

## TỔNG QUAN VỀ NHỮNG TIẾN BỘ VÀ TRIỂN VỌNG TRONG CHỌN TẠO GIỐNG LÚA CHỐNG CHỊU ĐIỀU KIỆN BẤT LỢI NHỜ CÔNG NGHỆ CRISPR/CAS9

Bùi Thị Thu Hương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hồng<sup>1</sup>, Chu Đức Hà<sup>2</sup>, Hà Thị Quyên<sup>2</sup>,  
Phạm Phương Thu<sup>3</sup>, Phùng Thị Thu Hương<sup>4</sup>, Lê Thị Ngọc Quỳnh<sup>5</sup>,  
Nguyễn Quốc Trung<sup>1</sup>, Đồng Huy Giới<sup>1</sup>, Nguyễn Thanh Hải<sup>1</sup>, Ninh Thị Thảo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

<sup>2</sup>*Khoa Công nghệ Nông nghiệp, Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội*

<sup>3</sup>*Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Đại học Sư phạm Hà Nội 2*

<sup>4</sup>*Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*

<sup>5</sup>*Khoa Hóa và Môi trường, Đại học Thủy lợi*

\*Tác giả liên hệ: ntthao@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 07.09.2021

Ngày chấp nhận đăng: 09.12.2021

### TÓM TẮT

Lúa gạo (*Oryza sativa* L.) là một trong những cây lương thực quan trọng được canh tác phổ biến trên toàn thế giới. Vai trò to lớn của lúa gạo đối với an ninh lương thực toàn cầu đã thúc đẩy các nhà nghiên cứu phát triển các giống lúa mới với các đặc tính nông học được cải thiện, như khả năng chống chịu stress sinh học và phi sinh học. Hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 mang đến một chiến lược đầy hứa hẹn để cải thiện đặc tính nông học của nhiều loại cây trồng nhờ tính hiệu quả, dễ sử dụng và độ chính xác cao. Bài viết này thảo luận về các ứng dụng của CRISPR/Cas9 trong cải tạo các giống lúa thích nghi tốt hơn với điều kiện môi trường bất lợi. Hàng loạt các gen chức năng và gen điều hòa liên quan đến tính kháng bệnh (bạc lá và đạo ôn), kháng thuốc trừ cỏ và chống chịu điều kiện bất thuận (mặn, hạn hán, lạnh) ở lúa đã được phân tích chức năng thông qua hệ thống CRISPR/Cas9. Một số hạn chế và ưu điểm khi áp dụng kỹ thuật này trên cây lúa cũng được phân tích. Kết quả của nghiên cứu này đã cung cấp một cái nhìn tổng thể về công cụ chỉnh sửa gen, từ đó định hướng ứng dụng trong nghiên cứu các giống cây trồng ứng phó với biến đổi khí hậu ở Việt Nam.

Từ khóa: Lúa gạo, CRISPR/Cas9, đột biến, chống chịu, bất lợi phi sinh học, bất lợi sinh học.

### Recent Advances and Future Perspectives for the Improvement of Stress Tolerance in Rice Breeding Using CRISPR/Cas9

### ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most important staple crops that is widely cultivated in the world. Due to the critical role of rice in the global food security, great efforts have been made in order to develop new rice varieties with good agronomic traits, such as biotic and abiotic stress tolerance. The CRISPR/Cas9 has emerged as a promising system for the improvement of various traits of crop plants because of its efficiency, simplicity, and versatility. In this mini review, we discussed the applications of the CRISPR/Cas9 gene editing system to improve a wide range of traits in rice varieties adapted to unfavorable conditions. Specifically, a number of functional and regulatory genes that are associated with diseases (rice blast, bacterial blight) and pesticide resistance and abiotic stress (salinity, drought, and cold) tolerance have been functionally characterized via the mutants produced by the CRISPR/Cas9 system. Additionally, the advances and limitations of using CRISPR/Cas9 system in rice plants were discussed. Taken together, our paper could provide a solid foundation for further application of genome editing tools in plant breeding for tackling climate change.

Keywords: Rice, CRISPR/Cas9, mutation, tolerance, abiotic stress, biotic stress.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa gạo (*Oryza sativa* L.) là cây lương thực quan trọng hàng đầu trên thế giới. Cây lúa có khả năng thích ứng với nhiều điều kiện môi trường khác nhau, được trồng rộng rãi trên nhiều hệ thống nông học. Sản lượng sản xuất gạo trên toàn thế giới năm 2020 theo ước của tổ chức nông lương thế giới (FAO) đạt khoảng 508 triệu tấn. Tuy nhiên, những diễn biến phức tạp của quá trình biến đổi khí hậu cùng sự xuất hiện và gia tăng nhanh chóng của nhiều loại dịch bệnh đã gây thiệt hại đáng kể tới năng suất và chất lượng lúa gạo, từ đó gây áp lực lớn đến an ninh lương thực ở các nước đang phát triển (Lenaerts & cs., 2019). Trước những thách thức lớn đó, việc gia tăng nhu cầu đối với các giống lúa mới có năng suất chất lượng tốt, thích ứng với biến đổi khí hậu và dịch bệnh là xu hướng tất yếu. Vì thế, mối quan tâm chính trong nghiên cứu nông nghiệp hiện nay là cải thiện khả năng chống chịu của thực vật đối với các điều kiện bất lợi sinh học và phi sinh học (Yu & cs., 2020).

Thập kỷ vừa qua đã chứng kiến những thành công lớn của công nghệ chỉnh sửa hệ gen (Genome editing - GE) trong việc phát triển các giống lúa ứng phó với biến đổi khí hậu, chịu được điều kiện bất lợi để duy trì tăng trưởng. Các kỹ thuật GE đã được phát triển và thay thế các phương pháp chọn tạo giống truyền thống (chọn giống đột biến và chọn giống sử dụng chỉ thị phân tử) bởi tính chính xác, hiệu quả và nhanh chóng. GE cho phép tạo các đột biến mất, thêm hoặc thay thế nucleotit bằng cách gây ra các đứt gãy sợi đôi (Double Strand Break - DSB) trong hệ gen mục tiêu. Tế bào thực vật sửa chữa các tổn thương này theo hai con đường: (1) ghép nối điểm cuối không tương đồng (Non-homologous end joining - NHEJ) và (2) sửa chữa tái tổ hợp tương đồng (Homology directed repair - HDR). NHEJ là con đường sửa chữa phổ biến hơn ở thực vật, chủ yếu gây ra các đột biến thêm hoặc mất các nucleotit do đó có thể dẫn đến đột biến dịch khung, trong khi HDR xảy ra khi có trình tự tương đồng xung quanh DSB và các trình tự này được sử dụng để sửa chữa các tổn thương, tạo nên các đột biến một cách chính xác.

Sự thay thế gen có thể xảy ra theo chủ đích khi một khuôn mẫu mang trình tự tương đồng được thiết kế trước và tích hợp vào công cụ chỉnh sửa gen. Zinc Finger Nucleases (ZFNs) và Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) là hai hệ thống GE dựa trên hoạt động của enzyme endonuclease lưỡng cực. Các enzyme này gồm vùng gắn với ADN và vùng gắn với enzyme cắt giới hạn *FokI*. Do việc nhận diện trình tự đặc hiệu chịu trách nhiệm bởi vùng protein gắn ADN thông qua tương tác protein-ADN, nên thiết kế các protein cần độ chính xác cao và rất phức tạp. Chính vì vậy, tiềm năng ứng dụng của hai phương pháp chỉnh sửa gen này trong công tác chọn tạo giống cây trồng còn hạn chế (Jani & cs., 2020).

Hiện nay, công nghệ chỉnh sửa hệ gen mới nhất - hệ thống Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated 9 (CRISPR/Cas9) cho phép tạo ra những thay đổi trên trình tự ADN theo cách có chủ đích tại một vị trí xác định trong vùng genome mục tiêu. Khác với ZFN và TALEN, hệ thống CRISPR giúp enzyme cắt ADN (Cas9) nhận biết trình tự đặc hiệu thông qua RNA dẫn đường ("guide RNA", gRNA) có chiều dài khoảng 18 đến 20 bazơ và bổ sung với trình tự đích. Để có thể giúp Cas9 nhận biết thành công trình tự mục tiêu, trong trình tự bộ gen đích phải có một đoạn trình tự protospacer adjacent motif (PAM) ngay sau trình tự đích và thường là 5'-NGG-3', trong đó N là một nucleotit bất kỳ. Khi phức hợp Cas9/gRNA bám vào trình tự mục tiêu, enzyme Cas9 sẽ cắt đoạn ADN ở cả 2 mạch tại vị trí nucleotit thứ ba và thứ tư phía trước trình tự PAM. Do chỉ cần thiết kế một gRNA mới khi cần cắt một trình tự mục tiêu trong cùng một hệ gen cây chủ, chỉnh sửa hệ gen bằng CRISPR/Cas9 trở nên vừa đơn giản vừa linh hoạt và dễ thao tác. Mặt khác, khi kết hợp nhiều gRNA, hệ thống CRISPR/Cas9 cho phép cắt nhiều mục tiêu cùng lúc. Với việc thiết kế đơn giản và hiệu quả cao hơn so với hệ thống ZFN và TALEN, đồng thời có thể sử dụng đối với nhiều loại tế bào khác nhau và nhiều gen cùng lúc, CRISPR/Cas9 thực sự là một hệ thống tiềm năng để biến đổi ADN bộ gen.

Trên thế giới, kỹ thuật CRISPR/Cas9 đã và đang được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu chức năng các gen và phát triển các dòng đột biến có khả năng chống chịu các bất lợi sinh học và phi sinh học (Malnoy & cs., 2016; Klap & cs., 2017; Wang & cs., 2018), kháng thuốc diệt cỏ (Shimatani & cs., 2017; Li và &., 2018; Oz & cs., 2021), nâng cao năng suất (Li & cs., 2016b; Zhou & cs., 2016)... Ở nước ta, tình hình nghiên cứu kỹ thuật CRISPR/Cas9 trên cây trồng mặc dù còn rất mới mẻ nhưng cũng đã thu được những thành tựu nhất định. Điển hình, nhóm nghiên cứu tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã thành công trong việc sử dụng kỹ thuật CRISPR/Cas9 để tạo ra giống đậu tương mới có lượng đường khó tiêu thấp hơn 35% (Huy Le & cs., 2020). Các kết quả nghiên cứu bước đầu trong ứng dụng kỹ thuật CRISPR/Cas9 để nâng cao khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi của cây lúa, cây ngô, cây đậu tương hay tạo dòng cà chua không hạt thực hiện tại Viện di truyền Nông nghiệp và Học viện Nông nghiệp Việt Nam mở ra một hướng đi triển vọng cho công nghệ GE phục vụ chọn tạo giống cây trồng

tại Việt Nam. Trong bài viết này, chúng tôi tập trung thảo luận những nghiên cứu sử dụng công nghệ CRISPR/Cas9 để cải thiện các tính trạng chống chịu bất lợi sinh học và phi sinh học cũng như các thách thức và tiềm năng ứng của kỹ thuật này trên cây lúa.

## 2. ỨNG DỤNG CỦA CRISPR/CAS9 TRONG CẢI THIỆN ĐẶC TÍNH CHỐNG CHỊU CỦA CÂY LÚA

Quá trình biến đổi khí hậu ngày càng tăng trên nhiều khu vực cũng như tần suất các điều kiện bất lợi sinh học và phi sinh học trên toàn thế giới, đe dọa nghiêm trọng đến sản xuất lúa gạo và gây ra tổn thất lớn cho kinh tế xã hội toàn cầu. Để ứng phó với tình hình nghiêm trọng này, trong giai đoạn tiên phong của công nghệ CRISPR/Cas9, việc chỉnh sửa hệ gen cây lúa đã đạt được những thành công nhất định (Bảng 1). Những nghiên cứu này cung cấp bằng chứng thuyết phục rằng hệ thống CRISPR/Cas9 hoạt động hiệu quả trong cây lúa và tiềm năng ứng dụng to lớn của nó trong chọn tạo giống lúa kháng bệnh và chống chịu các điều kiện bất lợi.

**Bảng 1. Các ứng dụng của CRISPR/Cas9 trên cây lúa**

Ứng dụng	Gen mục tiêu	Cơ chế sửa chữa	Phương pháp/vật liệu chuyển gen	Tài liệu tham khảo
Kháng bệnh bạc lá	<i>SWEET14</i> , <i>SWEET11</i>	NHEJ	PEG/Tế bào trần	Jiang & cs. (2013a); Jiang & cs. (2013b)
	<i>SWEET13</i>	NHEJ	<i>Agrobacterium</i> /mô sẹo	Zhou & cs. (2015)
	<i>SWEET14</i>	NHEJ	<i>Agrobacterium</i> /mô sẹo	Zeng & cs. (2020)
Kháng bệnh đạo ôn	<i>EFR922</i>	NHEJ	<i>Agrobacterium</i> /mô sẹo	Wang & cs. (2016)
	<i>SEC3A</i>	NHEJ	<i>Agrobacterium</i> /mô sẹo	Ma & cs. (2018)
	<i>Pi21</i>	NHEJ	<i>Agrobacterium</i> /mô sẹo	Nawaz & cs. (2020)
	<i>Osa-miR159a</i>	NHEJ	<i>Agrobacterium</i> /mô sẹo	Chen & cs. (2021)
Nâng cao tính chịu mặn	<i>RAV2</i>	NHEJ	<i>Agrobacterium</i> /mô sẹo	Duan & cs. (2016)
Nâng cao tính chịu hạn	<i>SAPK2</i>	NHEJ	<i>Agrobacterium</i> /mô sẹo	Lou & cs. (2017)
Nâng cao tính chịu lạnh	<i>ANN3</i>	NHEJ	<i>Agrobacterium</i> /mô sẹo	Shen & cs. (2017)
Kháng thuốc diệt cỏ	<i>EPSPS</i>	NHEJ	Súng bắn gen/mô sẹo	Li & cs. (2016a); Li & cs. (2016b)
	<i>AAC</i>	Chỉnh sửa bazơ nitơ bởi nCas9	<i>Agrobacterium</i> /mô sẹo	Chao & cs. (2018); Li & cs. (2018)
	<i>ALS</i>	Chỉnh sửa bởi nCas9 và/hoặc dCas9	<i>Agrobacterium</i> /mô sẹo	Shimatani & cs. (2017)
	<i>ALS</i>	HDR	Súng bắn gen/mô sẹo	Sun & cs. (2016)

Ghi chú: NHEJ: Ghép nối điểm cuối không tương đồng; HDR: Tái tổ hợp tương đồng; PEG: Polyethylene Glycol, nCas9, Cas9 nickase; dCas9, inactive Cas9.

## **2.1. Chỉnh sửa gen giúp tăng tính kháng bất lợi sinh học**

### **2.1.1. Chỉnh sửa gen tăng tính kháng bệnh bạc lá lúa**

Quá trình gây bệnh bạc lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* được thúc đẩy bởi hoạt động của nhóm protein tiết nhóm III TAL (transcription activator-like) với vai trò hoạt hóa sự biểu hiện gen “nhiễm” (susceptible gene) trong hệ gen tế bào chủ bằng cách liên kết với trình tự đích đặc hiệu trên vùng promoter của gen đích (effector binding element - EBE). Họ gen *SWEET* mã hóa chất vận chuyển đường được cho là những mục tiêu quan trọng của các protein TAL này. Zhou & cs. (2015) đã thiết kế một gRNA nhằm vào trình tự mục tiêu EBE của gen *OsSWEET13* giống lúa mô hình Kitaake. Kết quả thu nhận được hai dòng đột biến mất 4 và 11 nucleotit trong vùng mã hóa của gen *OsSWEET13*. Các dòng lúa đột biến này có kiểu hình giống cây đối chứng trong điều kiện trồng trọt bình thường nhưng thể hiện tăng khả năng kháng *X. oryzae* với chiều dài vết bệnh giảm tới 90% so với các cây kiểu dại khi tiến hành lây nhiễm nhân tạo. Tương tự, Zeng & cs. (2020) sử dụng kỹ thuật CRISPR/Cas9 để gây đột biến gen *OsSWEET14* trên giống lúa Zhonghua11 và thu được các dòng lúa đột biến vừa tăng mạnh mẽ khả năng kháng bệnh bạc lá vừa tăng chiều cao so với cây dại. Do vậy, đột biến gen *OsSWEET14* trở thành mục tiêu quan trọng trong chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá bằng công nghệ CRISPR/Cas9 (Zeng & cs., 2020).

### **2.1.2. Chỉnh sửa gen tăng tính kháng bệnh đạo ôn**

Bệnh đạo ôn do nấm *Magnaporthe oryzae* gây ra là căn bệnh tàn khốc nhất ở tất cả các quốc gia trồng lúa, gây tổn hại năng suất trung bình 10-30% sản lượng (Zhao & cs., 2018). Việc tăng cường tính kháng của lúa với *M. oryzae* là một trong những phương pháp hiệu quả nhất để kiểm soát căn bệnh này. Các yếu tố phản ứng ethylene thực vật (Ethylene Response Factors - ERFs) đã được chứng minh là có liên quan đến

việc điều biến tính kháng của lúa với nhiều yếu tố bất lợi (Yoon & cs., 2020). Việc giảm biểu hiện gen *ERF922* ở lúa Zhonghua 17 bằng kỹ thuật RNAi giúp tăng cường tính kháng với *M. oryzae* cho thấy gen này đóng vai trò là yếu tố điều hòa tiêu cực đối với tính kháng (Liu & cs., 2012). Wang & cs. (2016) đã thiết kế vector CRISPR/Cas9 nhằm tác động vào exon I của gen *OsERF922* trên lúa Kuiku 131 và thu nhận được 21 dòng lúa đột biến chứa các đột biến mất nucleotit (64,3%), đột biến thêm nucleotit (23,8%) và đồng thời cả hai loại đột biến (11,9%). Các dòng lúa đột biến đồng hợp tử ở thể hệ T1 mang các đặc điểm nông học như chiều cao cây, kích thước của lá cờ, số lượng và chiều dài hạt, số hạt trên bông và trọng lượng 1.000 hạt tương đương với cây kiểu dại. Tuy nhiên, khi lây nhiễm nhân tạo với nấm *M. oryzae*, các dòng đột biến này biểu hiện khả năng kháng *M. oryzae* tăng cường so với kiểu dại với độ dài vết bệnh giảm 66% (Wang & cs., 2016). Nghiên cứu này cũng cho thấy hệ thống CRISPR/Cas9 có thể tạo đột biến đa điểm hiệu quả cao ở cây lúa, với 90% số cây mang ba đột biến khác nhau khi sử dụng đồng thời ba gRNA nhắm ba vị trí đích trên cùng một gen.

## **2.2. Chỉnh sửa gen giúp tăng tính kháng bất lợi phi sinh học**

### **2.2.1. Chỉnh sửa gen tăng tính chịu mặn**

Một số nghiên cứu chỉ ra rằng họ gen *AP2/ERF* (*APETALA 2/ethylene-responsive element binding factor*) mã hóa các yếu tố phiên mã tham gia vào đáp ứng của lúa với stress mặn. Cụ thể, Duan & cs. (2016) đã xác định vùng GT-1 trên promoter của gen *OsRAV2* (một thành viên của họ gen *AP2/ERF*) có vai trò quan trọng đối với tính chống chịu mặn ở cây lúa. Nhóm nghiên cứu đã thiết kế một gRNA nhằm mục tiêu là vùng GT-1 và chuyển vào giống lúa Nipponbare. Kết quả cho thấy những dòng lúa đột biến bị mất vùng GT-1 không còn khả năng tăng cường biểu hiện gen *OsRAV2* trong điều kiện độ mặn cao, cho thấy yếu tố GT-1 tham gia trực tiếp vào điều

khởi đáp ứng điều kiện mặn của *OsRAV2* (Duan & cs., 2016).

### **2.2.2. Chỉnh sửa gen tăng tính chịu hạn**

Lou & cs. (2017) đã làm sáng tỏ vai trò của gen *OsSAPK2* (osmotic stress/ABA - activated protein kinase 2) trong điều hòa áp lực thẩm thấu bằng cách gây đột biến mất chức năng nhờ kỹ thuật CRISPR/Cas9. Một gRNA đã được thiết kế nhắm mục tiêu exon III của gen *OsSAPK2* và chuyển vào cây lúa nhờ vi khuẩn *Agrobacterium*. Kết quả thu được 20 dòng lúa T0 chuyển gen, trong đó hai dòng đột biến T1 đồng hợp tử được xác định thông qua giải trình tự gen. Hai dòng đột biến này có biểu hiện kiểu hình không nhạy cảm với ABA và nhưng lại nhạy cảm hơn với stress hạn so với cây kiểu dại, chứng tỏ *OsSAPK2* đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng với điều kiện hạn ở lúa.

### **2.2.3. Chỉnh sửa gen tăng tính chịu lạnh**

Annexin thực vật là những protein liên kết màng không phụ thuộc vào  $Ca^{++}$  giúp cây phát triển tốt và bảo vệ cây chống chịu với những stress phi sinh học. Để tìm hiểu chức năng chống chịu lạnh của annexin trên cây lúa, Shen & cs. (2017) sử dụng hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 để làm câm gen mã hoá annexin *OsANN3*. Phân tử gRNA đã được thiết kế nhắm mục tiêu exon II của gen *OsANN3* và chuyển vào giống lúa Taipei 309 nhờ vi khuẩn *Agrobacterium*. Kết quả thu được 4 dòng lúa T0 chuyển gen chứa 4 kiểu đột biến khác nhau bao gồm đột biến thêm 1 nucleotit, mất 1 nucleotit, mất 3 nucleotit và mất 4 nucleotit. Trong đó, 3 dòng đột biến là đồng hợp tử và 1 dòng đột biến có chứa 2 dạng đột biến khác nhau ở 2 alen (biallelic mutations). Đánh giá khả năng chống chịu lạnh của các dòng đột biến T1 đồng hợp tử ở nhiệt độ 4~6°C trong ba ngày cho thấy tỉ lệ sống sót của cây T1 giảm mạnh so với đối chứng. Điều này chứng tỏ gen *OsANN3* có vai trò quan trọng trong đáp ứng chống chịu lại điều kiện lạnh ở cây lúa. Đặc biệt, nghiên cứu của Shen & cs. còn cho thấy không có các hiệu ứng đột biến ngoài mục tiêu, chứng tỏ hệ thống CRISPR/Cas9 có tính đặc hiệu cao trên cây lúa.

### **2.2.4. Chỉnh sửa gen giúp tăng tính kháng thuốc diệt cỏ**

Tính kháng thuốc diệt cỏ là một đặc điểm quan trọng khác mà các nhà nghiên cứu đã cố gắng đưa vào cây lúa. Tuy nhiên, việc sử dụng các dòng biến đổi gen vẫn vấp phải rào cản pháp lý và thương mại về biến đổi gen sinh vật (Dong & cs., 2017; Fartyal & cs., 2018; Inui & cs., 2001; Te & cs., 2011). Hiện nay, kỹ thuật chỉnh sửa gen cho phép tạo ra các cây trồng mang gen mục tiêu được chỉnh sửa nhưng không chứa gen ngoại lai chuyển vào. Nhiều dòng lúa kháng thuốc diệt cỏ đã được tạo ra theo cách này, trong đó có trường hợp xuất phát từ các đột biến điểm. Acetolactate Synthase 1 (ALS1) là enzyme chủ chốt trong quá trình sinh tổng hợp các axit amin chuỗi nhánh và là mục tiêu chính đối với các loại thuốc diệt cỏ quan trọng bao gồm chlorsulfuron và bispyribac natri. Sun & cs. (2016) sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 và cung cấp một đoạn ADN có trình tự tương đồng với đoạn ADN đích để chỉnh sửa gen *ALS1* trong cây lúa Nipponbare bằng con đường HDR. Hai gRNA được thiết kế nhắm mục tiêu tại vị trí khoảng 1625-1888 bp trên gen *ALS1* và tái tổ hợp vào vector biểu hiện có mang gen mã hoá protein Cas9 và chuyển vào cây lúa Nipponbare bằng phương pháp súng bắn gen. Kết quả thu được các dòng lúa chuyển gen mang đột biến tại hai điểm, bao gồm W548L và S627I, có khả năng kháng thuốc diệt cỏ cao hơn hẳn so với kiểu lúa dại (Sun & cs., 2016). Tương tự, Yu & cs. (2015) sử dụng kỹ thuật CRISPR/Cas9 để tạo ra hai đột biến điểm, T102I và P106S, trong miền gắn kết với cơ chất pyruvate và thuốc diệt cỏ glyphosate của enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) trong cây lúa dẫn đến tăng tính kháng thuốc diệt cỏ.

Một chiến lược khác để tạo ra đột biến điểm thông qua CRISPR/Cas9 là sử dụng kỹ thuật chỉnh sửa bazơ nitơ, nghĩa là trao đổi một cặp bazơ nitơ cho nhau. Các nhà nghiên cứu đã thiết kế một nhóm các protein chỉnh sửa bazơ nitơ (base editors), có thể chuyển một cách đặc hiệu các bazơ nitơ. Công cụ chỉnh sửa gen này bao

gồm một enzyme chỉnh sửa bazơ nitơ, chẳng hạn như cytidine deaminase (chuyển C thành U), hợp nhất với một endonuclease Cas9 đột biến không có hoạt tính cắt (dCas9) hoặc có hoạt tính nickase (nCas9). Sau khi chuyển đổi một bazơ nitơ trên một mạch ADN, protein Cas9 này tạo ra một vết cắt nhỏ được gọi là “nick” trên mạch ADN đối diện, thúc đẩy bộ máy của tế bào nhằm thay thế bazơ nitơ nguyên bản vốn đang ở trong tình trạng không khớp với bazơ nitơ mới và vì thế hoàn thành sự trao đổi một cặp bazơ nitơ. Bằng việc sử dụng cả dCas9 và nCas9, đột biến điểm C287T được tạo ra trên gen *ALS1* đã làm cho cây lúa kháng với thuốc diệt cỏ imazamox (Shimatani & cs., 2017). Một gRNA nhắm vào bazơ nitơ C287 trên gen *ALS* đã được thiết kế và chuyển vào mô sẹo giống lúa Nipponbare, sử dụng chất chọn lọc là thuốc diệt cỏ imazamox. Kết quả thu được 3 và 14 dòng lúa chuyển gen tương ứng với hai phiên bản đột biến của Cas9, dCas9 và nCas9. Trong số 14 dòng chuyển gen thu được khi sử dụng nCas9, 7 dòng chuyển gen chứa đột biến mong muốn C287T và không phát hiện có các đột biến ngoài mục tiêu. Đặc biệt, nhóm tác giả cũng đã chứng minh rằng hoàn toàn có thể chọn lọc được các dòng lúa ở các thế hệ sau mang các đột biến điểm có khả năng kháng thuốc diệt cỏ nhưng không chứa các gen ngoại chuyển vào thông qua sự phân ly (Shimatani & cs., 2018).

### 3. THÁCH THỨC VÀ TIỀM NĂNG PHÁT TRIỂN CỦA CÔNG NGHỆ CRISPR/CAS9 TRONG CẢI THIẾN ĐẶC TÍNH CHỐNG CHIÙ Ở CÂY LÚA

Kể từ khi được triển khai lần đầu tiên vào năm 2013, hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 đã nhanh chóng được sử dụng và thử nghiệm tính hiệu quả trên thực vật. CRISPR/Cas9 đã trở thành công cụ phổ biến nhất cho các nghiên cứu chức năng và cải tiến các đặc tính nông học ở nhiều loài thực vật khác nhau, đặc biệt là ở cây lúa. Công nghệ CRISPR/Cas9 ngày càng được quan tâm nhiều hơn và thúc đẩy các nhà nghiên cứu khám phá thêm về những ứng dụng mới của nó. Theo đó, những kiến thức và cải tiến mới được cập nhật

liên tục, tạo điều kiện thuận lợi cho việc áp dụng công nghệ này trên cây trồng. Ngoài các ứng dụng cơ bản bao gồm tạo các đột biến thêm nucleotit, mất nucleotit, thay thế nucleotit (thay thế bazơ nitơ) một cách chính xác, CRISPR/Cas9 có thể được sử dụng để làm bất hoạt hoặc kích hoạt một gen bất kỳ. Những cải tiến mới của công nghệ này và kỹ thuật giải trình tự hệ gen cho phép nhà nghiên cứu có thể tạo ra các dòng lúa mới với các đột biến định hướng tại vị trí cụ thể mà không có đột biến ngoài mục tiêu. Quan trọng hơn, kỹ thuật này cho phép tạo ra và chọn lọc các cây đột biến không mà có gen chuyển, nên có thể vượt qua rào cản pháp lý nghiêm ngặt về sinh vật biến đổi gen. Nhìn chung, kỹ thuật này đã tạo điều kiện thuận lợi cho nghiên cứu cơ bản phân tích chức năng của các gen khác nhau ở lúa và cả nghiên cứu ứng dụng cho quá trình cải tiến các gen của cây trồng quan trọng này.

#### 3.1. Ưu điểm

Nhờ tích hợp được ưu điểm của công nghệ đột biến có chủ đích và công nghệ chuyển gen, kỹ thuật CRISPR/Cas9 được các nhà nghiên cứu về cải tiến gen trên toàn thế giới ưa thích. Một trong những đặc điểm hấp dẫn nhất của hệ thống CRISPR/Cas9 là khả năng chỉnh sửa đa điểm, tạo ra đột biến ở nhiều gen cùng một lúc, do đó giảm thời gian và chi phí tạo ra các giống mới. Xie & cs. (2015) đã thiết kế 8 gRNA nhắm mục tiêu 4 gen thuộc họ gen protein kinase hoạt hoá mitogen (mitogen-activated protein kinase - MPK). Mỗi cặp gRNA nhắm 2 vị trí trong cùng một gen, cách nhau khoảng 350-750 bazơ. Kết quả phân tích cây chuyển gen cho thấy đột biến xảy ra ở cả 8 vị trí mục tiêu của gRNA. Tương tự, các gRNA nhắm mục tiêu từ 2 đến 8 vị trí khác nhau trên gen *MPK1* và *MPK6* được Minkenberg & cs. (2017) thiết kế và chuyển vào cây lúa, kết quả thu được các đột biến xảy ra tại một, hai và bốn vị trí mục tiêu với hiệu suất lần lượt đạt 86-100%, 67-100% và 86%. Đặc biệt, Meng & cs. (2017) đã thiết kế 25.604 gRNA nhắm mục tiêu 12.802 gen trên cây lúa Zhonghua 11. Kết quả chuyển các gRNA vào cây lúa nhờ vi khuẩn *Agrobacterium* thu nhận được 14.000 cây chuyển gen T0. Tương tự, Lu & cs. (2017) thiết kế một

thư viện gRNA gồm 88.541 thành viên nhắm mục tiêu 34.234 gen trên cây lúa MSU7, trung bình 2,59 gRNA cho một gen. Kết quả sàng lọc sau chuyển gen thu nhận được 84.384 cây chuyển gen với tần suất đột biến 83,9%. Như vậy, nhờ công nghệ CRISPR/Cas9, một bộ thư viện đột biến toàn bộ gen ở lúa đã được xây dựng và là nguồn nguyên liệu rất có ý nghĩa, đầy tiềm năng cho chọn tạo giống lúa mới nhằm cải tiến tính chống chịu các điều kiện bất thuận.

Một ưu điểm quan trọng khác của CRISPR/Cas9 là các cây đột biến không mang gen ngoại lai có thể thu được ở những thế hệ đầu tiên thông qua quá trình phân ly gen chuyển. Một số ví dụ về cây đột biến không mang gen chuyển ở thế hệ T1 trên cây lúa đã được công bố trong các nghiên cứu của Woo & cs. (2015); Li & cs. (2016a); Wang & cs. (2016). Gần đây, một hệ thống chỉnh sửa gen mới đã được He & cs. (2018, 2019) phát triển nhằm thu nhận được các cây đột biến không mang gen chuyển ngay ở thế hệ đầu tiên, có tên Transgene Killer CRISPR (TKC). Hệ thống TKC sử dụng một cặp gen “tự sát” có khả năng loại bỏ gen chuyển sau khi gen mục tiêu đã được chỉnh sửa. Cặp gen này được tích hợp vào cấu trúc CRISPR/Cas9, do vậy được chuyển đồng thời vào mô tế bào thực vật cùng với gen Cas9 và gRNA. Chìa khoá thành công của công nghệ TKC là phân tách sự biểu hiện của gen Cas9 và các gen “tự sát”. Các thành phần chỉnh sửa gen bao gồm Cas9 và gRNA được biểu hiện trong quá trình chuyển gen, giai đoạn tạo callus và giai đoạn phát triển sinh dưỡng. Trong khi đó, các gen “tự sát” chỉ biểu hiện ở giai đoạn sinh sản để tiêu diệt hết tất cả các tế bào hạt phấn và phôi có chứa gen chuyển. Kết quả là chỉ có các hạt không chuyển gen được tạo ra, cho phép thu nhận các cây lúa không mang các trình tự gen ngoại lai nhưng chứa gen mục tiêu đã được chỉnh sửa (He & cs., 2018; 2019).

### 3.2. Thách thức và tiềm năng

Chỉnh sửa gen ở thực vật đòi hỏi phải đưa được hệ thống chỉnh sửa vào trong tế bào thực vật. Trong những năm gần đây, đã có một bước đột phá trong chuyển gen và việc đưa ADN

ngoại lai vào tế bào hiện có thể áp dụng cho hầu hết các loại cây trồng chính, bao gồm lúa. Tuy nhiên, các kỹ thuật nuôi cấy mô lại rất khó áp dụng trên một số giống lúa, đặc biệt là các giống lúa thuộc loài phụ indica, dẫn tới việc áp dụng kỹ thuật chỉnh sửa gen bị hạn chế trong nhiều giống lúa thương mại quan trọng. Hơn nữa, việc phát triển và tối ưu hóa các phương thức nuôi cấy mô là thường tốn nhiều công sức và thời gian. Nuôi cấy mô có thể làm xuất hiện các biến dị dòng vô tính làm tổn hại đến tổng thể của cây tái sinh (Sarmast, 2016). Vì vậy, việc giảm thiểu hoặc loại bỏ yêu cầu nuôi cấy mô sẽ cải thiện hiệu quả của chuyển gen và chỉnh sửa gen trên cây trồng (Jung & Seo, 2017).

Vận chuyển hệ thống CRISPR/Cas9 vào cây trồng là một bước quan trọng trong quá trình chỉnh sửa gen ở thực vật. Để biểu hiện các hợp phần của hệ thống CRISPR/Cas9 và chọn các cây được chỉnh sửa gen, các vector chứa tất cả các hợp phần và chỉ thị chọn lọc được chuyển vào tế bào thực vật. Những gen này thường được tích hợp vào bộ gen của tế bào để cho phép biểu hiện Cas9 và gRNA. Khi các cây chỉnh sửa gen được xác định, các yếu tố này có thể được loại bỏ thông qua quá trình phân ly trong thế hệ tiếp theo hoặc bằng cách tái tổ hợp. Hiện nay, một phương pháp khác có thể thay thế đó là sự biểu hiện tạm thời của các yếu tố này mà không tích hợp vào hệ gen cây chủ. Sự biểu hiện tạm thời này có thể kịp thời để chỉnh sửa gen bằng hệ thống CRISPR/Cas9 (Hamada & cs., 2018). Bằng cách này, cây đột biến không có gen chuyển có thể thu được ngay từ thế hệ T0. Chiến lược này đã được thử nghiệm thành công ở một số cây trồng trong đó có cây lúa (Woo & cs., 2015; Liang & cs., 2017, 2018; Svitashv & cs., 2016). Chuyển gen bằng *Agrobacterium* và súng bắn gen là hai phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất. Tuy nhiên, cả hai hệ thống đều có ưu và nhược điểm. *Agrobacterium* bị giới hạn hiệu quả trong phạm vi hẹp các kiểu gen trong một loài. Chuyển gen qua súng bắn gen có thể được áp dụng cho phạm vi kiểu gen rộng hơn so với chuyển gen thông qua *Agrobacterium*, nhưng sự tái sinh của cây sau khi bắn phá có thể bị hạn chế (Altpeter & Spinger, 2016). Do đó, việc cải

tiến các kỹ thuật này hoặc phát triển các tiến bộ kỹ thuật mới có thể giúp phát triển các phương pháp chỉnh sửa gen.

Mối quan tâm chính về chỉnh sửa gen bằng công nghệ CRISPR/Cas9 là sự xuất hiện của các sự kiện đột biến ngoài mục tiêu. Đây là rào cản lớn đối với việc áp dụng các hệ thống chỉnh sửa gen trong chọn tạo giống cây trồng. Việc sử dụng các nuclease mới có độ đặc hiệu cao hơn Cas9, chẳng hạn như Cpf1, đã cải thiện được khía cạnh này. Yin & cs. (2017) đã so sánh hai nuclease trong chỉnh sửa gen *EPFL9* (*Epidermal Patterning Factor like-9*) ở lúa indica IR64 và nhận thấy cả hai hệ thống CRISPR/Cas9 và CRISPR/Cpf1 có hiệu quả ngang nhau. Đồng thời, hiệu ứng ngoài mục tiêu trong các cây đột biến được cải thiện rõ rệt khi sử dụng nuclease Cpf1.

#### 4. KẾT LUẬN

Công cụ chỉnh sửa gen đã mang lại những thành tựu to lớn cho nghiên cứu và sản xuất lúa gạo trên thế giới. Thông qua hệ thống CRISPR/Cas9, các gen chức năng và gen điều hòa liên quan đến đặc tính chống chịu stress sinh học và stress phi sinh học đã được chỉnh sửa một cách chính xác nhằm phân tích chức năng gen. Qua đó, các nhà khoa học có thể cải thiện khả năng kháng bệnh cũng như tính chống chịu điều kiện bất thuận ở một số giống lúa. Tuy nhiên, hiệu quả chỉnh sửa gen hiện nay vẫn phụ thuộc rất nhiều vào hệ thống tái sinh đối với từng dòng/giống lúa cụ thể. Có thể thấy rằng, công cụ chỉnh sửa gen, đặc biệt là hệ thống CRISPR/Cas9 rất có tiềm năng ứng dụng trong nghiên cứu ở Việt Nam. Dựa trên những hiểu biết về các gen ứng viên quan trọng, chúng ta có thể cải biên lại thông tin di truyền của các giống lúa đại trà hiện nay nhằm nâng cao tính chống chịu của giống.

#### LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Dự án Việt Bỉ đã tài trợ kinh phí để nghiên cứu này được thực hiện qua đề tài “Design a gene-

editing complex, CRISPR/Cas9, to improve the blast resistance trait for Vietnamese rice”.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Altpeter F. & Springer N.M. (2016). Advancing Crop Transformation in the Era of Genome Editing. *The Plant Cell*. 28(7): 1510-1520.
- Chao L., Zong Y., Wang Y., Jin S., Zhang D., Song Q., Zhang R. & Gao C. (2018). Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biology*. 19.
- Chen J.F., Zhao Z.X., Li Y., Li T.T., Zhu Y., Yang X.M., Zhou S.X., Wang H., Zhao J. Q. & Pu M. (2021). Fine-tuning roles of Osa-miR159a in rice immunity against *Magnaporthe oryzae* and development. *Rice*. 14(1): 1-11.
- Dong Y., Jin X., Tang Q., Zhang X., Yang J., Liu X., Cai J., Zhang X., Wang X. & Wang Z. (2017). Development and Event-specific Detection of Transgenic Glyphosate-resistant Rice Expressing the G2-EPSPS Gene. *Frontiers in plant science*. 8(885).
- Duan Y.B., Li J., Qin R.Y., Xu R.F., Li H., Yang Y.C., Ma H., Li L., Wei P.C. & Yang J.B. (2016). Identification of a regulatory element responsible for salt induction of rice OsRAV2 through ex situ and in situ promoter analysis. *Plant molecular biology*. 90(1-2): 49-62.
- Fartyal D., Agarwal A., James D., Borphukan B., Ram B., Sheri V., Agrawal P.K., Achary V.M.M. & Reddy M.K. (2018). Developing dual herbicide tolerant transgenic rice plants for sustainable weed management. *Scientific reports*. 8: 11598.
- Hamada H., Liu Y., Nagira Y., Miki R., Taoka N. & Imai R. (2018). Biolistic-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat. *Scientific reports*. 8: 14422.
- He Y., Zhu M., Wang L., Wu J., Wang Q., Wang R. & Zhao Y. (2018). Programmed Self-Elimination of the CRISPR/Cas9 Construct Greatly Accelerates the Isolation of Edited and Transgene-Free Rice Plants. *Molecular plant*. 11(9): 1210-1213.
- He Y., Zhu M., Wang L., Wu J., Wang Q., Wang R. & Zhao Y. (2019). Improvements of TKC Technology Accelerate Isolation of Transgene-Free CRISPR/Cas9-Edited Rice Plants. *Rice Science*. 26(2): 109-117.
- Huy Le, Nhung Hong Nguyen, Dong Thị Ta, Thao Nhu Thi Le, Thao Phuong Bui, Ngoc Thu Le, Cuong Xuan Nguyen, Hardy Rolletschek, Gary Stacey, Minviluz G. Stacey, Ngoc Bich Pham, Phat Tien Do & Ha Hoang Chu (2020). CRISPR/Cas9-Mediated Knockout of Galactinol Synthase-Encoding Genes Reduces Raffinose Family



- Oligosaccharide Levels in Soybean Seeds. *Frontiers in Plant Science*. 11: 612942.
- Inui H., Shiota N., Ido Y., Inoue T., Hirose S., Kawahigashi H., Ohkawa Y. & Ohkawa H. (2001). Herbicide Metabolism and Tolerance in the Transgenic Rice Plants Expressing Human CYP2C9 and CYP2C19. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 71(3): 156-169.
- Janni M., Gulli M., Maestri E., Marmiroli M., Valliyodan B., Nguyen H. T. & Marmiroli N. (2020). Molecular and genetic bases of heat stress responses in crop plants and breeding for increased resilience and productivity. *Journal of Experimental Botany*. 71(13): 3780-3802.
- Jiang W., Bikard D., Cox D., Zhang F. & Marraffini L.A. (2013a). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*. 31(3): 233-239.
- Jiang W., Zhou H., Bi H., Fromm M., Yang B. & Weeks D.P. (2013b). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic acids research*. 41(20): e188.
- Jung J.H. & Seo Y. (2017). Challenges in wide implementation of genome editing for crop improvement. *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 20(2): 129-135.
- Klap C., Yeshayahou E., Bolger A.M., Arazi T., Gupta S.K., Shabtai S., Usadel B., Salts Y. & Barg R. (2017). Tomato facultative parthenocarpy results from SIAGAMOUS-LIKE 6 loss of function. *Plant Biotechnology Journal*. 15: 634-647.
- Lenaerts B., Collard B.C.Y. & Demont M. (2019). Review: Improving global food security through accelerated plant breeding. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*. 287: 110207-110207.
- Li J., Meng X., Zong Y., Chen K., Zhang H., Liu J., Li J. & Gao C. (2016a). Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9. *Nature plants*. 2: 16139.
- Li J., Zhang X., Sun Y., Zhang J., Du W., Guo X., Li S., Zhao Y. & Xia L. (2018). Efficient allelic replacement in rice by gene editing: A case study of the NRT1.1B gene. *Journal of integrative plant biology*. 60(7): 536-540.
- Li M., Li X., Zhou Z., Wu P., Fang M., Pan X., Lin Q., Luo W., Wu G. & Li H. (2016b). Reassessment of the Four Yield-related Genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in Rice Using a CRISPR/Cas9 System. *Frontiers in plant science*.
- Liang Z., Chen K., Tingdong L., Zhang Y., Wang Y., Zhao Q., Liu J., Huawei Z., Liu C., Ran Y. & Gao C. (2017). Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications*. 8: 14261.
- Liang Z., Chen K., Zhang Y., Liu J., Yin K., Qiu J.L. & Gao C. (2018). Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 in vitro transcripts or ribonucleoproteins. *Nature Protocols*. 13: 413-430.
- Liu D., Chen X., Liu J., Ye J. & Guo Z. (2012). The rice ERF transcription factor OsERF922 negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance. *Journal of experimental botany*. 63(10): 3899-3911.
- Lou D., Wang H., Liang G. & Yu D. (2017). OsSAPK2 Confers Abscisic Acid Sensitivity and Tolerance to Drought Stress in Rice. *Frontiers in plant science*. 8: 993.
- Ma J., Chen J., Wang M., Ren Y., Wang S., Lei C., Cheng Z. & Sodmergen (2018). Disruption of OsSEC3A increases the content of salicylic acid and induces plant defense responses in rice. *Journal of experimental botany*. 69(5): 1051-1064.
- Malnoy M., Viola R., Jung M.H., Koo O.J., Kim S., Kim J.S., Velasco R. & Nagamangala K.C. (2016). DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Front Plant Sci*. 7: 1904.
- Meng X., Yu H., Zhang Y., Zhuang F., Song X., Gao S., Gao C. & Li J. (2017). Construction of a Genome-Wide Mutant Library in Rice Using CRISPR/Cas9. *Mol Plant*. 10(9): 1238-1241.
- Minkenberg B., Xie K. & Yang Y. (2017). Discovery of rice essential genes by characterizing a CRISPR-edited mutation of closely related rice MAP kinase genes. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 89(3): 636-648.
- Nawaz G., Usman B., Peng H., Zhao N., Yuan R., Liu Y. & Li R. (2020). Knockout of pi21 by crispr/cas9 and itraq-based proteomic analysis of mutants revealed new insights into *M. oryzae* resistance in elite rice line. *Genes*. 11(7): 735.
- Oz M.T, Altpeter A., Karan R., Merotto A. & Altpeter F. (2021). CRISPR/Cas9-Mediated Multi-Allelic Gene Targeting in Sugarcane Confers Herbicide Tolerance. *Frontier in Genome Editing*. 3: 673566.
- Sarmast M. (2016). Genetic transformation and somaclonal variation in conifers. *Plant Biotechnology Reports*. 10: 309-325.
- Shen C., Que Z., Xia Y., Tang N., Li D., He R. & Cao M. (2017). Knock out of the annexin gene OsAnn3 via CRISPR/Cas9-mediated genome editing decreased cold tolerance in rice. *Journal of Plant Biology*. 60: 539-547.
- Shimatani Z., Fujikura U., Ishii H., Matsui Y., Suzuki M., Ueke Y., Taoka K.I., Terada R., Nishida K. & Kondo A. (2018). Inheritance of co-edited genes by CRISPR-based targeted nucleotide substitutions in rice. *Plant physiology and biochemistry*. 131: 78-83.

- Shimatani Z., Kashojiya S., Takayama M., Terada R., Arazoe T., Ishii H., Teramura H., Yamamoto T., Komatsu H., Miura K., Ezura H., Nishida K., Ariizumi T. & Kondo A. (2017). Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology*. 35: 441-443.
- 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. *Molecular plant*. 9(4): 628-631.
- Svitashev S., Schwartz C., Lenderts B., Young J.K. & Mark Cigan A. (2016). Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications*. 7: 13274-13274.
- Te Z., Lin C.Y. & Shen Z.C. (2011). Development of Transgenic Glyphosate-Resistant Rice with G6 Gene Encoding 5-Enolpyruvylshikimate-3Phosphate Synthase. *Agricultural Sciences in China*. 10(9): 1307-1312.
- Wang F., Wang C., Liu P., Lei C., Hao W., Gao Y., Liu Y.G. & Zhao K. (2016). Enhanced Rice Blast Resistance by CRISPR/Cas9-Targeted Mutagenesis of the ERF Transcription Factor Gene OsERF922. *PloS one*. 11(4): e0154027.
- Wang M., Wang S., Liang Z., Shi W., Gao C. & Xia G. (2018). From genetic stock to genome editing: gene exploitation in wheat. *Trends in Biotechnology*. 36: 160-172.
- Woo J.W., Kim J., Kwon S.I., Corvalán C., Cho S.W., Kim H., Kim S.G., Kim S.T., Choe S. & Kim J.S. (2015). DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nature biotechnology*. 33(11): 1162-1164.
- Yin X., Biswal A.K., Dionora J., Perdigon K.M., Balahadia C.P., Mazumdar S., Chater C., Lin H.C., Coe R.A., Kretzschmar T., Gray J.E., Quick P.W. & Bandyopadhyay A. (2017). CRISPR-Cas9 and CRISPR-Cpf1 mediated targeting of a stomatal developmental gene EPFL9 in rice. *Plant Cell Rep*. 36(5): 745-757.
- Yoon Y., Seo D.H., Shin H., Kim H.J., Kim C.M. & Jang G. (2020). The Role of Stress-Responsive Transcription Factors in Modulating Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Agronomy*. 10(6): 788.
- Yu Q., Jalaludin A., Han H., Chen M., Sammons R.D. & Powles S.B. (2015). Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance. *Plant physiology*. 167(4): 1440-1447.
- Yu S., Ali J., Zhang C., Li Z. & Zhang Q. (2020). Genomic Breeding of Green Super Rice Varieties and Their Deployment in Asia and Africa. *Theor Appl Genet*. 133(5): 1427-1442.
- Zeng X., Luo Y., Vu N.T.Q., Shen S., Xia K. & Zhang M. (2020). CRISPR/Cas9-mediated mutation of OsSWEET14 in rice cv. Zhonghua11 confers resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* without yield penalty. *BMC Plant Biology*. 20.
- Zhao H., Wang X., Jia Y., Minkenberg B., Wheatley M., Fan J., Jia M.H., Famoso A., Edwards J.D., Wamishe Y., Valent B., Wang G.L. & Yang Y. (2018). The rice blast resistance gene *Ptr* encodes an atypical protein required for broad-spectrum disease resistance. *Nature communications*. 9(1): 2039.
- Zhou J., Peng Z., Long J., Sosso D., Liu B., Eom J. S., Huang S., Liu S., Vera Cruz C., Frommer W.B., White F.F. & Yang B. (2015). Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 82(4): 632-643.
- Zhou J.P., Xin X.H., He Y., Chen H.Q., Li Q., Tang X., Zhong Z.H., Deng K.J., Zheng X.L., Akher S.A., Cai G.Z., Qi Y.P. & Zhang Y. (2018). Multiplex QTL editing of grain-related genes improves yield in elite rice varieties. *Plant Cell Rep*. 38(4): 475-485.