

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ỨC CHẾ GEN *CHLD* THAM GIA TỔNG HỢP CHLOROPHYLL TRÊN CÂY LÚA BẰNG ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES (ASOs)

Nguyễn Vũ Gia Hân¹, Nguyễn Trường Thọ¹, Ngô Quốc Nam², Trần Thanh Mến³, Bùi Thanh Liêm^{1*}

¹ Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ, Cần Thơ, Việt Nam

² Phù Sa Genomics, Cần Thơ, Việt Nam, Cần Thơ, Việt Nam

³ Trường Khoa học Tự nhiên, Đại học Cần Thơ, Cần Thơ, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Bùi Thanh Liêm <btliem@ctu.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 18-09-2025; Hoàn thành phản biện: 23-01-2026; Ngày chấp nhận đăng: 26-01-2026)

Tóm tắt. Antisense oligonucleotides (ASOs) được xem như công cụ đầy tiềm năng trong nghiên cứu chức năng gen và các nghiên cứu ứng dụng ASOs trên hệ thực vật vẫn còn hạn chế tại Việt Nam. Nghiên cứu này đánh giá tác động của ASO trên cây lúa (*Oryza sativa*) thông qua khả năng ức chế gen *CHLD*, gen mã hóa một tiểu đơn vị của enzyme Mg-chelatase sinh tổng hợp chlorophyll. Các ASOs được tổng hợp dưới dạng trình tự gốc và dạng biến đổi hóa học phosphorothioate (PS). ASOs được xử lý cho cây lúa 4 ngày tuổi bằng phương pháp phun lá với nồng độ 100 pmol/mL. Các chỉ tiêu hình thái và sinh hóa được theo dõi tại các thời điểm 3, 7 và 14 ngày sau xử lý. Kết quả cho thấy xử lý ASO làm giảm hàm lượng sắc tố lá và chiều cao cây tại 3 và 7 ngày. Cụ thể, hàm lượng chlorophyll a giảm 52–72%, chlorophyll b giảm 47–73%, carotenoid giảm 50–71% và chiều cao cây giảm 17–32%, trong khi sự phát triển của rễ không bị ảnh hưởng đáng kể. Các kết quả này cho thấy ASOs có khả năng ức chế gen *CHLD* và ảnh hưởng đến quá trình tích lũy chlorophyll ở cây lúa, gợi ý tiềm năng ứng dụng ASOs như một công cụ trong nghiên cứu chức năng gen và kiểm soát biểu hiện gen trên cây trồng.

Từ khóa: Antisense Oligonucleotides (ASOs), chlorophyll, phosphorothioate, tiểu đơn vị *CHLD*

Suppression of *CHLD* gene involved in chlorophyll synthesis in rice using Antisense Oligonucleotides (ASOs)

Nguyen Vũ Gia Hân¹, Nguyen Truong Tho¹, Ngo Quoc Nam², Tran Thanh Men³, Bui Thanh Liem^{1*}

¹ Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University, Cantho, Vietnam

² Phù Sa Genomics, Cantho, Vietnam, Cantho, Vietnam

³ College of Natural Sciences, Can Tho University, Cantho, Vietnam

* Correspondence to Bui Thanh Liem <btliem@ctu.edu.vn>

(Received: 19 September 2025; Revised: 30 January 2026; Accepted: 26 January 2026)

Abstract. Antisense oligonucleotides (ASOs) are emerging as a promising tool for functional genomics research, particularly in the regulation of gene expression. In Viet Nam, however, studies on the application of ASOs in plant systems remains limited. This study aimed to evaluate the effects of ASOs on rice (*Oryza sativa*) by targeting the *CHLD* gene, which encodes a subunit of Mg-chelatase involved

in chlorophyll biosynthesis. ASOs were synthesized in both unmodified and chemically modified phosphorothioate (PS) forms. Rice seedlings at four days after germination were treated by foliar spraying with ASOs at a concentration of 100 pmol/mL. The effects of ASO treatments were assessed at 3, 7, and 14 days after application based on leaf color, plant morphology, plant height, root length, and the contents of chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoids. The results showed that ASO-treated plants exhibited a marked reduction in leaf pigment contents and plant height at 3 and 7 days after treatment. Specifically, chlorophyll a content decreased by 52–72%, chlorophyll b by 47–73%, and carotenoids by 50–71%, while plant height was reduced by 17–32% compared with the control. In contrast, root development was not affected by ASO application. These findings demonstrate that ASOs can effectively suppress *CHLD* gene-associated phenotypes, highlighting their potential as a tool for gene expression control and functional gene analysis in crop plants.

Keywords: Antisense Oligonucleotides (ASOs), chlorophyll, phosphorothioate, *CHLD* subunit

1 Mở đầu

Các chuỗi ngắn nucleotide đối mã (Oligonucleotide antisense – ASOs) có khả năng tác động trực tiếp lên mRNA mà không làm thay đổi trình tự bộ gen nên được xem là công cụ giúp nghiên cứu chức năng và điều hòa biểu hiện gen. ASOs có tính linh hoạt cao phù hợp với nhiều ứng dụng y học và nông nghiệp. Trong y học, ASOs được ứng dụng để điều trị các bệnh di truyền, ung thư và rối loạn thần kinh bằng cách ức chế hoặc chỉnh sửa RNA liên quan đến bệnh [1]. Trong nghiên cứu về thực vật, ASOs giúp cải thiện năng suất cây trồng như gây ức chế vi khuẩn gây bệnh trên cây cam (*Citrus*), cây khoai tây và cà chua, và chống lại sự lây nhiễm của virus đến cây thuốc lá (*N. benthamiana*) [2–4], tăng khả năng chống chịu với điều kiện môi trường khắc nghiệt và kéo dài thời gian bảo quản nông sản mà không cần đến biến đổi gen (non – GMO) trên dưa lưới và cà chua [5–8]. Mặc dù ASOs được sử dụng khá phổ biến trong các nghiên cứu trên thế giới nhưng ở Việt Nam vẫn chưa có nhiều nghiên cứu được công bố.

Lúa gạo (*Oryza sativa*) là loại ngũ cốc được sử dụng để làm lương thực phổ biến trên thế giới. Năng suất và chất lượng hạt lúa là vấn đề quan tâm của quá trình sản xuất và tiêu thụ lúa gạo. Quá trình quang hợp giúp cây trồng sinh trưởng và tích lũy chất dinh dưỡng. Để hoạt động quang hợp diễn ra thuận lợi, các sắc tố quang hợp trong

lá là không thể thiếu, đặc biệt là chlorophyll, một loại sắc tố thiết yếu tham gia vào quá trình quang hợp ở thực vật. Quá trình tạo chlorophyll trên thực vật là một chuỗi các phản ứng phức tạp, trong đó có chu trình gắn ion magie vào tâm hoạt động của protoporphyrin IX thành Mg – protoporphyrin IX, một tiền chất quan trọng trong chu trình sinh tổng hợp chlorophyll [9,10]. Phản ứng đó xảy ra khi có sự xúc tác của enzyme Mg – chelatase, đây là enzyme được cấu tạo từ ba tiểu đơn vị (*CHLD*, *CHLI* và *CHLH*) [11–13]. Trong số đó, tiểu đơn vị *CHLD* (*MeCHLD*) đóng vai trò chủ chốt trong cấu hình của enzyme, khi trình tự của *MeCHLD* bị biến đổi thì Mg – chelatase không được hình thành [9,14–16]. Từ đó, sắc tố chlorophyll không được tạo ra làm suy giảm quá trình quang hợp. Gen *CHLD* được lựa chọn làm mục tiêu để thử nghiệm khả năng tác động của ASOs lên quá trình suy giảm tổng hợp chlorophyll (do tính trạng dễ quan sát và dễ đo đạc) có liên quan đến chức năng gen *CHLD*.

Trong nghiên cứu này, bốn đoạn ASOs được thiết kế ở hai dạng: Oligo trình tự gốc và biến đổi hóa học dạng phosphorothioate (PS), nhằm ức chế gen *CHLD*. Các chỉ tiêu về hình thái, chiều cao cây, chiều dài rễ và hàm lượng các sắc tố (chlorophyll *a*, chlorophyll *b* và carotenoid) được ghi nhận để đánh giá hiệu quả ức chế.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Giống lúa OM18 nguồn gốc từ Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long.

Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm giống cây trồng, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ.

Các đoạn ASOs được sản xuất tại công ty cổ phần Phù Sa Genomic.

2.2 Phương pháp

Thiết kế Antisense Oligonucleotides

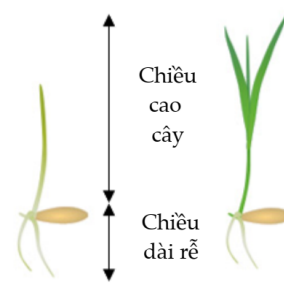
Các phân tử ASOs được thiết kế với độ dài 21 và 27 nucleotide sử dụng công cụ RNAi design – IDT.

Xử lý ASOs trên cây lúa

Thí nghiệm bao gồm 5 nghiệm thức (NT): 4 NT ASOs: Oligo 3 (O3), PS-Oligo 3 (PS3), Oligo 4 (O4), PS-Oligo 4 (PS4) và NT đối chứng nước. Trồng lúa vào vỉ nhựa chứa 90 cây cho mỗi NT. Cây phát triển đến 4 ngày tuổi (cao 2 – 3 cm) được phun trực tiếp ASOs với nồng độ 100 pmol/mL cho từng NT, tần suất phun 2 lần/ngày (mỗi lần phun 15 mL) tiến hành liên tục trong 14 ngày.

Đánh giá ảnh hưởng của ASOs lên chiều cao, chiều dài rễ và hàm lượng sắc tố lá

Chiều cao cây và chiều dài rễ được đo bằng thước kẻ tại các thời điểm 3, 7 và 14 ngày sau xử lý, mỗi nghiệm thức đo 30 cây lúa trên một thời điểm. Chiều cao cây được đo từ hạt lúa đến đầu ngọn lá, chiều dài rễ được đo từ hạt lúa đến đầu ngọn rễ.



Hình 1. Hình minh họa cách đo chiều cao cây và chiều dài rễ

Phương pháp ly trích và đo hàm lượng sắc tố trên lá theo phương pháp của Sumanta và cộng sự [17]: Cân 50 mg lá lúa tươi cho vào ống thủy tinh. Thêm 5 mL ethanol 95% và ủ trong bể ổn nhiệt 60 °C trong 1 giờ. Đo độ hấp thụ của dịch chiết sắc tố lá ở 4 bước sóng 470, 649, 652 và 664 nm. Hàm lượng chlorophyll *a*, *b* và carotenoid được tính toán dựa trên công thức của Sumanta và cộng sự [17]:

$$Ch-a = 13,36 * A664 - 5,19 * A649 \text{ (Chlorophyll } a)$$

$$Ch-b = 27,43 * A649 - 8,12 * A664 \text{ (Chlorophyll } b)$$

$$Cx + c = (1000 * A470 - 2,13 * Ca - 97,63 * Cb) / 209 \text{ (Carotenoid).}$$

Dung dịch ethanol 95% được sử dụng làm đối chứng.

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được thu thập với 3 lần lặp lại, phân tích phương sai một nhân tố và phân tích hậu kiểm với phép thử Tukey HSD ở mức ý nghĩa $p < 0,05$. Các giá trị được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Trình tự Antisense ligonucleotides

Các đoạn ASOs đã được thiết kế và tổng hợp để bổ sung với trình tự gen mục tiêu *CHLD* của *Oryza sativa* Japonica group (mã số truy cập GenBank là LOC4334537). Trong bài nghiên cứu này, ASOs được tổng hợp ở 2 dạng: dạng trình tự gốc và biến đổi hóa học dạng PS. Biến đổi PS

được sử dụng rộng rãi trong nhiều nghiên cứu có nhiệm vụ bảo vệ ASOs khỏi các enzyme nuclease, trong đó enzyme exonuclease hoạt động mạnh nhất ở đầu 3' [18]. Biến đổi PS ở đầu 3' hoặc cả hai đầu 3' và 5' làm hạn chế sự phân hủy của enzyme exonuclease [19]. Theo nghiên cứu của Pleskot và cộng sự, ASOs được biến đổi PS ở 4 nucleotide đầu tiên tại đầu 3' và 5' cho thấy hiệu quả ức chế lên NtPLD β 1 hoặc NtPLD δ làm suy giảm sự phát triển ống phấn cây thuốc lá [20]. Ngoài ra, theo

Dinç và cộng sự, biến đổi PS tại 3 nucleotide đầu tiên mỗi đầu 3', 5' và các nucleotide pyrimidine ở giữa thể hiện khả năng ức chế đáng kể của ASOs lên cây lúa mì [19]. Ở nghiên cứu này, các đoạn ASOs được biến đổi hóa học dạng PS sẽ có 5 nucleotide ở đầu 3' và 5' được biến đổi (Bảng 1). Sau khi thử nghiệm kết quả ức chế gen *CHLD* đạt hiệu quả đáng kể đến sự tổng hợp chlorophyll, làm cho màu lá bị úa màu (Hình 2A).

Bảng 1. Trình tự các oligo và oligo được biến đổi hóa học được sử dụng trong nghiên cứu.

STT	ASO	GC%	ASO (5'-3')	Chiều dài (nucleotide)
1	Oligo 3 (O3)	29	TATCAATAACAAGAAGTGAAATTCCAG	27
2	PS-Oligo 3 (PS3)	29	T*A*T*C*A*ATAACAAGAAGTGAAATT*C*C*A*G*	27
3	Oligo 4 (O4)	45	CTTGTCATGGAAGCTATACGCGG	20
4	PS-Oligo 4 (PS4)	45	C*T*T*G*T*CATGGAAGCTATAC*G*C*G*G*	20

Ghi chú: *: vị trí nucleotide được biến đổi hóa học PS

3.2 ASOs tác động đến sự tăng trưởng của cây lúa

ASOs có khả năng gây ức chế hiệu quả trên một số loài thực vật tùy theo nồng độ sử dụng và sự đáp ứng trên từng loại thực vật, các nghiên cứu cho thấy nồng độ ASOs phù hợp là 30 μ M ở *Agapanthus umbellatus* [21], 20 μ M ở *Arabidopsis thaliana* [22], 30 μ M ở *Nicotiana tabacum* [20], 10 μ M ở *Nicotiana benthamiana* và 10 μ M ở *Triticum aestivum* [19]. Theo Mizuta và cộng sự, nồng độ ASOs quá cao sẽ gây ảnh hưởng tiêu cực đến cây [22]. Thử nghiệm ở nồng độ 0,1 μ M (100 pmol/mL) ASOs có khả năng tác động lên sự tích lũy chlorophyll trên lá thông qua chức năng gen *CHLD*. Do sử dụng nồng độ cao và nhiều dạng cấu tạo hóa học khác nhau của các trình tự ASOs dẫn đến gia tăng chi phí cho dịch vụ tổng hợp hóa chất nên thí nghiệm khảo sát trước đó đã được thực hiện đánh giá ASOs ở các nồng độ 0,05 μ M, 0,1 μ M và 0,2 μ M. Kết quả cho thấy ở nồng độ 0,1 μ M có sự tác động lên quá trình suy giảm tích lũy

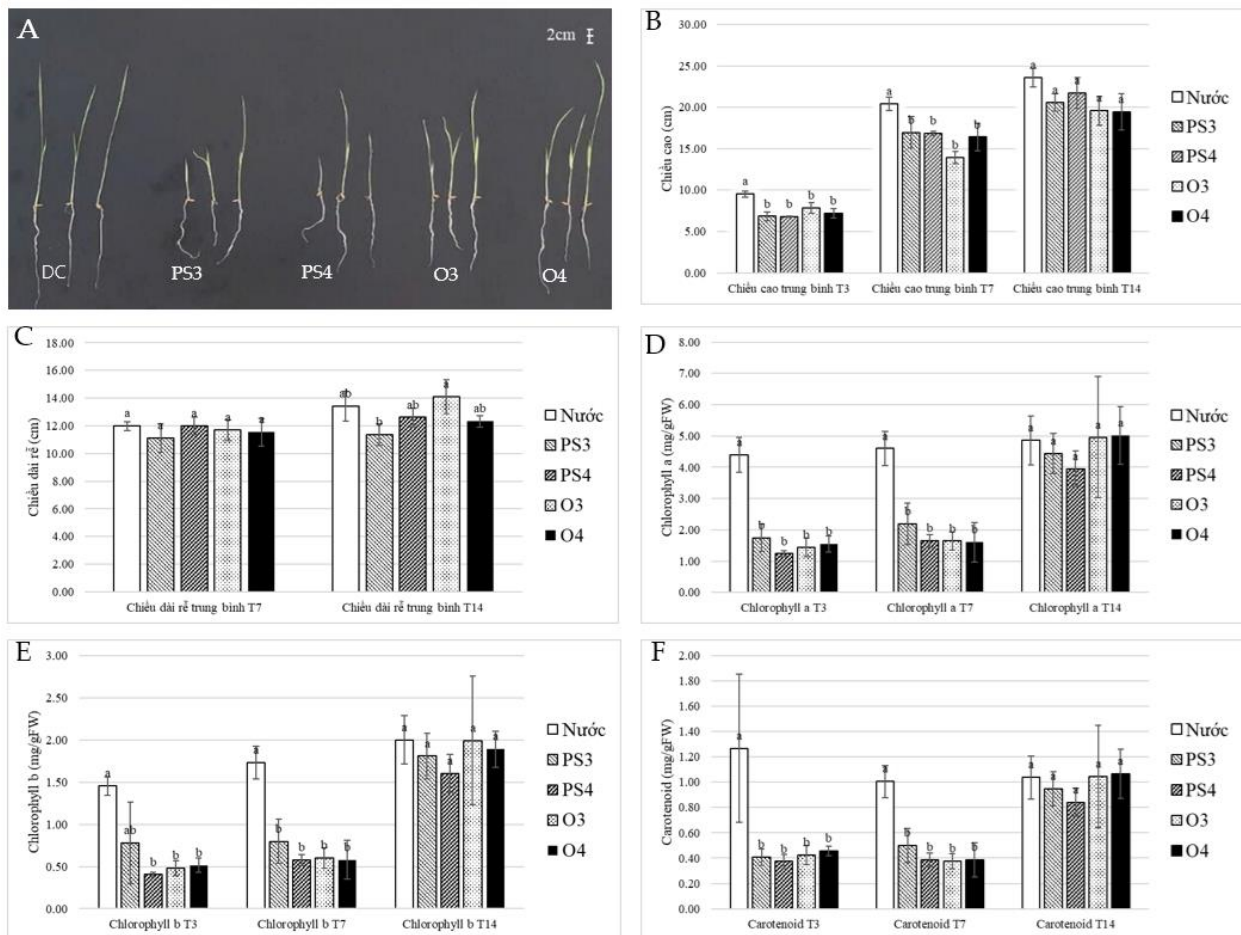
chlorophyll trên lá lúa tốt hơn nồng độ 0,05 μ M và tương đương nồng độ 0,2 μ M. Trong nghiên cứu này, nồng độ ASOs 0,1 μ M tiếp tục được sử dụng để thực hiện xử lý và đo đạc các chỉ tiêu theo dõi. Ở giai đoạn đầu của thí nghiệm (thời điểm 3 và 7 ngày sau xử lý), tác động của ASOs lên cây lúa được quan sát rõ nét nhưng đến ngày thứ 14 sau xử lý nồng độ 0,1 μ M không cho thấy tác động rõ ràng. Điều này có thể do giai đoạn đầu cây lúa còn nhỏ và tần suất phun xịt nhiều nên khả năng chịu tác động của các ASOs cao hơn, dù có sự tác động lên khả năng tích lũy chlorophyll nhưng hiệu quả chưa triệt để dẫn đến cây lúa vẫn tiếp tục tăng trưởng. Kéo dài thời gian xử lý ASO dẫn đến giảm tác động lên quá trình tổng hợp và tích lũy chlorophyll. Cụ thể, màu sắc lá lúa và chiều cao cây lúa giữa các nghiệm thức đều không thể hiện sự khác biệt (Hình 2).

Sự xâm nhập của các đoạn antisense vào tế bào thực vật dễ dàng hơn so với tế bào động vật. Có một số cách để các đoạn ASOs di chuyển vào tế bào thực vật: thẩm thấu, xâm nhập qua khí

khống và sử dụng hệ thống phân phối hạt sinh học (gene gun) [5]. Nghiên cứu sử dụng phương pháp phun dung dịch ASOs trực tiếp lên lá lúa non cho tỷ lệ lá bị úa vàng và cụp ngọn chiếm đến 20% và 26,7% ở nghiệm thức O3 vào các ngày thứ 3 và 7. Ở các nghiệm thức PS3 ngày thứ 3, O4 ngày thứ 3 và PS3 ngày thứ 7 cho tỷ lệ lần lượt là 13%, 10% và 10%. Ngoài ra, tất cả các nghiệm thức được xử lý ASOs tại 3 thời điểm 3, 7 và 14 ngày đều có tỷ lệ 100% lá bị úa vàng so với nghiệm thức đối chứng vẫn xanh tốt [19] (Hình 2A).

Ngoài ra, khả năng ức chế của ASOs còn được biểu hiện qua các thông số chiều cao cây và

chiều dài rễ. Ở các nghiệm thức xử lý ASOs, chiều cao cây giảm ở tại hai mốc thời gian 3 và 7 ngày sau xử lý: NT O3 (18% và 32%), NT PS3 (28% và 17%), NT O4 (24% và 20%) và NT PS4 (29% và 18%). Tuy nhiên, không có sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức ở ngày thứ 14 (Hình 2B). Chiều dài rễ ghi nhận cho thấy sự khác biệt không có ý nghĩa giữa các nghiệm thức ở ngày 7 và ngày 14, từ đó cho thấy sự tác động của ASOs lên gen *CHLD* không ảnh hưởng đến chiều dài rễ cây lúa (Hình 2D).



Hình 2. Ảnh hưởng của xử lý ASOs nồng độ 100 pmol/mL lên các chỉ tiêu hình thái và sắc tố lá cây lúa qua các giai đoạn khảo sát T3 (3 ngày sau xử lý), T7 (7 ngày sau xử lý) và T14 (14 ngày sau xử lý). (A) Hình thái cây lúa ở thời điểm 7 ngày sau xử lý ASOs, (B) Chiều cao trung bình đo từ gốc đến chóp lá qua các giai đoạn T3, T7 và T14, (C) Chiều dài rễ trung bình qua các giai đoạn T3, T7 và T14, (D) Hàm lượng chlorophyll a, (E) Hàm lượng chlorophyll b và (F) Hàm lượng carotenoid qua các giai đoạn T3, T7 và T14. Các nhóm biểu đồ thanh có cùng ký tự đi kèm không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê (kiểm định Tukey ở mức ý nghĩa $p < 0,05$). Thanh sai số thể hiện độ lệch chuẩn (S.D.) với số lần lặp lại $n = 3$

3.3 Biểu hiện của sắc tố lá

Sau 3 ngày xử lý ASOs, tất cả các nghiệm thức xử lý đều có hàm lượng chlorophyll *a* thấp hơn so với đối chứng, cụ thể PS3 giảm 60%, PS4 giảm 72%, O3 giảm 67% và O4 giảm 65%. Tương tự ở ngày 7, các nghiệm thức PS3, PS4, O3 và O4 có hàm lượng chlorophyll giảm so với đối chứng lần lượt là 52%, 64%, 64% và 65% (Hình 2D), cho thấy mức độ ức chế đáng kể của ASOs đến sắc tố lá. Ngoài ra, hàm lượng chlorophyll *b* và carotenoid cũng có xu hướng tương tự, khả năng ức chế của ASOs đến gen *CHLD* có tác động đáng kể đến các thành phần sắc tố lá (Hình 2E và 2F). Hàm lượng chlorophyll *b* bị ức chế từ 47 – 73% ở thời điểm 3 ngày sau xử lý và 54 – 67% ở ngày thứ 7; hàm lượng carotenoid giảm từ 64 – 71% sau 3 ngày và 50 – 62% sau 7 ngày xử lý ASOs. Tuy nhiên, số liệu ghi nhận tại tất cả các nghiệm thức sau 14 ngày xử lý khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Nồng độ ASOs đi vào trong tế bào có thể không đạt nồng độ ức chế nên tác động không còn rõ rệt. Điều này cũng gợi ý khả năng ứng dụng kiểm soát sự biểu hiện gen theo giai đoạn thời gian hoặc vị trí tác động để tác động lên tính trạng mục tiêu.

4 Kết luận và kiến nghị

Kết quả nghiên cứu này cho thấy ASOs có thể tác động lên sự tổng hợp và tích lũy chlorophyll trên cây lúa. Xử lý ASOs ở nồng độ 100 pmol/mL làm giảm hàm lượng sắc tố chlorophyll *a* từ 52 – 72%, chlorophyll *b* từ 47 – 73%, carotenoid từ 50 – 71% và chiều cao cây từ 17 – 32%. Xử lý ASO không cho thấy tác động lên sự phát triển chiều dài rễ. Trong các biến đổi hóa học ASOs được sử dụng, chưa quan sát được sự khác biệt đáng kể giữa hai loại ASO Oligo 3 và PS – oligo 3, Oligo 4 và PS – oligo 4. Mặc dù đã ghi nhận được sự tác động của ASOs lên sự tổng hợp và tích lũy chlorophyll trên cây lúa ở giai đoạn

sớm thông qua giả định ASOs tác động lên hoạt động của gen mục tiêu *CHLD* nhưng các kết quả đo đạc trực tiếp sự biểu hiện của gen này ở mức mRNA hoặc protein chưa được cung cấp và giải quyết thấu đáo. Tương tự, nghiệm thức đối chứng dương sử dụng ASOs ngẫu nhiên và tác động trung tính lên tính trạng mục tiêu chưa được sử dụng để thấy rõ ràng tác động của các ASOs thử nghiệm. Cần mở rộng các thí nghiệm bổ sung để làm rõ hơn tác động của ASOs một cách trực tiếp lên sự hoạt động của các gen mục tiêu.

Nghiên cứu này có thể được xem như báo cáo mở đầu tại Việt Nam chứng minh khả năng ứng dụng ASOs như một công cụ không biến đổi gen trong nghiên cứu chức năng gen ở cây lúa.

Tài liệu tham khảo

1. Dhuri K, Bechtold C, Quijano E, et al. Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development. *J Clin Med.* 2020;9(6):1-24.
2. Hunter WB, Cooper WR, Sandoval-Mojica AF, McCollum G, Aishwarya V, Pelz-Stelinski KS. Improving Suppression of Hemipteran Vectors and Bacterial Pathogens of Citrus and Solanaceous Plants: Advances in Antisense Oligonucleotides (FANA). *Front Agron.* 2021;Volume 3 - 2021.
3. Lima LFF de, Carvalho IGB, Souza-Neto RR de, et al. Antisense Oligonucleotide as a New Technology Application for *CsLOB1* Gene Silencing Aiming at Citrus Canker Resistance. *Phytopathology.* 2024;114(8):1802-1809.
4. Gruber C, Gursinsky T, Gago-Zachert S, Pantaleo V, Behrens SE. Effective Antiviral Application of Antisense in Plants by Exploiting Accessible Sites in the Target RNA. *Int J Mol Sci.* 2023;24(24).
5. Krasnodębski C, Sawuła A, Kazmierczak U, Żuk MJJoMS. Oligo—Not Only for Silencing: Overlooked Potential for Multidirectional Action in Plants. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5):4466.
6. Ayub R, Guis M, Amor MB, Gillot L, Roustan J-P, Latché A, et al. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nature Biotechnology.* 1996;14(7):862-6.

7. Sheehy RE, Kramer M, Hiatt WR. Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci.* 1988;85(23):8805-9.
8. Smith CJS, Watson CF, Ray J, Bird CR, Morris PC, Schuch W, et al. Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature.* 1988;334(6184):724-6.
9. Gräfe S, Saluz H-P, Grimm B, Hänel F. Mg-chelatase of tobacco: The role of the subunit CHL D in the chelation step of protoporphyrin IX. *Journal of Plant Growth Regulation.* 1999;96(5):1941-6.
10. Zhang H, Li J, Yoo J-H, Yoo S-C, Cho S-H, Koh H-J, et al. Rice Chlorina-1 and Chlorina-9 encode ChlD and ChlI subunits of Mg-chelatase, a key enzyme for chlorophyll synthesis and chloroplast development. *Plant Molecular Biology.* 2006;62(3):325-37.
11. Du S-Y, Zhang X-F, Lu Z, Xin Q, Wu Z, Jiang T, et al. Roles of the different components of magnesium chelatase in abscisic acid signal transduction. *Plant Molecular Biology.* 2012;80(4):519-37.
12. Wu C-j, Wang J, Zhu J, Ren J, Yang Y-x, Luo T, et al. Molecular Characterization of Mg-Chelatase CHLI Subunit in Pea (*Pisum sativum* L.). *Front Plant Sci.* 2022;13(January):1-13.
13. Yang X, Cai J, Xue J, Luo X, Zhu W, Xiao X, et al. Magnesium chelatase subunit D is not only required for chlorophyll biosynthesis and photosynthesis, but also affecting starch accumulation in *Manihot esculenta* Crantz. *BMC Plant Biology.* 2023;23(1):258.
14. Jensen PE, Gibson LCD, Henningsen KW, Hunter CN. Expression of the *chlI*, *chlD*, and *chlH* Genes from the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 in *Escherichia coli* and Demonstration That the Three Cognate Proteins Are Required for Magnesium-protoporphyrin Chelatase Activity. *Journal of Biological Chemistry.* 1996;271(28):16662-7.
15. Walker CJ, Willows RD. Mechanism and regulation of Mg-chelatase. *Biochemical Journal.* 1997;327(2):321-33.
16. Willows RD. Biosynthesis of chlorophylls from protoporphyrin IX. *Natural Product Reports.* 2003;20(3):327-41.
17. Nayek S, Choudhury I, Haque, Jaishee N, Roy S. Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. *Research Journal of Chemical Sciences.* 2014;4:2231-606.
18. Shaw J-P, Kent K, Bird J, Fishback J, Froehler B. Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum. *Nucleic Acids Research.* 1991;19(4):747-50.
19. Dinç E, Tóth SZ, Schansker G, Ayaydin F, Kovács L, Dudits D, et al. Synthetic Antisense Oligodeoxynucleotides to Transiently Suppress Different Nucleus- and Chloroplast-Encoded Proteins of Higher Plant Chloroplasts *Plant Physiology.* 2011;157(4):1628-41.
20. Pleskot R, Potocký M, Pejchar P, Linek J, Bezdová R, Martinec J, et al. Mutual regulation of plant phospholipase D and the actin cytoskeleton. *The Plant Journal.* 2010;62(3):494-507.
21. Moutinho A, Hussey PJ, Trewavas AJ, Malhó R. cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation. *Plant Science.* 2001;98(18):10481-6.
22. Mizuta Y, Higashiyama T. Antisense gene inhibition by phosphorothioate antisense oligonucleotide in *Arabidopsis* pollen tubes. *The Plant Journal.* 2014;78(3):516-26.