

HIỆN TRẠNG CÔNG NGHỆ CHỈNH SỬA GEN CRISPR/Cas9 TRONG CẢI TIẾN MỘT SỐ TÍNH TRẠNG Ở CÂY LÚA VÀ TRIỂN VỌNG Ở VIỆT NAM

Nguyễn Tiến Dũng¹, Lê Văn Hiến¹

TÓM TẮT

Phát triển cây trồng đột biến thông qua chỉnh sửa gen là hướng đi đầy triển vọng và linh hoạt trong công tác chọn giống cây trồng phục vụ cho một nền sản xuất nông nghiệp bền vững. Trong đó, nghiên cứu chỉnh sửa hệ gen bằng CRISPR/Cas9 tạo ra những thay đổi ở mức độ phân tử và đảm bảo tính đặc hiệu. Kỹ thuật này nhanh chóng, đơn giản và hiệu quả cao hơn so với các phương pháp gây đột biến thông thường như ZFNs và TALENs. Thiết kế vectơ CRISPR/Cas9 dành riêng cho nhiều loài thực vật đã được thiết lập, áp dụng thành công trên cây mô hình *Arabidopsis thaliana* và các cây lương thực quan trọng như lúa, đậu tương, ngô. Chỉnh sửa hệ gen bằng CRISPR/Cas9 sẽ tạo ra nguồn vật liệu có giá trị cho công tác chọn giống đột biến. Bài viết này tóm tắt vai trò của công nghệ CRISPR/Cas9 trong chỉnh sửa hệ gen và một số thành tựu đạt được cũng như tiềm năng ứng dụng trong cải thiện di truyền cây lúa liên quan đến năng suất, chất lượng và khả năng chống chịu các điều kiện bất lợi của môi trường.

Từ khoá: CRISPR/Cas9, đột biến, GMO, lúa, stress.

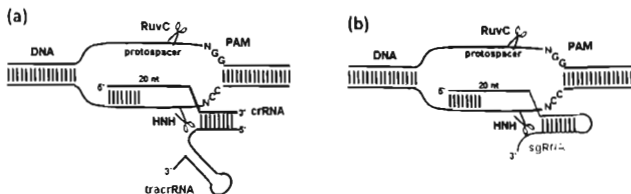
1. HỆ THỐNG CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas9) được phát hiện trong hệ thống miễn dịch của vi khuẩn chống lại sự xâm nhập của DNA (Deoxyribonucleic acid) ngoại lai, như thực khuẩn thể hay plasmid. Khác với hệ thống miễn dịch dựa trên các enzyme cắt giới hạn, hệ thống này phá hủy DNA ngoại lai bằng phân tử RNA. Hệ thống bao gồm trình tự lặp CRISPR và một protein Cas9. Vùng CRISPR bao gồm sự kết hợp của gen Cas9, trình tự không mã hoá (non-coding) RNA gọi là CRISPR RNA (crRNA) và trình tự ngăn chuyển mã (trans-activating; tracrRNA) (Barrangou, 2013; Bortesi và Fischer, 2015). Hai trình tự crRNA và tracrRNA được biết đến như một RNA dẫn đường (guide RNA, gRNA), nó xác định tính đặc hiệu vị trí phân chia nucleotit mục tiêu thuộc motif liên hệ tiền vùng dìm (Protospacer Adjacent Motif -PAM), trình tự PAM gồm 3 nucleotit 5'-NGG-3' nằm ở phía sau (downstream) của DNA mục tiêu, là điều kiện đầu tiên cho DNA tách đôi bởi Cas9. Trong đó, 20 nucleotit xác định vị trí đặc hiệu, gọi là hạt nhân xấp xỉ 12 nucleotit (vàng cam) nằm phía trước (upstream) của PAM là đặc biệt quan trọng đối với

quá trình bắt cặp giữa RNA và DNA mục tiêu (Hình 1) (Barrangou, 2013; Jinek và cs., 2012). Protein Cas9 là một enzyme endonuclease gồm hai tiểu phần RuvC và HNH, mỗi tiểu phần cắt một chuỗi DNA (Hình 1). Enzyme này hỗ trợ CRISPR tại vị trí sợi đôi DNA bị phá vỡ (double-stranded breaks, DSBs) bởi một trình tự gRNA gồm khoảng 20 nucleotit bổ sung cho đoạn DNA mục tiêu (Cong và cs., 2013). Một protein Cas9 có khả năng sử dụng cho nhiều gRNA khác nhau hướng đến nhiều vị trí mục tiêu trong bộ gen (Jinek và cs., 2012; Jiang và cs., 2013; Wang và cs., 2016).

So với kỹ thuật chỉnh sửa hệ gen dựa trên hoạt động của enzyme endonuclease như zinc finger nucleases (ZFNs) và transcription activator-like effector nuclease (TALENs), kỹ thuật chỉnh sửa hệ gen CRISPR/Cas9 được ứng dụng rộng rãi hơn do có nhiều ưu điểm vượt trội như đơn giản, hiệu quả đột biến cao. Ví dụ, trên cây ngô, CRISPR/Cas9 và TALENs gây đột biến ở cùng vị trí mục tiêu đạt hiệu quả lần lượt là 13,1% và 9,1% (Liang và cs., 2014). Tuy nhiên, để đạt được kết quả này còn phụ thuộc vào trình tự mục tiêu, cấu trúc và trình tự gRNA, protein Cas9 (codon tối ưu), chiến lược biểu hiện gRNA và độ nhạy của phương pháp phân tích (Shan và cs., 2013; Bortesi và Fischer, 2015).

¹ Khoa Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm,
Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên
Email: dungnt@uaf.edu.vn



Hình 1. Cấu trúc của CRISPR/Cas9 và RNA-dẫn DNA tách đôi bởi Cas9

(a) Ở hệ thống tự nhiên, Cas9 protein (xanh nhạt) được dẫn bằng một cấu trúc hình thành bởi CRISPR RNA (crRNA, màu đen), bao gồm 20 nucleotit xác định vị trí đặc hiệu và một yếu tố chuyển mã CRISPR RNA (tracrRNA, đỏ), đảm bảo ổn định về cấu trúc và hoạt động của Cas9 để phân tách DNA mục tiêu (protospacer) và sự hiện diện của một protospacer-adjacent motif (PAM, vàng). (b) Cas9 có thể được lập trình lại để tách DNA bởi một phân tử RNA dẫn sợi đơn (sgRNA, xanh lá cây), một DNA hoàn chỉnh (chimera) được tạo ra bằng cách kết hợp đầu 3' của crRNA với đầu 5' của tracrRNA (Bortesi và Fischer, 2015).

2. ỨNG DỤNG CRISPR/Cas9 TRONG CẢI TIẾN MỘT SỐ TÍNH TRẠNG Ở CÂY LÚA

2.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Cho đến nay, hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 đã được áp dụng trên 20 loài cây trồng

khác nhau (Jiang và cs., 2013; Shan và cs., 2013), trong đó cây lúa được nhiều nhà khoa học quan tâm cải thiện các đặc tính nông sinh học quan trọng bao gồm cải thiện năng suất, chất lượng, tính kháng các stress sinh học và phi sinh học (Bảng 1).

Bảng 1. CRISPR/Cas 9 chỉnh sửa gen liên quan đến các tính trạng được cải thiện ở cây lúa

Đặc điểm	Gene mục tiêu	Kỹ thuật áp dụng	Chức năng	Tham khảo
Cải tiến năng suất và chất lượng	<i>GW2</i> , <i>GW5</i> , <i>TGW6</i>	CRISPR/Cas9	Tăng khối lượng hạt	Xu và cs., 2016; Su và cs. 2011
	<i>Gn1a</i> , <i>DEP1</i> , <i>GS3</i>	CRISPR/Cas9	Tăng số lượng hạt, kích thước hạt	Li M và cs., 2016; Xu và cs., 2016
	<i>TGW2</i> , <i>GSE5</i> , <i>GSN1</i> , <i>GSW6</i>	CRISPR/Cas9	Tăng chiều dài hạt	Su và cs., 2011; Guo và cs., 2018
	<i>PYLs</i>	CRISPR/Cas9	Cải thiện tăng trưởng và năng suất	Miao và cs., 2018
	<i>BADH2</i>	CRISPR/Cas9	Tăng hương thơm	Shan và cs., 2015
Kháng stress sinh học	<i>OsSWEET13/14</i>	TALENs	Tăng cường khả năng kháng bệnh bạc lá	Antony và cs., 2010; Li và cs., 2012; Blanvillain-Baufum và cs. 2017
	<i>Os09g29100</i>	TALENs	Tăng cường khả năng kháng bệnh bạc lá	Cai và cs., 2017
	<i>OsER922</i>	CRISPR/Cas9	Tăng cường khả năng kháng bệnh đạo ôn	Wang và cs., 2016
Kháng stress phi sinh học	<i>BEL</i> , <i>ALS</i> , <i>OsEPSPS</i>	CRISPR/Cas9	Kháng thuốc diệt cỏ/glyphosate	Sun và cs., 2016
	<i>ARGOS8</i>	CRISPR/Cas9	Kháng hạn	Shi và cs., 2017
Cải thiện dinh dưỡng	<i>SBE1b</i> , <i>SBE1</i>	CRISPR/Cas9	Tăng hàm lượng tinh bột	Sun và cs., 2017

2.1.1. Cải thiện năng suất và chất lượng hạt

Ở cây lúa năng suất được quy định bởi hai hoặc nhiều gen (Xing và Zhang, 2010). Nhiều nhóm nghiên cứu đã cố gắng thiết lập bản đồ các tính trạng số lượng (locus trait quantitative- QTL). Các gene tiềm năng có thể được chuyển trực tiếp hoặc gián tiếp vào cây để phát triển các giống có năng suất cao (Shen và cs., 2018). Tuy nhiên, phương pháp này rất khó đối với các tính trạng được quy định bởi nhiều gen và khó kiểm soát được vị trí của các gen mục tiêu. Khác với phương pháp trên, CRISPR/Cas9 có khả năng nhận diện chính xác DNA mục tiêu bằng phân tử gRNA và chỉnh sửa bằng enzyme Cas9 (Cong và cs., 2013; Lin và cs., 2014; Bortesi và Fischer, 2015). Bằng kỹ thuật này, tính trạng hạt ở cây lúa đã được cải thiện thông qua chỉnh sửa trình tự gen kiểm soát kích thước hạt *GS3* (*Grain size 3*) và số lượng hạt trên bông *Gn1a* (*Grain number 1a*) (Li và cs., 2016; Shen và cs., 2018).

Nghiên cứu của Xu và đồng tác giả (2016) cho thấy năng suất lúa đã được cải thiện sau khi loại bỏ các gen liên quan đến kích thước, số lượng và khối lượng hạt như *grain size 3*, *5* (*GS3*, *GS5*), *dense and erect panicle 1* (*DEP1*), *grain weight 2* (*GW2*), *grain number 1a* (*Gn1a*). Li và cộng sự (2016) đã chỉnh sửa bốn gen riêng rẽ *Gn1a*, *DEP1*, *GS3* và *IPAI* thu được các cây lúa có kiểu hình như số hạt/bông tăng, nhiều hạt chắc/bông và kích thước hạt lớn hơn so với cây đối chứng. Ở một nghiên cứu khác, Xu và cộng sự (2016) cho rằng đột biến đồng thời ba gen liên quan đến khối lượng hạt *GW2*, *GW5* và *thousand grain weight 6* (*TGW6*) có thể làm tăng 29,3% khối lượng hạt so với ban đầu. Điều này cho thấy CRISPR/Cas9 có khả năng gây đột biến các gen liên quan đến năng suất lúa.

Ngoài ra, CRISPR/Cas9 cũng được ứng dụng để cải thiện chất lượng gạo thông qua chỉnh sửa các gen chi phối. Ví dụ như gen *betaine aldehyde dehydrogenase 2* (*BADH2*) kiểm soát khả năng tổng hợp hàm lượng 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) quy định hương thơm chính trong gạo. Bằng kỹ thuật CRISPR/Cas9, Shao và cộng sự (2017) đã chỉnh sửa gen *BADH2* làm tăng hàm lượng 2AP ở giống lúa indica Zhonghua 11 dẫn đến hương thơm của gạo tăng lên đáng kể. Sun và cộng sự (2017) đã thành công tạo ra hạt gạo có hàm lượng tinh bột cao bằng cách chỉnh sửa gen *starch branching enzyme* (*SBE*). *SBE1* và *SBE1b*. Trong khi các dòng đột biến gen

SBE1 không làm tăng hàm lượng tinh bột, các đột biến gen *SBE1b* cho thấy hàm lượng tinh bột cao hơn 25 lần so với đối chứng. Điều này cho thấy gen *SBE1b* đóng một vai trò quan trọng trong việc xác định cấu trúc và tính chất của tinh bột của hạt gạo.

2.1.2. Cải thiện khả năng chống chịu

Stress sinh học do các vi sinh vật gây bệnh bao gồm vi khuẩn, nấm và côn trùng tạo ra làm tổn thất tới 42% năng suất lương thực toàn cầu (Oerke, 2005). Do vậy, phát triển cây trồng kháng bệnh là nhu cầu cần thiết, trong đó một số gen liên quan đến bệnh đã được gây đột biến bằng các phương pháp chỉnh sửa gen để tạo ra giống lúa kháng bệnh.

Zhou và cộng sự (2015) sử dụng kỹ thuật CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa gen *OsSWEET13* trên giống lúa IR24 tạo ra các dòng đột biến có khả năng đề kháng đối với bệnh bạc lá. Wang và cộng sự (2016) gây đột biến gen *OsERF922* bằng cách chèn hoặc xóa vị trí đích tạo ra tần số đột biến lên tới 42% ở các cây T0. Đánh giá kiểu hình của 6 dòng đột biến đồng hợp tử T2 cho thấy tỷ lệ nhiễm bệnh đạo ôn đã giảm đáng kể so với các cây đối chứng. Gen *eukaryotic translation initiation factor 4G* (*eIF4G*) được cho rằng có liên quan đến các phản ứng kháng lại vi rút RTSV (Rice tungro spherical virus) gây bệnh vàng lùn ở lúa (Lee và cs., 2010). Điều này đã được chứng minh khi Macovei và cộng sự (2018) gây đột biến gen *eIF4G* ở giống lúa IR64 miễn cảm với vi rút RTSV tạo ra các dòng lúa có tính kháng cao.

Ngoài các nghiên cứu tăng khả năng chống chịu các stress sinh học như trên, các nhà khoa học cũng chú trọng đến việc nâng cao khả năng chống chịu các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh (phi sinh học). Gần đây, Li và đồng tác giả (2016) đã thay thế gen dựa trên kỹ thuật TALEN và tạo ra đột biến điểm kép ở cây lúa mang gen mã hoá enzym *acetolactate synthase* (*ALS*). Hiệu suất đột biến là 6,3% với toàn bộ đột biến ổn định cho khả năng kháng thuốc diệt cỏ mạnh. Tương tự, thông qua CRISPR/Cas9 Sun và cộng sự (2016) tạo ra nhiều đột biến điểm lẻ trên trình tự gen *ALS*. Kết quả sàng lọc kiểu hình cho thấy các dòng chỉnh sửa biểu hiện khả năng kháng thuốc diệt cỏ sau 36 ngày phun. Nâng cao khả năng chống chịu nhiệt độ thấp ở lúa cũng được nhiều nhà khoa học quan tâm. Huang và cộng sự (2017) đã chỉnh sửa gen *TIFY1a* và *TIFY1b* liên quan đến khả năng chống chịu nhiệt độ ở cây lúa. Các cây đột biến

biểu hiện rõ rệt khả năng chống chịu với nhiệt độ thấp của môi trường.

2.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam

Ở nước ta, công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 vẫn còn khá mới mẻ, đang được tiếp cận, và triển khai vào thực tiễn. Hiện nay, Cas9 đang được một số viện và trung tâm tiếp thu, trao đổi với đối tác quốc tế trong khuôn khổ các đề tài, dự án hợp tác quốc tế cũng như các dự án trong nước. Chính sửa gen CRISPR/Cas9 bước đầu xây dựng và ứng dụng thành công trên một số cây trồng quan trọng như lúa, thuốc lá, và cà chua. Tại Viện Công nghệ Sinh học, nhóm nghiên cứu tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật đã sử dụng CRISPR/Cas9 thành công tạo đột biến gen trên cây đậu tương và thuốc lá, với hiệu suất tạo đột biến đậu tương >90% và 20-40% ở thuốc lá. Kết quả phân tích đột biến cho thấy không ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng, phát triển của cây đậu tương và thuốc lá so với giống gốc.

Hơn nữa, chỉnh sửa gen CRISPR-Cas9 là một trong những hướng đi mới của Viện Di truyền và Học viện Nông nghiệp Việt Nam trong giai đoạn 2015-2025. Ở giai đoạn này, chương trình công nghệ sinh học nông nghiệp *"Ứng dụng công nghệ chỉnh sửa hệ gen để cải tạo tính trạng mùi thơm và kháng bệnh bạc lá ở một số giống lúa chủ lực của Việt Nam"* thực hiện tại Viện Di truyền Nông nghiệp trong giai đoạn 2017-2020. Với kết quả dự kiến chỉnh sửa vùng promoter của gen *OsSWEET14* trên giống Bắc Thơm 7 và gen *BADH2* trên giống lúa OM5451. Bên cạnh đó, các nhà khoa học của Học viện Nông nghiệp Việt Nam đang tiến hành nghiên cứu sử dụng CRISPR/Cas9 tạo đột biến định hướng trên gen *IAA9* ở cây cà chua nhằm tạo dòng cà chua không hạt. Nhưng định hướng và dự kiến kết quả đạt được ở một số cơ quan nghiên cứu cho thấy khả năng tiếp nhận và làm chủ công nghệ chỉnh sửa gen cũng như tiềm năng ứng dụng công nghệ này trong chọn tạo giống cây trồng đột biến ở Việt Nam.

3. TIỀM NĂNG ỨNG DỤNG Ở VIỆT NAM

Chọn tạo giống lúa ở nước ta chủ yếu thông qua lai tạo truyền thống, xử lý đột biến, chọn lọc và tuyển chọn các dòng nhập nội. Phương pháp này đòi hỏi mất rất nhiều thời gian, chi phí để tạo ra giống mới. Vì thế, một số nhà khoa học đã ứng dụng công nghệ mới trong chọn tạo giống lúa như chọn giống bằng chỉ thị phân tử ADN, chuyển gen thông qua các hợp

tác nghiên cứu với các nhà khoa học nước ngoài. Những năm gần đây, Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long đã tạo ra nhiều giống lúa mới nhờ ứng dụng chỉ thị phân tử MAS trong chọn giống lúa chịu mặn, chịu nóng, kháng rầy,... Viện Di truyền Nông nghiệp cũng tạo ra các giống lúa thơm, chịu ứng thông qua chỉ thị phân tử. Phương pháp này mặc dù mang lại hiệu quả nhưng vẫn mất nhiều thời gian lai tạo và chọn lọc.

Mặt khác, tạo giống cây trồng mới thông qua chuyển gen cho thấy tiềm năng ứng dụng nhanh chóng và hiệu quả. Kỹ thuật này đang được ứng dụng trên đậu tương, ngô và bông. Lợi ích cây trồng biến đổi gen mang lại đã được đa số người trồng trên thế giới thừa nhận. Tuy nhiên ở nước ta việc nghiên cứu chuyển gen trên cây lúa không được khuyến khích bởi liên quan đến vấn đề xuất khẩu gạo và đặc biệt khi vẫn còn những lo ngại về sự an toàn đến sức khỏe của người tiêu dùng. Công nghệ chỉnh sửa hệ gen CRISPR/Cas9 cho phép tạo ra cây trồng mới mà không cần chuyển bất cứ một gen ngoại lai nào vào cây chủ vì thế loại bỏ hoàn toàn lo ngại về gen kháng kháng sinh cũng như các gen chỉ thị khác thường thấy ở phương pháp chuyển gen. Công nghệ này có thể ứng dụng trong công tác chọn tạo giống lúa đáp ứng yêu cầu sản xuất ở Việt Nam trong điều kiện thuận lợi, khó khăn và dinh dưỡng như sau:

3.1. Thuận lợi

3.1.1. Vai trò và tầm quan trọng của việc nghiên cứu nhanh chóng tạo ra giống lúa năng suất chất lượng/chống chịu

Lúa gạo là mặt hàng nông sản xuất khẩu chủ lực của quốc gia chịu ảnh hưởng nhiều bởi khí hậu thay đổi và chất lượng chưa cao, điều này dẫn đến giá trị gạo trên thị trường xuất khẩu và thu nhập của nông dân trồng lúa còn thấp. Thực tế trên đòi hỏi phải tạo ra giống lúa chống chịu được nhiều yếu tố bất lợi cùng lúc, nhưng vẫn đảm bảo chất lượng. Với phương pháp tạo giống hiện nay thường chỉ tạo ra giống kháng với một vài yếu tố bất lợi. Do đó, CRISPR/Cas9 với cách tiếp cận có khả năng tạo đột biến đa gen cùng một lúc sẽ là cơ hội tạo ra các giống lúa kháng đa yếu tố cần thiết để ứng phó với biến đổi khí hậu và đảm bảo sản xuất bền vững. Hơn nữa, với sự đặc hiệu vốn có CRISPR/Cas9 trực tiếp gây ra những đột biến ở các gen mục tiêu sẽ là cơ sở để lựa chọn các đột biến tốt có khả năng tăng năng suất, chất lượng và chống chịu stress.

3.1.2. Về phòng thí nghiệm

Để đáp ứng nhu cầu trong công tác nghiên cứu và tạo dòng lúa đột biến, hệ thống cơ sở phòng thí nghiệm được thiết lập ở các viện, trung tâm nghiên cứu và trường đại học. Bao gồm 1 phòng thí nghiệm trong điểm công nghệ gen (Viện Công nghệ Sinh học) và 2 phòng thí nghiệm trong điểm công nghệ tế bào thực vật thuộc Viện Di truyền Nông nghiệp và Viện Sinh học Nhiệt đới và nhiều phòng thí nghiệm sinh học phân tử quy mô nhỏ ở các trường đại học khối ngành nông - lâm nghiệp. Thông qua các chương trình và dự án hợp tác quốc tế đầu tư trang thiết bị tại Viện Công nghệ Sinh học, Viện Di truyền Nông nghiệp và Học viện Nông nghiệp Việt Nam phải kể đến dự án tài trợ của FIRST, JICA... Cụ thể, với nguồn tài trợ của FIRST, 2 phòng thí nghiệm (Tun sinh học và Sinh học phân tử giám định gen thực vật) đã được đầu tư nâng cấp. Tại đây, các trang thiết bị sinh học phân tử - kỹ thuật di truyền khá đồng bộ và đầy đủ đáp ứng được yêu cầu của nhiều công việc như sàng lọc gen, thiết kế vector và tạo chủng *Agrobacterium* phục vụ chuyển gen.

3.1.3. Về hệ thống tài sinh

Hiện nay, quy trình tái sinh cây lúa đã được nhiều nghiên cứu trong nước công bố, với việc lựa chọn và sàng lọc các giống có khả năng tái sinh cao phục vụ cho chuyển gen. Khả năng tái sinh thành công các giống lúa bản địa và các giống nhập nội đã được ghi nhận. Theo kết quả nghiên cứu của Phan Thị Thu Hiền (2012) cho thấy 25/31 giống lúa nương Việt Nam có khả năng tái sinh, trong đó 4 giống có tỷ lệ tái sinh cao gồm IR78878 (70,3%), Khẩu công ton (70,3%), Khẩu tói (70,3%), Khẩu trộm hòm (75,3%). Một nghiên cứu khác cho thấy một số giống nhập nội IR64, J02 và Bắc Thơm có khả năng tái sinh và tiếp nhận gen khá tốt, đáp ứng được yêu cầu cho nghiên cứu chuyển gen kháng hạn và kháng bệnh hại (Phạm Thu Hằng và cs., 2016). Đến nay, quy trình tái sinh một số giống lúa japonica (BM9630, NV1, NV2, NV3, J02) và indica (Hương cốm và BC15) đã được hoàn thiện (Phan Thị Hương và cs., 2014). Với những kết quả nghiên cứu đạt được sẽ tạo tiền đề cho công nghệ chuyển gen tạo dòng lúa đột biến sau này.

3.1.4. Về nhân lực/điều kiện nghiên cứu về chuyển gen

Nhiều chương trình đổi mới công nghệ quốc gia tập trung hỗ trợ nghiên cứu tạo cây lúa chuyển gen đã được xây dựng và hoàn thiện. Các đề tài cấp Nhà nước và hợp tác quốc tế với Bỉ (1997-2001), EU (1998-nay) đề "Tạo cây lúa chuyển gen chịu hạn và chịu mặn" đã được triển khai với chọn lọc gen, thiết kế vector mang gen, và quy trình chuyển gen trên cây lúa thông qua *Agrobacterium* đã được xây dựng và hoàn thiện tại Viện Công nghệ Sinh học. Tương tự, tại Viện Di truyền Nông nghiệp, các kết quả nghiên cứu phân lập gen và thiết kế vector biểu hiện gen đã được tiến hành nhằm tạo nguồn vật liệu di truyền cho các nghiên cứu chuyển gen, tạo cây trồng biến đổi gen có khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi. Viện đã phân lập được 19 gen điều khiển tăng cường tình chịu hạn phục vụ nghiên cứu tạo giống cây trồng chuyển gen chịu hạn và đã xây dựng được quy trình chuyển gen vào giống lúa Indica (PB1), Japonica (J02), ngô, đậu tương và thuốc lá. Hơn nữa, Viện Di truyền Nông nghiệp là cơ sở trực tiếp hợp tác nghiên cứu với Trung tâm John Innes và Trung tâm phân tích hệ gen Anh, đã tiến hành giải mã thành công 36 giống lúa bản địa ưu tú của Việt Nam trong năm 2013. Tiếp đó, dự án 600 dòng/giống lúa bản địa đã đề xuất với Bộ Khoa học và Công nghệ hỗ trợ triển khai tiểu dự án "Nâng cao năng lực nghiên cứu, làm chủ công nghệ genom học (Genomics - Assisted Breeding, GAB) và công nghệ chọn giống ứng dụng chỉ thị phân tử (Marker Assisted Backcrossing - MABC) để chọn tạo các giống lúa kháng đa yếu tố ứng phó với biến đổi khí hậu". Do vậy, việc triển khai các dự án trên là dịp để đào tạo, nâng cao nguồn nhân lực trong lĩnh vực hệ gen học và tin sinh học. Trong đó các nhà khoa học Việt Nam đã tiếp cận với các phương pháp giải mã hệ gen tiên tiến, tiến tới chủ động giải trình tự, tạo lập cơ sở dữ liệu hệ gen đầy đủ của các giống lúa Việt Nam. Đồng thời là cơ hội để áp dụng công nghệ mới CRISPR/Cas9 chọn tạo giống lúa đột biến gen mới một cách nhanh chóng, hiệu quả.

3.2. Khó khăn/thách thức

Để đảm bảo đảm an ninh lương thực và xuất khẩu nông sản bền vững trước tình trạng biến đổi khí hậu, công tác nghiên cứu chọn, tạo giống đang được đặt lên hàng đầu. Việc nhanh chóng tạo ra những giống cây trồng đột biến có sức chống chịu điều kiện bất lợi sinh học và phi sinh học ứng phó với biến đổi khí hậu cũng như pha vỡ rào cản để tăng năng suất,

sản lượng lương thực, đòi hỏi phải có những thông tin chính xác về kiểu gen và kiểu hình của các nguồn vật liệu, đặc biệt là các nguồn gen bản địa quý. Mặt khác, trong quy trình chọn tạo giống bằng chỉ thị phân tử, để xác định sự có mặt của gen quy định chất lượng, gen kháng sâu bệnh đều sử dụng nguồn gen kháng của nước ngoài (IRRI, Trung Quốc). Tuy nhiên, kiểu gen của giống bản địa Việt Nam và Trung Quốc có sự khác biệt, dẫn đến khó khăn trong việc tìm kiếm và sàng lọc gen. Trong khi đó, các nguồn gen lúa bản địa rất đa dạng, nhiều nguồn gen chất lượng có khả năng kháng sâu bệnh tốt nhưng chưa được khai thác hết. Chưa có những công bố khoa học về xác định bản đồ di truyền của các gen chất lượng, gen kháng sâu bệnh, xác định thành phần alen/locus, so sánh sự sai khác giữa các alen chất lượng, alen kháng của các giống lúa bản địa Việt Nam với các giống lúa trên thế giới để phục vụ công tác lai tạo giống.

3.3. Định hướng trong thời gian tới

Tập trung ứng dụng CRISPR/Cas9 tạo đột biến liên quan đến biểu hiện promoter/gen nâng suất liên quan đến tăng khối lượng hạt, số lượng hạt, chiều dài hạt, số nhánh/cây và gen kháng bệnh bạc lá và đạo ôn. Tiếp tục tạo đột biến cải thiện hàm lượng amylose và lycopene trong gạo, là cơ sở ứng dụng chỉnh sửa gen tạo ra các đột biến mới góp phần nâng cao chất lượng. Bên cạnh đó, tiềm năng của CRISPR/Cas9 trong việc tạo đột biến đa gen liên quan đến các hormone điều hòa sinh trưởng và kháng stress, nhưng vẫn đảm bảo chất lượng. Chọn tạo được các dòng lúa đột biến bằng công nghệ CRISPR/Cas9 áp dụng ở quy mô phòng thí nghiệm và nhà lưới.

4. KẾT LUẬN

CRISPR/Cas9 là công nghệ chỉnh sửa gen thao tác một cách dễ dàng, đặc hiệu và đã được áp dụng thành công trên nhiều giống cây trồng quan trọng. Công nghệ này sẽ thúc đẩy cả hai hướng nghiên cứu cơ bản và ứng dụng, nâng cao hiểu biết chức năng gen và tạo tiền đề cải thiện các tính trạng mong muốn ở cây trồng.

Công nghệ CRISPR/Cas9 có thể được ứng dụng trong công tác chọn tạo giống cây trồng ở Việt Nam. Đặc biệt trong công tác chọn tạo giống lúa để nâng cao năng suất và chất lượng và khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã cấp kinh phí cho để tại hợp tác nghiên cứu song phương và đa phương giữa Trường Đại học Quốc gia Kyungpook Hàn Quốc và Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên mã số HNQT/SPDP/13.19.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Antony G, Zhou J, Huang S, Li T, Liu B, White F, Fang B (2010). Rice xa13 recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene Os-11N3. *Plant Cell* 22: 3864-3876.
2. Barrangou R (2013). CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 4: 267-278.
3. Blanvillain-Baufum S, Reschke M, Sol M, Auguy F, Doucoure H, Szurek B, Meynard D, Portefaix M, Cunnac S, Guiderdoni E, Boch J, Koebnik R (2017). Targeted promoter editing for rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* reveals differential activities for SWEET14-inducing TAL effectors. *Plant Biotechnol. J.* 15: 306-317.
4. Bortesi L, Fischer R (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol. Advances* 33: 41-52.
5. Cai L, Cao Y, Xu Z, Ma W, Zakria M, Zou L, Cheng Z, Chen G (2017). A transcription activator-like effector Tal7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* activates rice gene Os09g29100 to suppress rice immunity. *Sci. Rep.* 7: 5089.
6. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339: 819-823.
7. Huang XZ, Zeng XF, Li JR, Zhao DG (2017). Construction and analysis of tifyla and tifylb mutants in rice (*Oryza sativa*) based on CRISPR/Cas9 technology. *J. Agric. Biotechnol.* 25: 1003-1012.
8. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816-821.
9. Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene

modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res.* 41: e188.

10. Lee JH, Muhsin M, Atienza GA, Kwak DY, Kim SM, De Leon TB, Angeles ER, Coloquio E, Kondoh H, Satoh K, Cabunagan RC, Cabauatan PQ, Kikuchi S, Leung H, Choi IR (2010). Single nucleotide polymorphisms in a gene for translation initiation factor (eIF4G) of rice (*Oryza sativa*) associated with resistance to rice tungro spherical virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23: 29–38.

11. Li M, Li X, Zhou Z, Wu P, Fang M, Pan X, Lin Q, Luo W, Wu G, Li H (2016). Reassessment of the four yield-related genes Gnl1, DEP1, GS3, and IPA1 in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Front. Plant Sci.* 7: 377.

12. Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C (2014). Targeted mutagenesis in zeamay using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J. Genet. Genomics* 41: 63–68.

13. Lin Y, Cradick TJ, Brown MT, Deshmukh H, Ranjan P, Sarode N, Wile BM, Vertino PM, Stewart FJ, Bao G (2014). CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 42: 7473–7485.

14. Macovei A, Sevilla NR, Cantos C, Jonson GB, Slamet-Loedin I, Čermák T, Voytas DF, Choi IR, Chadha-Mohanty P (2018). Novel alleles of rice eIF4G generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to rice tungro spherical virus. *Plant Biotechnol. J.* 16: 1918–1927.

15. Miao C, Xiao L, Hua K, Zoua C, Zhao Y, Bressanb RA, Zhu JK (2018). Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 115: 6058–6063.

16. Oerke EC (2005). Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144: 31–43.

17. Phạm Thu Hằng, Đàm Quang Hiếu, Phan Tuấn Nghĩa, Phạm Xuân Hội (2016). Thiết kế vector và chuyển gen OsNAC1 liên quan đến tính chịu hạn vào giống J02 (*Oryza sativa* L. Japonica). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 14 (2): 271–277.

18. Phan Thị Thu Hiền (2012). Khả năng tạo callus và tái sinh cây của tập đoàn 31 giống lúa nương miền Bắc Việt Nam phục vụ công tác chuyển gen. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 10 (4): 567–575.

19. Phan Thị Hương, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Thị Thùy Linh, Nguyễn Trang Hiếu, Ninh Thị Thảo (2014). Xây dựng hệ thống tái sinh *in vitro* trên cây lúa. *Tạp chí Khoa học & Phát triển* 12 (8): 1249–1257.

20. Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xu JJ, Qu JL, Gao C (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31: 686–688.

21. Shan Q, Zhang Y, Chen K, Zhang K, Gao C (2015). Creation of fragrant rice by targeted knockout of the OsBADH2 gene using TALEN technology. *Plant Biotechnol. J.* 13: 791–800.

22. Shao G, Xie L, Jiao G, Wei X, Sheng Z, Tang S, Hu P (2017). CRISPR/CAS9-mediated editing of the fragrant gene Badh2 in rice. *Chin. J. Rice Sci.* 31: 216–222.

23. Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, Yang M, Hakimi S.M, Mo H, Habben JE (2017) ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol. J.* 15: 207–216.

24. Shen L, Wang C, Fu Y, Wang J, Liu Q, Zhang X, Yan C, Qian Q, Wang K (2018). QTL editing confers opposing yield performance in different rice varieties. *J. Inter. Plant Biol.* 60: 89–93.

25. Su Z, Hao C, Wang L, Dong Y, Zhang X (2011). Identification and development of a functional marker of TaGW2 associated with grain weight in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 122: 211–223.

26. Sun Y, Zhang X, Wu C, He Y, Ma Y, Hou H, Guo X, Du W, Zhao Y, Xia L (2016). Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Mol. Plant.* 9: 628–631.

27. Sun Y, Jiao G, Liu Z, Zhang X, Li J, Guo X, Du W, Du J, Francis F, Zhao Y, Xia L (2017). Generation of high amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Front. Plant Sci.* 8: 298.

28. Xing Y, Zhang Q (2010). Genetic and molecular bases of rice yield. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 421–442.

29. Xu R, Yang Y, Qin R, Li H, Qiu C, Li L, Wei P, Yang J (2016). Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. *J. Genet. Genomics* 43: 529–532.

30. Zhou J, Peng Z, Long J, Sosso D, Liu B, Eom JS, Huang S, Liu S, Vera Cruz C, Frommer WB, White FF, Yang B (2015). Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *Plant J.* 82: 632–643.

31. Wang F, Wang C, Liu P, Lei P, Hao W, Gao Y, Liu YG, Zhao K (2016). Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. *PLoS One* 11: e0154027.

THE CURRENT STATUS OF GENOME EDITING TECHNOLOGY (CRISPR/Cas9) FOR IMPROVING TRAITS IN RICE AND PERSPECTIVE IN VIET NAM

Nguyen Tien Dung, La Van Hien

Summary

Development of mutation crops by genetic edition is conventional and an extremely flexible tool for sustainable agricultural production. Whereas, genome editing (GE) has been modified at the molecular as the nucleotide and ensured by specificity of CRISPR/Cas9. This technique is more quick, simple, and high efficiency than ZFNs and TALENs. Various plant-specific CRISPR/Cas9 vector systems have been established for adaptation of this technology to many plant species and successfully applied to model plant as *Arabidopsis thaliana* and other important crops such as soybean and corn. With this potential powerful and innovative technique, the GE plant breeders make valuable materials for mutation breeding. In this review, we summarize the role of CRISPR/Cas9 in plant genome editing and current achievements as well as the potential application for rice genetic improvement related to productivity, quality, and tolerant ability to adverse environmental conditions.

Keywords: *CRISPR/Cas9, mutants, GMO, rice, stress.*

Người phản biện: PGS.TS. Khuất Hữu Trung

Ngày nhận bài: 13/3/2020

Ngày thông qua phản biện: 15/4/2020

Ngày duyệt đăng: 22/4/2020