

Tình hình ứng dụng CRISPR/Cas trong cải thiện di truyền cây nông nghiệp

Lê Thị Ngọc Quỳnh^{1,2}, Chu Đức Hà³, Lê Tiến Dũng³

¹Đại học Tsukuba, Nhật Bản

²Khoa Kỹ thuật Tài nguyên Nước, Đại học Thủy lợi

³Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam
research@letindung.info

Tóm tắt

Biến nạp gen trên thực vật đã trở thành một công cụ nghiên cứu chức năng gen hữu hiệu trong thời gian gần đây. Không những thế, kỹ thuật này còn là chìa khóa trong việc phát triển các thể hệ cây trồng biến đổi gen đang được sử dụng rộng rãi trong canh tác. Trong vài năm trở lại đây, sự phát triển của công nghệ chỉnh sửa hệ gen (genome editing) đã mở ra một cách tiếp cận mới trong cải thiện di truyền cây nông nghiệp. Trong công nghệ chỉnh sửa hệ gen, hệ thống CRISPR/Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat; CAS, CRISPR associated protein) hứa hẹn có tiềm năng ứng dụng lớn nhất. Hệ thống này bao gồm một protein thuộc họ Cas, phổ biến nhất là Cas9. Cas9 sử dụng các RNA dẫn đường để tìm và cắt đặc hiệu sợi đôi DNA. Sự xuất hiện các đứt gãy trên mạch đôi DNA sẽ kích hoạt cơ chế tự sửa chữa DNA của tế bào. Năm 2013, CRISPR/Cas đã có ứng dụng đầu tiên trên đối tượng thực vật. Sau đó, CRISPR/Cas đã được ứng dụng thành công vào một số cây mô hình (*Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*), các cây lương thực quan trọng (đậu tương, lúa gạo, lúa mì, ngô) và hàng loạt đối tượng cây nông nghiệp khác đang được tiến hành nghiên cứu. Trong bài viết này, chúng tôi tóm tắt cơ chế hoạt động của hệ thống CRISPR/Cas và các thành tựu hiện nay cũng như tiềm năng ứng dụng trong cải thiện di truyền cây nông nghiệp quan trọng.

Nhận 15.01.2018
Được duyệt 30.05.2018
Công bố 19.06.2018

Từ khóa

CRISPR, Cas9/gRNA, chỉnh sửa hệ gen, cải thiện di truyền cây trồng, thực vật chuyển gen

© 2018 Journal of Science and Technology - NTTU

1. Quá trình phát triển các phương pháp biến nạp gen trên thực vật

Lịch sử phát triển của kỹ thuật di truyền đã trải qua nhiều giai đoạn khác nhau, trong đó điểm xuất phát được ghi nhận từ năm 1973 khi Cohen và Boyer đã thành công trong việc cắt gen kháng kháng sinh và chuyển vào *E. coli* [1]. Từ đó, sự hoàn thiện và phát triển của kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*, tái sinh cây và chuyển gen đã dẫn đến sự kiện tạo ra cây trồng biến đổi gen (genetically modified crop, GMC) đầu tiên vào năm 1985 [2]. Sau này, kỹ thuật chuyển gen được coi là hệ thống phổ biến cho hai hướng nghiên cứu cơ bản và ứng dụng. Biến nạp gen ngoại lai vào thực vật có thể được thực hiện nhờ nhiều phương pháp khác nhau như sử dụng vector plasmid Ti của vi khuẩn *Agrobacterium*, chuyển gen nhờ súng bắn gen, vi tiêm, nhờ polyethylene glycol hoặc nhờ

xung điện (electroporation). Tuy mỗi phương pháp đều có những ưu, nhược điểm riêng nhưng biến nạp nhờ súng bắn gen và gián tiếp thông qua *Agrobacterium* vẫn là hai phương pháp được sử dụng nhiều nhất [3].

Phương pháp biến nạp sử dụng súng bắn gen

Phương pháp này được phát triển từ năm 1987 bởi nhóm nghiên cứu của Sanford tại Đại học Cornell (Hoa Kỳ), trong đó đã mô tả việc sử dụng hạt kim loại nặng được bao bọc bởi phân tử DNA và đưa vào tế bào đích dưới áp lực cao của dòng khí helium. Đậu tương (*Glycine max*) là cây trồng đầu tiên được chuyển gen nhờ phương pháp này, đến nay đã ghi nhận khá nhiều kết quả có giá trị [4].

Sự kiện biến đổi gen NK603 đang được thương mại hóa trên dòng ngô Roundup Ready™ 2 là kết quả của việc sử dụng súng bắn gen để chuyển gen trực tiếp vào phôi ngô [5]. Cụ thể, đoạn DNA được cắt bởi enzyme *MluI* chứa 2 cassette



biểu hiện gene *cp4 epsps* đã được biến nạp giúp cây ngô chuyển gen có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ glyphosate. Bên cạnh NK603, sự kiện biến đổi gen GA21 chống chịu thuốc diệt cỏ gốc glyphosate cũng được tạo bởi quá trình biến nạp sử dụng súng bắn gen [6]. Ưu điểm lớn nhất của phương pháp súng bắn gen là có thể chuyển gen vào bất kỳ loại tế bào hay mô nào, tuy nhiên cây chuyển gen có thể chứa nhiều bản sao của gen chuyển [7].

Phương pháp biến nạp thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*
 Phương pháp chuyển gen gián tiếp nhờ *Agrobacterium tumefaciens* tạo ra GMC thành công đầu tiên gần như được công bố đồng thời bởi cả 3 nhóm nghiên cứu của tập đoàn Monsanto (Hoa Kỳ), Mary-Dell Chilton (Syngenta, Hoa Kỳ) và Marc Van Montagu (Đại học Ghent, Bỉ) [8]. Nguyên tắc chung là sử dụng vector chuyển gen có nguồn gốc từ Ti plasmid, chọn lọc sau biến nạp bằng kháng sinh, cây tái sinh chuyển gen biểu hiện ổn định tuân theo quy luật phân ly Mendel ở thế hệ con cháu. Hiện nay, hầu như toàn bộ quá trình chuyển gen vào các cây trồng chính như ngô, đậu tương, bông vải (*Gossypium herbaceum*), lúa gạo (*Oryza sativa*) đều được tiến hành thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* [9].

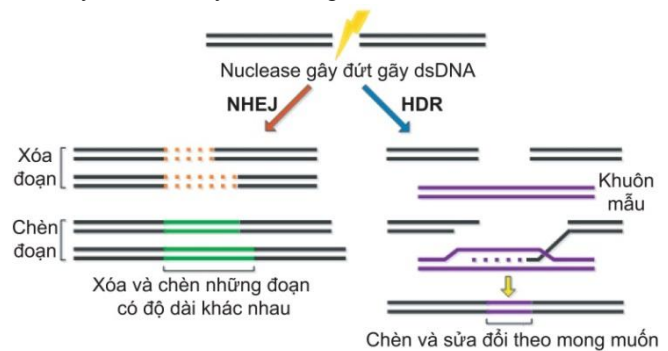
Cây trồng chuyển gen thông qua *Agrobacterium* được thương mại hóa đầu tiên là giống cà chua (*Solanum lycopersicum*) có tên gọi là Flavr Savr, sử dụng công nghệ RNA đối mã (antisense RNA) để điều hòa biểu hiện của enzyme polygalacturonase nhằm kiểm soát quá trình chín chậm [10]. Sự kiện ngô biến đổi gen MON89034 cũng được tạo ra thông qua biến nạp gen gián tiếp nhờ *Agrobacterium*. Cụ thể, sự kiện này đã biến nạp thành công gen mã hóa cho protein Cry phân lập từ *Bacillus thuringiensis*, *cry2Ab2* và *cry1A.105*, dưới sự điều khiển của promoter CaMV35S giúp ngô kháng lại ấu trùng thuộc Bộ cánh vẩy (*Lepidoptera*) [11].

Tuy nhiên, hiệu quả biến nạp thấp được xem là hạn chế lớn nhất của phương pháp chuyển gen gián tiếp này [12]. Để cải thiện nhược điểm đó, một số yếu tố biến nạp đã được xem xét để tối ưu hóa như vật liệu, chủng vi khuẩn biến nạp, thời gian và nhiệt độ đồng nuôi cây [13]. Tiến hành biến nạp 2 gen *gusA* và *bar* vào phôi ngô cho tỷ lệ thành công đạt 12,2% trong điều kiện môi trường đồng nuôi cây có nồng độ muối thấp và có bổ sung L-cysteine và dithiothreitol [14]. Trong nghiên cứu khác, hiệu quả chuyển gen đã đạt tới 50% khi biến nạp 3 gen *npt II*, *bar* và *gusA* đã tạo được giống mía đường (*Saccharum spp.*) có khả năng kháng thuốc diệt cỏ glufosinate với nồng độ 60g/l [15]. Trong hơn 3 thập niên vừa qua, biến nạp gen ngoại lai vào cây trồng đã được nghiên cứu rộng rãi để tạo ra những tính trạng mong muốn, đem lại hiệu quả cao cho sản xuất nông nghiệp như đặc tính kháng sâu bệnh, kháng thuốc trừ cỏ, tăng cường năng suất.

Cho đến nay, GMC và các sản phẩm từ GMC đã được chấp nhận và cho phép nhập khẩu ở nhiều quốc gia trên thế giới. Tuy nhiên, rõ ràng là rất khó kiểm soát việc chèn gen lạ vào genome cây chủ [16]. Hơn nữa, sinh vật biến đổi gen (genetically modified organism, GMO) nói chung vẫn còn đang chịu nhiều tranh cãi về rủi ro an toàn thực phẩm, môi trường và đa dạng sinh học. Những ý kiến trái chiều này đã và đang làm ảnh hưởng đến quá trình ứng dụng hạt giống công nghệ sinh học trong phát triển nông nghiệp bền vững.

2. Cơ chế gây đột biến và đặc điểm của hệ thống CRISPR/Cas

Công nghệ chỉnh sửa genome (genome editing, GE) sử dụng các công cụ phân tử tạo ra một hay nhiều điểm đứt gãy trên một genome đích. Khi xuất hiện các điểm đứt gãy, cơ chế sửa chữa tổn thương của DNA sẽ được kích hoạt. Nhờ đó, điểm đứt gãy có thể được sửa chữa bằng hình thức kết nối không tương đồng (nonhomologous end-joining, NHEJ) hoặc tái tổ hợp tương đồng (homology-directed repair, HDR). Các dạng đột biến được tạo ra khá đa dạng, chủ yếu là đột biến mất đoạn, ngoài ra còn có chèn đoạn, lặp đoạn, đảo đoạn và đột biến điểm. Đột biến xảy ra ở những vùng trình tự có chiều dài khác nhau, làm lệch khung của gen mã hóa hoặc các vị trí điều hòa *cis-* trong vùng khởi động, dẫn đến hiện tượng bất hoạt gen, giúp cho nghiên cứu chức năng gen trong tế bào. Sửa chữa thông qua hình thức HDR chỉ xảy ra khi tại vị trí đứt gãy có mặt các đoạn DNA có trình tự tương đồng với hai đầu đứt gãy, vì thế, phương 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 (Hình 1) [17]. Tuy nhiên, NHEJ lại là cơ chế sửa chữa rất nhanh do không cần đoạn DNA tương đồng nên được tế bào “chọn” ưu tiên sử dụng, điều này giải thích tại sao các nghiên cứu GE đạt được tỷ lệ HDR xảy ra rất thấp.

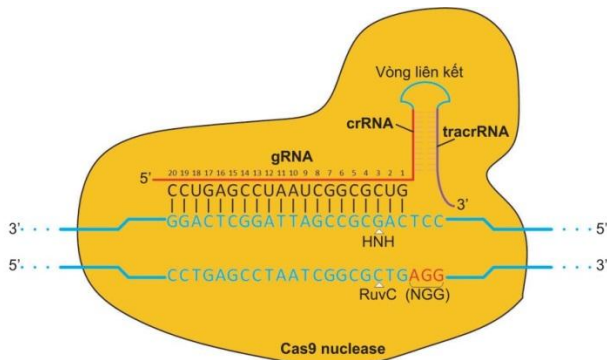


Hình 1. Chỉnh sửa hệ gen nhờ nuclease. Nuclease gây nên đứt gãy mạch đôi DNA (double-strained DNA, dsDNA), dẫn đến quá trình sửa chữa theo cơ chế dựa vào tính tương đồng (homology-directed repair, HDR) hoặc sửa chữa ngẫu nhiên không dựa vào tính tương đồng (nonhomologous end-joining, NHEJ) [17].

Các cấu trúc phân tử dùng cho công nghệ GE ban đầu sử dụng meganuclease, nuclease “ngón tay kẽm” (zinc finger

nuclease, ZFN), nuclease tương tự nhân tố kích hoạt phiên mã (transcription activator - like effector nucleases, TALEN) [16,17]. Gần đây, cấu trúc phân tử dùng cho công nghệ GE đã sử dụng nhóm các đoạn lặp xuôi ngược ngắn giống nhau và cách nhau đều đặn (clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR). CRISPR được chia làm một vài nhóm dựa vào sự tham gia của nuclease Cas và cấu trúc đoạn lặp lại trong CRISPR [18]. Trong đó, phổ biến nhất là CRISPR loại II có sự tham gia của một endonuclease mang vùng tương đồng với enzyme resolvase (RuvC) và vùng Histidine-Asparagine-Histidine (H-N-H domain), được gọi là Cas9 (CRISPR associated protein 9) [16,17,19].

CRISPR/Cas có nguồn gốc từ hệ thống đáp ứng miễn dịch tự nhiên của vi khuẩn, trong đó gen mã hóa nuclease Cas9 có nguồn gốc từ *Streptococcus pyogenes* [20]. CRISPR/Cas hoạt động linh hoạt hơn nhờ RNA dẫn đường (guide RNA, gRNA) tương tác với chuỗi DNA đích để nuclease thực hiện quá trình phân cắt, trong khi ZFN và TALEN lại sử dụng tương tác giữa DNA - protein.



Hình 2. Hệ thống CRISPR/Cas9 để nhận biết và làm đứt gãy vị trí DNA mong muốn.

Nuclease cắt mạch đôi DNA đích có trình tự bổ sung với gRNA. Cas9 chứa 2 vùng RuvC và HNH, mỗi vùng có nhiệm vụ cắt một mạch đơn DNA [17].

Hệ thống CRISPR/Cas9 gồm CRISPR RNA array (crRNA) mã hóa cho phân tử RNA dẫn đường (guide RNA, gRNA) và cần sự hỗ trợ của RNA hoạt hóa CRISPR (trans-activating crRNA, tracrRNA) tạo nên phức hệ crRNA:tracrRNA để kết hợp với nuclease Cas9 [21]. Cas9 và gRNA nhận biết và phân cắt DNA đích nếu đoạn này nằm cạnh một trình tự ngắn đặc trưng cho mỗi loại protein Cas (protospacer adjacent motif, PAM) [17], trong đó, 20 nucleotide ở đầu 5' của gRNA được dùng để xác định vị trí DNA đích theo nguyên tắc kết cặp bổ sung. Trình tự PAM đặc trưng cho Cas9 phổ biến là 5'-NGG (Nucleobase-Guanine-Guanine) (Hình 2) [17].

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

Từ năm 2013, những công bố đầu tiên về ứng dụng CRISPR/Cas chỉnh sửa genome thực vật đã được ghi nhận trên *Arabidopsis thaliana* [22], *Nicotiana benthamiana* [23] và một số cây lương thực quan trọng như lúa gạo [24], cao lương (*Sorghum bicolor*) [25], ngô [26] và lúa mì (*Triticum aestivum*) [27]. Trong đó, hệ thống CRISPR/Cas đã được chứng minh có biểu hiện ổn định trong các thế hệ tiếp theo của *A. thaliana* [28] và lúa gạo [24]. Do đó, CRISPR/Cas đã nhanh chóng được áp dụng rộng rãi trong GE của nhiều loài thực vật (Bảng 1).

Năm 2014, nhóm nghiên cứu của Jia đã sử dụng phương pháp CRISPR/Cas để gây đột biến gen *CsPDS* - mã hóa enzyme phytoene desaturase trên cây cam ngọt (*Citrus sinensis*). Công bố đã ghi nhận tỷ lệ gây đột biến gen *CsPDS* khi sử dụng hệ thống này đạt khoảng 3,2 - 3,9%, không tìm thấy đột biến lệch đích (off-target), kết quả là tạo ra dòng cam ngọt đột biến không xuất hiện đốm trắng trên lá [19]. Trên lúa mì, phương pháp TALEN và CRISPR/Cas đã được sử dụng đồng thời để bất hoạt 3 locus *MLO*, mã hóa cho protein gây ức chế khả năng kháng bệnh phấn trắng. Khi sử dụng CRISPR/Cas, không có dòng đột biến cả 3 allen *TaMLO* được tạo ra (chỉ có 4 dòng mang đột biến ở những vị trí khác nhau của allen *TaMLO-A1*), trong khi phương pháp TALEN đã thu được dòng cây chuyển gen bị bất hoạt 3 allen, *TaMLO-A1*, *TaMLO-B1* và *TaMLOD1*, cây chuyển gen có khả năng kháng lại bệnh phấn trắng [27].

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

#	Gene đích	Đối tượng	Tính trạng mới đem lại	Tham khảo
1	<i>PDS</i>	<i>Citrus sinensis</i>	Kháng lại bệnh đốm trắng trên lá	[19]
2	<i>MLO</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Kháng lại bệnh phấn trắng	[27]
3	<i>DDM1</i> và <i>GFP</i>	<i>Glycine max</i>	Tăng cường sự phát triển bộ rễ	[29]
4	<i>ALS1</i>		Kháng thuốc trừ cỏ có nguồn gốc từ chlorsulfuron	[30]
5	<i>PDS</i> và <i>BADH2</i>	<i>Oryza sativa</i>	Tính trạng lùn và bạch tạng	[31]
6	<i>eIF4E</i>	<i>Cucumis sativus</i>	Kháng virus gây bệnh vàng lá gân xanh trên dưa chuột, potyvirus gây bệnh khảm lá và virus gây bệnh đốm vòng	[32]
7	Gene mã hóa vỏ virus	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Kháng virus gây bệnh xoắn lá trên cà chua	[33]
8	<i>OST2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hạn chế quá trình mở khí khổng khi gặp điều kiện bất lợi	[34]
10	<i>ARGOS8</i>	<i>Zea mays</i>	Tăng cường khả năng chống chịu với điều kiện hạn hán	[35]

Trên *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 dạng đột biến mất đoạn và chèn đoạn. Thế hệ T1 có

tần số đột biến là 71,2%, 58,3% trong thể hệ T2 và 79,4% ở thể hệ T3 [28]. Trên đậu tương, CRISPR/Cas có thể gây đột biến với tỷ lệ khoảng 95% trên 11 locus với mục tiêu tăng cường sự phát triển của bộ rễ [29]. Trong nghiên cứu khác, 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 đoạn nhỏ. Trên ngô, đột biến P178S trên gene *ALS1* tạo ra bằng kỹ thuật GE đã mang lại dòng ngô có khả năng kháng thuốc trừ cỏ có nguồn gốc từ chlorsulfuron [30]. Gần đây, Wang và cộng sự đã sử dụng hệ thống CRISPR/Cas để tác động đến gene *StIAA2* (mã hóa protein Auxin/IAA) trên khoai tây (*Solanum tuberosum*), kết quả thu được 12 dòng T1 cho kết quả dương tính với *Cas9* khi thực hiện PCR phiên mã ngược [36]. Thành công của kỹ thuật GE trên một số đối tượng cây trồng khác được trình bày ở Bảng 1.

4. Tiềm năng ứng dụng CRISPR/Cas và quan điểm của cơ quan quản lý

Tiềm năng ứng dụng của công nghệ GE được công nhận là rất lớn, tuy nhiên kỹ thuật này vẫn còn một vài điểm cần được cải thiện, trong đó việc giảm thiểu đột biến sai đích là quan trọng nhất. Để tăng độ đặc hiệu của CRISPR/Cas, một số nghiên cứu đã tạo ra các biến thể của gRNA chứa từ 1 - 4 nucleotide không có trình tự bổ sung với DNA đích và kiểm tra hoạt tính của nuclease thông qua gen chỉ thị hay các vị trí đích của gen nội sinh. Kết quả cho thấy, các nucleotide không bổ sung nằm ở đầu 5' của biến thể gRNA thì *Cas9* vẫn có khả năng hoạt động. Trong 20 nucleotide thuộc gRNA, chỉ có 8 -12 đơn phân đầu tiên từ đầu 3' đóng vai trò quan trọng trong việc nhận diện đúng mục tiêu, được gọi là trình tự lõi (seed sequence) [17]. Nhìn chung, rất khó để nhận biết với số lượng bao nhiêu nucleotide không bắt cặp bổ sung thì nuclease vẫn có khả năng cắt mạch đôi DNA, và tại sao không bổ sung ở vị trí này thì vẫn phân cắt trong khi ở một số vị trí khác lại không [17]?

Nuclease *Cas9* và gRNA vẫn là vấn đề mới và sự hiểu biết về nó vẫn còn chưa được đầy đủ. Tuy nhiên, các nghiên cứu vẫn cố gắng để khắc phục hiện tượng đột biến lệch mục tiêu của hệ thống CRISPR/Cas. Nhóm nghiên cứu của Fu đã nghiên cứu trên gRNA được làm ngắn lại (17-18 nucleotide), cho thấy tỷ lệ đột biến không mong muốn đã giảm xuống ít nhất 5000 lần [37]. Chiến lược tiếp theo để giảm hiện tượng đột biến sai đích là sử dụng hệ thống cắt kép (double-nicking system), nghĩa là dùng hai *Cas9* nickase riêng lẻ, mỗi nuclease *Cas9* bị bất hoạt một vùng để chỉ có thể nhận biết một mạch và chỉ những trình tự DNA đích được nhận biết đồng thời bởi cặp *Cas9* nickase mới bị cắt trên mạch đôi. Kết quả là giảm đột biến sai mục tiêu từ 50 - 1500 lần, trong khi hiệu quả tạo đột biến chèn và xóa đoạn trên DNA đích vẫn giữ nguyên như nuclease *Cas9* nguyên bản [38].

Sự đơn giản, hiệu quả và khả năng ứng dụng rộng rãi giúp công nghệ GE nhờ gRNA đã trở thành hướng nghiên cứu tiềm năng trong sinh học thực vật. Trình tự DNA có thể bị biến đổi theo mong muốn đã cung cấp những hiểu biết quan trọng về chức năng của chúng. Mặc dù GE vẫn xảy ra những đột biến không mong muốn, tuy nhiên các kết quả thực nghiệm đã chứng minh có nhiều biện pháp hiệu quả để khắc phục nhược điểm này.

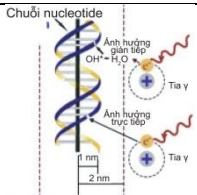
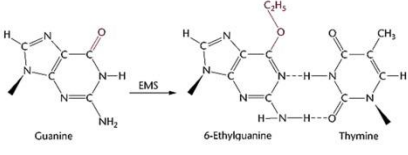
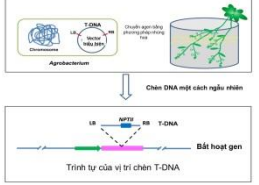
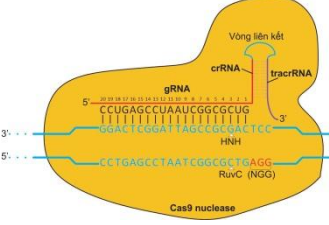
GMC trước khi đưa vào sản xuất đại trà đều phải trải qua quá trình nghiên cứu lâu dài và tốn kém về khía cạnh an toàn với sức khỏe con người và an toàn sinh học với môi trường. Trong bối cảnh đó, kỹ thuật GE (CRISPR/Cas) cho phép chỉnh sửa gene và tạo ra sản phẩm không mang gene chuyển, có thể ứng dụng 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 GE thì những công bố chính thức về cơ chế giám sát cho những sản phẩm của công nghệ GE vẫn còn đang ở giai đoạn khởi đầu [39]. Một số nhà khoa học cho rằng sản phẩm từ kỹ thuật GE nên được áp dụng quy chế giống như những đột biến được tạo ra nhờ phóng xạ hoặc do hóa chất, bởi vì bản chất của chúng giống nhau và không chứa gen ngoại lai (Bảng 2). Bộ Nông nghiệp Mỹ cũng chỉ ra rằng nếu như đột biến được tạo ra dựa theo cơ chế của tự nhiên thì đó không phải là GMO. Bên cạnh đó, khi bất hoạt chức năng gen theo cơ chế tự sửa chữa DNA của tế bào (như trường hợp sửa chữa theo cơ chế NHEJ) thì vẫn không thuộc nhóm GMO. Hệ thống CRISPR/Cas tạo ra thực vật bị đột biến hoàn toàn dựa vào cơ chế này, do vậy cây trồng ứng dụng kỹ thuật GE đã chính thức nằm ngoài danh mục GMO được quy định bởi Bộ Nông nghiệp Mỹ [40]. Năm 2016, một nhóm các tác giả tại Mỹ đã được cấp bằng sáng chế về phương pháp tạo ra cây trồng được chỉnh sửa genome mà không cần chuyển gen. Bên cạnh ngô, nấm ăn sử dụng hệ thống CRISPR cũng có thể được đưa ra thị trường như các sản phẩm không phải GMO khác [40]. Đây được coi là những đối tượng ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas được chấp nhận đầu tiên tại Mỹ. Liên quan đến kỹ thuật GE, chính phủ Canada đã công nhận chính thức cho dòng cải dầu sử dụng đột biến nhờ các đoạn oligonucleotide, trong tương lai sẽ tiếp tục chấp thuận những dòng cây trồng mới sử dụng kỹ thuật GE như hệ thống CRISPR/Cas9 [41]. Tại các nước Châu Âu, GMC được quản lý bởi một hành lang pháp lý rất nghiêm ngặt, nhưng hiện không rõ là cây trồng sử dụng công nghệ GE có chịu sự quản lý hay không? Các nhà khoa học Thụy Điển và Hà Lan đã tỏ thái độ lo ngại khi áp dụng kỹ thuật GE do lo ngại không được chấp nhận thử nghiệm ở quy mô đồng ruộng, thậm chí một số công ty lớn đã rút những khoản đầu tư nghiên cứu và phát triển ra khỏi Châu Âu vì những lý do tương tự [41].

Tuy nhiên, Thụy Điển lại là nước Châu Âu đầu tiên xác nhận cây trồng chỉnh sửa genome nhờ hệ thống CRISPR/Cas không chứa DNA ngoại lai nên không thuộc nhóm cây trồng

GMC và quan điểm này đã nhận được nhiều sự ủng hộ trong giới khoa học (Bảng 2). Tuy nhiên, đa số các quốc gia Châu

Âu vẫn chưa có cơ chế pháp lý rõ ràng cũng như chưa có câu trả lời cho chính thức cho vấn đề này [42].

Bảng 2. Đột biến bằng phương pháp khác nhau được coi là GMO hay không dưới sự hướng dẫn của Ủy ban Châu Âu

Đột biến	Nguyên nhân gây đột biến	Mô tả chi tiết	Ảnh minh họa
A	Đột biến nhờ tia phóng xạ	Đột biến gen do neutron có gia tốc lớn làm đứt gãy DNA, sau đó gen được sửa chữa nhờ cơ chế sửa chữa DNA của tế bào. Trong quá trình sửa chữa, gen bị bất hoạt chức năng. → Không thuộc danh mục GMC do không chứa gen ngoại lai.	
B	Đột biến nhờ hóa chất	Gen có thể được gây đột biến nhờ hóa chất (như ethyl methane sulfonate). Thay đổi một nucleotide cũng có thể dẫn đến rối loạn chức năng của gen. → Không thuộc danh mục GMC do không chứa gen ngoại lai.	
C	Đột biến nhờ chuyển đoạn T-DNA	Đột biến còn được tạo ra nhờ chuyển đoạn T-DNA thông qua vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i> . T-DNA được chèn vào dẫn đến phá hủy gen, làm gen bị bất hoạt. → Thuộc danh mục GMC do chứa T-DNA.	
D	Đột biến nhờ hệ thống CRISPR/Cas9	Hệ thống CRISPR/Cas9 sẽ phá vỡ mạch đôi DNA và gen sẽ được kích hoạt cơ chế sửa chữa. Xóa đoạn DNA giữa đoạn đứt gãy sẽ dẫn đến rối loạn chức năng gen. Đột biến D là đột biến trung gian mà vẫn chứa gen từ hệ thống CRISPR/Cas9. → Thuộc danh mục GMC do chứa T-DNA.	
E		Đột biến E được tạo ra từ đột biến D thông qua quá trình thụ phấn tự nhiên. Theo quy luật di truyền của Mendel, 1/4 số cá thể ở thế hệ kế tiếp sẽ không chứa gene bộ máy của CRISPR/Cas9, những cá thể đó là đột biến E. Chúng hoàn toàn không chứa DNA ngoại lai và chỉ khác chủng đại ở đặc điểm là gen đã bị đột biến xóa đoạn nhỏ. → Chưa được xếp hạng rõ ràng nhưng không chứa gen ngoại lai.	

5. Kết luận

Nhìn chung, CRISPR/Cas là công cụ phân tử giúp thao tác biến đổi di truyền trực tiếp hay gián tiếp trên genome 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 GE 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 với thành tựu khoa học 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.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu trong nhóm của chúng tôi được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia theo đề tài mã số 106-NN.02-2013.46.

Tài liệu tham khảo

1. Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 3240-3244.
2. Horsch R, Fry J, Hoffmann N, Eichholtz D, Rogers Sa, Fraley R (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
3. Rao AQ, Bakhsh A, Kiani S, Shahzad K, Shahid AA, Husnain T, Riazuddin S (2009) The myth of plant transformation. *Biotechnol Adv* 27: 753-763.
4. Aragão F, Sarokin L, Vianna G, Rech E (2000) Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. *Theor Appl Genet* 101: 1-6; Vianna G, Aragão F, Rech E (2011) A minimal DNA cassette as a vector for genetic transformation of soybean (*Glycine max*). *Genet Mol Res* 10: 382-390.
5. Songstad D, Armstrong C, Petersen W, Hairston B, Hinchee M (1996) Production of transgenic maize plants and progeny by bombardment of Hi-II immature embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 32: 179-183.
6. Spencer M, Mumm R, Gwyn J (2000) Glyphosate resistant maize lines (Google Patents); Behr CF, Heck GR, Hironaka C, You J (2014) Corn event pv-zmgt32 (nk603) and compositions and methods for detection thereof (Google Patents).
7. Hadi MZ, McMullen MD, Finer JJ (1996) Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Rep* 15: 500-505.
8. Chilton M-D (2005) Adding diversity to plant transformation. *Nat Biotechnol* 23: 309-310.
9. Van Montagu M (2011) It is a long way to GM agriculture. *Annu Rev Plant Biol* 62: 1-23.
10. Kramer MG, Redenbaugh K (1994) Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The FLAVR SAVR™ tomato story. *Euphytica* 79: 293-297.
11. Anderson HM, Allen JR, Groat JR, Johnson SC, Kelly RA, Korte J, Rice JF (2013) Corn plant and seed corresponding to transgenic event MON89034 and methods for detection and use thereof (Google Patents).
12. Dai S, Zheng P, Marmey P, Zhang S, Tian W, Chen S, Beachy RN, Fauquet C (2001) Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Mol Breed* 7: 25-33.
13. Opabode JT (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnol Mol Biol Rev* 1: 12-20.
14. Vega JM, Yu W, Kennon AR, Chen X, Zhang ZJ (2008) Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. *Plant Cell Rep* 27: 297-305.
15. Manickavasagam M, Ganapathi A, Anbazhagan V, Sudhakar B, Selvaraj N, Vasudevan A, Kasthuriangan S (2004) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. *Plant Cell Rep* 23: 134-143.
16. Weeks DP, Spalding MH, Yang B (2015) Use of designer nucleases for targeted gene and genome editing in plants. *Plant Biotechnol J* 14: 483-495.
17. Sander JD, Joung JK (2014) CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotech* 32: 347-355.
18. Chylinski K, Makarova KS, Charpentier E, Koonin EV (2014) Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res* 42: 6091-6105.
19. Jia H, Wang N (2014) Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS One* 9: e93806.
20. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315: 1709-1712.
21. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8: 2281-2308.
22. Fauser F, Schiml S, Puchta H (2014) Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 79: 348-359.
23. Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JD, Kamoun S (2013) Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotech* 31: 691-693.
24. Zhang H, Zhang J, Wei P, Zhang B, Gou F, Feng Z, Mao Y, Yang L, Zhang H, Xu N (2014) The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J* 12: 797-807.
25. 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.
26. Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C (2014) Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genomics* 41: 63-68.

27. Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu J-L (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotech* 32: 947-951.
28. Feng Z, Mao Y, Xu N, Zhang B, Wei P, Yang D-L, Wang Z, Zhang Z, Zheng R, Yang L (2014) Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 4632-4637.
29. Jacobs TB, LaFayette PR, Schmitz RJ, Parrott WA (2015) Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol* 15: 16.
30. Li Z, Liu Z-B, Xing A, Moon BP, Koellhoffer JP, Huang L, Ward RT, Clifton E, Falco SC, Cigan AM (2015) Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol* 169: 960-970.
31. Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ, Qiu J-L (2013) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotech* 31: 686-688.
32. Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M, Sherman A, Arazi T, Gal-On A (2016) Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol Plant Pathol* 17: 1140.
33. Ali Z, Abulfaraj A, Idris A, Ali S, Tashkandi M, Mahfouz MM (2015) CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome Biol* 16: 238.
34. Osakabe Y, Watanabe T, Sugano SS, Ueta R, Ishihara R, Shinozaki K, Osakabe K (2016) Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants. *Sci Rep* 6: 26685.
35. Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, Yang M, Hakimi SM, Mo H, Habben JE (2016) ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol J* 15: 207-216.
36. Wang S, Zhang S, Wang W, Xiong X, Meng F, Cui X (2015) Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant Cell Rep* 34: 1473-1476.
37. Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK (2014) Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol* 32: 279-284.
38. Ran FA, Hsu PD, Lin C-Y, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154: 1380-1389.
39. Kuzma J, Kokotovich A, Kuzhabekova A (2016) Attitudes towards governance of gene editing. *Asian Biotechnol Dev Rev* 18: 69-92.
40. Waltz E (2016) Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature News* 532: 293.
41. Sprink T, Eriksson D, Schiemann J, Hartung F (2016) Regulatory hurdles for genome editing: process-vs. product-based approaches in different regulatory contexts. *Plant Cell Rep* 35: 1493-1506.
42. Abbott A (2015) Europe's genetically edited plants stuck in legal limbo. *Nature* 528: 319-320.

Progress of CRISPR/Cas as a tool in crop genetic improvement

Le Thi Ngoc Quynh^{1,2}, Chu Duc Ha³, Le Tien Dung³

¹University of Tsukuba, Japan

²Faculty of Water Resource Engineering, Water Resources University

³Agricultural Genetics Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences

research@letindung.info

Abstract In the last 30 years, plant genetic transformation has become an indispensable tool for functional genomic studies. Moreover, this technique was also the key in the development of genetically modified crops which have been widely adopted by growers in 28 countries. Recently, the development of genome-editing tools has opened up a new approach for crop genetic improvement. In genome-editing technologies, CRISPR/Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat; CAS, CRISPR associated protein) is the most promising tool. The CRISPR/Cas system employs an endonuclease belong to Cas protein family in which Cas9 endonuclease is the most explored Cas protein. The RNA-guided nuclease induces sequence-specific double-strand breaks stimulates cellular DNA repair mechanisms and mediates genetic modification. In 2013, the first successful application of CRISPR/Cas9-based genome editing was reported. After that, CRISPR/Cas9 has been used widely in model plants (*Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*) and crops (soybean, wheat, rice, maize). In this review, we summarized the mechanism of action of CRISPR/Cas and recent progress in plants functional genomic studies as well as the potentials of this technology in improving agronomic traits in crop plants via genetic gain.

Keywords CRISPR, Cas9/gRNA, genome editing, crop improvement, transgenic plants.

