

## ỨNG DỤNG CRISPR/Cas9

# TẠO RA GIỐNG CÀ CHUA CÓ HÀM LƯỢNG AXIT AMIN CAO

TS Đỗ Tiến Phát, TS Nguyễn Xuân Cường, ThS Nguyễn Hồng Nhung

Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Hiện nay, hệ thống chỉnh sửa hệ gen CRISPR/Cas9 đã được phát triển và ứng dụng trên nhiều đối tượng thực vật khác nhau. Hệ thống này đang được xem là công cụ hiệu quả nhất trong cải tạo giống cây trồng. Ứng dụng CRISPR/Cas9, các nhà khoa học thuộc Viện Công nghệ Sinh học (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) đã cho ra đời sản phẩm cà chua đột biến có hàm lượng đường và axit amin tăng gấp 2 lần so với giống cà chua truyền thống. Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam tạo ra đột biến trên các nguồn gen tiềm năng của giống cà chua trong nước.

### Tiềm năng của công nghệ chỉnh sửa gen

Gần đây, công nghệ chỉnh sửa hệ gen đã mang lại nhiều thành tựu to lớn trong nghiên cứu cơ bản cũng như cải tạo giống cây trồng nhờ tính hiệu quả và chính xác. Điểm đặc biệt của hệ thống chỉnh sửa hệ gen là các đột biến tạo được có thể tách biệt khỏi gen chuyển và mang đặc điểm tương tự các dòng đột biến thông qua những phương pháp truyền thống. Tại một số quốc gia, chính sách quản lý đối với cây trồng chỉnh sửa gen cũng được đổi mới nhanh chóng trong vài năm gần đây. Ấn Độ và Trung Quốc (hai quốc gia có quy mô dân số lớn nhất thế giới) đã cho phép việc trồng trọt và canh tác cây trồng chỉnh sửa gen. Những nền sản xuất nông nghiệp hàng đầu thế giới như Mỹ, Trung Quốc, Ấn Độ, Brazil cũng đã mở cửa hoặc tuyên bố ý định mở cửa đối với các sản phẩm nông nghiệp thương mại có nguồn gốc chỉnh sửa gen. Một vài nước thuộc châu Âu, thị trường nhập khẩu một lượng lớn

các sản phẩm nông nghiệp trên toàn thế giới cũng đã có quy định cho phép một vài sản phẩm chỉnh sửa gen được miễn các quy định nghiêm ngặt đối với cây trồng biến đổi gen (GMO) bao gồm cả việc dán nhãn. Từ đó cho thấy, con đường để thực vật chỉnh sửa gen trở thành sản phẩm thương mại, được thị trường chấp nhận đang ngày càng rút ngắn lại.

Cà chua là một trong những loại rau chủ lực của nhiều nước nông nghiệp. Sản lượng cà chua luôn tăng qua các năm, tính đến năm 2019, cà chua đã chiếm 22% tổng sản lượng rau trên toàn thế giới. Ở Việt Nam, việc tiêu thụ cà chua tươi rất phổ biến và ước tính chiếm khoảng 20% tổng lượng rau tiêu thụ. Các giống cà chua thương mại hiện nay đã trải qua thời gian dài chọn lọc, thuần hóa, lai tạo từ cà chua dại nên thường có hương vị kém hấp dẫn, chủ yếu được sử dụng cho chế biến. Đối với cà chua nói riêng và các loại quả nói chung, hàm lượng đường và axit amin là những chỉ tiêu quan trọng để đánh giá chất

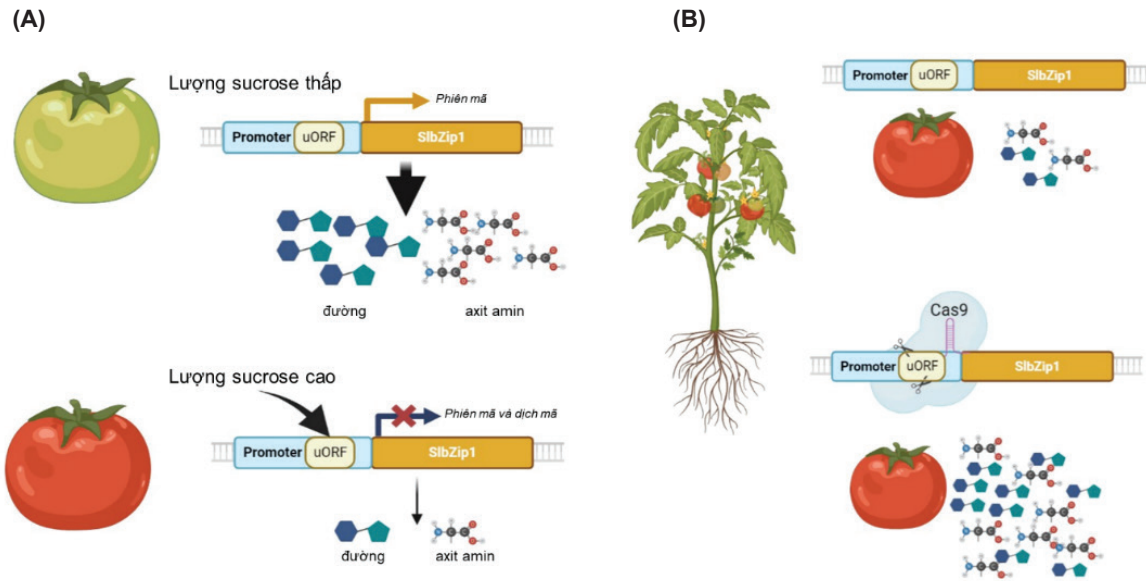
lượng. Để cải thiện chất lượng quả cà chua, một số phương pháp chọn tạo giống truyền thống đã được áp dụng, tuy nhiên yêu cầu thời gian thực hiện kéo dài và có thể kèm theo một số tính trạng không mong muốn.

### Dòng cà chua có hàm lượng đường và axit amin tăng gấp 2 lần

Sử dụng công nghệ gen tác động tới cơ chế cảm ứng, điều hòa và hoạt động của các enzyme trong các con đường sinh tổng hợp và tích lũy các hợp chất khác trong cây là hướng đi triển vọng góp phần nâng cao chất lượng các loại quả. Từ hướng đi này, nhóm nghiên cứu thuộc Viện Công nghệ Sinh học đã tiến hành xác định thông tin gen *SibZIP1* (một gen mã hóa cho yếu tố điều hòa hoạt động của gen và enzyme trong quá trình sinh tổng hợp đường và axit amin trên cây cà chua) - hình 1.

Khác với thực phẩm biến đổi gen, các dòng cà chua đột biến được tạo bằng công nghệ CRISPR/Cas9 có khả năng di

## Khoa học - Công nghệ và Đổi mới sáng tạo



Hình 1. (A) Sự chi phối của vùng trình tự phía trước (uORF) trên gen *SlbZIP1* đến quá trình chuyển hóa, tích lũy đường và axit amin trong quả chín; (B) Mô phỏng phương pháp chỉnh sửa gen tạo cây cà chua đột biến. Promoter: vùng khởi động phiên mã của gen *SlbZIP1*, uORF: trình tự dịch mã phía trước gen *SlbZIP1*.

truyền ổn định ở các thế hệ tiếp theo và có thể không mang theo bất cứ trình tự ADN ngoại lai nào trong hệ gen. Qua đó, nhóm nghiên cứu đã phát triển hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 mang hai trình tự định hướng gRNA để tạo ra các đột biến có mục tiêu trong các vùng uORF của gen. Công nghệ này giúp chỉnh sửa chính xác các trình tự gen nhằm tạo ra các tính trạng mong muốn ở cây trồng. Chúng được xem là phương pháp nhanh và hiệu quả hơn nhiều so với các phương pháp chọn tạo giống truyền thống.

Trong quá trình thực hiện, nhóm nghiên cứu đã xây dựng hệ thống vector CRISPR/Cas9 hiệu suất cao để tiến hành chỉnh sửa vùng gen quan tâm và thu nhận được các dòng đột biến ổn định từ giống cà chua Việt Nam. Thông qua các phân tích đánh giá về sinh trưởng, hình thái và năng suất, nhóm nghiên cứu cũng đã phát hiện ra đột biến tạo



Hình 2. Sinh trưởng của các dòng cà chua đột biến và quả cà chua của các dòng này.

được trên vùng uORF trên gen *SlbZIP1* không làm ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây cà chua (hình 2). Trong khi đó, độ Brix (giá trị xác định hàm lượng chất rắn hòa tan tổng số) ở các dòng đột biến tăng 12,8-45,39% so với giống

gốc ban đầu, tổng hàm lượng đường hexose tích lũy trong quả cũng cao hơn hẳn (3,34/100 g) so với giống gốc (2,43/100 g). Đặc biệt, hàm lượng axit amin tổng số trong quả của các dòng đột biến *SlbZIP1*-uORF đều tăng cao hơn nhiều so với quả của giống

**Bảng 1. Hàm lượng các axit amin trong quả cà chua chín (trung bình ± sai số chuẩn).**

Axit amin (mg/100g)	Giống gốc	Dòng đột biến 9.1a	Dòng đột biến 14.1	Dòng đột biến 15.2
Aspartic acid	56,86±6,63 <sup>a</sup>	138,76±5,16 <sup>c</sup>	98,97±15,14 <sup>b</sup>	130,05±13,9 <sup>bc</sup>
Serine	13,01±1,93 <sup>a</sup>	17,26±0,94 <sup>ab</sup>	27±3,12 <sup>c</sup>	22,12±2,23 <sup>bc</sup>
Glutamic acid	144,03±12,66 <sup>a</sup>	379,39±9,6 <sup>b</sup>	302,7±39,33 <sup>b</sup>	389,73±52,19 <sup>b</sup>
Glycine	20,2±2,73 <sup>a</sup>	25,22±2,06 <sup>ab</sup>	36,55±3,37 <sup>c</sup>	31,82±3,45 <sup>bc</sup>
Histidine	12,88±2,23 <sup>a</sup>	14,79±0,88 <sup>ab</sup>	17,69±0,48 <sup>c</sup>	16,23±1,28 <sup>ab</sup>
Arginine	200,63±30,69 <sup>a</sup>	391,41±54,28 <sup>a</sup>	326,95±59,4 <sup>a</sup>	740,61±113,61 <sup>b</sup>
Threonine	10,37±1,01 <sup>a</sup>	14,41±0,29 <sup>b</sup>	16,61±1,17 <sup>b</sup>	16,89±0,86 <sup>b</sup>
Alanine	24,9±2,75 <sup>a</sup>	29,81±0,61 <sup>ab</sup>	49,43±8,71 <sup>c</sup>	40,16±3,34 <sup>bc</sup>
Proline	10,75±1,2 <sup>a</sup>	14,99±0,08 <sup>b</sup>	22,04±2,18 <sup>c</sup>	19,43±1,27 <sup>c</sup>
Tyrosine	19,02±4,02 <sup>a</sup>	23,47±3,76 <sup>a</sup>	28,23±1,42 <sup>a</sup>	26,04±2,47 <sup>a</sup>
Valine	15,11±1,77 <sup>a</sup>	20,7±0,44 <sup>ab</sup>	26,91±2,7 <sup>c</sup>	25,92±2,09 <sup>bc</sup>
Methionine	4,81±1,15 <sup>a</sup>	8,51±0,86 <sup>b</sup>	6,18±1,04 <sup>ab</sup>	5,8±0,36 <sup>ab</sup>
Lysine	14,45±3,99 <sup>a</sup>	24,41±3,04 <sup>ab</sup>	27,16±4,71 <sup>b</sup>	31,13±1,49 <sup>b</sup>
Isoleucine	13,28±1,68 <sup>a</sup>	19,1±0,96 <sup>b</sup>	23,02±2,4 <sup>b</sup>	22,59±2,08 <sup>b</sup>
Leucine	129,83±34,03 <sup>a</sup>	124,16±19,25 <sup>a</sup>	118,29±3,55 <sup>a</sup>	107,1±6,51 <sup>a</sup>
Phenylalanine	25,17±5,62 <sup>a</sup>	30,58±4,85 <sup>a</sup>	31,83±1,91 <sup>a</sup>	34,26±2,68 <sup>a</sup>
Tổng số	715,28±14,12 <sup>a</sup>	1276,96±29,79 <sup>b</sup>	1159,55±23,69 <sup>b</sup>	1659,86±45,97 <sup>c</sup>

a, b, c: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu phân tích.

gốc (62,11-132,05%), sự thay đổi được ghi nhận trên hầu hết các loại axit amin thiết yếu (bảng 1).

Kết quả đánh giá hàm lượng axit amin ở bảng 1 cho thấy, tất cả các chỉ số của dòng cà chua đột biến đều có chất lượng cao hơn so với giống ban đầu, điều này chứng tỏ nhóm nghiên cứu đã thành công khi tạo ra loại cà chua có hàm lượng đường và axit amin tăng gấp 2 lần (1659,86±45,97/715,28±14,12) bằng công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9.

\*  
\* \*

Đây là nghiên cứu đầu tiên trên thế giới cũng như ở Việt Nam về ứng dụng CRISPR/Cas9 để tạo đột biến định hướng trên vùng uORFs của gen *SibZIP1* trên cây

cà chua. Kết quả nghiên cứu đã được công bố trên Tạp chí *Planta* của Springer Nature (tạp chí uy tín về công nghệ sinh học thực vật thuộc nhóm Q1 trong cơ sở dữ liệu của Web of Science). Thành công này cho thấy, các nhà khoa học Việt Nam đã sớm làm chủ công nghệ CRISPR/Cas9, phát triển các phương pháp đánh giá được cấu trúc chỉnh sửa gen, đồng thời mở ra tiềm năng to lớn trong cải tạo chất lượng cũng như các tính trạng quan trọng khác trên cây cà chua, mở rộng khả năng ứng dụng trên các cây trồng chủ lực khác ở nước ta.

Việc phát triển thành công dòng cà chua đột biến có chất lượng nâng cao hơn so với cà chua truyền thống mang lại nhiều ý nghĩa quan trọng đối với khoa học, môi trường và xã hội. Cụ thể,

về khoa học: việc áp dụng công nghệ chỉnh sửa gen trong nghiên cứu và phát triển giống cây cà chua đã mang lại những triển vọng trong việc giảm thiểu sử dụng phân bón và thuốc trừ sâu hóa học, tăng khả năng chống chịu với sâu bệnh và điều kiện thời tiết khắc nghiệt của cây cà chua. Về mặt xã hội, sản phẩm cà chua đột biến cung cấp thêm sự lựa chọn tốt cho sức khỏe của người tiêu dùng, giúp người nông dân nâng cao thu nhập.

Trong thời gian tới, nhóm nghiên cứu mong muốn Việt Nam sẽ có các chính sách cụ thể trong công tác quản lý cây trồng chỉnh sửa gen để tạo hành lang pháp lý cho việc thúc đẩy công tác phát triển giống cây trồng phục vụ nhu cầu sản xuất và tiêu dùng.