

TỔNG QUAN VỀ DI TRUYỀN PHÔI MÀM KHÔNG LỖ CỦA HẠT GẠO

GS BÙI CHÍ BỬU

Ngày 22 tháng 5 năm 2021

TẠI SAO PHẢI CẢI TIẾN PHÔI MÀM TO?



Ở Hàn Quốc, Chung et al. (2017) xác định được đặc điểm sinh hóa và sinh lý của gạo có phôi mầm không lỗ, từ giống lúa "Seonong 17" và "Keunnunjami". Seonong 17 và Keunnunjami có phôi mầm lớn hơn gạo thông thường. Phân tích proteomic bằng điện di hai chiều cho thấy sự khác biệt phổ biểu hiện protein của Seonong 17 và Keunnunjami.

Hình: Kiểu hình phôi mầm to *LE*. Thang chuẩn là 1 mm (Lee et al. 2017)

và lõi sống. Có nhiều thuốc kiểm soát huyết áp như diuretics, β -adrenoceptor blockers, angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, calcium channel blockers, α -adrenergic receptor blockers, vasodilators, và thuốc có bản chất *centrally acting*. Tuy nhiên, xử lý hypertension là một tiến trình lâu dài, không phải chỉ có liệu pháp thuốc mà còn phải kết hợp với thay đổi lối sống, ví dụ hạn chế rượu bia, hạn chế đồ ăn mặn và chất béo. Bên cạnh đó, người ta phát hiện γ -Aminobutyric acid (GABA), là một trong những chất **neurotransmitters** chủ lực ức chế hệ thần kinh trung ương, ví dụ như vận chuyển neuron và kích thích **hypotension**. Nó hoạt động theo bản chất diuretic và an thần (tranquilizer). GABA có trong nhiều loài thực phẩm, trong rau, quả, trà xanh, sữa lên men, nước đậu nành, cà chua, gạo lứt nảy mầm. GABA có nhiều trong gạo lứt đã góp phần kiểm soát cao huyết áp rất hiệu quả (Zhou et al. 2019). Họ xác định "Shangshida NO.5" một đột biến phôi mầm không lỗ mang gen **GE** trong giống lúa "Chao2-10". Nó có tác dụng rất rõ ràng trong quản lý bệnh cao huyết áp (thí nghiệm trên chuột).

Zhao et al. (2017) tiến hành nghiên cứu cơ chế phân tử của hàm lượng GABA tích lũy trong hạt gạo. Họ phân tích mức độ biểu hiện các gen điều khiển hệ biến dưỡng chất GABA, hàm lượng GABA trung gian khi hạt gạo phát triển, và nghiệm thức gạo lứt tiên nảy mầm của giống lúa phôi mầm không lỗ 'Shangshida No. 5' so sánh với giống lúa bình thường 'Chao2-10'. Hàm lượng GABA cao hơn của giống lúa 'Shangshida No. 5' đi kèm theo sự điều tiết kiểu "up" của phân tử transcripts. Hàm lượng chất trung gian trong chu trình polyamine biểu hiện kiểu "down" của phân tử transcript gen dị hóa GABA. Trong hạt gạo lứt nảy mầm, hàm lượng GABA cao hơn của giống lúa 'Shangshida No. 5' song hành với sự kiện upregulation của gen **OsGAD** và transcript của gen này trong chu trình polyamine, **Glu** và chu trình polyamine, downregulation của transcript gen **GABA** dị hóa (Zhao et al. 2017).

DI TRUYỀN TÍNH TRẠNG PHÔI MÀM TO

Mặc dù phôi mầm chỉ chiếm 2–3% khối lượng hạt thóc, nhưng nó là nguồn dinh dưỡng cực kỳ tốt cho sức khỏe con người. Bởi vì kích thước phôi mầm lớn làm gia tăng hàm lượng dinh dưỡng và các hợp chất có tính chất tăng hoạt tính sinh học được dự trữ trong hạt. Đột biến phôi mầm khổng lồ có thuật ngữ là “giant embryo” của cây lúa (*Oryza sativa* L.) là tài nguyên di truyền tuyệt vời để cải tiến giá trị dinh dưỡng của hạt gạo.

Ba dòng đột biến “*giant embryo*” được tìm thấy. Đó là đột biến *le* (large embryo: phôi lớn), *ge* (giant embryo: phôi khổng lồ) và *ges* (super-giant embryo: phôi siêu khổng lồ). Chúng có kiểu hình phôi mầm rất biến đổi được Lee et al. (2021) sử dụng trong nghiên cứu này. Người ta tìm hiểu những gen điều khiển kích thước phôi mầm (embryo size) trong ba thể đột biến *le*, *ge* và *ges*, xem chúng có “allelic” với nhau hay không? Mặc dù *ge* và *ges* có allelic với GIANT EMBRYO (GE), nhưng *le* không allelic với *ge* và *ges* theo kết quả **allelism test**.

Gen *GE* mang một đoạn phân tử nucleotide thay thế rất độc đáo (nucleotide substitution) trong mỗi alen của hai đột biến *ge* và *ges*, resulting in non-synonymous mutations in exon 2 of GE in both mutants. However, the GE gene of the *le* đã không mang bất cứ đột biến kiểu hình nào. Kết quả cho thấy kiểu hình phôi mầm khổng lồ của *le* được khống chế bởi một gen khác. Sử dụng phương pháp “map-based cloning”, người ta lập bản đồ di truyền của gen *LE*, nó định vị trên vai ngắn của **nhễm sắc thể 3**. Đột biến *le* cho thấy một sự lớn lên một cách khiêm tốn của kích thước phôi mầm. Nó là kết quả của sự gia tăng kích thước tế bào “**scutellar parenchyma**”. Gen *LE* mã hóa protein **C3HC4-type RING finger**. Gen biểu hiện ở mức độ tương đối cao ở cuối giai đoạn phát triển hạt. Tiến hành knockdown sự biểu hiện của gen *LE* bằng kỹ thuật RNA can thiệp, kết quả làm tăng kích thước phôi mầm của hạt gạo. Điều này khẳng định rằng vai trò của *LE* gắn với kiểu hình tính trạng kích thước phôi mầm. Người ta đã phân lập được một gen mới điều khiển kích thước phôi mầm hạt gạo. Tính chất kiểu hình và bản chất phân tử đều xác định rằng đột biến *le* đóng vai trò là nguồn di truyền đáng giá để phát triển giống lúa mới có phôi mầm to, giàu dinh dưỡng (Lee et al. 2021).

Thế giới ngày càng có nhu cầu gạo với chất lượng dinh dưỡng cao, cho nên nhiều nỗ lực đã được tiến hành nhằm cải tiến phẩm chất dinh dưỡng của cơm (Fitzgerald et al. 2009). Phôi mầm của hạt gạo chỉ chiếm 2–3% khối lượng hạt gạo, nhưng nó rất giàu dưỡng chất, ví dụ như proteins, lipids, vitamins, khoáng, và phytochemicals (Gopala Krishna et al. 1984; Tanaka et al. 1977). Chính hàm lượng dinh dưỡng của phôi mầm làm cho thị trường gạo lứt (brown rice) ngày càng khởi sắc, bên cạnh là phôi mầm được sàng lọc sau khi đánh bóng gạo và cám gạo. Mọi cố gắng trong cải tiến giống lúa về nâng cao phẩm chất dinh dưỡng đều tập trung vào kết quả tạo đột biến và du nhập gen đột biến vào giống cao sản. Rất nhiều đột biến khác nhau với kích cỡ phôi mầm khác nhau, cũng như kiểu hình của nội nhũ đã được báo cáo trong hệ gen cây lúa, bao gồm endospermless (ít nội nhũ), embryoless (ít phôi mầm), reduced embryo (phôi mầm giảm), và phôi mầm khổng lồ (giant embryo) (Satoh và Omura 1981; Hong et al. 1995). Đặc biệt đột biến phôi mầm khổng lồ đã được xem là nguồn vật liệu di truyền rất giá trị để cải thiện chất lượng dinh dưỡng hạt gạo. Cho đến nay, nhiều giống lúa có phôi mầm khổng lồ đã được báo cáo (Maeda et al. 2001; Takahashi et al. 2009; Hong et al. 2012; Han et al. 2012).

Gạo lứt của những dòng lúa đột biến này chứa hàm lượng cao hơn nhiều lần về proteins, lipids, amino acids cần thiết, vitamins (B1, B2, và E), khoáng chất (Ca, Fe, Mg, K, và P), chất tăng hoạt tính sinh học [γ -aminobutyric acid (GABA) và γ -oryzanol] so với giống nguyên thủy (wild-type) có phôi mầm bình thường (Koh et al. 1993; Zhang et al. 2005; Jeng et al. 2012; Kim et al. 2013). Đến nay, chỉ có hai gen liên quan đến kích cỡ phôi mầm đã được phân lập trong hệ gen cây lúa.

Gen thứ nhất là **GIANT EMBRYO (GE)** định vị trên **nhễm sắc thể 7** (Satoh và Iwata 1990; Koh et al. 1996). Trong 37 chỉ thị phân tử RFLP và hai chỉ thị SSRs trên nhiễm sắc thể 7, Koh et al. (1996) xác định RM18 liên kết với gen *ge^s* với giá trị 7,7 cM và RM10 liên kết với gen đích là 9,6 cM (quần thể F2 của Hwacheongbyeo-*ge^s* (super-giant embryo)/Milyang 23). Công trình của Nagasawa et al. (2013) xác định gen **GE** mã hóa **CYP78A13**, một protein đóng vai trò **cytochrome P450**. Protein có chức năng xác định kích thước phôi mầm và nội nhũ. Đột biến theo kiểu “*loss-of-function*” gen **GE** biểu hiện sự lớn lên của phôi mầm và sự nhăn nheo của nội nhũ. Bên cạnh đó, gen **GE** có vai trò quan trọng đặc biệt trong duy trì sinh mô đỉnh chồi **SAM** (shoot apical meristem). Sự biểu hiện mạnh mẽ gen **GE** thúc đẩy rõ ràng sự phân bào và gia tăng số tế bào, tăng trưởng của cây và năng suất hạt (Yang et al. 2013). Trong cây bắp, sự chèn đoạn của phân tử đóng vai trò yếu tố **transposable** tại gen **ZmGE2**, một homolog của gen **OsGE**, cho kết quả làm suy giảm sự biểu hiện gen và làm gia tăng tỷ lệ phôi mầm/nội nhũ (**EER**) (Zhang et al. 2012). Gen **ZmGE2** mã hóa **cytochrome P450 protein** của họ protein CYP78A, và sự biểu hiện mạnh mẽ gen **OsGE** trong cây bắp transgenic làm suy giảm tỷ lệ **EER**. Như vậy **cytochrome P450 proteins** có vai trò quan trọng trong điều tiết kích cỡ phôi mầm. Cơ chế của EER mang tính chất bảo thủ trong quá trình tiến hóa của cây bắp và cây lúa (Zhang et al. 2012).

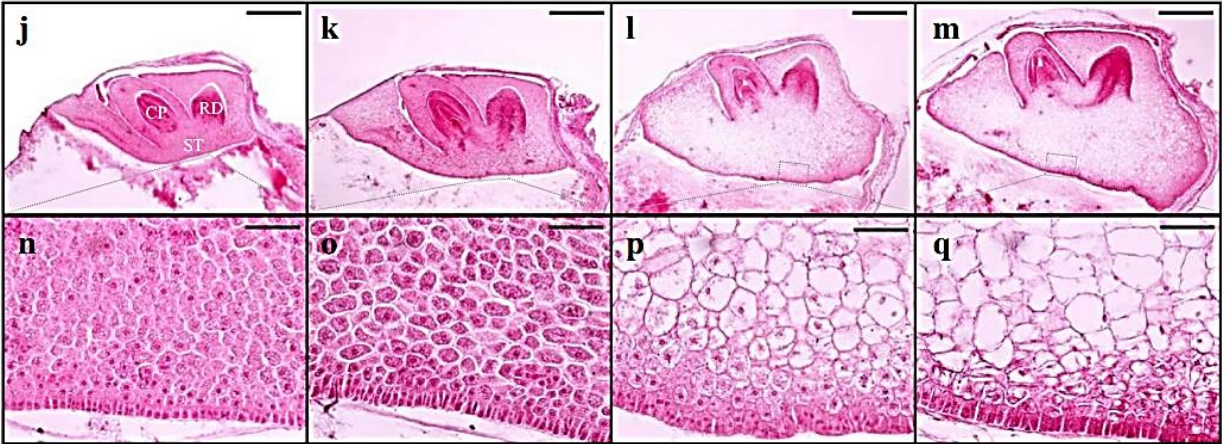
Gen thứ hai là **GOLIATH (GO)** liên quan đến phôi mầm đã được người ta xác định trên bản đồ di truyền, định vị trên vai dài của **nhễm sắc thể 3** (Taramino et al. 2003). Đột biến được phân lập riêng biệt là **plastochron3 (PLA3)** allelic với đột biến. Kiểu đột biến *loss of function PLA3*, mã hóa glutamate carboxypeptidase, biểu hiện bản chất của kiểu hiện gen đa tính trạng (**pleiotropic**), bao gồm tính trạng phôi mầm to (bởi sự gia tăng số tế bào), tính trạng sức sống của hạt mầm, tính trạng khiếm khuyết sự duy trì **SAM**, hình dạng lá bị méo mó (Kawakatsu et al. 2009). Gần đây, nguồn vật liệu mới về tính trạng phôi mầm khổng lồ đã được công bố; kiểu hình phôi mầm to và hàm lượng rất cao **triacylglycerol** so với giống nguyên thủy (wild type). Gen này đáp ứng tốt với kiểu hình mô tả trên, không allelic với gen **GE**. Nó được xác định vị trên bản đồ di truyền ở trên vai ngắn của nhiễm sắc thể 3 (Sakata et al. 2016). Theo nghiên cứu này, người ta tiến hành trắc nghiệm **allelism tests** để xác định gen có đáp ứng tốt với những kiểu hình phôi mầm to hay không? trong đột biến **ge**, **ges**, và **le**, chúng có allelic với nhau không? Người ta đã xác định được một gen mới điều khiển kích cỡ phôi mầm.



Hình 1: Hạt gạo và phôi mầm với kiểu hình HC (giống lúa Hwacheong) và đột biến phôi mầm khổng lồ. Từ trái sang phải là **HC**, **le**, **ge**, và **ges**. Scale bars = 2 mm (Lee et al. 2021).

Di truyền số lượng

Dong et al. (2003) nghiên cứu QTL điều khiển kích thước phôi mầm thông qua quần thể cận giao tái tổ hợp RILs từ cặp lai giữa Asominori và IR24. Có tất cả 289 chỉ thị phân tử RFLP được sử dụng. Người ta quan sát được hiện tượng phân bố liên tục và phân ly có tính chất vượt trội về tính trạng chiều dài phôi mầm, chiều rộng phôi mầm trong quần thể RILs. Kết luận: tính trạng kích thước phôi mầm biểu thị tính chất di truyền số lượng. Ba QTL điều khiển chiều dài phôi được tìm thấy trên nhiễm sắc thể **1, 2, và 3**; chúng giải thích được 17,9, 25,7, và 9,2% biến thiên kiểu hình, theo thứ tự. Ba QTL điều khiển chiều rộng phôi mầm được tìm thấy trên nhiễm sắc thể **2, 8, và 10**; chúng giải thích được 13,5, 15,7, và 15,0% biến thiên kiểu hình, theo thứ tự (Dong et al. 2003).



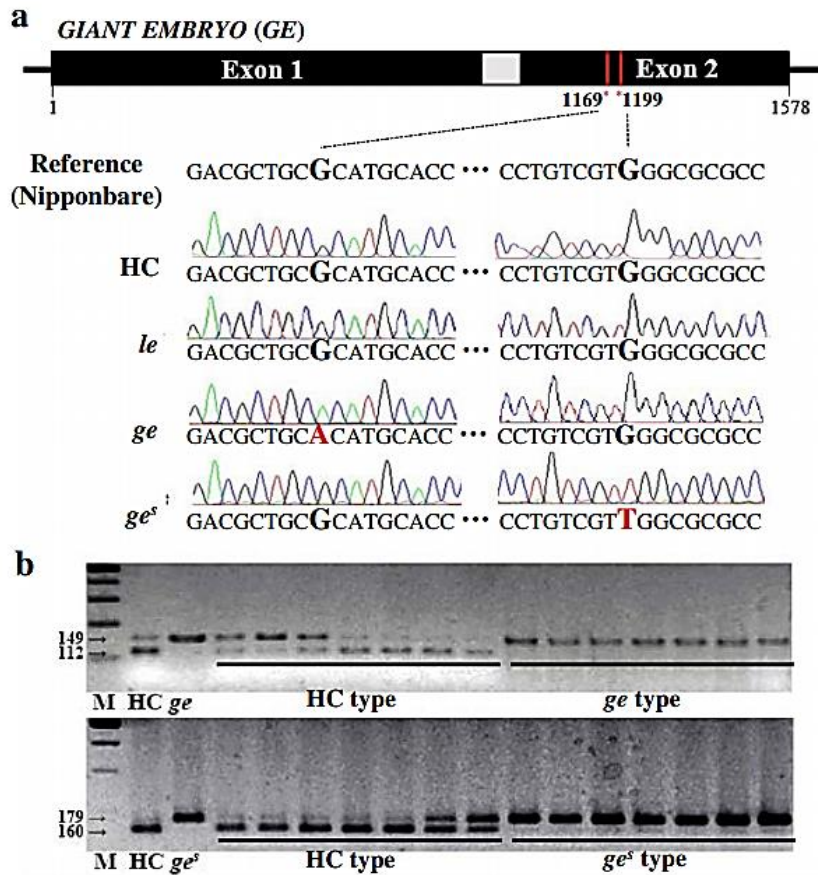
Hình 2:

Đặc điểm của phôi mầm HC và phôi mầm không lồ. (Lee et al. 2021)

j-q. Giải phẫu học phôi mầm 20 ngày tuổi sau khi thụ phấn (DAP): wild type (j và n), *le* (k và o), *ge* (l và p), và *ges* (m và q).

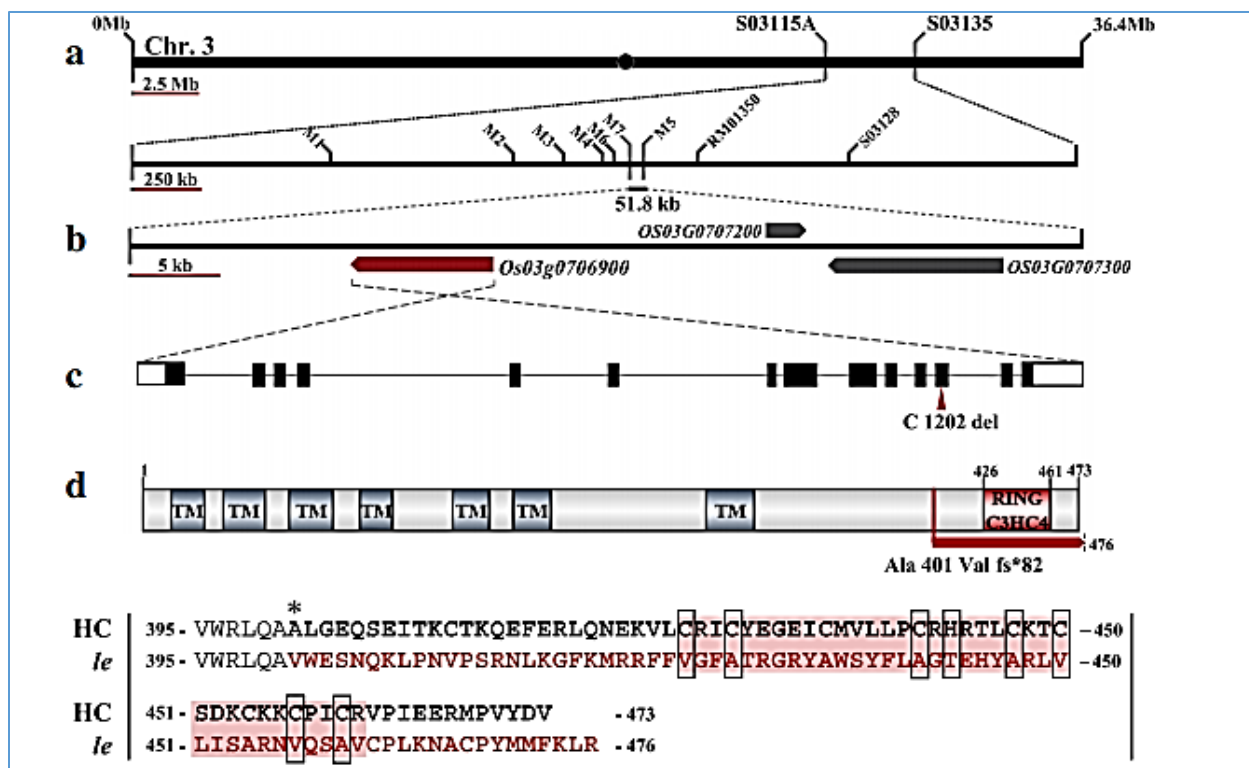
CP, coleoptiles; RD, radicle; ST, scutellum (n-q).

The means followed by lowercase letters indicate statistically significant difference ($p < 0.05$, ANOVA) according to Duncan test. Error bars indicate \pm s.d. of replicates. Scale bars = 0.5 mm (j-m), Scale bar = 50 μ m (n-q)

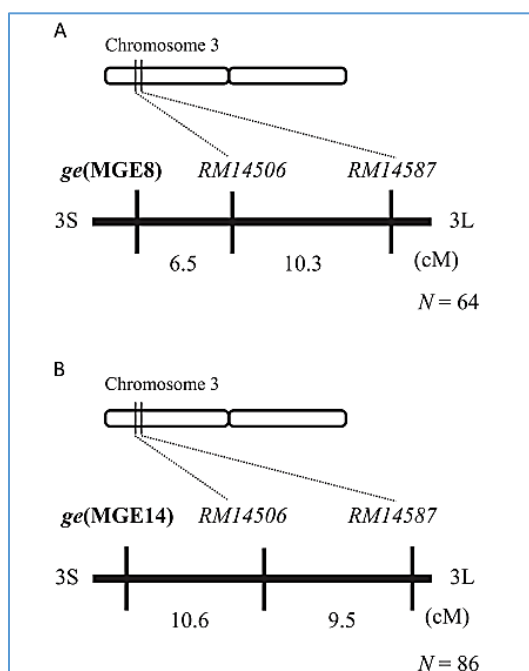


Hình 3:

Phân tích trình tự DNA tại locus *GE*. (a) Xác định đột biến tại *GE* locus. (b) Trắc nghiệm co-segregation tìm đột biến điểm và kiểu hình phôi mầm to của F_2 dẫn xuất từ tổ hợp lai HC/*ge* và HC/*ges* (Lee et al. 2021).

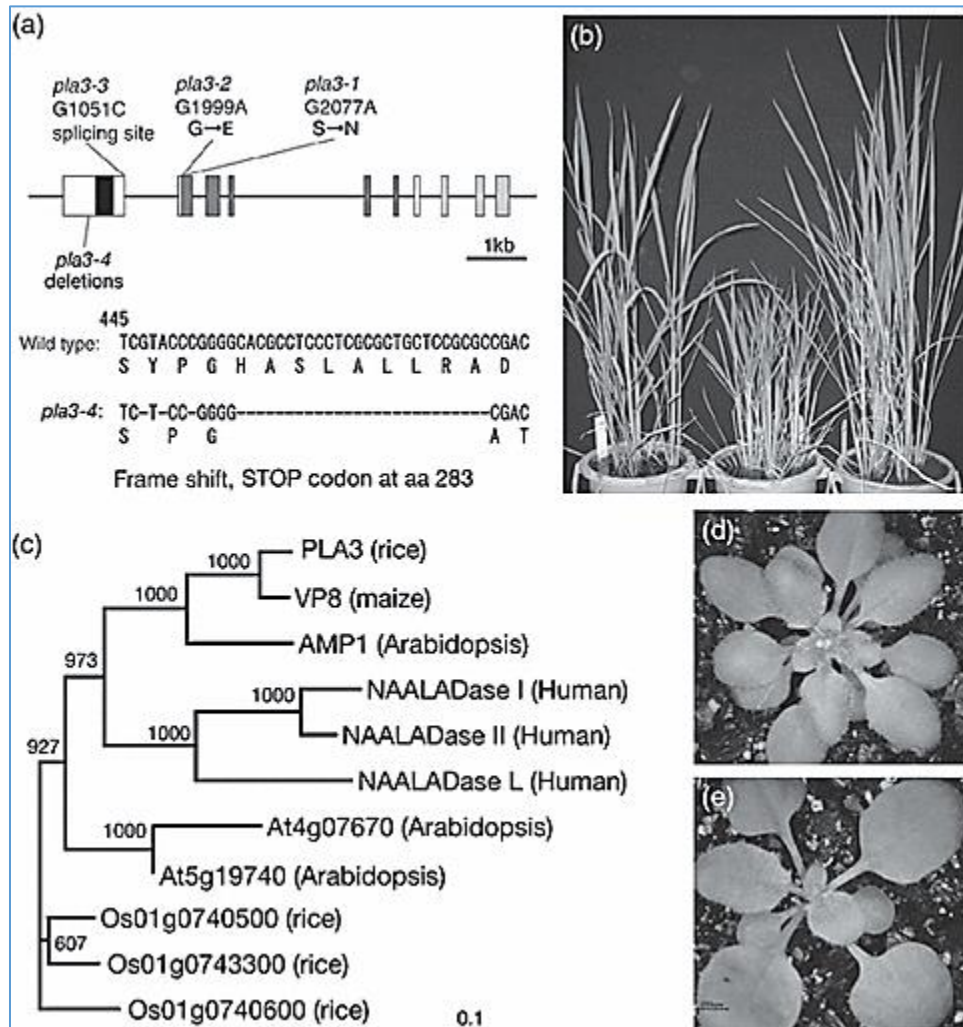


Hình 5: “Dòng hóa gen trên cơ sở bản đồ” *LE*. (a) Sơ đồ mapping tại *LE* locus. (b) ORFs ứng cử viên. (c) *LE* gene structure và splicing pattern. Đường đen: intron, hộp trắng: UTRs, hộp đen: exons. Mũi tên đỏ là vị trí đột biến. (d) *LE* protein structure và so sánh chuỗi trình tự amino acid giữa *HC* và *le* mutant. Dấu hoa thị là vị trí của amino acid substitution bởi một base bị mất trong *le* mutant. Amino acids trong trình tự khung **frameshift (fs)** biểu thị màu đỏ. Nền đỏ và black open boxes là trình tự amino acid của RING C3HC4 domain và phân tử bảo thủ trong domain (Lee et al. 2021).



Di truyền và tính ổn định của đột biến phôi mầm không lồ, qua nhiều thế hệ con lai, được xem xét qua nguồn giống lúa P47. Dòng lúa này được tạo ra bởi kỹ thuật chèn T-DNA vào quần thể F₂ giữa P47 x Junam. Các dòng đột biến tăng 1,5 lần chiều dài phôi, 1,7 lần chiều rộng phôi và 1,8 lần khối lượng của 100 phôi mầm, qua 3 thế hệ liên tục (Qin et al. 2009).

Hình 6: Bản đồ liên kết gen: (A) gen *ge* (MGE8); (B) gen *ge* (MGE14) trên nhiễm sắc thể 3 (Sakata et al. 2016).



Hình 7: Cấu trúc của gen *PLA3* (Kawakatsu et al. 2009)

- (a) Exon/intron của gen *PLA3* gene. 10 hộp biểu trưng cho exons. Vùng domain của Protease associated (PA), domain của M28 peptidase và domain của transferrin receptor-like dimerization (TFR) biểu trưng bằng màu đen black, xám đậm và xám nhạt, theo thứ tự. Vị trí của 4 đột biến gen *pla3*.
- (b) Đột biến *pla3* mutation. Cây wild type (trái), *pla3-1* (giữa) và *pla3-2* (phải).
- (c) Cây gia hệ của họ glutamate carboxypeptidases. Con số ở mỗi branch point biểu trưng giá trị bootstrap (n là 1000).
- (d) Arabidopsis *amp1* bởi *PLA3/GO*: (d) *amp1* cây non,
- (e) Cây non Arabidopsis *amp1* được cứu nhờ du nhập vào *PLA3/GO* cDNA của cây lúa.

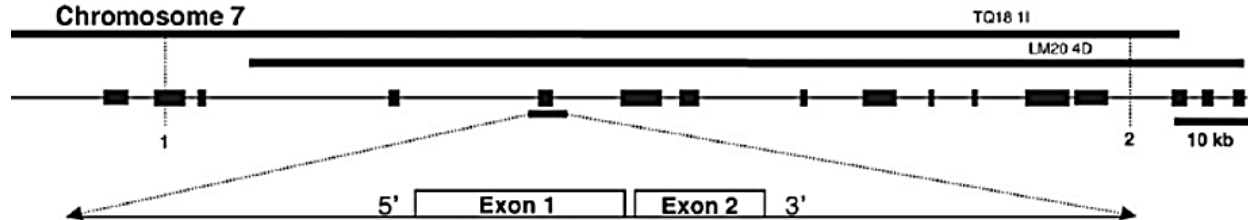
Phân tích di truyền đột biến

Dầu cám rất có lợi cho sức khỏe. Ở Nhật, Sakata et al. (2016) nghiên cứu tiềm năng của triacylglycerol (TAG) trong dầu cám ở giống lúa có phôi mầm khổng lồ, nhờ đột biến hóa học (*N*-methyl-*N*-nitrosourea: MNU). Thanh học hạt M₂, người ta tìm thấy bốn dòng có phôi mầm khổng lồ. Kết quả phân tích di truyền cho thấy các loci đích của dòng lúa MGE12 và MGE13 có tính chất allelic với *giant embryo* (*ge*) trên nhiễm sắc thể 7. Chính đột biến thay đổi base làm ra

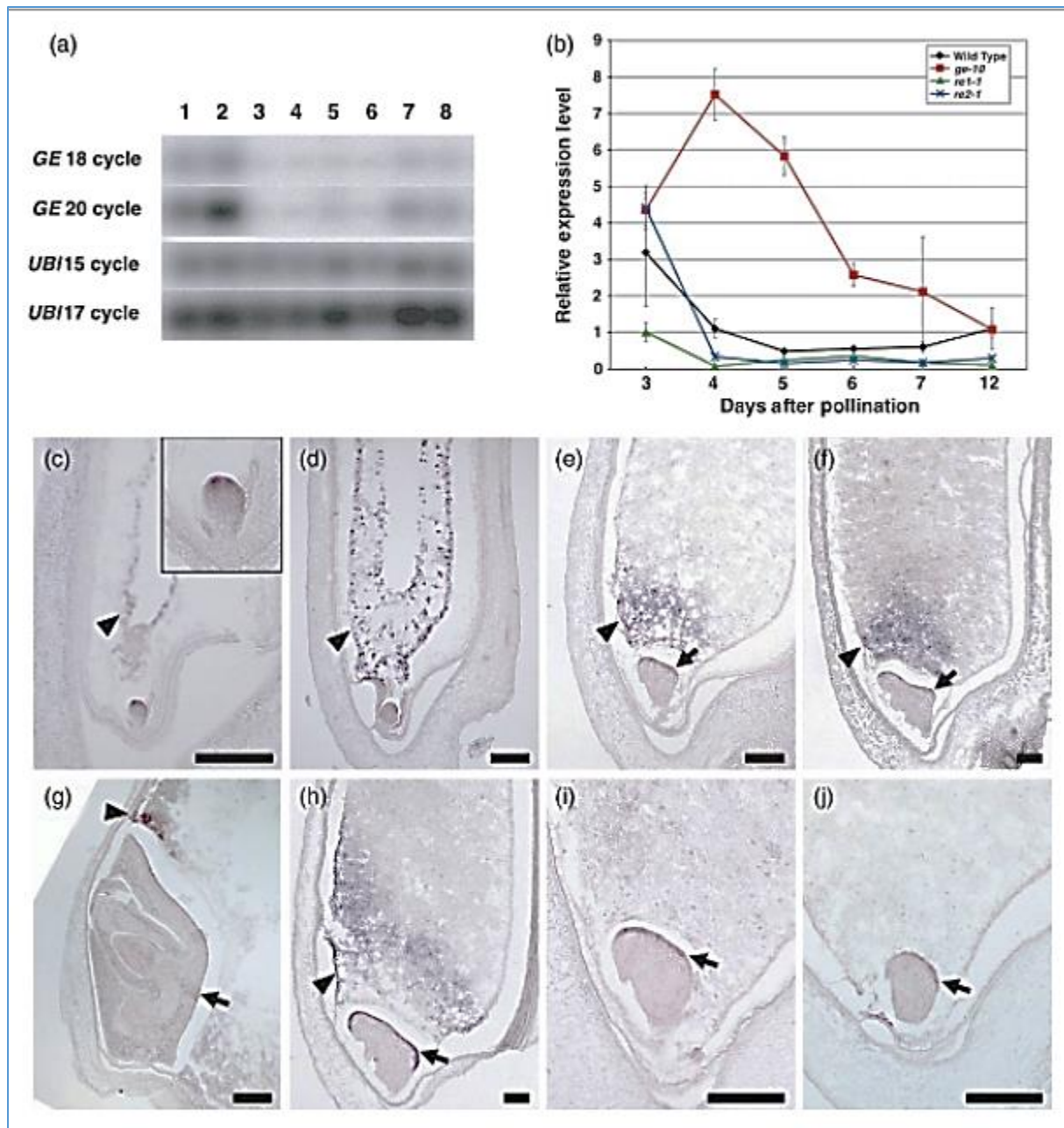
gen mới *Os07g0603700*. Loci đích của dòng MGE8 và MGE14 không allelic với gen *ge*, cả hai đều được định vị trên bản đồ di truyền ở nhiễm sắc thể 3. Dòng MGE13 có các tính trạng nông học giống như giống lúa ‘Mizuhochikara’. Người ta xem đó là nguồn vật liệu để phục vụ cải tiến hàm lượng dầu cám trong giống lúa phôi mầm to (Sakata et al. 2016).

Hong et al. (1995) nghiên cứu 188 dòng đột biến lặn, rồi tiến hành thanh lọc 5600 cá thể M_2 của giống gốc Taichung 65 và Kinmaze. Phương pháp đột biến hóa học được xử lý trên hoa lúa khi có giao tử (zygotes) hoặc hai tế bào phôi mầm, với liều lượng **1.0 mM MNU** (N-methyl-N-nitrosourea). Tất cả gen đột biến allelic với gen lặn *ge* trên nhiễm sắc thể 7 (Satoh và Iwata 1990). Người ta ký hiệu 6 alen ở locus *Ge* là *ge-2* (**odm30**), *ge-3* (**odm 44**), *ge-4* (**odm 90**), *ge-5* (**odm 93**) và *ge-6* (**odm 132**), còn alen nguyên bản là *ge-1*. Mặt khác, trong đột biến phôi mầm bị giảm, chỉ có con lai F_1 của cặp lai **odm49/odm16** biểu hiện kiểu hình phôi mầm bị giảm. Những cặp lai khác có tỷ lệ phân ly ở F_2 theo luật Mendel là 9:7 (hai gen lặn bổ sung cho nhau: complementary gene action). Bốn đột biến có phôi mầm suy giảm biểu hiện 3 loci độc lập, *RE1* với hai alen, *re1-1*(odm 16) và *re1-2* (odm49), *RE2* với một alen, *re2* (odm48), và *RE3* với một, *re3* (odm62). Phân tích đột biến kép cho thấy rằng *re1-1* và *re2* tương tác epistatic với alen *ge* (Hong et al. 1990).

Nagasawa et al. (2013) đã tiến hành dòng hóa gen *GIANT EMBRYO (GE)* như một gen “cytochrome P450”. Kết quả phân tích di truyền phân tử cho thấy gen *GE* biểu hiện ở vùng đôi mặt với phôi mầm trong nội nhũ và tại mô “scutellar epithelium” của phôi mầm. Cả hai vị trí biểu hiện gen này cần có một cân bằng về kích thước nhất định giữa phôi mầm (2n) và nội nhũ (3n). Sự điều tiết mức độ biểu hiện gen *GE* có vai trò vô cùng quan trọng trong xác định kích thước của phôi mầm so với nội nhũ khi hạt thóc phát triển (Nagasawa et al. 2013).



Hình 8: Bản chất phân tử của gen *GE* (Nagasawa et al. 2013).



Hình 9: Phân tích biểu hiện của gen *GE* (Nagasawa et al. 2013).

(a) Reverse transcriptase-PCR analysis, RNA tổng số của wild-type (1) và *ge-2* (2) ở giai đoạn hạt phát triển 4–6 ngày sau thụ phấn, phiến lá của wild-type (3), bẹ lá của wild-type (4), rễ lúa wild-type (5), gié lúa non của wild-type (6), *re1-2* (7) và *re2-1* (8) khi hạt phát triển 4–6 ngày sau thụ phấn. *Ubiquitin* là đối chứng. (*DAP: ngày sau thụ phấn)

(b) Real-time RT-PCR analysis của biểu hiện gen *GE* của cây wild type, *ge-10*, *re1-1* và *re2-1* giai đoạn hạt phát triển. Mức độ biểu hiện gen *GE* tương ứng với *ACT1*. Thanh đứng là SE.

(c)–(k) *In situ* hybridization của phân tử *GE* transcripts trong hạt wild-type:

(c)–(g) Biểu hiện gen *GE* trong hạt wild-type ở giai đoạn 2 DAP (c), 3 DAP (d), 4 DAP (e), 5 DAP (f) và 10 DAP (g). Inset trong (c) được tăng lớn lên ở trong phôi mầm.

(h)–(j) Biểu hiện gen *GE* trong hạt *ge-10* (h), *re1-2* (i) và *re2-1* (j) ở 5 DAP. Mũi tên chỉ sự biểu hiện gen *GE* trong nội nhũ và mô scutellar epithelium. Bars = 100 μ m in (c)–(f) và (h)–(j); 500 μ m trong (g).

Tài liệu tham khảo

- Chung SI, Lee SC, Kang MY. 2017 Physicochemical properties of giant embryo rice Seonong 17 and Keunnunjami. *Biosci Biotechnol Biochem.* 81(5):972-978.
- Dong Y, Tsuzuki E, Kamiunten H, Terao H, Lin DZ. 2003. Mapping of QTL for Embryo Size in Rice. *Cell Biology & Molecular Genetic.* 43(3):1068-1071.
- Fitzgerald MA, McCouch SR, Hall RD. 2009. Not just a grain of rice: the quest for quality. *Trends Plant Sci* 14(3):133–139
- Gopala Krishna AG, Prabhakar JV, Sen DP. 1984. Effect of degree of milling on tocopherol content of rice bran. *J Food Sci Technol* 21(4):222–224
- Han SJ, Kwon SW, Chu S-H, Ryu SN. 2012. A new rice variety ‘Keunnunjami’, with high concentrations of Cyanidin 3-glucoside and Giant embryo. *Korean J Breed Sci* 44(2):185–189
- Hong HC, Kim YG, Choi YH, Yang SJ, Lee KS, Lee JH, Jung OY, Yang CI, Cho YC, Choi IS, Baek MK, Kim MK, Yea JD, Hwang HG, Roh JH, Kim SL, Choi HC, Lee YT, Lee SH. 2012. A Medium-Maturing, Giant-embryo, and Germination Brown Rice Cultivar ‘Keunnun’. *Korean J Breed Sci* 44(2):160–164
- Hong SK, Aoki T, Kitano H, Satoh H, Nagato Y (1995) Phenotypic diversity of 188 rice embryo mutants. *Dev Genet* 16(4):298–310
- Jeng TL, Shih YJ, Ho PT, Lai CC, Lin YW, Wang CS, Sung JM. 2012. γ -Oryzanol, tocol and mineral compositions in different grain fractions of giant embryo rice mutants. *J Sci Food Agric* 92(7):1468–1474
- Kawakatsu T, Taramino G, Itoh JI, Allen J, Sato Y, Hong SK, Yule R, Nagasawa N, Kojima M, Kusaba M, Sakakibara H, Sakai H, Nagato Y. 2009. PLASTOCHRON3/GOLIATH encodes a glutamate carboxypeptidase required for proper development in rice. *Plant J* 58(6):1028–1040
- Kim DD, Kim TH. 2013. Manufacturing method of aseptic packing cooked Rice using specialty Rice with embryo buds. KR patent, pp 10–1545056
- Koh H, Won Y, Heu M, Park S. 1993. Nutritional and agronomic characteristics of super-giant embryo mutant in rice. *Korean J Crop Sci* 38(6):537–544
- Koh HJ, Heu MH, McCouch SR. 1996. Molecular mapping of the ge (s) gene controlling the super-giant embryo character in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 93(1–2):257–261
- Lee G, Piao R, Lee Y, Kim B, Seo JH, Lee DR, Jang S, Jin Z, Lee CS, Chin JH and Koh HJ. 2021. Identification and Characterization of LARGE EMBRYO, a New Gene Controlling Embryo Size in Rice (*Oryza sativa* L.).
- Maeda H, Nemoto H, Iida S, Ishii T, Nakagawa N, Hoshino T, Sakai M, Okamoto M, Shinoda H, Yoshida T. 2001. A New Rice Variety with Giant Embryos, ‘Haiminori’. *Breed Sci* 51(3):211–213
- Nagasawa N, Hibara K, Heppard EP, Vander Velden KA, Luck S, Beatty M, Nagato Y, Sakai H. 2013. GIANT EMBRYO encodes CYP78A13, required for proper size balance between embryo and endosperm in rice. *Plant J* 75(4):592–605
- Qin Y, Kim SM, Park HY, Sohn JK. 2009. Inheritance analysis of giant embryo mutation induced by T-DNA insertion in rice. *Korean J. of Breed. Sci.* 41(1):9-15.
- Sakata M, Seno M, Matsusaka H, Takahashi K, Nakamura Y, Yamagata Y, Angeles ER, Mochizuki T, Kumamaru T, Sato M, Enomoto A, Tashiro K, Kuhara S, Satoh H, Yoshimura A. 2016. Development and evaluation of rice giant embryo mutants for high oil content originated from a high-yielding cultivar ‘Mizuhochikara’. *Breed Sci* 66(3):425–433
- Satoh H, Iwata N. 1990. Linkage analysis in rice. On three mutant loci for endosperm properties, ge (giant embryo), du-4 (dull endosperm-4) and flo-1 (floury endosperm-1). *Japan J Breed* 40(Suppl 2):268–269
- Satoh H, Omura T. 1981. New endosperm mutations induced by chemical mutagens in Rice *Oryza sativa* L. *Japanese J Breed* 31(3):316–326
- Takahashi S, Ohtani T, Iida S, Sunohara Y, Matsushita K, Maeda H, Tanetani Y, Kawai K, Kawamukai M, Kadowaki KI. 2009. Development of CoQ10-enriched rice from giant embryo lines. *Breed Sci* 59(3):321–326
- Tanaka K, Ogawa M, Kasai Z. 1977. The Rice scutellum. II. A comparison of Scutellar and Aleurone Electron-dense particles by transmission Electron microscopy including energy-dispersive X-ray analysis. *Cereal Chemistry* 54(3):684–689
- Taramino G, Allen J, Hong S-K, Nagasawa N, Nagato Y, Sakai H. 2003. Mapping of *GOLIATH*, a new gene controlling embryo size in rice. *Rice Genet Newsl* 20:24–26

- Yang W, Gao M, Yin X, Liu J, Xu Y, Zeng L, Li Q, Zhang S, Wang J, Zhang X, He Z. 2013. Control of rice embryo development, shoot apical meristem maintenance, and grain yield by a novel cytochrome p450. *Mol Plant* 6(6):1945–1960
- Zhang L, Hu P, Tang S, Zhao H, Wu D. 2005. Comparative studies on major nutritional components of rice with a giant embryo and a Normal embryo. *J Food Biochem* 29(6):653–661
- Zhang P, Allen WB, Nagasawa N, Ching AS, Heppard EP, Li H, Hao X, Li X, Yang X, Yan J, Nagato Y, Sakai H, Shen B, Li J. 2012. A transposable element insertion within *ZmGE2* gene is associated with increase in embryo to endosperm ratio in maize. *Theor Appl Genet* 125(7):1463–1471
- Zhao GC, Xie MX, Wang YC, Li JY. 2017. Molecular Mechanisms Underlying γ -Aminobutyric Acid (GABA) Accumulation in Giant Embryo Rice Seeds. *J Agric Food Chem*. 65(24):4883-4889.
- Zhou X, Zhao G, Sun S, Li J. 2019. Antihypertensive effect of giant embryo brown rice and pre-germinated giant embryo brown rice on spontaneously hypertensive rats. *Food Sci Nutr*. 7(9):2888-2896.