

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

\*\*\*\*\*

**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

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

Thành phố Hồ Chí Minh, năm 2023

**Công trình được hoàn thành tại:**

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH**

Hướng dẫn khoa học:

Phản biện 1:.....

.....

Phản biện 2:.....

.....

Phản biện 3:.....

.....

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Trường

họp tại: Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

Vào hồi.....giờ .....ngày .....tháng.....năm.....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh
- Thư viện Quốc gia Hà Nội

## MỞ ĐẦU

### 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. 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 chống chịu 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 chỉ thị phân tử giúp phân biệt tính kháng đối với nấm gây bệnh đạo ôn trên cây lúa.

Theo nghiên cứu 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 khả năng 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 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 ngăn 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 kháng 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 chống chịu bệnh đạo ôn (*Magnaporthe oryzae*)” đã được tiến hành.

### 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*) ở Việt Nam, hầu hết thuộc giống lúa *indica*.

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.

### **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.

### **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* 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 miễn 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*.

### **Thời gian nghiên cứu**

Từ tháng 10 năm 2015 đến tháng 10 năm 2020

### **Đối tượng nghiên cứu**

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

### **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* và *OsNramp6*, đề từ

đó góp phần hỗ trợ cho công tác lai tạo giống lúa kháng 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.

### **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* 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 các biến thể phiên mã *OsNramp6.1*, *OsNramp6.8* với một số phân tử microRNAs trên lúa.

### **Bố cục của luận án**

Luận án gồm 125 trang (không kể phụ lục), có 4 chương, phần kết quả nghiên cứu có 10 bảng số liệu và 31 hình. Tổng cộng có 181 (01 tiếng Việt và 180 tiếng Anh) tài liệu đã được tham khảo các nội dung liên quan đến luận án.

## Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

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

Quá trình gây bệnh của nấm *M. oryzae* bao gồm hai giai đoạn là sinh sản sinh dưỡng và sinh sản vô tính. *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).

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 quang 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 tâm vốc và số lượng đẻ nhánh của cây làm ảnh hưởng đến năng suất (Ribot và ctv., 2008). Thông thường bệnh đạo ôn ở cỏ bông sẽ gây ra thiệt hại lớn nhất về năng suất hạt gạo trong quá trình xâm nhiễm (Filippi và ctv., 2011).

#### 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). 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).

#### 1.1.2. 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 microRNA 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 (miRNA), 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).

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, bao gồm các miRNAs sau: *osa-miR159a*, *osa-miR160*, *osa-miR162*, *osa-miR166*, *osa-miR168*, *osa-miR1320*, *osa-miR398*, *osa-miR7695*, *osa-miR812w*. Và 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, bao gồm: *osa-miR164*, *osa-miR167*, *osa-miR169*, *osa-miR319*, *osa-miR396*, *osa-miR399*, *osa-miR439*, *osa-miR444*, và *osa-miR1873*.

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

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, *OsNRAMP6* có vai trò tương tự protein *OsNRAMP5* là vận chuyển  $\text{Fe}^{2+}$  và  $\text{Mn}^{2+}$ . Các nghiên cứu gần đây cho thấy protein *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 kháng 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*) 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.

### **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.

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).

Môi Trường nuôi cấy nấm *M. oryzae*: CM, OMA, PDA.

DNA lý trích từ các mẫu nấm *M. oryzae* và được sử dụng để định danh nấm *M. oryzae* bằng kỹ thuật PCR với mỗi Pot2 transposon.

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, DNase I-RNase free, reverse transcriptase primer, EDTA 0.5M, TransAmp Buffer, Reverse Transcriptase. Hóa chất để điện di sản phẩm PCR: agarose, TBE bufer 1X, ladder 100 bp, 1kb. 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, đoạn mồi, cDNA, nước tinh khiết không RNAase.

Các thiết bị: Kính hiển vi, nồi hấp khử trùng, cân điện tử, bếp điện, tủ cấy, tủ mát, tủ lạnh -20 °C, tủ sấy, máy vortex, máy lắc, máy PCR, máy ly tâm, bồn điện di, máy chụp gel, lò vi sóng, khay đồ gel,

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.

## 2.4. Phương pháp nghiên cứu

### 2.4.1. Phương pháp đánh giá khả năng kháng với nấm *M. oryzae* trên các giống lúa thí nghiệm

Các giống lúa được trồng thành cây con 14 ngày tuổi trong nhà lưới trước khi chủng bệnh, theo quy trình của Campo và ctv. (2013).

Để chuẩn bị cho dung dịch huyền phù bào tử nấm gây bệnh đạo ôn, mẫu nấm phân lập *M. oryzae* LBT2 được nuôi cấy trên đĩa petri chứa môi trường oatmeal agar 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.. Bào tử nấm *M. oryzae* LBT2 được pha loãng và trộn với dung dịch Tween20 0.1%, sau đó phun sương lên lá lúa 14 ngày tuổi.

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. Vùng lá bị nhiễm của 19 giống lúa được thu thập ở các thời điểm 24h, 48h, và 72h sau khi nhiễm (hpi). Sau 5-7 ngày, các mẫu lá lúa nhiễm nấm *M. oryzae* được thu thập và đánh giá mức độ nhiễm bằng phần mềm Assess 2.0 (Lamari, 2008) để so sánh mức độ nhiễm theo công thức:

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

### 2.4.2. Phương pháp chiết xuất RNA

RNA tổng (bao gồm miRNA) của mẫu lá nhiễm bệnh được chiết xuất bằng Trizol, trong môi trường vô trùng và không có RNAase. Quy trình tiến hành như sau: 1g mẫu lá được nghiền với nitơ lỏng, thêm 1ml Trizol và giữ 10 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp đó, thêm 200 µL chloroform lạnh, ly tâm ở 10,000 rpm trong 10 phút. Dịch nổi được chuyển vào eppendorf 1.5 ml, và tủa qua đêm ở nhiệt độ -20 °C bằng isopropanol. Hỗn hợp dịch được ly tâm 20 phút ở 10,000 rpm và lấy phần kết tủa đem đi rửa với diethyl pyrocarbonate (DEPC) ethanol 2 lần và để khô trong chân không. Cuối cùng, kết tủa được hòa tan với 100 µL nước không có nuclease. Đo nồng độ và mức độ tinh khiết của RNA bằng máy NanoDrop™ 1000. Tất cả các mẫu RNA được xử lý với DNaseI để loại bỏ các phân tử DNA tồn dư.

### 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 mồi đặc hiệu (Campo và ctv., 2013). Quy trình được tiến hành như sau: RNA tổng (Total RNA) được phiên mã ngược thành cDNA bằng kit SensiFAST cDNA Synthesis. 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. Những dòng dương tính (positive clones) được chọn lựa và kiểm tra bằng phương pháp PCR với đoạn mồi *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 phân mềm BLAST với cơ sở dữ liệu miRBase

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

Mức độ biểu hiện của phân tử *osa-miR7695*, *osa-miR169a* và phân tử *OsNramp6.4* được đánh giá bằng phương pháp qPCR với kit SensiFAST SYBR No-ROX. Phản ứng Real-time PCR được thực hiện bằng thiết bị Mygo Pro 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 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* và *OsNramp6.4* bằng phương pháp  $2^{-\Delta Ct}$ . 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).

#### **2.4.5. Phương pháp xác định microRNA tiềm năng**

Trình tự của các biến thể phiên mã của gen *OsNramp6* dưới định dạng FASTA được đưa vào phần mềm psRNATarget V2 để nhận diện các microRNAs 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).

#### **2.4.6. 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, xử lí bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và Graphpad Prism 8.4.3.

Mức độ đặc hiệu, độ nhạy của giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  (*osa-miR7695*, *osa-miR169a*, *OsNramp6*), được xác định dựa trên phương pháp phân tích đường cong ROC (Receiver Operating Characteristic) (Fawcett, 2006) dựa trên nền web (<http://www.rad.jhmi.edu/jeng/javarad/roc/JROCFITi.html>) hoặc phần mềm Graphpad Prism 8.4.3.

### CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

Sự thay đổi phần trăm diện tích lá bệnh được quan sát ở cây lúa và được phân loại vào nhóm chống chịu hoặc mẫn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn. Nhóm chống chịu (ST5, OM8017, RVT, Gold Carolina, IR50404, và OM5451) và nhóm mẫn cảm (OM6162, OM9921, Nang Hoa 9, OM2517, OM9582, Jasmine85, OM4900, OM576, BC15, OM344, OM6976, OM4218, và OM7347). Nhóm mẫn cảm có mức độ nhiễm gấp 3 lần so với nhóm chống chịu, điều này cũng cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về mức độ xâm nhiễm của nấm *M. oryzae* giữa nhóm chống chịu và nhóm mẫn cảm (**Bảng 3.1**). Phân tích thống kê t-test mức độ nhiễm cho thấy nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm có sự khác biệt hoàn toàn ( $P < 0,001$ ).

**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

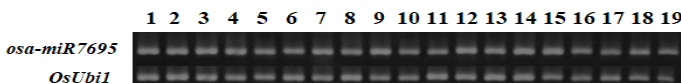
v.2.0

Nhóm lúa	Tên giống lúa	Mức độ nhiễm (%)	Giá trị nhiễm trung bình nhóm (%)
Nhóm lúa chống chịu	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	
Nhóm mẫn cảm	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	

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

Trong nghiên cứu này việc xác định sự hiện diện của *osa-miR7695* đóng vai trò rất quan trọng nhằm có thể tiến hành đánh giá mức độ và giá trị biểu hiện của *osa-miR7695* trên các giống lúa trồng phổ biến tại Việt Nam. Kỹ thuật nested RT-PCR được sử dụng để xác định sự hiện diện của *osa-miR7695* với 4 đoạn mồi đã được mô tả trước đây (Campo và ctv., 2013).



**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 chỉ ra rằng sự hiện diện của các sản phẩm khuếch đại nested RT-PCR được quan sát trên hầu hết 19 giống lúa thử nghiệm, 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**).

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 dài 487 bp (**Hình 3.16**). Kết quả đánh giá 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. 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*.

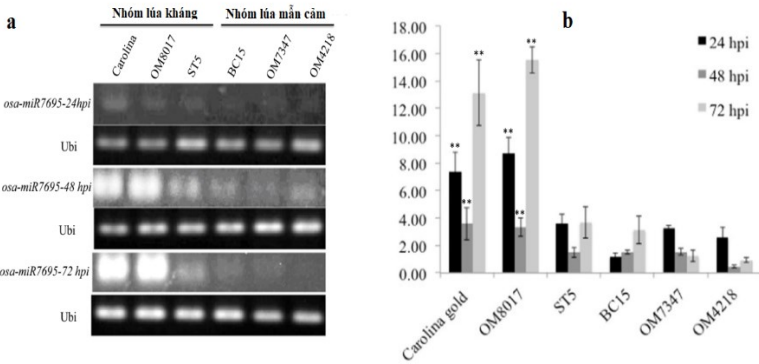


**Hình 3.16** – Kết quả cloning và giải trình tự của phân tử precursor *osa-miR7695* (487 bp). Trình tự màu đỏ: primer *LpJET1.2F*; Trình tự màu xanh: primer *LpJET1.2R*

### 3.3. 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*

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 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 trên 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 mẫn 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 mẫn 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 t-test cho thấy có

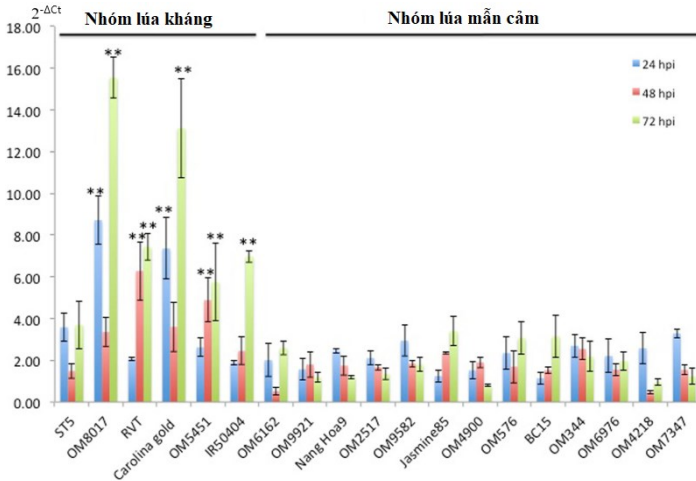
sự khác biệt giữa nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm (\*\* tương đương  $P < 0.01$ )



**Hình 3.18** - Mức độ biểu hiện của *osa-miR7695* trên một số giống lúa đại diện cho hai nhóm lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm *M. oryzae*. (\*\* tương đương  $P < 0,01$ ; hpi: giờ sau lây nhiễm). a: Kết quả đánh giá RT-PCR; b: Kết quả phân tích realtime PCR.

Kết quả qRT-PCR ở toàn bộ 19 giống 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 mẫn cảm. Giá trị biểu hiện cao nhất của *osa-miR7695* được ghi nhận ở thời điểm 72 hpi trên nhóm lúa chống chịu, có sự khác biệt về mặt thống kê khi so sánh với nhóm lúa mẫn cảm ở cùng thời điểm (**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, modun *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 kháng nấm *M. oryzae* thông qua sự ức chế gen đích *OsNramp6*. 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 có ý nghĩa trong việc xây dựng các quy trình phân biệt các giống lúa thuộc nhóm chống chịu và mẫn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn dựa trên các giá trị biểu hiện của phân tử *osa-miR7695*.



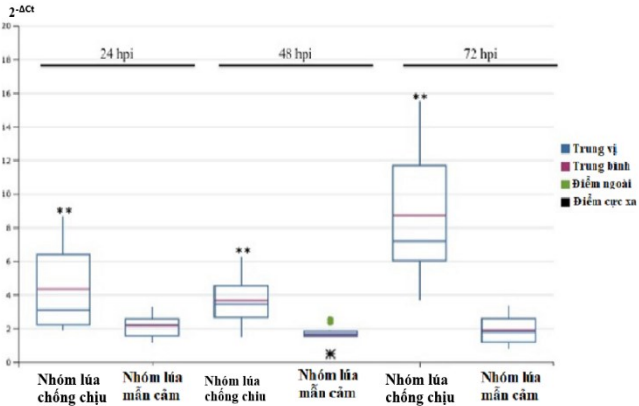


**Hình 3.19** - Mức độ biểu hiện của microRNA *osa-miR7695* ở 19 giống lúa trồng ở Việt Nam. Mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm chống chịu và mẫn cảm (\*\* tương đương  $P < 0,01$ ; hpi: giờ sau lây nhiễm).

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

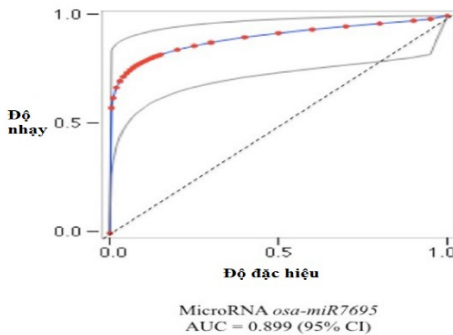
Phân tích biểu đồ hộp dựa trên giá trị  $2^{-\Delta C_t}$  của *osa-miR7695* được thực hiện trên 19 giống lúa của cả hai nhóm chống chịu và mẫn cảm với *M. oryzae* ở các thời gian sau lây nhiễm khác nhau 24, 48 và 72 hpi. Kết quả chỉ ra rằng biểu hiện của *osa-miR7695* tăng mạnh ở 72 hpi và có sự khác 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  $2^{-\Delta C_t}$  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  $2^{-\Delta C_t}$  nằm trong khoảng khoảng **8,75 – 15,54** (nhóm giống lúa chống chịu) và **1,91 – 3,39** (nhóm giống lúa mẫn cảm).



**Hình 3.20** - Biểu đồ hộp mô tả biểu hiện  $2^{-\Delta Ct}$  của *osa-miR7695* ở 19 giống lúa chống chịu và mẫn cảm. Mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê (\*\* tương đương  $P < 0,01$ ; hpi: giờ sau lây nhiễm).

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 mẫn cảm, phương pháp đường cong ROC (receiver operator characteristic) được sử dụng (Quoc và ctv., 2019). Kết quả phân tích cho thấy giá trị AUC (Area under the curve) đạt 0,899 (độ tin cậy 95%), điều này cho thấy mô hình nhận diện, phân biệt nhóm lúa chống chịu và mẫn 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**).



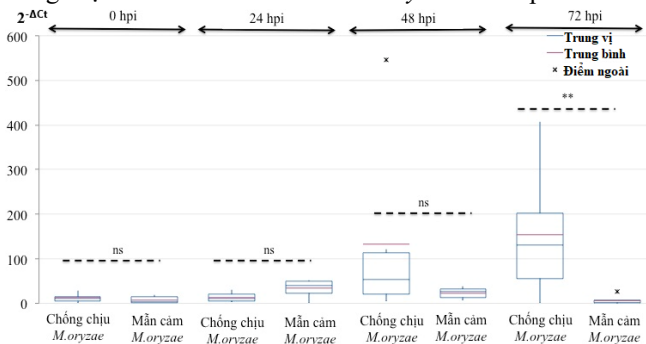
**Hình 3.21** - Đường cong ROC (Receiver operator characteristic) thể hiện độ nhạy và độ đặc hiệu của giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  (*osa-miR7695*) trong việc phân biệt nhóm giống lúa chống chịu và mẫn cảm. Diện tích bên dưới

đường cong (AUC) là 0,899.

Do vậy, kết quả phân tích cho thấy *osa-miR7695* là một phân tử chỉ thị (marker) tiềm năng, hỗ trợ công tác phân biệt giống lúa chống chịu và mẫn cảm với nấm gây bệnh đạo ôn, *M. oryzae*. Điều này góp phần hỗ trợ rất nhiều cho các chương trình tuyển chọn và lai tạo các giống lúa tại Việt Nam hiện nay.

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

Kết quả phân tích biểu đồ hộp (box plot) 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. Hơn nữa, sự gia tăng của giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  trung bình của *osa-miR169a* 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*. Ở 72 hpi, các giống lúa chống chịu và mẫn cảm với *M. oryzae* có giá trị  $2^{-\Delta Ct}$  của *osa-miR169a* lần lượt là 56,15 - 202,93 và 0,72 - 6,4. 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

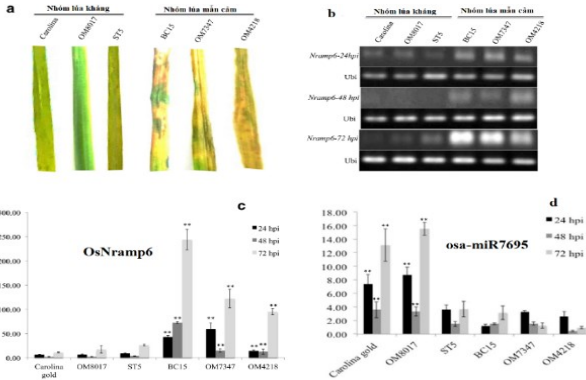
nhóm lúa ( $P < 0,01$ ). hpi: giờ sau nhiễm

Kết quả 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 chỉ 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.

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

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 qPCR được sử dụng trên 3 giống lúa đại diện cho mỗi nhóm. Kết quả cho thấy mức độ biểu hiện bệnh giữa 03 giống lúa chống chịu thấp hơn so với 03 giống lúa mẫn cảm (**Hình 3.26a**). Kết quả phân tích RT-PCR cho thấy gen *OsNramp6* hiện diện ở các giống lúa (rõ nhất ở thời điểm 24 hpi) (**Hình 3.26b**). Ở 3 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**). Hơn nữa, khi đánh giá biểu hiện của gen *OsNramp6* bằng qPCR cho thấy mức độ biểu hiện của gen *OsNramp6* ở nhóm lúa mẫn cảm cao hơn so với nhóm lúa chống chịu, đặc biệt ở thời điểm 72 hpi (**Hình 3.26c**). Biểu hiện trung bình của gen *OsNramp6* ở các giống kháng dao động từ 10-30, trong khi con số này ở nhóm lúa mẫn cảm

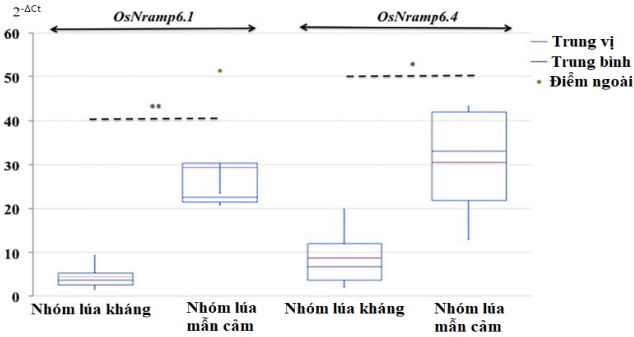
dao động từ: 20-60 ở 24 hpi; 20-80 ở 48 hpi và 100-240 ở 72 hpi sau lây nhiễm (**Hình 3.26c**). So sánh mức độ biểu hiện giữa *osa-miR7695* và gen *OsNramp6* trên 06 giống lúa đại diện, kết quả cho thấy xu hướng biểu hiện trái ngược nhau (**Hình 3.26c,d**). Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu 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 kháng 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). hpi: giờ sau nhiễm. a: Kết quả đánh giá mức độ nhiễm bệnh; b: Kết quả đánh giá RT-PCR của mẫu; c,d: Kết quả đánh giá realtime-PCR trên gen *OsNramp6* và *Osa-miR7695*

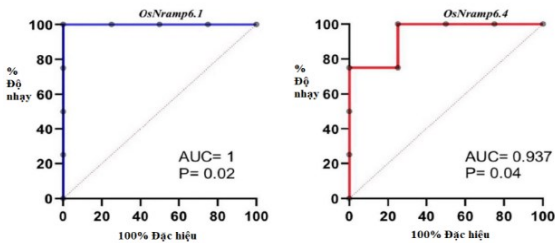
### 3.7. Phân tích mức độ và giá trị biểu hiện của các biến thể phiên mã *OsNramp6* ở nhóm lúa chống chịu và nhóm lúa mẫn cảm với nấm *M. oryzae*

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 (**Hình 3.29**). 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).



**Hình 3.29** - Biểu đồ hộp (Box plot) thể hiện mức độ biểu hiện  $2^{-\Delta Ct}$  của biến thể phiên mã *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* của 08 giống lúa trồng ở Việt Nam, thời điểm 24 hpi.

Kết quả ROC 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**). 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 hẹn 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.

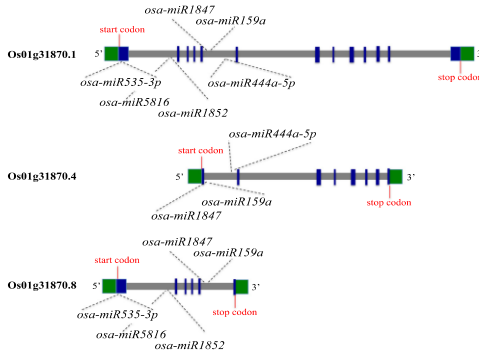


**Hình 3.30** - Đường cong ROC của *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4*. Diện tích dưới đường cong (AUC) của *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* tương ứng là 1 và 0,937 ( $P < 0,05$ ).

### 3.8. Nhận diện các microRNAs tiềm năng trong việc điều hòa *OsNramp6.1* và *OsNramp6.4* ở lúa bằng phân tích insilico

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*) (**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 có thể chỉ điều hòa sự biểu hiện được 2/3 biến thể phiên mã *OsNramp6* (**Hình 3.31**). 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*.



**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*

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 mẫn cảm với nấm *M. oryzae* ở Việt Nam dựa trên biểu hiện.

## KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 1. Kết luận

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

- Mức độ biểu hiện của *osa-miR7695* có sự khác biệt (gấp 2 - 4 lần) giữa nhóm lúa chống chịu và lúa mẫn cảm với nấm *M. oryzae* ở các thời điểm 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi. Mức độ biểu hiện của *osa-miR169a* trên nhóm lúa chống chịu cao gấp 25 lần so với nhóm lúa mẫn cảm ở thời điểm 72 hpi.

- 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. 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 *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*, *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.

### 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. Expression profiles of *OsNramp6* transcript variants involving in *Magnaporthe oryzae* resistance and non-resistance of Vietnamese rice cultivars (2021). *European Journal of Plant Pathology*, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02375-9>.

2. Expression of *osa-miR7695* against the blast fungus *Magnaporthe oryzae* in Vietnamese rice cultivars (2019). *European Journal of Plant Pathology*, 155(1): 307–317. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01772-5>.

3. 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.