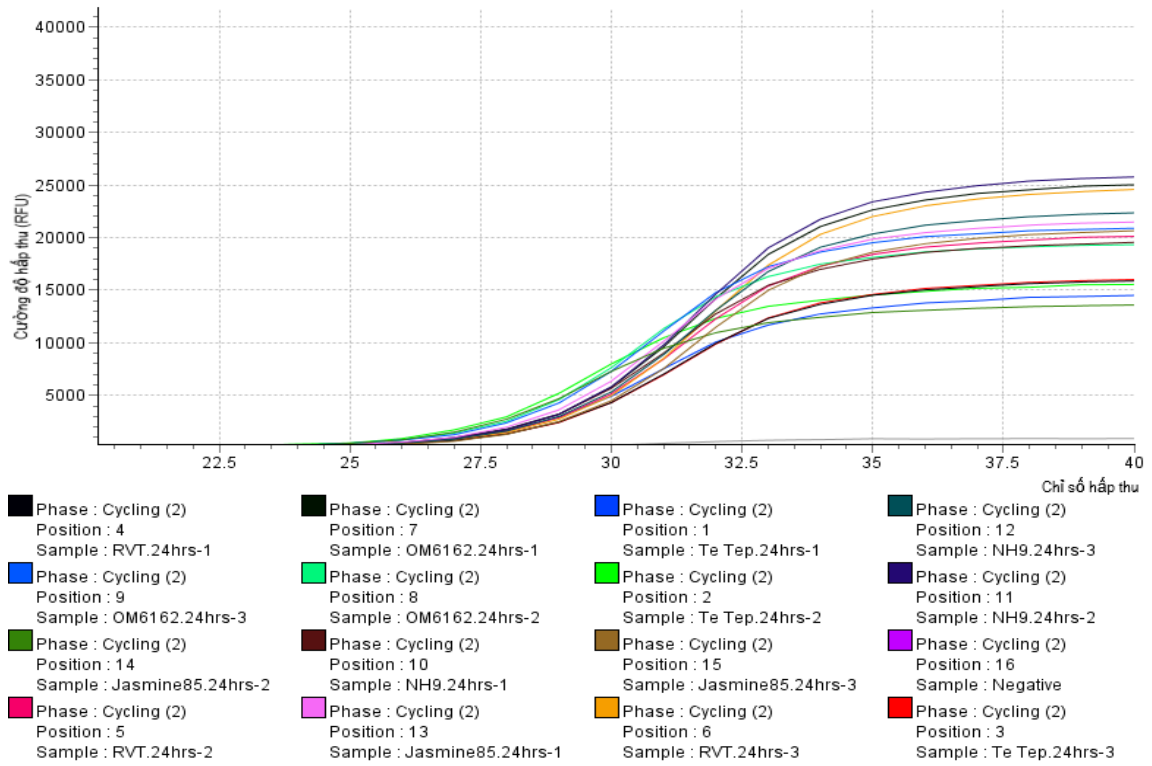
Hình 4.3.4 – Mức độ biểu hiện của *osa-miR7695* trên các giống lúa thí nghiệm ở thời điểm 48 hpi.



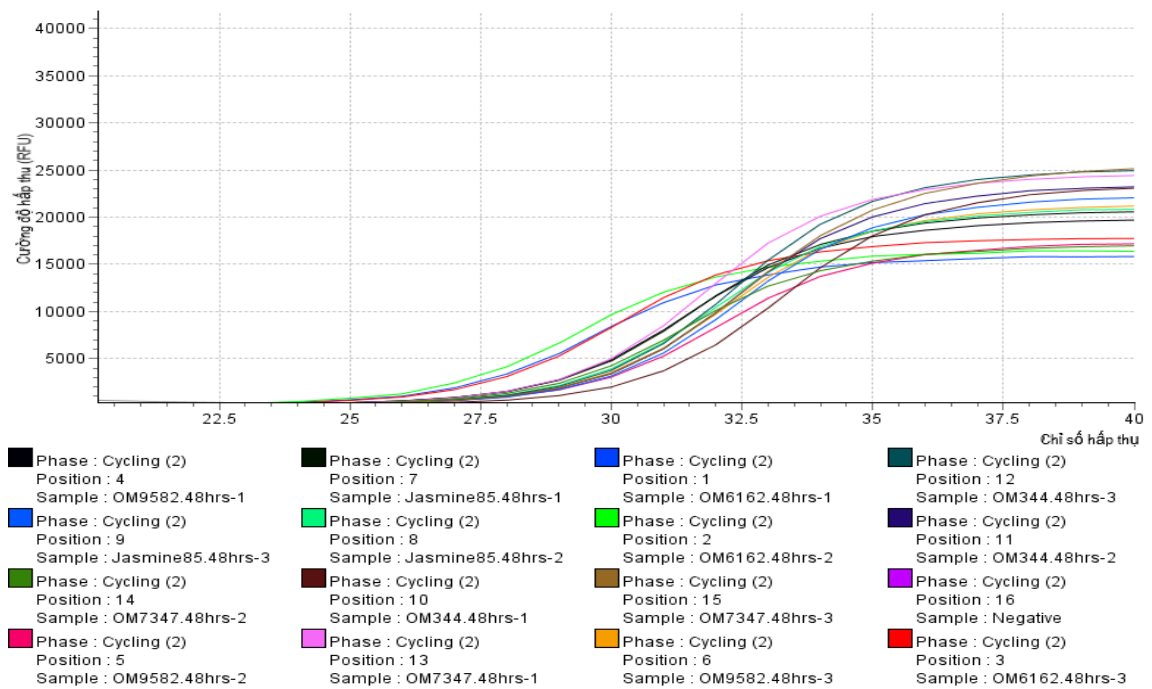
Hình 4.3.5 – Mức độ biểu hiện của *osa-miR7695* trên các giống lúa thí nghiệm ở thời điểm 72 hpi.



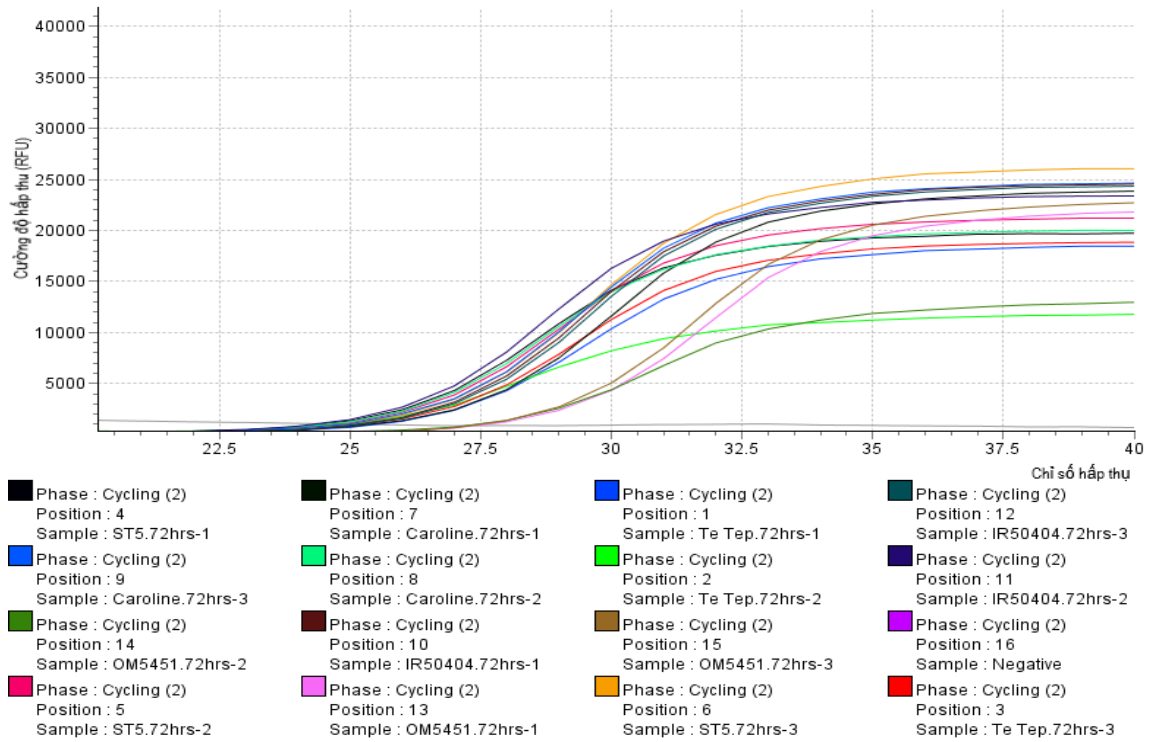
Hình 4.3.6 – Mức độ biểu hiện của *OsNramp6* trên các giống lúa thí nghiệm ở thời điểm 0hpi.



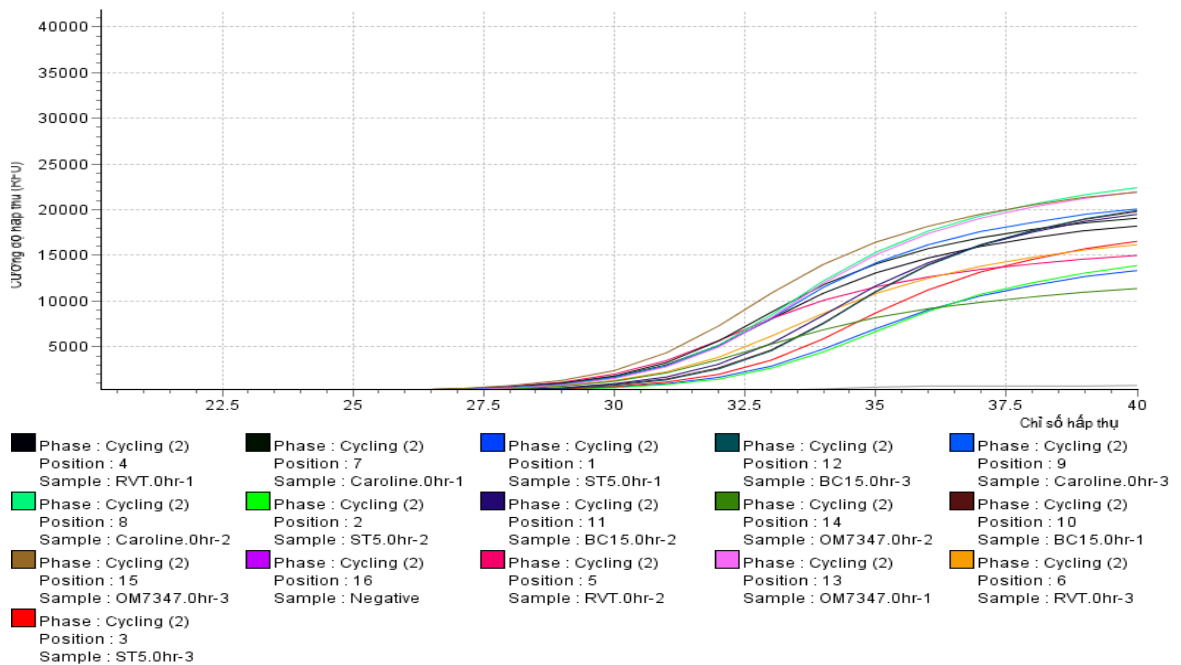
Hình 4.3.7 – Mức độ biểu hiện của *OsNramp6* trên các giống lúa thí nghiệm ở thời điểm 24 hpi.



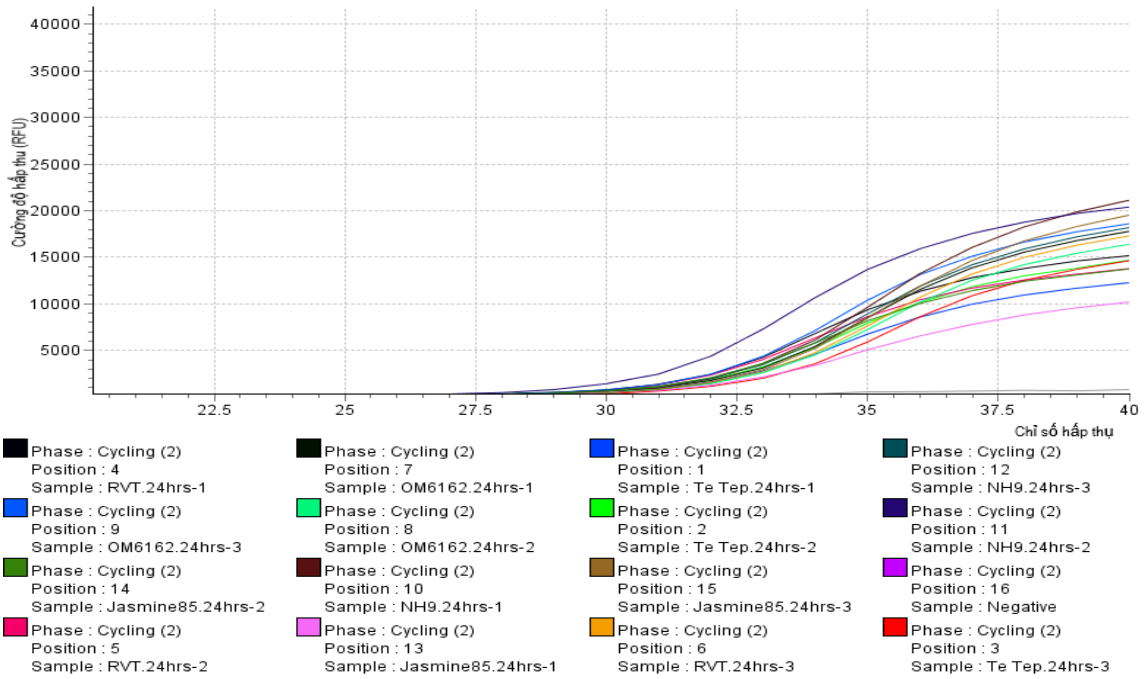
Hình 4.3.8 Mức độ biểu hiện của *OsNramp6* trên các giống lúa thí nghiệm ở thời điểm 48 hpi.



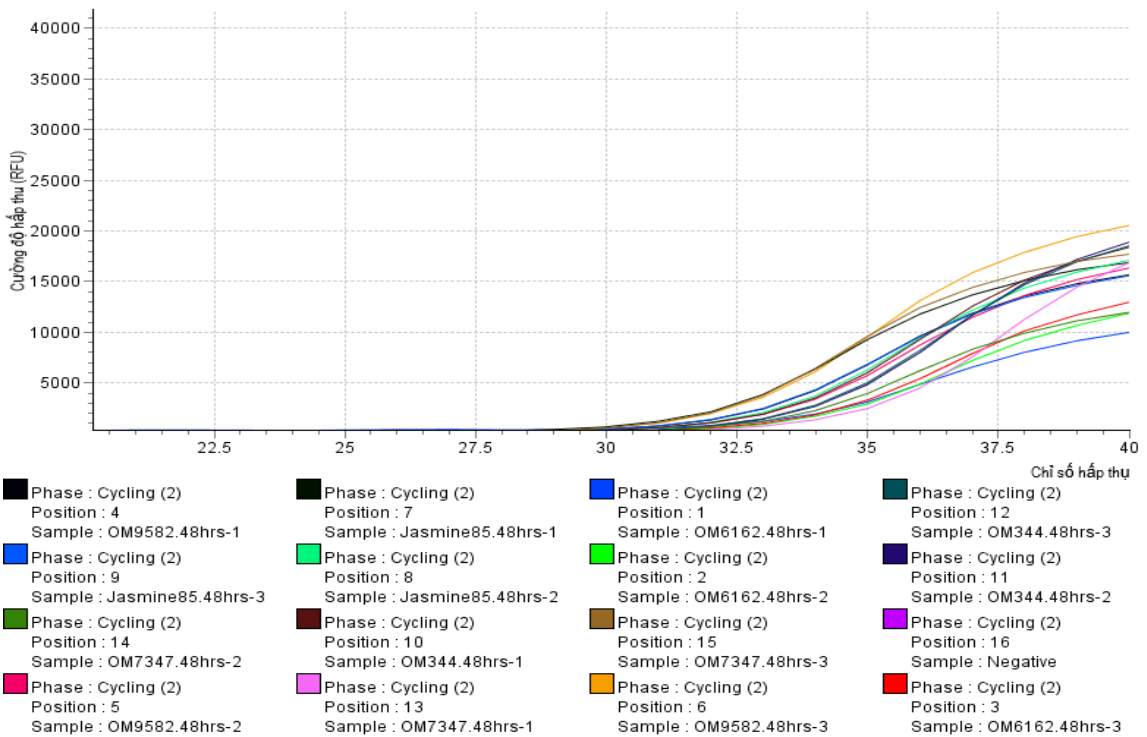
Hình 4.3.9 – Mức độ biểu hiện của *OsNramp6* trên các giống lúa thí nghiệm ở thời điểm 72 hpi.



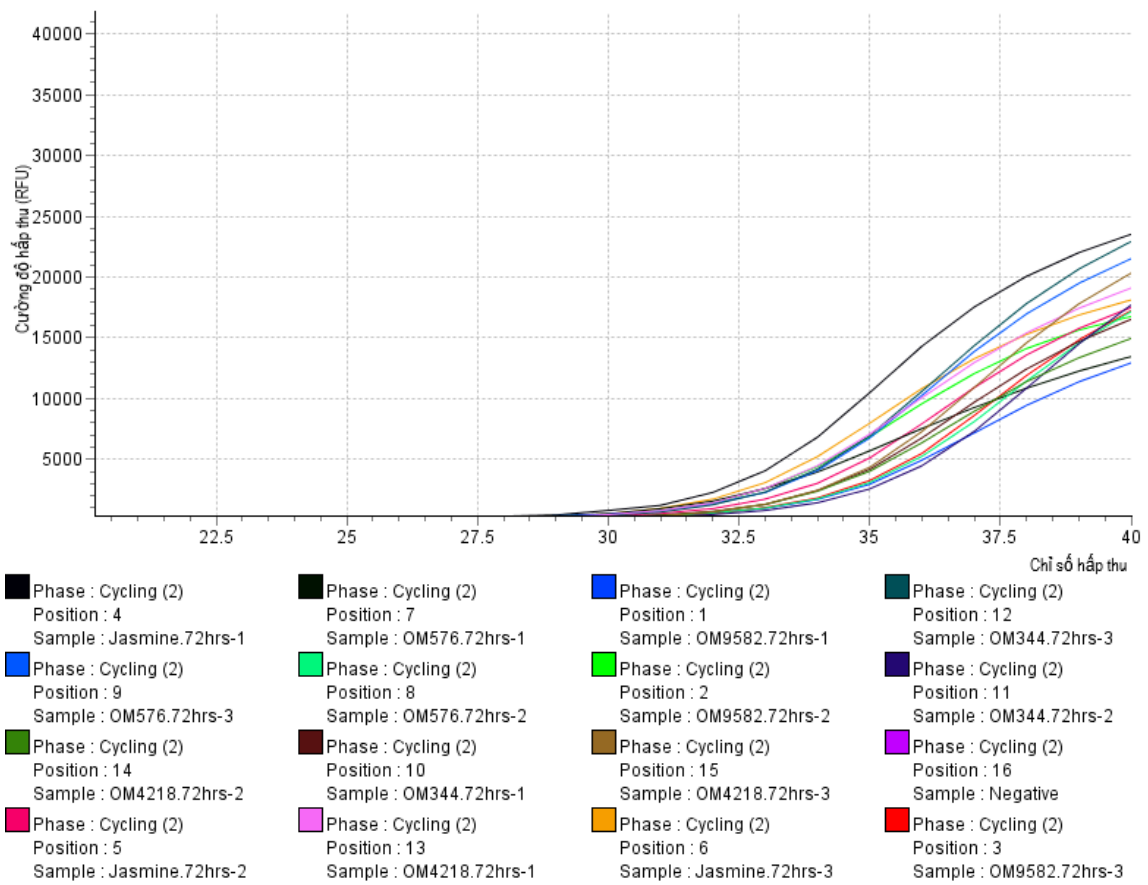
Hình 4.3.10 – Mức độ biểu hiện của *OsUbi1* trên các giống lúa thí nghiệm ở thời điểm 0hpi.



Hình 4.3.11 – Mức độ biểu hiện của *OsUbi1* trên các giống lúa thí nghiệm ở thời điểm 24 hpi.

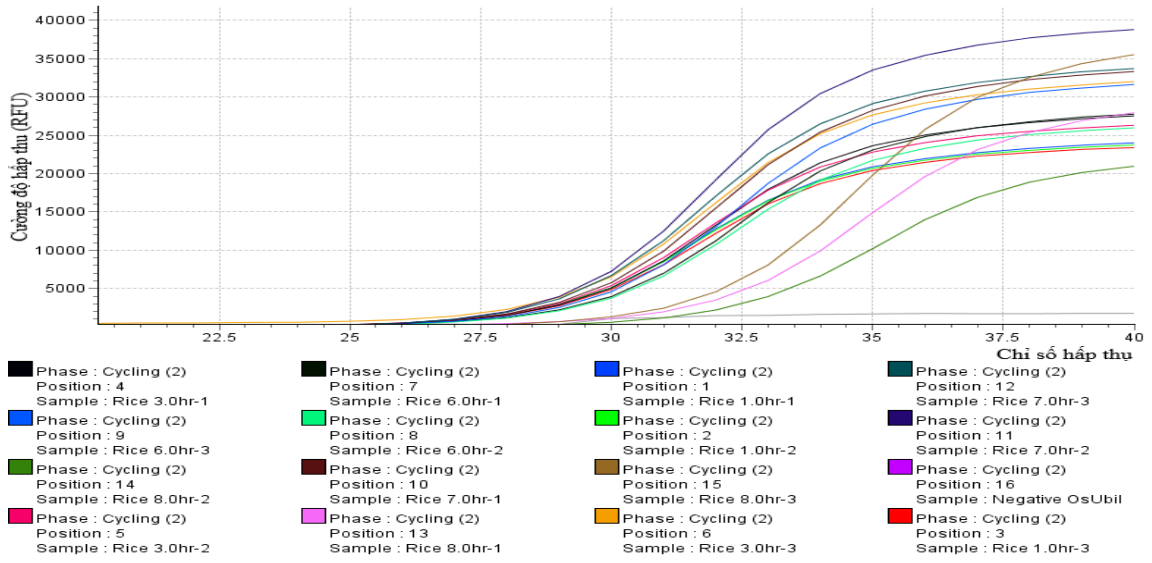


Hình 4.3.12 – Mức độ biểu hiện của *OsUbi1* trên các giống lúa thí nghiệm ở thời điểm 48 hpi.

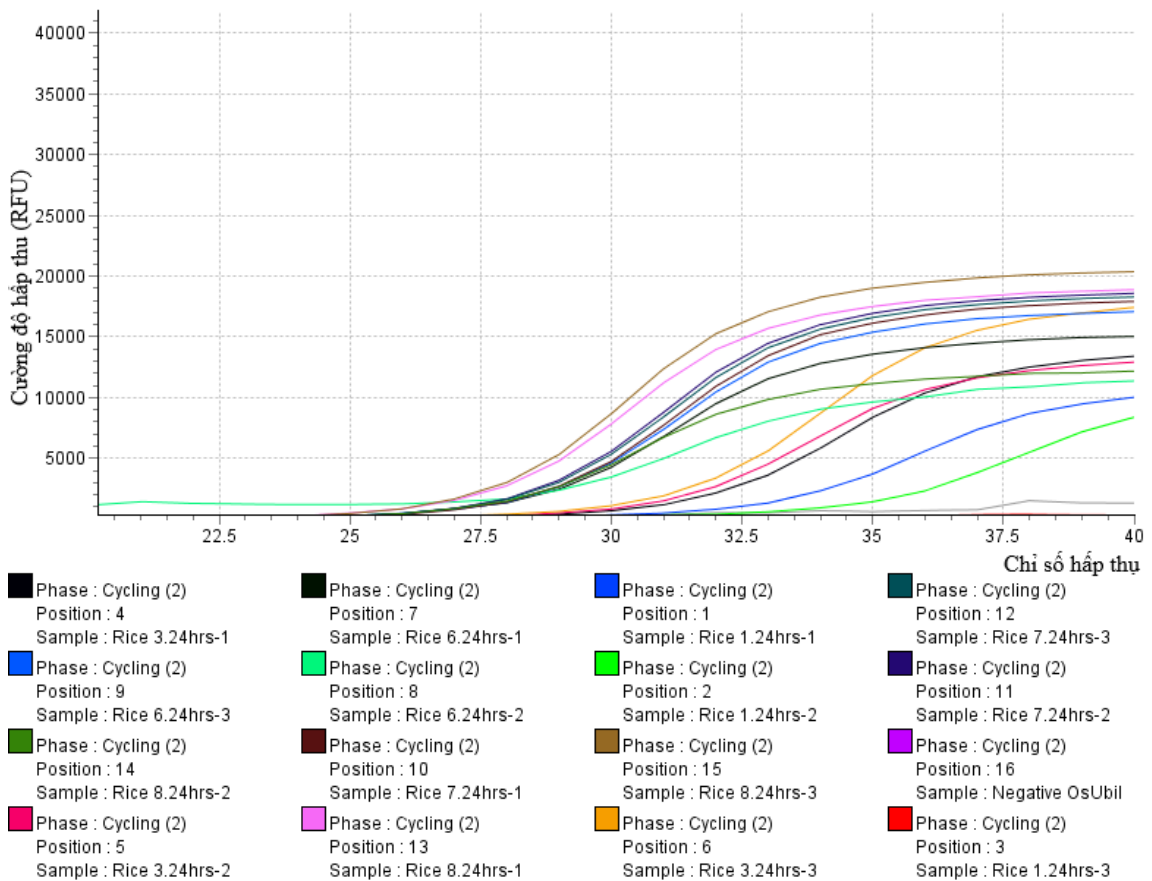


Hình 4.3.13– Mức độ biểu hiện của *OsUbi1* trên các giống lúa thí nghiệm ở thời điểm 72 hpi.

4.4. Kết quả qPCR đối với mức độ biểu hiện của *osa-miR169a* trên các giống lúa thí nghiệm.

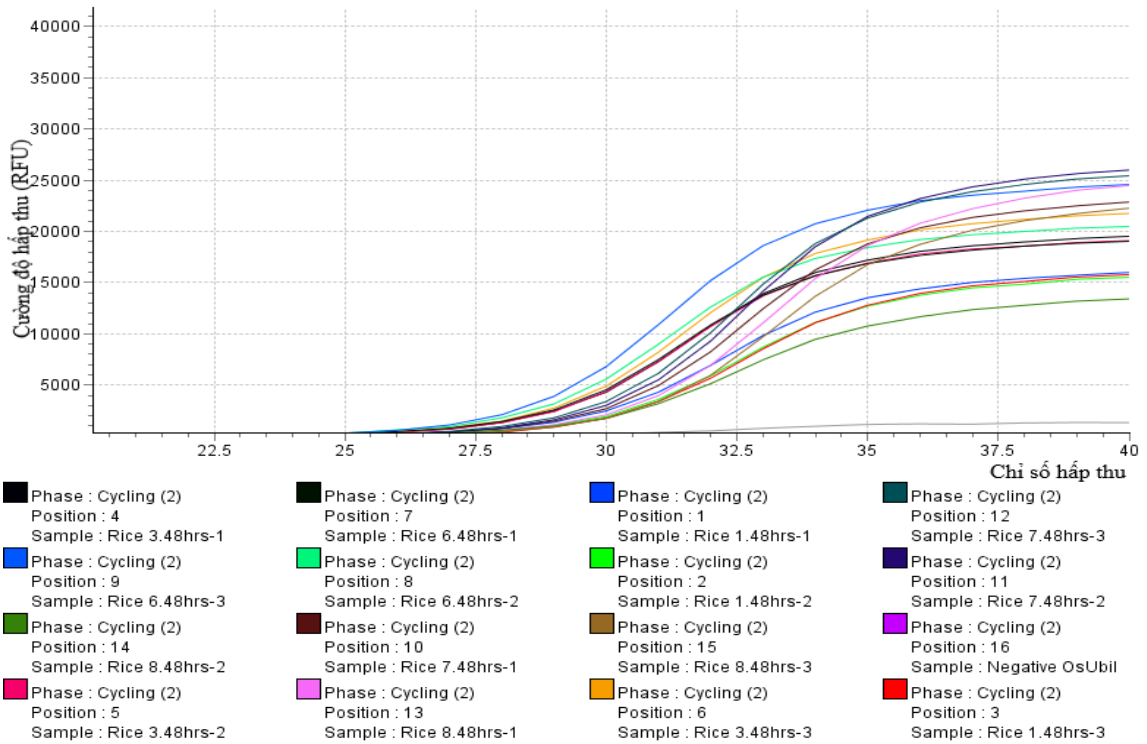


Hình 4.4.1– Mức độ biểu hiện của *osa-miR169a* trên các giống lúa thí nghiệm ở thời điểm 0hpi.

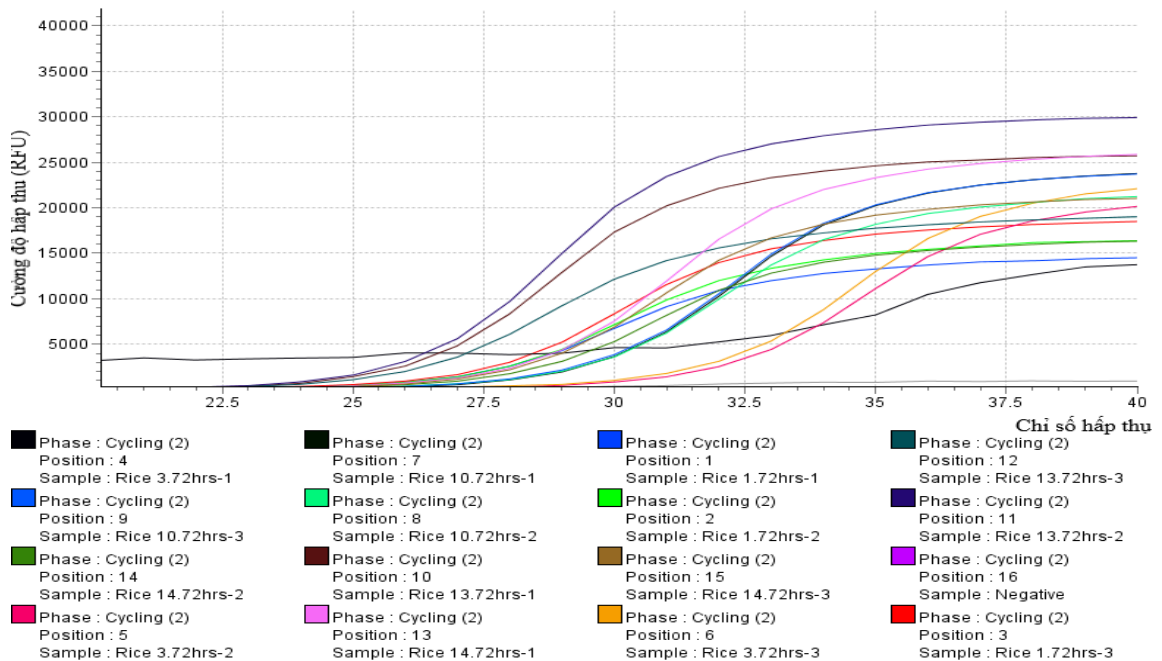


Hình 4.4.2– Mức độ biểu hiện của *osa-miR169a* trên các giống lúa thí nghiệm ở thời điểm 24hpi.





Hình 4.4.3– Mức độ biểu hiện của *osa-miR169a* trên các giống lúa thí nghiệm ở thời điểm 48 hpi.



Hình 4.4.4– Mức độ biểu hiện của *osa-miR169a* trên các giống lúa thí nghiệm ở thời điểm 72 hpi.

**Phụ lục 5.** Quy trình định lượng mức độ biểu hiện của các biến thể phiên mã *OsNramp6*.

Gen *OsNramp6* bao gồm 08 biến thể phiên mã (*OsNramp6.1* đến *OsNramp6.8*) trong đó *OsNramp6.1* có trình tự dài nhất, chứa đầy đủ trình tự phiên mã từ gen *OsNramp6*. Các biến thể tiếp theo có trình tự ngắn hơn và biến thể *OsNramp6.8* có trình tự ngắn nhất. Các nghiên cứu trước đây cho thấy *osa-miR7695* tác động đến sự biểu hiện của biến thể phiên mã *OsNramp6.8* (*s-Nramp6*) (Campo và ctv., 2013). Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu trước đây chỉ tiến hành so sánh trên 01 giống lúa chống chịu và 01 giống lúa mẫn cảm với nấm *M. oryzae*, mà chưa triển khai trên nhiều giống lúa cũng như các giống lúa trồng tại Việt Nam. Do vậy, nghiên cứu của chúng tôi tiến hành đánh giá mức độ biểu hiện của các biến thể phiên mã *OsNramp6* để tìm hiểu và xây dựng hồ sơ về mức độ biểu hiện của các biến thể phiên mã trên 08 giống lúa trồng tại Việt Nam.

Các bước ly trích RNA tổng số, tổng hợp cDNA, thực hiện phản ứng qPCR tương tự như các bước đã tiến hành với *osa-miR7695* phía trên. Một số bước khác biệt, chúng tôi xin được trình bày bên dưới.

**5.1. Thiết kế các cặp primer**

Tên đoạn mồi (Primer)	Trình tự	Tài liệu tham khảo
qPCR- <i>OsUbi1</i> -F	5' CACCTTGGCTGACTACAACATCCA 3'	(Campo và ctv., 2013)
qPCR- <i>OsUbi1</i> -R	5' TGCTTACCAGCAAAGATCAGACGC 3'	
<i>OsNramp6.1</i> - F	5' GCAGCCTATATTGCTGCTCTG 3'	Trong nghiên cứu của chúng tôi.
<i>OsNramp6.1</i> - R	5' AATCTCACCAGAACTGAATTGG 3'	
<i>OsNramp6.23</i> - F	5' CCATCGCATACTTGATCCT 3'	
<i>OsNramp6.23</i> - R	5' CCCAAATAGGAGTACCCATAGC 3'	

<i>OsNramp6.04</i> - F	5' TCTCCGGAATGAGAAAGTGC 3'
<i>OsNramp6.04</i> - R	5' AAGTACCACCAATGCTGCAA 3'
<i>OsNramp6.567</i> - F	5' AACTGTGTATGGTGTGGCCTTA 3'
<i>OsNramp6.567</i> - R	5' AAATGTACCTGCATGATGTATTGG 3'
<i>OsNramp6.8</i> - F	5' GCTACTCCACATCCCTTTCTG 3'
<i>OsNramp6.8</i> - R	5' GCAGAGAAAATTCTTACCCATA 3'

## 5.2. Kết quả mức độ biểu hiện của các biến thể phiên mã *OsNramp6*

Bảng 5.2.1 – Mức độ biểu hiện của các biến thể phiên mã ở các thời điểm 0h, 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi

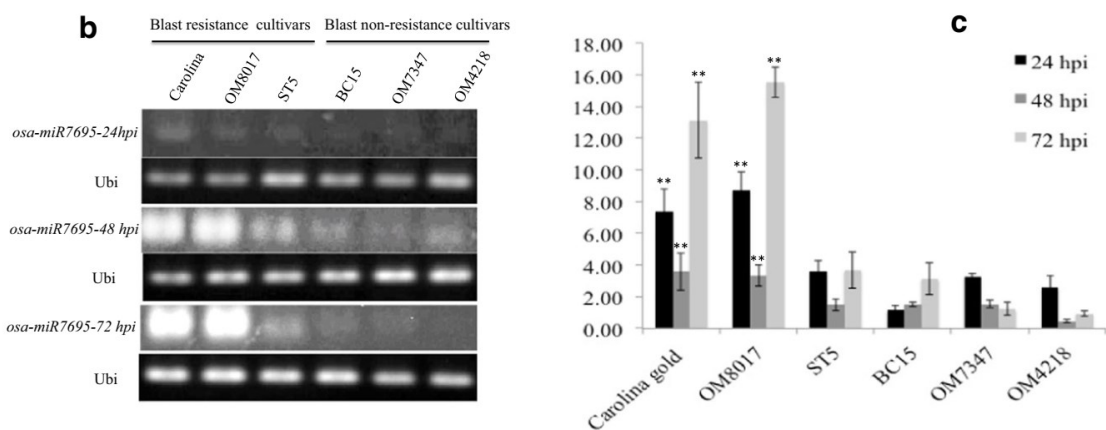
Thời gian	Biến thể	Nhóm kháng					Nhóm miễn cảm					
0 hpi	<i>OsNramp6.23</i>	-3,07	-5,96	-4,11	-3,31	-3,46	-3,37	-3,73	-1,13	-5,59	-5,64	-4,09
	<i>OsNramp6.1</i>	-5,13	-8,05	-6,83	-5,94	-6,13	-6,46	-6,31	-4,90	-7,88	-8,41	-6,77
	<i>OsNramp6.4</i>	-5,44	-8,95	-7,52	-6,23	-6,78	-6,58	-6,70	-3,74	-8,93	-9,40	-8,18
	<i>OsNramp6.567</i>	-3,56	-7,29	-4,75	-3,97	-3,54	-4,76	-4,24	-1,87	-7,23	-7,52	-4,70
	<i>OsNramp6.8</i>	4,58	2,89	4,57	3,46	4,57	1,55	3,59	2,71	5,28	2,54	3,88
24 hpi	<i>OsNramp6.23</i>	2,13	0,24	-2,63	-0,27	-1,62	-3,63	-3,28	-1,42	-0,46	-1,39	-3,60
	<i>OsNramp6.1</i>	-0,39	-1,24	-3,58	-2,00	-4,34	-5,15	-4,29	-4,36	-3,98	-4,35	-5,63
	<i>OsNramp6.4</i>	-0,41	-1,92	-3,58	-4,41	-4,34	-6,12	-5,41	-4,88	-3,98	-4,86	-5,63
	<i>OsNramp6.567</i>	1,58	0,10	-3,29	-3,81	-3,47	-4,40	-4,01	-3,83	-2,64	-3,51	-4,80
	<i>OsNramp6.8</i>	5,93	5,51	-0,54	6,15	6,53	1,12	3,01	5,00	6,17	1,94	4,52
48 hpi	<i>OsNramp6.23</i>	-2,21	2,02	-1,99	-2,81	-0,31	-2,96	0,25	-2,91	-0,89	1,39	-0,42
	<i>OsNramp6.1</i>	-4,09	-3,34	-3,22	-4,54	-2,80	-5,50	-2,03	-4,79	-3,71	-4,08	-3,10
	<i>OsNramp6.4</i>	-4,83	-3,24	-4,30	-5,37	-3,18	-5,78	-2,63	-5,51	-4,48	-4,39	-4,38
	<i>OsNramp6.567</i>	-3,36	-1,18	-2,90	-4,26	-1,53	-4,50	-1,39	-4,10	-2,69	-2,68	-2,77
	<i>OsNramp6.8</i>	5,55	5,97	-0,50	6,18	6,56	1,16	3,04	5,03	6,21	1,98	4,56

72 hpi	<i>OsNramp6.23</i>	-4,24	0,69	-4,55	-6,50	-4,50	-4,80	-2,87	-0,49	-4,02	-0,59	-4,74
	<i>OsNramp6.1</i>	-6,31	-3,88	-7,12	-7,47	-6,78	-7,07	-4,51	-3,21	-3,98	0,14	-7,16
	<i>OsNramp6.4</i>	-7,73	-2,98	-8,19	-8,67	-8,04	-8,01	-5,84	-0,30	-0,78	-0,71	-8,24
	<i>OsNramp6.567</i>	-6,11	-1,12	-6,71	-7,40	-6,50	-6,51	-4,75	-0,41	-2,54	-1,60	-6,40
	<i>OsNramp6.8</i>	0,62	3,79	0,44	0,95	1,19	-0,28	2,03	3,07	-0,30	2,95	2,88

### Phụ lục 6. Kết quả xử lý thống kê.

**Bảng 6.1** – Phân tích thống kê tỷ lệ nhiễm bệnh giữa hai nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm

	Nhóm kháng	Nhóm mẫn cảm
Số lượng mẫu	6	13
Giá trị nhỏ nhất	4.020	31.54
Phân vị 1	6.450	35.85
Trung vị	14.69	45.93
Phân vị 3	22.86	70.04
Giá trị lớn nhất	23.65	89.21
Trung bình	14.49	51.94
Độ lệch chuẩn	8.240	19.73
Sai số chuẩn	3.364	5.473
Giá trị P = 0.0004 (***)		



**Hình 6.1** – Biểu hiện của *osa-miR7695* trên một số giống lúa tiêu biểu của nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm.

**Bảng 6.1** - Phân tích thống kê mức độ biểu hiện của *osa-miR7695* giữa nhóm chống chịu và nhóm mẫn cảm.

Thời gian	Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê	Giá trị P	Trung bình nhóm kháng	Trung bình nhóm nhiễm	Mức khác biệt	Sai số chuẩn	t ratio
24 hpi	Có	<0.01	4.37	2.16	2.21	0.83	2.66
48 hpi	Có	<0.01	3.68	1.63	2.05	0.52	3.95
72 hpi	Có	<0.01	8.75	1.91	6.84	1.28	5.35

**Bảng 6.2** – Phân tích biểu đồ Box plot của giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  (*osa-miR7695*) giữa nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm.

	24 hpi- Nhóm kháng	24 hpi- Nhóm nhiễm	48 hpi- Nhóm kháng	48 hpi- Nhóm nhiễm	72 hpi- Nhóm kháng	72 hpi- Nhóm nhiễm
Số mẫu	6	13	6	13	6	13
Giá trị tối thiểu	1.89	1.15	1.49	0.47	3.69	0.80
Phân vị thứ nhất	2.21	1.57	2.68	1.54	6.06	1.19
Trung vị	3.10	2.21	3.48	1.70	7.21	1.80
Phân vị thứ 3	6.42	2.58	4.56	1.84	11.70	2.83
Giá trị tối đa	8.71	3.28	6.28	2.55	15.54	3.39
Giá trị trung bình	4.37	2.16	3.68	1.63	8.75	1.91
Độ lệch chuẩn	2.93	0.65	1.71	0.59	4.58	0.89
Sai số	1.20	0.18	0.70	0.16	1.87	0.25
Khoảng tin cậy dưới	1.30	1.77	1.88	1.27	3.95	1.37

Khoảng tin cậy trên	7.45	2.56	5.47	1.98	13.55	2.45
------------------------	------	------	------	------	-------	------

**Bảng 6.3** - Phân tích thống kê mức độ biểu hiện của *osa-miR169a* giữa nhóm chống chịu và nhóm mẫn cảm

Thời gian	Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê	Giá trị P	Trung bình nhóm kháng	Trung bình nhóm nhiễm	Mức khác biệt	Sai số chuẩn	t ratio
0 hpi	Không	0.3966	12.08	7.59	4.485	5.064	0.885
24 hpi	Không	0.0642	13.80	33.46	- 19.66	9.450	2.080
48 hpi	Không	0.2232	133.0	23.11	109.9	84.59	1.299
72 hpi	Có (**)	<0.01	154.8	6.145	148.6	60.00	2.477

**Bảng 6.4** - Phân tích biểu đồ hộp (Box plot) của giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  (*osa-miR169a*) giữa nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm

	0hpi- Nhóm kháng	0hpi- Nhóm nhiễm	24 hpi- Nhóm kháng	24 hpi- Nhóm nhiễm	48 hpi- Nhóm kháng	48 hpi- Nhóm nhiễm	72 hpi- Nhóm kháng	72 hpi- Nhóm nhiễm
Số giá trị	6	6	6	6	6	6	6	6
Gía trị tối thiểu	1.440	1.590	2.560	0.6600	5.490	6.830	0.4700	0.1800
Tứ phân vị 1	4.350	1.905	4.990	12.80	15.75	8.705	56.15	0.72
Trung vị	10.41	3.685	10.77	40.47	53.11	26.20	131.2	1.245
Tứ phân vị 3	19.21	17.08	24.12	51.15	227.6	34.01	202.9	6.40
Gía trị tối đa	28.95	17.76	31.13	51.15	545.2	37.15	407.8	25.55
Khoảng	27.51	16.17	28.57	50.49	539.7	30.32	407.3	25.37

Trung bình	12.08	7.597	13.80	33.46	133.0	23.11	154.8	6.145
Độ lệch chuẩn	9.775	7.637	10.97	20.39	206.8	12.40	146.6	9.943
Sai số chuẩn	3.991	3.118	4.478	8.322	84.44	5.061	59.86	4.059
Khoảng tin cậy dưới	1.823	-0.4183	2.289	12.07	-84.10	10.10	0.8875	-4.290
Khoảng tin cậy trên	22.34	15.61	25.31	54.85	350.0	36.12	308.6	16.58

**Bảng 6.5** - Phân tích thống kê mức độ biểu hiện của các biến thể phiên mã *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* ở các thời điểm khác nhau.

Thời gian	Khác biệt có ý nghĩa thống kê	Giá trị P	Nhóm kháng	Nhóm miễn cảm	Mức khác biệt	Sai số chuẩn	Ngưỡng giới hạn t	Độ tự do
24 hpi	Có	0,0099	4,43	29,22	-24,79	9,748	3,254	7
48 hpi	Không	0,7489	14,92	17,5	-2,573	7,796	0,33	7
72 hpi	Không	0,3569	102,5	62,28	40,24	41,44	0,9711	7
24 hpi	Có	0,0256	8,79	30,63	-21,05	10,13	2,671	7
48 hpi	Không	0,9291	24,75	25,71	-0,9625	10,52	0,09153	7
72 hpi	Không	0,2992	230	126,3	103,7	94,12	1,102	7