

Sàng lọc và tuyển chọn một số dòng lúa chỉnh sửa gen *GS3* bằng CRISPR/Cas9

Nguyễn Tiến Dũng^{1*}, Trương Thanh Tùng¹, Đào Minh Lệ¹, Nguyễn Đức Huy¹, Lê Văn Hiền¹,
Bùi Tri Thức¹, Nguyễn Xuân Vũ¹, Ngô Xuân Bình^{1,2}, Cao Lệ Quyên³

¹Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

²Bộ Khoa học và Công nghệ

³Viện Di truyền Nông nghiệp

Ngày nhận bài 11/8/2021; ngày chuyển phản biện 16/8/2021; ngày nhận phản biện 17/9/2021; ngày chấp nhận đăng 23/9/2021

Tóm tắt:

Kết quả sàng lọc 41 dòng lúa T_0 chỉnh sửa gen *GS3* ở giống Bắc Thơm 7 bằng PCR thu được 38 dòng mang đoạn gen mã hóa protein Cas9. Phân tích đột biến, xác định được dòng D1 và D25 mất 2 nucleotides T, C ở vị trí 127 và 128 so với trình tự ban đầu. Các dòng đột biến có kích thước hạt dao động đáng kể (dài 0,68-0,97 cm, rộng 0,21-0,27 cm), trong đó 15 dòng có kích thước hạt lớn hơn (0,86-0,97 cm) và 4 dòng có kích thước nhỏ hơn so với đối chứng. Khối lượng 1.000 hạt của các dòng dao động từ 13,6 đến 22,6 g. Trong đó, 10 dòng có khối lượng 1.000 hạt cao hơn (19,22-22,6 g) so với đối chứng (17,9 g). Kết quả này bước đầu cho thấy, đột biến gen *GS3* đã làm tăng kích thước hạt ở giống lúa Bắc Thơm 7. Tuy nhiên, cần có thêm các phân tích chức năng đột biến ở các dòng khác nhau cũng như đánh giá các đặc điểm nông sinh học khác của các dòng lúa có triển vọng trên.

Từ khóa: Bắc Thơm 7, chỉnh sửa gen, CRISPR/Cas9, đột biến, gen *GS3*.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Lúa là cây trồng chủ lực cung cấp nguồn lương thực chính cho nhu cầu trong nước và xuất khẩu. Vì vậy, công tác chọn tạo giống lúa luôn được các nhà khoa học quan tâm và đã đạt được những thành tựu đáng kể, giúp đưa Việt Nam trở thành một trong những nước xuất khẩu gạo hàng đầu thế giới. Tuy nhiên, nhiều nhà khoa học cho rằng, sản xuất lúa gạo ở nước ta chưa thực sự tương xứng với tiềm năng và thường gặp phải những khó khăn như: thiếu giống tốt có năng suất, chất lượng cao, ổn định và có khả năng chống chịu với điều kiện ngoại cảnh...

Chọn tạo giống lúa theo định hướng ở nước ta đã được chú trọng hơn trong thời gian gần đây. Tuy nhiên, các phương pháp chủ yếu vẫn thông qua lai tạo truyền thống, xử lý đột biến, chọn lọc và tuyển chọn các dòng nhập nội, đồng thời mất nhiều thời gian và chi phí để tạo ra giống mới. Đến nay, một số kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại đã được ứng dụng trong chọn tạo giống lúa như chỉ thị phân tử DNA, MAS... [1, 2]. Mặc dù, các phương pháp này đã phần nào giúp nâng cao hiệu quả chọn tạo giống lúa nhưng vẫn còn những hạn chế nhất định.

Những năm gần đây, công nghệ chỉnh sửa hệ gen CRISPR với sự tham gia của enzyme Cas9 đã cho thấy hiệu quả tốt trong chọn tạo giống cây trồng. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh hệ thống CRISPR có thể tạo ra các đột biến đích di truyền qua các thế hệ. Ưu điểm nổi bật của công

nghệ này là tạo ra các đột biến gen đích một cách chính xác mà không cần sự có mặt của gen ngoài, vì thế có tính an toàn sinh học cao hơn các cây trồng chuyển gen [3]. Kỹ thuật này được đánh giá là hệ thống chỉnh sửa hệ gen đơn giản, chính xác và hiệu quả nhất tính tới thời điểm hiện tại, là bước tiến mới trong chọn tạo giống lúa ở nhiều nước trên thế giới [4].

Ở lúa, năng suất là tính trạng do nhiều gen chi phối và được xác định bởi các yếu tố như số bông/cây, số hạt/bông, tỷ lệ hạt chắc/bông và khối lượng 1.000 hạt [5]. Cải thiện tính trạng năng suất bằng cách can thiệp trực tiếp vào các gen liên quan là cách tiếp cận mang lại hiệu quả cao. *GS3* là gen trội nằm trên nhiễm sắc thể số 3, mã hóa cho protein xuyên màng gồm 4 vùng: kiểm soát kích thước (OSR), xuyên màng, thụ thể hoại tử khối u giàu cysteine (TNFR/NGFR) và VWFC kết thúc [6]. Gen *GS3* có vai trò kiểm soát kích thước hạt, khi gen này bị đột biến mất chức năng sẽ làm cho hạt gạo dài hơn ở giống lúa Minghui63 [7]. Li và cs (2016) [8] gây đột biến độc lập 4 gen kiểm soát số lượng hạt/bông (*Gn1a*), cấu trúc bông (*DEP1*), kích thước hạt (*GS3*) và cấu trúc cây (*IPA1*) bằng kỹ thuật CRISPR/Cas9 đã thu được các dòng đột biến có số hạt, chiều dài bông tăng và kích thước hạt lớn hơn so với đối chứng. Tương tự, Xu và cs (2016) [9] gây đột biến đồng thời cả 3 gen liên quan đến khối lượng hạt (*GW2*, *GW5*, *TGW6*) đã làm tăng trọng lượng hạt lên 29,3%. Các kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy, gây đột biến gen *GS3* có khả năng làm tăng năng suất hiệu quả ở lúa [10, 11].

*Tác giả liên hệ Email: nguyentientung@tuaf.edu.vn

Screening and detecting *GS3* mutant-rice lines generated by CRISPR/Cas9 technology

Tien Dung Nguyen^{1*}, Thanh Tung Truong¹,
Minh Le Dao¹, Duc Huy Nguyen¹,
Van Hien La¹, Tri Thuc Bui¹, Xuan Vu Nguyen¹,
Xuan Binh Ngo^{1,2}, Le Quyen Cao³

¹Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

²Ministry of Science and Technology (MOST)

³Agricultural Genetics Institute

Received 11 August 2021; accepted 23 September 2021

Abstract:

Screening 41 *GS3* putative-edited T_0 rice lines of Bac Thom 7 cultivar by PCR, obtained 38 lines carrying the gene encoding Cas9 protein. Sequencing analysis identified two lines D1 and D25, having two nucleotides T, C deleted at positions 127 and 128 as compared to the original sequence. The target mutant lines expressed a significant variation in grain size, from 0.68 to 0.97 cm in length and 0.21 to 0.27 cm in width, of which 15 lines exhibited their larger grain size (from 0.86 to 0.97 cm), and 4 lines were smaller than the control. The 1,000-grain weight ranged from 13.6 to 22.6 g. In which, ten lines showed a higher 1,000-grain weight of 19.22-22.6 g than the control of 17.9 g. This indicated that *GS3* gene mutation has increased grain size in Bac Thom 7 cultivar. However, there is still a need to further analyse the function of mutant lines as well as evaluate other agro-biological characteristics of these promising rice lines.

Keywords: Bac Thom 7, CRISPR/Cas9, gene editing, *GS3* gene, mutation.

Classification number: 4.6

Ở Việt Nam, một số nhà khoa học đã tiếp cận và ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 ở một số đối tượng cây trồng như lúa, đậu tương [12, 13]. Trong khuôn khổ hợp tác nghiên cứu với Đại học Quốc gia Kyungpook Hàn Quốc, chúng tôi đã ứng dụng công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 để gây đột biến gen *GS3* liên quan đến kích thước hạt và đã tạo ra được các dòng lúa chỉnh sửa gen [13]. Bài báo trình bày kết quả sàng lọc và tuyển chọn các dòng đột biến gen *GS3* có triển vọng nhằm làm vật liệu cho công tác tạo giống lúa năng suất cao phục vụ sản xuất.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

41 dòng lúa thế hệ T_0 chỉnh sửa gen *GS3* từ giống Bắc Thom 7. Các dòng lúa được trồng riêng rẽ thành từng chậu có kích thước 40x32 cm. Sử dụng đất phù sa phối trộn với 1 kg phân chuồng + 100 g NPK (5:10:3) cho từng chậu trước khi trồng. Cây được trồng trong điều kiện nhà lưới với các chế độ chăm sóc như nhau.

Các hóa chất: CTAB, chlorophyll, isoamyl, isopropanol của Hãng Merck (www.sigmaaldrich.com). Hóa chất PCR được cung cấp bởi Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa (www.phusabiochem.com).

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số: ADN tổng số được tách từ lá cây lúa chuyển gen theo phương pháp CTAB của Xu và cs (2005) [14] với một số thay đổi. 100 mg mẫu lá non được nghiền thành bột mịn trong nitor lỏng. Bổ sung 700 μ l đệm CTAB mỗi ống, lắc đều trong 15 giây rồi ủ ở 65°C trong 30 phút. Ống được ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút và thu 600 μ l dịch pha trên. Bổ sung 600 μ l dung dịch chloroform:isoamylalcohol (tỷ lệ 24:1) vào mỗi ống, lắc đều và ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Thu 500 μ l dịch, bổ sung isopropanol vào ống theo tỷ lệ 1:1. Tiến hành ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 15 phút để thu tủa DNA. Tủa DNA được rửa trong 500 μ l ethanol 70% và được làm khô ở nhiệt độ phòng. DNA tinh sạch được hòa tan bằng 50 μ l TE để sử dụng cho nghiên cứu.

PCR kiểm tra sự có mặt cấu trúc biểu hiện gen chuyển: để kiểm tra sự tồn tại của cấu trúc biểu hiện gen chuyển trong các dòng lúa, tiến hành PCR nhân bản đoạn gen mã hóa protein Cas9 bằng cặp mồi pUbiCas9-For/pUbiCas9-Rev (bảng 1). Phản ứng PCR được thực hiện trong 20 μ l với chu trình nhiệt biến tính 1 ở 95°C, 2 phút; biến tính 2 ở 94°C, 30 giây; gắn mồi 55°C, 30 giây; kéo dài 72°C, 30 giây; kéo dài 72°C, 5 phút; kết thúc 10°C. Sản phẩm được khuếch đại trong 30 chu kỳ. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

Bảng 1. Môi sử dụng cho PCR kiểm tra dòng lúa chỉnh sửa gen.

Tên môi	Trình tự môi (5'-3')	Kích thước sản phẩm
pUbi-Cas9-Rev	GACCATGTCTAACTGTC	355 bp
pUbi-Cas9-For	CTTTTCTCTTAGGTTAC	

Đánh giá đặc điểm hình thái hạt:

Kích thước hạt: chiều dài và chiều rộng của hạt được đo bằng phần mềm ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Đo ngẫu nhiên 50 hạt/dòng. Đo 3 mẫu để tổng hợp số liệu trung bình.

Khối lượng 1.000 hạt: cân khối lượng của 1.000 hạt chắc bằng cân điện tử (lẻ đến 4 số). Cân 3 lần lặp lại và lấy số liệu trung bình.

Xử lý số liệu

Số liệu thống kê được xử lý bằng phần mềm Excel và SAS 4.0.

Kết quả và bàn luận

Sàng lọc cây chuyển gen bằng PCR

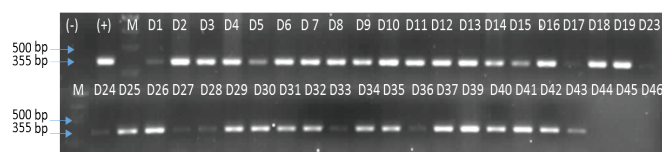
Các dòng lúa chuyển gen T_0 được sàng lọc bằng PCR dựa trên sự có mặt của gen mã hóa protein Cas9. Theo thiết kế cặp môi pUbiCas9-For/pUbiCas9-Rev sẽ khuếch đại đoạn gen Cas9 có kích thước 355 bp.

Kết quả điện di sản phẩm PCR của 41 dòng lúa thu được 38 dòng cho 1 băng đặc hiệu với kích thước khoảng 355 bp, đúng với dự đoán theo lý thuyết. 3 dòng không xuất hiện băng tương ứng với kích thước gen Cas9 gồm D44, D45 và D46 (bảng 2, hình 1). Điều đó chứng tỏ rằng các dòng này không phải dòng chuyển gen. Các dòng dương tính với gen Cas9 được tiếp tục theo dõi và đánh giá.

Bảng 2. Kết quả phân tích các dòng lúa chỉnh sửa gen bằng PCR gen Cas9.

Dòng	Cas9	Dòng	Cas9	Dòng	Cas9	Dòng	Cas9	Dòng	Cas9
D1	+	D10	+	D18	+	D30	+	D39	+
D2	+	D11	+	D19	+	D31	+	D40	+
D3	+	D12	+	D23	+	D32	+	D41	+
D4	+	D13	+	D24	+	D33	+	D42	+
D5	+	D14	+	D25	+	D34	+	D43	+
D6	+	D15	+	D26	+	D35	+	D44	-
D7	+	D16	+	D27	+	D36	+	D45	-
D8	+	D17	+	D28	+	D37	+	D46	-
D9	+								

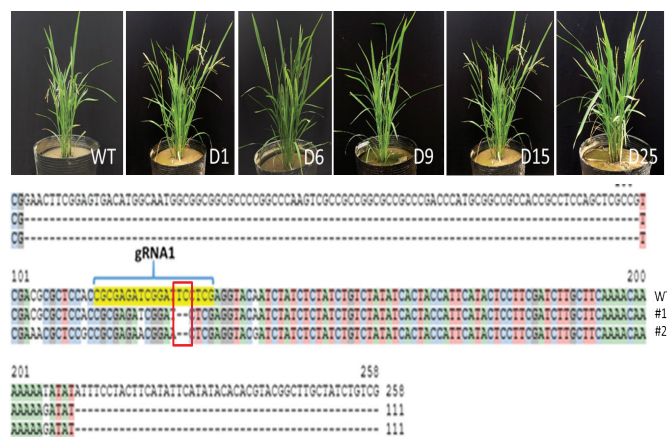
Ghi chú: Cas9: gen mã hóa protein Cas9; +: dương tính; -: âm tính.



Hình 1. Kết quả sàng lọc các dòng lúa chỉnh sửa gen bằng PCR. Marker: 1 kb (M); (-): đối chứng âm; (+): đối chứng dương; D1-D45: các dòng lúa chuyển gen.

Xác định trình tự đột biến

Để xác định trình tự đột biến gen *GS3* bởi cấu trúc vector cas9, chúng tôi tiến hành giải trình tự vùng gen mục tiêu đối với 5 dòng lúa có kết quả dương tính với gen mã hóa Cas9, gồm D1, D6, D9, D15 và D25. Kết quả xác định được 2 dòng D1 và D25 bị đột biến mất 2 nucleotides T, C ở vị trí 127 và 128 trên nhiễm sắc thể số 3 so với trình tự gốc ban đầu (WT, hình 2). Kết quả này cho thấy, cấu trúc vector Cas9 đã gây đột biến vùng gen mục tiêu *GS3* như thiết kế.



Hình 2. Cây chỉnh sửa gen và trình tự GS3 chỉnh sửa dòng D1 và D25. Trình tự gen mục tiêu (màu vàng) đã bị mất 2 nucleotides T, C ở vị trí 127 và 128 ở dòng D1 và D25 so với trình tự ban đầu (WT).

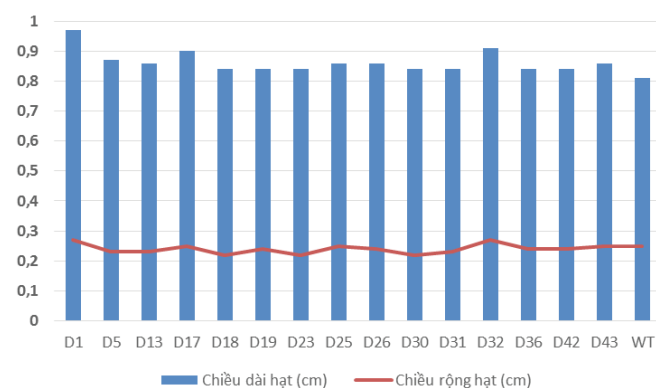
Kích thước hạt của các dòng lúa đột biến

Kết quả đo đếm ở các dòng chỉnh sửa gen cho thấy, chiều dài hạt dao động từ 0,68 đến 0,97 cm (trung bình 0,81 cm), chiều rộng từ 0,21 đến 0,27 cm (trung bình 0,24 cm), tỷ lệ dài/rộng đạt 3,43 (bảng 3, hình 3). Nhìn chung, các dòng chỉnh sửa gen chủ yếu biến động về chiều dài hạt. Trong số 38 dòng, chúng tôi thu được 15 dòng có chiều dài lớn hơn so với đối chứng, dao động từ 0,86 đến 0,97 cm, 4 dòng có hạt ngắn hơn gồm D9-11 và D41, dao động từ 0,68 đến 0,75 cm (bảng 3, hình 3). Khối lượng 1.000 hạt cũng có sự biến động, trong đó 10 dòng có khối lượng 1.000 hạt từ 19,22-22,6 g cao hơn so với đối chứng 17,9 g, các dòng còn lại có khối lượng 1.000 hạt tương đương hoặc thấp hơn so với đối chứng (bảng 3, hình 4A).

Bảng 3. Kích thước hạt của các dòng lúa chỉnh sửa gen.

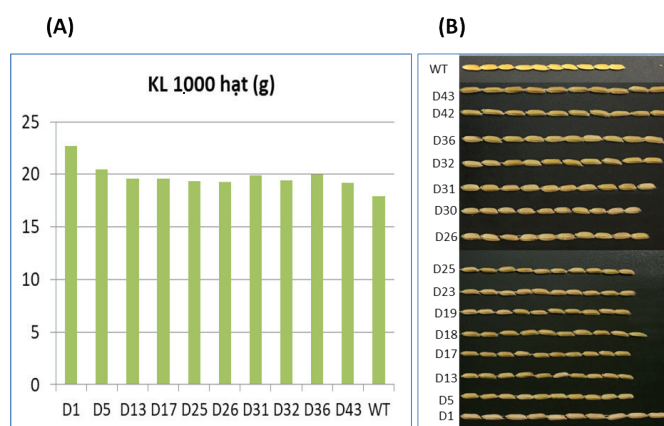
Dòng	Chiều dài (cm)	Chiều rộng (cm)	Dài/ rộng	Khối lượng 1.000 hạt (g)	Dòng	Chiều dài (cm)	Chiều rộng (cm)	Dài/ rộng	Khối lượng 1.000 hạt (g)
D1	0,97*	0,27 ^{ns}	3,59	22,66*	D27	0,79 ^{ns}	0,23 ^{ns}	3,43	15,06*
D2	0,81 ^{ns}	0,25 ^{ns}	3,24	17,24 ^{ns}	D28	0,79 ^{ns}	0,23 ^{ns}	3,43	15,39*
D3	0,79 ^{ns}	0,22*	3,59	16,4*	D30	0,84*	0,22*	3,77	15,46*
D4	0,77 ^{ns}	0,23 ^{ns}	3,35	16,4*	D31	0,84*	0,23 ^{ns}	3,65	19,91*
D5	0,87*	0,23*	3,61	20,5*	D32	0,90*	0,27 ^{ns}	3,37	19,42*
D6	0,77 ^{ns}	0,22*	3,5	16,41*	D33	0,77 ^{ns}	0,23 ^{ns}	3,35	14,46*
D7	0,78 ^{ns}	0,22*	3,55	16,18*	D34	0,81 ^{ns}	0,24 ^{ns}	3,38	14,68*
D8	0,79 ^{ns}	0,22*	3,59	14,55*	D35	0,81 ^{ns}	0,23 ^{ns}	3,39	14,58*
D9	0,75*	0,23*	3,26	16,18*	D36	0,84*	0,24 ^{ns}	3,5	19,99*
D10	0,68*	0,23 ^{ns}	2,96	15,22*	D37	0,81 ^{ns}	0,25 ^{ns}	3,24	18,78 ^{ns}
D11	0,73*	0,25 ^{ns}	2,92	14,0*	D39	0,80 ^{ns}	0,24 ^{ns}	3,33	15,07*
D13	0,86*	0,23 ^{ns}	3,74	19,62*	D40	0,81 ^{ns}	0,26 ^{ns}	3,12	15,04*
D14	0,79 ^{ns}	0,23 ^{ns}	3,43	17,8 ^{ns}	D41	0,75*	0,26 ^{ns}	2,88	17,68 ^{ns}
D15	0,79 ^{ns}	0,22*	3,59	15,97*	D42	0,84*	0,24 ^{ns}	3,46	17,19 ^{ns}
D16	0,80 ^{ns}	0,21*	3,81	14,82*	D43	0,86*	0,25 ^{ns}	3,32	19,22*
D17	0,90*	0,25 ^{ns}	3,60	19,62*	D44	0,80 ^{ns}	0,23 ^{ns}	3,48	14,72*
D18	0,84*	0,22*	3,73	15,78*	Mean	0,81	0,24	3,43	16,03
D19	0,84*	0,24 ^{ns}	3,42	15,07*	Max	0,97	0,27	3,81	22,66
D23	0,84*	0,22*	3,77	13,80*	Min	0,68	0,21	2,88	13,6
D24	0,74*	0,25 ^{ns}	2,96	13,60*	WT	0,81	0,25	3,24	17,9
D25	0,86*	0,25 ^{ns}	3,44	19,36*	CV (%)	2,52	2,89		5,72
D26	0,86*	0,24 ^{ns}	3,58	19,30*	LSD ₀₁	0,036	0,023		1,13

Ghi chú: *: sự sai khác có ý nghĩa; ^{ns}: sai khác không có ý nghĩa.



Hình 3. Kích thước hạt của một số dòng lúa chỉnh sửa gen GS3.

Năng suất lúa phụ thuộc vào nhiều yếu tố như chế độ dinh dưỡng, điều kiện sinh thái và bản chất di truyền (giống). *GS3* là một trong những gen kiểm soát chặt kích thước hạt được Fan và cs báo cáo năm 2006 [6]. Khi gen bị mất chức năng sẽ làm cho kích thước của hạt thay đổi, hạt dài ra hoặc ngắn hơn tùy theo vị trí bị đột biến vùng chức năng kiểm soát kích thước cơ quan (OSR) hay vùng kết thúc



Hình 4. Hình thái hạt của một số dòng lúa chỉnh sửa gen GS3. Khối lượng 1.000 hạt (A) và hình thái hạt (B) của một số dòng lúa chỉnh sửa gen GS3 so với đối chứng (WT).

(C-terminal region) tương ứng [7]. Li và cs (2016) [8] gây đột biến gen *GS3* ở giống Zhonghua 11 thu được các cây đột biến có kích thước hạt lớn hơn (8 mm) so với đối chứng (6,4 mm) khi gen *GS3* bị mất 4 đến 5 nucleotides. Khối lượng hạt cũng tăng lên 31 mg so với cây đối chứng 25,7 mg. Tương tự, giống lúa Nipponbare khi bị đột biến đồng thời 2 gen *GS3* và *GL3.1* có hạt dài hơn và hàm lượng chalkiness cao hơn so với cây đối chứng [10]. Giống TP309 có chiều dài và khối lượng 1.000 hạt tăng 31,39 và 27,15% so với đối chứng khi bị đột biến gen *GS3* [11].

Bắc Thơm 7 là giống lúa có hạt thon dài, chất lượng ngon, được chỉnh sửa gen *GS3* nhằm tăng kích thước hạt [13]. Kết quả sàng lọc 41 dòng T_0 cho thấy, có 38 dòng mang trình tự gen mã hóa protein Cas9 để chỉnh sửa trình tự gen mục tiêu. Giải trình tự 5 dòng T_0 thu được 2 dòng lúa D1 và D25 bị đột biến mất 2 nucleotides T và C ở vị trí 127 và 128 làm tăng chiều dài hạt từ 0,86 đến 0,97 cm so với đối chứng (0,81 cm). Trong số 38 dòng kiểm tra, có 26 dòng không có sự khác biệt, 15 dòng có kích thước hạt lớn hơn và 4 dòng có kích thước hạt nhỏ hơn so với đối chứng. Kết quả này cho thấy, vị trí gây đột biến có thể khác nhau làm cho chức năng của gen *GS3* biểu hiện khác nhau ở các nhóm tính trạng thu được. Kết quả này cũng được lý giải trong các báo cáo trước đó [8, 10]. Do vậy, cần có thêm các phân tích sâu hơn để đánh giá vai trò của các dạng đột biến cũng như biểu hiện gen ở các dòng đột biến nêu trên.

Kết luận

Kết quả sàng lọc 41 dòng lúa T_0 chỉnh sửa gen *GS3* bằng PCR thu được 38 dòng có mang đoạn gen mã hóa protein Cas9. Phân tích đột biến 5 dòng cho thấy, D1 và D25 mất 2 nucleotides T, C ở vị trí 127 và 128. Kích thước hạt của các dòng đột biến có sự dao động đáng kể: 26/38 dòng không có sự khác biệt, 15/26 dòng có kích thước hạt lớn hơn (từ 0,86 đến 0,97 cm), trong đó 10 dòng có khối lượng 1.000

hạt cao hơn (19,22-22,6 g) so với đối chứng (17,9 g). Tuy nhiên, cần có thêm các phân tích chức năng đột biến ở các dòng khác nhau cũng như đánh giá các đặc điểm nông sinh học khác của các dòng lúa có triển vọng nêu trên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Dương Xuân Tú và cs (2018), “Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa thơm kháng bệnh bạc lá cho các tỉnh phía Bắc”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam B*, **2**, tr.59-64.
- [2] Nguyễn Trọng Phước và cs (2021), “Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn giống lúa chịu mặn (*Oryza sativa* L.)”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, **3**, tr.3-9.
- [3] A. Ricroch, et al. (2017), “Use of CRISPR systems in plant genome editing: toward new opportunities in agriculture”, *Emerg. Top Life Sci.*, **1**, pp.169-182.
- [4] H. Zhang, et al. (2017), “Genome editing - principles and applications for functional genomics research and crop improvement”, *Critical Reviews in Plant Sciences*, **36(4)**, pp.291-309.
- [5] N. Li, et al. (2018), “Control of grain size in rice”, *Plant Reprod.*, **31(3)**, pp.237-251.
- [6] C. Fan, et al. (2006), “GS3, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein”, *Theor. Appl. Genet.*, **112**, pp.1164-1171.
- [7] H. Mao, et al. (2010), “Linking differential domain functions of the GS3 protein to natural variation of grain size in rice”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, pp.19579-19584.
- [8] M. Li, et al. (2016), “Reassessment of the four yield-related genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in rice using a CRISPR/Cas9 system”, *Front. Plant Sci.*, **7**, DOI: 10.3389/fpls.2016.00377.
- [9] R. Xu, et al. (2016), “Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice”, *Genet Genomics*, **43(8)**, pp.529-532.
- [10] Y. Chen, et al. (2020), “Effects of *GS3* and *GL3.1* for grain size editing by CRISPR/Cas9 in rice”, *Rice Science*, **27**, pp.405-413.
- [11] B. Usman, et al. (2021), “CRISPR/Cas9 guided mutagenesis of grain size 3 confers increased rice (*Oryza sativa* L.) grain length by regulating cysteine proteinase inhibitor and ubiquitin-related proteins”, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, DOI: 10.3390/ijms22063225.
- [12] H. Le, et al. (2020), “CRISPR/Cas9-mediated knockout of galactinol synthase-encoding genes reduces raffinose family oligosaccharide levels in soybean seeds”, *Front. Plant Sci.*, **11**, DOI: 10.3389/fpls.2020.612942.
- [13] Nguyễn Tiến Dũng và cs (2021), “Kết quả bước đầu tạo dòng lúa tăng kích thước hạt bằng công nghệ chỉnh sửa hệ gen CRISPR/Cas9”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, **8**, tr.35-42.
- [14] X. Xu, et al. (2005), “A protocol for high-throughput extraction of DNA from rice leaves”, *Plant Mol. Biol. Rep.*, **23**, pp.291-295.