

CRISPR/Cas:

THÀNH TỰU MỚI TRONG CẢI THIỆN DI TRUYỀN CÂY NÔNG NGHIỆP

Lê Tiến Dũng, Lê Thị Ngọc Quỳnh

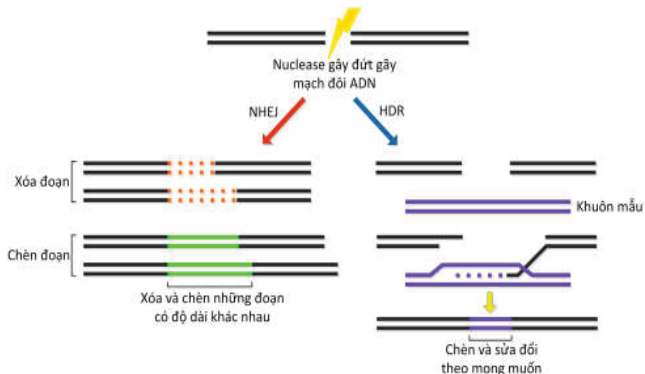
Viện Di truyền nông nghiệp, Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam

Trong vài năm trở lại đây, sự phát triển của công nghệ chỉnh sửa hệ gen đã mở ra một cách tiếp cận mới trong cải thiện di truyền cây nông nghiệp. Trong công nghệ chỉnh sửa hệ gen thì CRISPR/Cas hứa hẹn có tiềm năng ứng dụng lớn nhất. CRISPR/Cas đã được ứng dụng thành công vào các cây mô hình (*Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*), cây lương thực (đậu tương, lúa gạo, lúa mì, ngô) và hàng loạt giống cây trồng khác cũng đang được tiến hành nghiên cứu nhằm cải thiện các tính trạng mong muốn. Bài viết giới thiệu tóm tắt cơ chế hoạt động của hệ thống CRISPR/Cas, các thành tựu đạt được cũng như tiềm năng ứng dụng của công nghệ này trong cải thiện di truyền các cây nông nghiệp quan trọng.

Cơ chế hoạt động của hệ thống CRISPR/Cas

Công nghệ CRISPR/Cas (CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat, Cas - CRISPR associated protein) sử dụng các công cụ phân tử để tạo ra một hay nhiều điểm đứt gãy trên hệ gen sinh vật. Khi xuất hiện các điểm đứt gãy, cơ chế sửa chữa ADN sẽ được kích hoạt. Điểm đứt gãy có thể được sửa chữa bằng một trong hai hình thức: “Kết nối không tương đồng” (NHEJ) hoặc “tái tổ hợp tương đồng” (HDR). Sửa chữa thông qua hình thức HDR chỉ xảy ra khi tại vị trí đứt gãy có mặt các đoạn ADN có trình tự tương đồng với hai đầu đứt gãy. Như vậy, sửa chữa bằng hình thức HDR có thể được sử dụng để gây đột biến điểm đặc biệt hoặc chèn chuỗi mong muốn thông qua cơ chế tái tổ hợp. Tuy nhiên, NHEJ là cơ chế sửa chữa rất nhanh do không cần đoạn ADN tương đồng nên được tế bào “chọn” ưu tiên sử dụng. Đây cũng là một trong những nguyên nhân khiến các nghiên cứu chỉnh sửa hệ gen đạt được tỷ lệ HDR xảy ra là rất thấp.

Các cấu trúc phân tử dùng cho công nghệ chỉnh sửa hệ gen ban đầu sử dụng meganuclease, nuclease “ngón tay kẽm” (Zinc Finger Nucleases - ZFN), nuclease tương tự nhân tố kích hoạt phiên mã (Transcription Activator - Like Effector Nucleases - TALEN). Gần đây, cấu trúc phân tử dùng cho công nghệ chỉnh sửa hệ gen sử dụng nhóm các đoạn lặp lại xuôi ngược giống nhau và cách nhau đều đặn (CRISPR). CRISPR được chia làm một số nhóm dựa vào sự tham gia của



Hình 1. Chỉnh sửa hệ gen nhờ nuclease. Nuclease gây nên đứt gãy mạch đôi ADN dẫn đến quá trình sửa chữa theo 2 cơ chế: HDR hoặc NHEJ.

nuclease Cas và cấu trúc đoạn lặp lại trong chuỗi CRISPR. Trong đó, phổ biến nhất là CRISPR loại II có sự tham gia của một endonuclease mang nhiều vùng đặc biệt gọi là Cas9. Cas9 bao gồm 2 vùng, vùng thứ nhất tương đồng với enzyme Resolvase phân lập từ chủng *E. coli* kháng tia UV (RuvC), vùng còn lại chứa trình tự His-Asn-His gọi tắt là vùng HNH. Mỗi vùng của Cas9 chịu trách nhiệm phân cắt một mạch đơn ADN, trong đó vùng HNH chịu trách nhiệm phân cắt mạch đích. Điều này làm cho bộ máy enzyme nhỏ gọn và dễ dàng tiếp cận ADN đích, phù hợp để thực hiện quá trình chỉnh sửa hệ gen.

Thành tựu của CRISPR/Cas trong cải thiện di truyền cây nông nghiệp

Năm 2013, nhiều nghiên cứu về ứng dụng CRISPR/Cas chỉnh sửa hệ gen thực vật trên cây mô hình *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* và các cây lương thực như lúa gạo (*Oryza sativa*), cao lương (*Sorghum bicolor*), ngô (*Zea mays*), lúa mì (*Triticum aestivum*) được công bố. Hệ thống CRISPR/Cas được chứng minh là có biểu hiện ổn định trong các thế hệ tiếp theo của *A. thaliana* và lúa gạo. Do đó, CRISPR/Cas nhanh chóng được mở rộng ứng dụng trong chỉnh sửa hệ gen của nhiều loài thực vật (bảng 1).

Bảng 1. Một số thành tựu ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas9 trên cây trồng.

STT	Gen đích	Cây trồng/thực vật	Tính trạng mới đem lại
1	CsPDS	<i>Citrus sinensis</i>	Kháng bệnh đốm trắng trên lá
2	MLO	<i>Triticum aestivum</i>	Kháng bệnh phấn trắng
3	DDM1 GFP	<i>Glycine max</i>	Tăng cường sự phát triển bộ rễ
4	ALS1		Kháng thuốc trừ cỏ có nguồn gốc từ chlorsulfuron
5	OsPDS OsBADH2	<i>Oryza sativa</i>	Tính trạng lùn và bạch tạng
6	eIF4E	<i>Cucumis sativus</i> L.	Kháng virus gây bệnh vàng lá gân xanh trên dưa chuột, potyvirus gây bệnh khảm lá và virus gây bệnh đốm vòng
7	Gen mã hóa cho protein tạo vỏ virus	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Kháng virus gây bệnh xoàn lá trên cà chua
8	OST2	<i>A. thaliana</i>	Hạn chế quá trình mở khí khổng khi gặp điều kiện bất lợi
9	Liguleless-1 MS26 và MS45 ALS1 và ALS2	<i>Zea mays</i>	Kháng thuốc diệt cỏ có nguồn gốc từ chlorsulfuron
10	ARGOS8		Tăng cường khả năng chống chịu với điều kiện hạn hán

Năm 2014, Jia và cộng sự đã sử dụng phương pháp CRISPR/Cas để gây đột biến gen *CsPDS* mã hóa phytoene desaturase trên cây cam ngọt (*Citrus sinensis*). Nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ gây đột biến gen *CsPDS* khi sử dụng hệ thống này là khoảng 3,2-3,9%, khả năng gây đột biến lệch đích không được tìm thấy. Kết quả đã tạo ra những dòng cam ngọt đột biến, không xuất hiện những đốm trắng trên lá.

Trên lúa mì, phương pháp TALEN và CRISPR/Cas đã được sử dụng đồng thời để làm bất hoạt 3 locus *MLO*, mã hóa cho protein gây ức chế khả năng kháng lại bệnh phấn trắng trên nhiều loại cây trồng khác nhau. Nghiên cứu không tạo ra được dòng đột biến cả 3 alen *TaMLO* bằng phương pháp CRISPR/Cas, nhưng trong 72 dòng lúa mì chuyển gen ở thế hệ T0 thì có 4 dòng mang đột biến ở những vị trí khác nhau của alen *TaMLO-A1*. Tần số gây ra đột biến của CRISPR/Cas là 5,6%, tương đương với sử dụng phương pháp TALEN.

Trên cây mô hình *A. thaliana*, khả năng tạo đột biến của CRISPR/Cas đã được nghiên cứu trên nhiều thế hệ và cho thấy, tỷ lệ đột biến cao với đột biến mất đoạn và đột biến chèn những đoạn ngắn. Thế hệ T1 có tần số đột biến là 71,2%, T2 là 58,3% và ở T3 là 79,4%. Năm 2015, trên đậu tương (*Glycine max*), ứng dụng CRISPR/Cas đã gây đột biến với tỷ lệ cao 95% trên 11 locus với mục tiêu làm tăng cường sự phát triển của bộ rễ. Trong đó, đột biến mất đoạn được tìm thấy nhiều nhất bên cạnh đột biến đơn nucleotide và chèn đoạn. Trên cùng đối tượng cây đậu tương, hai vị trí trên hệ gen *DD20* và *DD43* có mặt trên nhiễm sắc thể số 4 được gây đột biến với tần số tương ứng là 59 và 76%, chủ yếu là các đột biến chèn, mất các đoạn nhỏ. Đột biến P178S trên gen *ALS1* cũng được tạo ra nhờ chỉnh sửa hệ gen, góp phần tạo ra dòng ngô đột biến kháng thuốc trừ cỏ có nguồn gốc từ chlorsulfuron.

Khoai tây (*Solanum tuberosum* L.) cũng là cây lương thực quan trọng góp phần đảm bảo cho an ninh lương thực trên toàn thế giới. Với mục tiêu tìm hiểu khả năng sử dụng CRISPR/Cas để làm bất hoạt, nghiên cứu chức năng gen, Wang và cộng sự (2015) đã sử dụng hệ thống này để tác động đến gen đích là *StIAA2*, mã hóa cho protein Auxin/IAA trên khoai tây. Hệ thống CRISPR/Cas được thiết kế để gây đột biến trên đoạn exon 2 của *StIAA2*. Kết quả thu được 12 dòng chuyển gen ở thế hệ T1 có kết quả dương tính với Cas9 khi thực hiện PCR phiên mã ngược (RT-PCR).

Năm 2016, CRISPR/Cas9 cũng được sử dụng để bất hoạt gen *OsBE11b* mã hóa cho enzyme phân nhánh tinh bột trên đối tượng là lúa gạo, cụ thể là có vai trò chuyển liên kết α -1,6 glucoside thành liên kết α -polyglucan, quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp amylopectin. Kết quả cho thấy sự nhận biết chính xác để tạo đột biến trên gen *OsBE11b*, không tạo đột biến trên gen *OsBE11a*, dù cho gen *OsBE11b* có độ tương đồng về trình tự khoảng 80% so với gen *OsBE11a*.

Năm 2015, báo cáo đầu tiên về ứng dụng CRISPR/Cas trên ngô để làm bất hoạt đa gen gồm gen *liguleless-1* hoạt động đặc hiệu cho quá trình phát triển lá ngô, gen *ms26* và *ms45* tham gia vào quá trình phát sinh hạt phấn, gen *als1* và *als2* mã hóa acetolactate synthase. Việc gây ra đột biến trên gen *als2* đã tạo ra các dòng ngô kháng thuốc diệt cỏ có nguồn gốc từ chlorsulfuron. Năng suất của ngô có thể thu được cao hơn nếu như giảm được sự nhạy cảm đối với ethylene. Gen *ARGOS* là chất điều hòa âm tính đối với ethylene thông qua con đường dẫn truyền tín hiệu. Các dòng ngô được tăng cường biểu hiện gen này cũng tăng khả năng chống chịu với điều kiện hạn hán, năng suất thay đổi không đáng kể so với điều kiện đối chứng.

CRISPR/Cas9 đã được ứng dụng để tạo ra các biến thể khác nhau của gen *ARGOS*, nhằm tạo ra các tính trạng có lợi khi lai tạo giống ngô. Sự khác biệt rõ rệt nhất xảy ra khi gặp phải điều kiện bất lợi ở giai đoạn ra hoa. ARGOS8-v1 và ARGOS8-v2 đạt năng suất cao hơn 0,33 tấn/ha so với dòng cây đối chứng. Ở điều kiện bình thường, ARGOS8-v1 và ARGOS8-v2 đạt năng suất cao hơn tương ứng là 0,12 và 0,18 tấn/ha so với dòng cây đối chứng.

Tiềm năng ứng dụng CRISPR/Cas

Sự đơn giản, hiệu quả và khả năng ứng dụng rộng rãi giúp công nghệ chỉnh sửa hệ gen nhờ ARN dẫn đường trở thành công nghệ nghiên cứu tiềm năng trong sinh học thực vật. Trình tự ADN có thể bị biến đổi theo mong muốn, cung cấp những hiểu biết quan trọng về chức năng của chúng. Mặc dù quá trình chỉnh sửa hệ gen vẫn gây ra những đột biến không mong muốn, nhưng các kết quả thực nghiệm đã chứng minh có nhiều biện pháp hiệu quả để khắc phục nhược điểm này.

Cây trồng biến đổi gen trước khi đưa vào sản xuất đại trà đều phải trải qua quá trình nghiên cứu lâu dài và tốn kém để đảm bảo an toàn sức khỏe đối với con người và an toàn sinh học với môi trường. Trong bối cảnh đó, kỹ thuật chỉnh sửa hệ gen, mà đại diện là hệ thống CRISPR/Cas cho phép chỉnh sửa gen và tạo ra sản phẩm không mang gen chuyển, có thể ứng dụng được trên phổ rộng các loài thực vật. Trong khi CRISPR/Cas đang được đẩy mạnh nghiên cứu trên nhiều loại giống cây trồng vì tiềm năng to lớn trong chỉnh sửa hệ gen, thì những công bố chính thức về cơ chế giám sát cho những sản phẩm của công nghệ chỉnh sửa hệ gen vẫn còn đang ở giai đoạn khởi đầu.

Một số nhà khoa học cho rằng, sản phẩm từ kỹ thuật chỉnh sửa hệ gen nên được áp dụng quy chế giống như những đột biến được tạo ra nhờ tia phóng xạ và nhờ hóa chất, do bản chất giống nhau và không chứa gen ngoại lai. Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ (USDA) cũng cho rằng, nếu như đột biến được tạo ra dựa theo cơ chế của tự nhiên thì đó không phải là GMO (sinh vật biến đổi gen). Cây ngô đầu tiên sử dụng CRISPR được tạo ra bởi Công ty DuPont Pioneer đã được USDA khẳng định không phải là GMO. Liên quan đến kỹ thuật chỉnh sửa hệ gen, Chính phủ Canada đã công nhận cho dòng cải dầu sử dụng đột biến nhờ các đoạn oligonucleotide và nhiều khả năng là trong thời gian gần sẽ chấp thuận những dòng cây trồng mới sử dụng kỹ thuật chỉnh sửa hệ gen như CRISPR/Cas9. Tại các nước thuộc EU, cây trồng GMO được quản lý bởi một hành lang pháp lý rất nghiêm ngặt (Chỉ thị 2001/EC/18 và 2015/412),

nhưng hiện không rõ là cây trồng sử dụng công nghệ chỉnh sửa hệ gen có chịu sự quản lý của Chỉ thị này hay không.

Nhìn chung, CRISPR/Cas là công cụ phân tử giúp thao tác biến đổi di truyền trực tiếp hay gián tiếp trên hệ gen một cách dễ dàng và đặc hiệu, đã được áp dụng thành công trên nhiều giống cây trồng khác nhau. Trong tương lai gần, phương pháp này sẽ giúp thúc đẩy cả hai hướng nghiên cứu cơ bản và ứng dụng, nâng cao hiểu biết về chức năng gen và cải thiện hàng loạt các tính trạng mong muốn trên cây trồng. Nếu như cây trồng đột biến gen tạo bởi kỹ thuật chỉnh sửa hệ gen được chấp nhận như là cây trồng không biến đổi gen, thì sẽ tạo ra một bước thay đổi lớn trong ứng dụng công nghệ sinh học nông nghiệp, giúp rút ngắn thời gian nghiên cứu phát triển các giống cây trồng mới. Việc này còn giúp nông dân được tiếp cận với thành tựu khoa học và công nghệ sớm hơn, nhờ đó sản phẩm có khả năng cạnh tranh cao trên thị trường, đồng thời góp phần đảm bảo an ninh lương thực.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M.J. Schleiden (1838), "Beiträge zur Phytogenese, Archiv für Anatomie, Physiologie und Wissenschaftliche Medici, 13, pp.137-176.
2. T. Schwann (1839), *Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Thiere und Pflanzen*, Sander'schen Buchhandlung, Berlin, Germany, p.270.
3. J.C. Sanford, T.M. Klein, E.D. Wolf, N. Allen (1987), "Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process", *Particulate Science and Technology*, 5(1), pp.27-37.
4. S. Dai, P. Zheng, P. Marmey, S. Zhang, W. Tian, S. Chen, R.N. Beachy, C. Fauquet (2001), "Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment", *Molecular Breeding*, 7(1), pp.25-33.
5. H. Jia, N. Wang (2014), "Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA", *PLoS One*, 9(4), e93806.
6. S. Wang, S. Zhang, W. Wang, X. Xiong, F. Cui, X. Meng (2015), "Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system", *Plant Cell Report*, 34(9), pp.1473-1476.
7. J. Chandrasekaran, M. Brumin, D. Wolf, D. Leibman, C. Klap, M. Pearlman, A. Sherman, A. Arazi, T. Gal-On (2016), "Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology", *Molecular plant pathology*, 17(7), p.1140-1153.
8. Z. Ali, A. Abulfaraj, A. Idris, S. Ali, M. Tashkandi, M.M. Mahfouz (2015), "CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants", *Genome biology*, 16(1), pp.1-11.
9. Y. Fu, J.D. Sander, D. Reyon, V.M. Cascio, J.K. Joung (2014), "Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs", *Nature biotechnology*, 32(3), pp.279-284.