

ĐA HÌNH NUCLEOTIDE ĐƠN GENE HIGH-AFFINITY POTASSIUM TRANSPORTER 1;4 (OsHKT1;4) CỦA MỘT SỐ GIỐNG LÚA (ORYZA SATIVA) Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM OF THE HIGH-AFFINITY POTASSIUM TRANSPORTER 1;4 GENE (OsHKT1;4) OF SOME RICE VARIETIES (ORYZA SATIVA) IN THE MEKONG DELTA

TRƯƠNG THẾ QUANG^(*)

TÓM TẮT: Tách chiết và thu nhận được DNA tổng số của 15 mẫu thân lá cây lúa (*Oryza sativa*) trồng tại các vùng có độ mặn khác nhau ở Đồng bằng sông Cửu Long. Thiết kế và sàng lọc thu được các cặp mồi đặc hiệu HKT1;4-1, HKT1;4-2, HKT1;4-3 khuếch đại các vùng mã hóa gene OsHKT1;4 của cây lúa bằng kỹ thuật PCR. Giải trình tự, ráp nối và chú thích thành công gene OsHKT1;4. Gene OsHKT1;4 của các giống lúa (*Oryza sativa*) Bến Tre, Tiền Giang, Long An sống trong môi trường nước lợ, độ mặn từ 2,4 đến 4,0 ppt có các đột biến điểm thay thế SNP ở vùng mã hóa làm thay đổi amino acid valine (V) thành glycine (G) hoặc tyrosine (Y) thành serine (S), dẫn đến thay đổi cấu trúc protein OsHKT1;4 theo hướng tạo nhiều kênh SG^3 để loại bỏ Na^+ ra khỏi lá nhanh hơn. Gene OsHKT1;4 của các giống lúa (*Oryza sativa*) Vĩnh Long, Đồng Tháp trồng trong môi trường nước ngọt độ mặn từ 0,1 đến 0,3 ppt có các đột biến điểm SNP không làm thay đổi cấu trúc protein OsHKT1;4 theo hướng không tăng thêm kênh SG^3 để loại bỏ Na^+ ra khỏi lá chậm hơn.

Từ khóa: cây lúa; đa hình nucleotide đơn; gene OsHKT1;4; sắp hàng trình tự.

ABSTRACT: Total DNA was extracted and obtained from the sample of 15 rice leaves (*Oryza sativa*) collected in different salinity zones in the Mekong Delta. We have designed and screened to obtain pairs of specific primers HKT1;4-1, HKT1;4-2, HKT1;4-3 amplified OsHKT1;4 gene coding regions of the rice by PCR technique. We have successfully sequenced, assembled and annotated OsHKT1;4 gene of the rice. OsHKT1;4 genes of the rice varieties (*Oryza sativa*) Ben Tre, Tien Giang, Long An planted in brackish water with salinity from 2.4 to 4.0 ppt have the SNP substituted point mutations in the coding area converting amino acid valine (V) to glycine (G) or tyrosine (Y) to serine (S). This leads to changes in the protein structure of OsHKT1;4 in the direction of creating more SG^3 channels to remove Na^+ from the leaves faster. OsHKT1;4 genes of the rice varieties (*Oryza sativa*) Vinh Long, Dong Thap planted in freshwater environment with salinity from 0.1 to 0.3 ppt have SNP point mutations that did not change the structure of OsHKT1;4 protein in the direction of keeping SG^3 channels intact to remove Na^+ from the leaves more slowly.

Key words: rice; single nucleotide polymorphism; OsHKT1;4 gene; sequence alignment.

^(*) TS. Trường Đại học Văn Lang, quangtruongthe@gmail.com, Mã số: TCKH24-10-2020

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Người ta cho rằng, tổ tiên của chi lúa *Oryza* là một loài cây hoang dại trên siêu lục địa Gondwana cách đây ít nhất 130 triệu năm và phát tán rộng khắp các châu lục trong quá trình trôi dạt lục địa, hiện nay, có khoảng 21 loài cây hoang dại thuộc chi này và 2 loài lúa đã được thuần hóa là lúa châu Á (*Oryza sativa*) và lúa châu Phi (*Oryza glaberrima*) [4, tr.44-48]. Lúa (*Oryza sativa*) có nguồn gốc xung quanh vùng Đông Nam Á, sau đó được nhân rộng và phân hóa thành hai nhóm sinh thái là Indica và Japonica. Japonica được trồng ở nơi khô ráo, mát mẻ của vùng cận nhiệt đới và ôn đới, trong khi Indica được tìm thấy ở vùng nhiệt đới châu Á. Hai nhóm sinh thái này được phân biệt bởi các đặc điểm hình thái, sinh lý và đặc điểm sinh thái, Indica có lá bản rộng và sáng hơn, cây cao và dễ nhánh tốt, hạt dài mảnh; Japonica có lá hẹp và xanh đậm hơn, chiều cao cây thấp hơn và dễ nhánh trung bình, hạt tròn ngắn [5, tr.1256-1258]. Lúa (*Oryza sativa*) có rất nhiều giống thích nghi với nhiều điều kiện môi trường và được gieo trồng làm cây lương thực trên khắp thế giới [8, tr.1-7]. Với tầm quan trọng trong cung cấp lương thực toàn cầu, việc nghiên cứu tăng năng suất của cây lúa đang ngày càng được chú trọng, nghiên cứu đáp ứng mặn ở cây lúa là một trong những hướng nghiên cứu đầy tiềm năng [4, tr.44-48]. Trong cây lúa (*Oryza sativa*) kênh high-affinity potassium transporter (HKT) có chức năng loại bỏ muối ra khỏi lá, có tác dụng giảm stress mặn, giúp cây lúa sống được ở môi trường nước lợ, độ mặn khoảng từ 2,4 đến 4,0 ppt. Do đó, nghiên cứu đa dạng di truyền về đa hình nucleotide đơn hay SNP (Single Nucleotide Polymorphism) có ý nghĩa quan trọng trong việc giải thích cơ chế loại bỏ muối của HKT. Cơ chế này gắn liền với các đột biến gene HKT trên cây lúa sống ở môi trường nước lợ so với cây lúa đối chứng sống ở môi trường nước ngọt [3, tr.117-124].

2. MỤC TIÊU VÀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Mục tiêu nghiên cứu phân tích đa dạng di truyền SNP một số giống lúa (*Oryza sativa*) sống tại các vùng nước có độ mặn khác nhau ở Đồng bằng sông Cửu Long, nhận diện một số giống lúa chịu mặn ở khu vực này bằng SNP dựa trên gene HKT1;4, từ đó giải thích được cơ chế loại bỏ muối ra khỏi lá hoặc mầm lá cây lúa của HKT. Nội dung nghiên cứu tách chiết DNA tổng số từ thân lá cây lúa trồng ở các vùng có độ mặn khác nhau tại Đồng bằng sông Cửu Long, khuếch đại gene OsHKT1;4 bằng kỹ thuật PCR. Phân tích SNP và giải thích được cơ chế loại bỏ muối của HKT trong cây lúa khi chịu áp lực mặn từ môi trường.

3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Mẫu vật thí nghiệm

Thu thập các mẫu lúa thuộc các vùng có độ mặn khác nhau tại Đồng bằng sông Cửu Long vào tháng 08 - 2019. Mẫu lúa được mang về phòng thí nghiệm để xử lý và bảo quản ở -20°C cho việc tách chiết DNA tổng số (Total Deoxyribonucleic Acid) và giải trình tự gene OsHKT1;4.

3.2. Cơ chế vận chuyển Na^{+} của protein HKT1;4 trong cây lúa

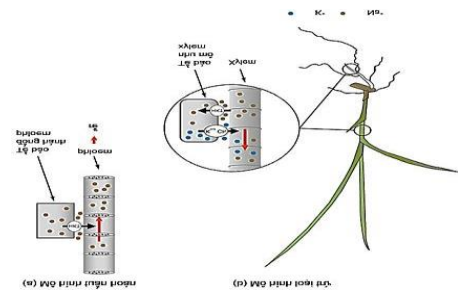
3.2.1. Các mô hình vận chuyển Na^{+} của protein OsHKT1;4

Trong đất bình thường, tiềm năng nước trong tế bào rễ thấp hơn so với môi trường bên ngoài và dòng nước chảy vào rễ xảy ra thông qua các protein kênh nước gọi là aquaporin [17, tr.393-397], [13, tr.85-96], [12, tr.1-14]. Tuy nhiên, trong môi trường mặn, sự khác biệt về tiềm năng nước giữa đất và tế bào rễ bị giảm hoặc thậm chí đảo ngược, dẫn đến giảm sự hấp thu hoặc mất nước [7, tr.790-805], ức chế tăng trưởng và hậu quả cuối cùng làm tổn thương mô nghiêm trọng. Khi cân bằng nước bên trong bị xáo trộn bởi áp lực môi trường như stress mặn, thực vật tổng hợp và tích lũy các hợp chất hữu cơ, được gọi là các chất hòa tan tương thích, như polyol, đường không khử và amino acid [9, tr.15-40]. Độc tính ion là một thuật

ngữ chung cho các suy yếu khác nhau trong các quá trình tế bào khác nhau do nồng độ ion tăng cao. Độc tính của tế bào Na^+ là độc tính ion chiếm ưu thế do stress mặn, dẫn đến ức chế một loạt các quá trình như hấp thụ K^+ [14, tr.1611], các phản ứng enzyme quan trọng, tổng hợp protein và quang hợp [18, tr.1195-1206]. Các quá trình quang hợp có khả năng là phản ứng tế bào quan trọng nhất được bảo vệ khỏi Na^+ độc tính do sự gián đoạn của các quá trình có liên quan trực tiếp đến việc giảm quá trình cố định carbon và sản xuất sinh khối trong thực vật [10, tr.149-190]. Khi bị stress muối, Na^+ được loại trừ khỏi chồi và K^+ được tích lũy trong chồi, do đó ổn định cao tỷ lệ K^+ / Na^+ trong tế bào đặc biệt là ở lá. Có hai mô hình vận chuyển Na^+ của protein OsHKT1;4 trong cây lúa dưới áp lực stress mặn là mô hình tuần hoàn và mô hình loại trừ (Hình 1).

Mô hình tuần hoàn: Mô hình tuần hoàn được đề xuất bởi Berthomieu và các cộng sự. Trong mô hình này, khi cây bị stress mặn nồng độ Na^+ trong lá cao, protein OsHKT1;4 làm trung gian vận chuyển Na^+ từ tế bào đồng hành phloem vào mạch phloem và được chuyển xuống rễ, làm giảm tích lũy Na^+ trong lá và K^+ được tích lũy trong lá. Khi nồng độ Na^+ trong chồi lá thấp, OsHKT1;4 vận chuyển Na^+ từ rễ lên lá qua mạch xylem. Vì vậy, protein OsHKT1;4 có chức năng sinh lý ổn định tỷ lệ nồng độ K^+ / Na^+ trong tế bào lá đặc biệt là ở chồi cây lúa [6, tr.2004-2014].

Mô hình loại trừ: Mô hình loại trừ [16, tr.928-938], [11, tr.622-633], trong mô hình này, protein OsHKT1;4 trong cây lúa có chức năng loại trừ Na^+ ra khỏi mạch xylem vào các tế bào nhu mô xylem, dẫn đến duy trì tỷ lệ K^+ / Na^+ cao trong cây [15, tr.1141-1146]. OsHKT1;4 hấp thụ các ion Na^+ vào tế bào nhu mô xylem từ mạch xylem. Việc loại bỏ Na^+ bằng OsHKT1;4 có thể gây khử cực màng tế bào nhu mô xylem và kích hoạt bài tiết K^+ vào mạch xylem thông qua màng khử cực gây ra các kênh K^+ hướng ra ngoài (KOR) và kênh K^+ không chọn lọc hướng ra ngoài (NOR) [19, tr.799-813], [20, tr.1707-1719].



Hình 1. Sơ đồ của hai mô hình hoạt động chức năng sinh lý của OsHKT1;4 dưới áp lực mặn [15, tr.1141-1146]

3.2.2. Cơ chế vận chuyển Na^+ của protein OsHKT1;4



Hình 2. Cấu trúc protein OsHKT1;4 loại bỏ Na^+ chậm (a) và nhanh (b)

Protein OsHKT1;4 trong cây lúa gồm nhiều cấu trúc vòng Serine-Glycine-Glycine-Glycine (SG^3) tạo thành kênh chọn lọc vận chuyển Na^+ từ tế bào đồng hành phloem vào phloem và đi xuống rễ (mô hình tuần hoàn) hoặc từ mạch xylem vào tế bào nhu mô xylem (mô hình loại trừ) ức chế áp lực mặn từ môi trường. Các đột biến thay thế SNP trong các vùng mã hóa (exon) của gene OsHKT1;4 làm thay đổi cấu trúc protein OsHKT1;4 như valine (V) chuyển thành glycine (G) hoặc tyrosine (Y) thành serine (S) làm tăng khả năng hình thành các kênh SG^3 chọn lọc vận chuyển Na^+ , dẫn đến làm vận tốc vận chuyển loại bỏ Na^+ ra khỏi lá nhanh hơn khi cây lúa chịu áp lực mặn từ môi trường (Hình 2) [21].

3.3. Tách chiết DNA tổng số, khuếch đại PCR và giải trình tự gene OsHKT1;4

DNA tổng số được trích ly từ mẫu thân lá cây lúa bằng bộ kit PHUSA-IHHNV theo quy trình của Công ty Sinh hóa Phù Sa. Kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của các mẫu DNA tổng số bằng phương pháp đo hai bước sóng 260 nm và 280 nm trên máy quang phổ hấp thụ phân tử UV-VIS, hãng Bio-Rad. Các cặp mồi HKT1;4-1 , HKT1;4-2 , HKT1;4-3 khuếch đại các vùng mã hóa

exon 1, exon 2, exon 3 của gene OsHKT1;4 được thiết kế bằng công cụ Primer-BLAST, National Center for Biotechnology Information (NCBI) và được tổng hợp tại Phòng Oligo, Công ty Sinh hóa Phù Sa [1, tr.137-141]. Sau khi chạy PCR khuếch đại trình tự gene OsHKT1;4, tiến hành điện di trên gel agarose 2% để kiểm tra chất lượng và độ tinh sạch sản phẩm PCR. Sử dụng thang chuẩn DNA 100bp (từ 100 bp đến 1500bp) để ước lượng kích thước band sản phẩm PCR. Band sản phẩm PCR phải sáng rõ, chiều rộng của band lớn và có kích thước khoảng 1100bp đối với exon 1, 220bp đối với exon 2 và 200bp đối với exon 3, xem như phản ứng khuếch đại thành công. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch theo quy trình của Công ty Sinh hóa Phù Sa và giải trình tự theo nguyên tắc Sanger bằng hệ thống 3130, hãng Applied Biosystems.

Chỉnh sửa các file trình tự gene OsHKT1;4 thu được bằng phần mềm BioEdit phiên bản 7.0.5.2 và công cụ Nucleotide Blast, NCBI.

3.4. Đa hình vị trí nucleotide đơn gene OsHKT1;4

Phân tích đa hình vị trí nucleotide đơn (SNP) bằng cách sắp hàng hai trình tự gene OsHKT1;4 của các mẫu lúa thuộc các vùng có độ mặn khác nhau ở Đồng bằng sông Cửu Long với trình tự gene OsHKT1;4 đối chứng là giống lúa sông trong môi trường nước ngọt (OsHKT1;4 ĐC) có accession AJ491853 trên GenBank bằng công cụ nucleotide BLAST (NCBI).

4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Lấy mẫu lúa

Kết quả lấy mẫu lúa thuộc các vùng có độ mặn khác nhau tại các địa phương tỉnh Long An, Tiền Giang, Bến Tre, Đồng Tháp và Vĩnh Long ở Đồng bằng sông Cửu Long (Bảng 1).

Bảng 1. Danh sách lấy mẫu lúa thuộc các vùng có độ mặn khác nhau

STT	Địa phương	Độ mặn (ppt)	Tọa độ	Tên gọi	Số lượng mẫu
1	Huyện Cần Giuộc, tỉnh Long An	4,0	10°33'58.5"N 106°38'27.2"E	<i>Oryza sativa</i> LA	3
2	Huyện Gò Công, tỉnh Tiền Giang	3,0	10°17'42.1"N 106°46'25.4"E	<i>Oryza sativa</i> TG	3
3	Huyện Ba Tri, tỉnh Bến Tre	2,4	10°05'14.5"N 106°31'05.8"E	<i>Oryza sativa</i> BT	3
4	Huyện Cao Lãnh, tỉnh Đồng Tháp	0,3	10°26'51.7"N 105°40'27.9"E	<i>Oryza sativa</i> ĐT	3
5	Huyện Măng Thít, tỉnh Vĩnh Long	0,1	10°10'08.4"N 106°01'48.9"E	<i>Oryza sativa</i> VL	3

4.2. Các cặp mồi PCR

Dựa trên miền bảo tồn và kết quả sàng lọc đã thiết kế được các cặp mồi đặc hiệu dùng để

chạy PCR khuếch đại gene OsHKT1;4 gồm ba vùng mã hóa exon 1, exon 2 và exon 3 (Bảng 2).

Bảng 2. Các cặp mồi PCR dùng để khuếch đại gene OsHKT1;4

STT	Tên mồi	Trình tự mồi	
		Mồi xuôi (5'→ 3')	Mồi ngược (5'→ 3')
1	HKT1;4-1 (exon 1)	ATATATAGCGCGGCAGCACG	CAGATGGAGTACTAGCTAGGTTGA
2	HKT1;4-2 (exon 2)	CCCAAGGGTGACTTTC TGATCG	GTATCAGTTTGCCAGA GTCGC
3	HKT1;4-3(exon 3)	TCACAACCTCTCCTACC TGACC	GAGCTTTGTGCAAGGA TGACAG

4.3. Đa hình vị trí nucleotide đơn (SNP) dựa trên gene OsHKT1;4

Sắp hàng hai trình tự gene OsHKT1;4 của các mẫu lúa trồng tại các vùng có độ mặn khác nhau ở Đồng bằng sông Cửu Long với trình tự gene OsHKT1;4 đối chứng là giống lúa sống trong môi trường nước ngọt (OsHKT1;4 ĐC) có accession AJ491853 trên GenBank bằng công cụ nucleotide BLAST (NCBI) [1, tr.137-141].

4.3.1. SNP của HKT1;4 *Oryza sativa* Long An

Trình tự HKT1;4 *Oryza sativa* Long An (OsHKT1;4 LA) trồng ở môi trường có độ mặn 4,0 ppt và OsHKT1;4 ĐC có tỷ lệ tương đồng 99,83 % và có 9 vị trí SNP: Vùng intron 5' có 1 vị trí SNP 189 (T → C) là đột biến điểm thay thế ở vùng không mã hóa nên không làm thay đổi thành phần amino acid trong sản phẩm protein nhưng có thể làm thay đổi cấu trúc của protein OsHKT1;4 LA. Vùng exon 1 có 1 SNP tại vị trí 605 (T → G) là đột biến điểm thay thế làm thay đổi amino acid valine (V) thành glycine (G), dẫn đến làm thay đổi cấu trúc protein OsHKT1;4 LA theo hướng tạo thêm nhiều kênh SG³ để loại bỏ Na⁺ ra khỏi lá hoặc mầm lá nhanh hơn khi cây lúa chịu áp lực mặn từ môi trường. Vùng intron 1 có 3 SNP tại vị trí 4328 (C → G) là đột biến điểm thay thế không làm thay đổi thành phần amino acid nhưng có thể làm thay đổi cấu trúc của protein OsHKT1;4 LA, tại vị trí 4331 (C → G) và 4332 (C → -) cả hai vị trí liên tiếp đều xảy ra đột biến điểm, vị trí 4332 xảy ra đột biến mất điểm do đó làm thay đổi cấu trúc protein theo hướng vận chuyển Na⁺ nhanh hơn khi cây lúa chịu áp lực mặn từ môi trường. Vùng exon 2 có một vị trí SNP 4336 (A → C) là đột biến điểm thay thế amino acid tyrosine (Y) thành serine (S) làm thay đổi cấu trúc sản phẩm protein theo hướng vận chuyển Na⁺ nhanh hơn khi cây lúa chịu áp lực mặn từ môi trường. Vùng intron 2 có một vị trí SNP 4582 (C → T) là đột biến điểm thay thế ở vùng không mã hóa nên không làm thay đổi

thành phần amino acid của protein OsHKT1;4 LA. Vùng exon 3 (4743 .. 4941) không có vị trí SNP là vùng có tính bảo tồn cao. Vùng intron 3' có hai vị trí SNP tại vị trí 4973 (G → T) là đột biến điểm thay thế và tại vị trí 4975 (- → T) là đột biến chèn điểm ở vùng không mã hóa nên không làm thay đổi thành phần amino acid của protein OsHKT1;4 LA [2, tr.43-44].

4.3.2. SNP của HKT1;4 *Oryza sativa* Tiền Giang

Trình tự HKT1;4 *Oryza sativa* Tiền Giang (OsHKT1;4 TG) trồng ở môi trường có độ mặn 3,0 ppt và trình tự OsHKT1;4 ĐC có tỷ lệ tương đồng 99,89 % và có 6 vị trí SNP: Vùng intron 5' có 1 vị trí SNP 189 (T → C) là đột biến điểm thay thế ở vùng không mã hóa nên không làm thay đổi thành phần amino acid nhưng có thể làm thay đổi cấu trúc của protein. Vùng exon 1 có 2 SNP tại vị trí 605 (T → G) và 1262 (T → G), cả 2 SNP đều là đột biến điểm thay thế làm thay đổi amino acid valine (V) thành glycine (G), dẫn đến làm thay đổi cấu trúc sản phẩm protein OsHKT1;4 TG theo hướng tạo nhiều kênh SG³ để vận chuyển Na⁺ nhanh hơn khi cây lúa chịu áp lực mặn từ môi trường. Vùng intron 1 không có SNP. Vùng exon 2 có hai vị trí SNP 4337 và 4392. Tại vị trí 4337 (A → C) là đột biến điểm thay thế làm thay đổi amino acid tyrosine (Y) thành serine (S) làm thay đổi cấu trúc sản phẩm protein theo hướng vận chuyển Na⁺ nhanh hơn khi cây lúa chịu áp lực mặn từ môi trường. Tại vị trí 4392 (T → C) là đột biến điểm thay thế nhưng không làm thay đổi amino acid aspartic acid (D). Vùng intron 2 có một vị trí SNP 4582 (C → T) là đột biến điểm thay thế ở vùng không mã hóa nên không làm thay đổi thành phần amino acid của protein OsHKT1;4 TG. Vùng exon 3 (4743 .. 4941) không có vị trí SNP là vùng có tính bảo tồn cao. Vùng intron 3' không có SNP [2, tr.44-45].

4.3.3. SNP của HKT1;4 *Oryza sativa* Bến Tre

Trình tự HKT1;4 *Oryza sativa* Bến Tre (OsHKT1;4 BT) đã được GenBank (USA, England, Japan) phát hành với mã số gia nhập

(accession) MT012827 [22, 23, 24] ở môi trường có độ mặn 2,4 ppt và OsHKT1;4 ĐC có tỷ lệ tương đồng 99,94 % và có 3 vị trí SNP: Vùng intron 5' có một vị trí SNP 371 (A → C) là đột biến điểm thay thế ở vùng không mã hóa nên không làm thay đổi thành phần amino acid nhưng có thể làm thay đổi cấu trúc của sản phẩm protein OsHKT1;4 BT. Vùng exon 1 không có SNP. Vùng intron 1 có hai SNP tại vị trí 1823 (T → A) và 4328 (C → A), cả 2 SNP đều là đột biến điểm thay thế không làm thay đổi thành phần amino acid của protein nhưng có thể làm thay đổi cấu trúc của protein theo hướng vận chuyển Na^+ nhanh hơn khi cây lúa chịu áp lực mặn từ môi trường. Những vùng còn lại như vùng exon 2, intron 2 và intron 3' không có SNP. Vùng exon 3 không có SNP là vùng có tính bảo tồn cao [2, tr.46].

4.3.4. SNP của HKT1;4 *Oryza sativa* Đồng Tháp

Trình tự HKT1;4 *Oryza sativa* Đồng Tháp (OsHKT1;4 ĐT) trồng ở môi trường nước ngọt có độ mặn 0,3 ppt và OsHKT1;4 ĐC có tỷ lệ tương đồng 99,93 % với 4 vị trí SNP: Vùng intron 5' có một vị trí SNP 308 (T → G) là đột biến điểm thay thế ở vùng không mã hóa nên không làm thay đổi thành phần amino acid của sản phẩm protein OsHKT1;4 ĐT. Vùng exon 1 không có SNP. Vùng intron 1 có hai SNP tại vị trí 4327 và 4334, tại vị trí 4327 (G → –) là đột biến mất điểm và tại vị trí 4334 (A → G) xảy ra đột biến điểm thay thế, cả hai vị trí không làm thay đổi thành phần amino acid của protein. Vùng exon 2 không có SNP. Vùng intron 2 có một vị trí SNP tại vị trí 4582 (A → G) là đột biến điểm thay thế không làm thay đổi thành phần amino acid của protein OsHKT1;4 ĐT. Vùng exon 3 không có SNP là vùng có tính bảo tồn cao. Vùng intron 3 không có SNP [2, tr.46-47].

4.3.5. SNP của HKT1;4 *Oryza sativa* Vĩnh Long

Trình tự HKT1;4 *Oryza sativa* Vĩnh Long (OsHKT1;4 VL) trồng ở môi trường nước ngọt có độ mặn 0,1 ppt và OsHKT1;4 ĐC có tỷ lệ tương đồng 99,98 % với 1 vị trí SNP 201 (T →

C) tại vùng intron 5' là đột biến điểm thay thế ở vùng không mã hóa nên không làm thay đổi thành phần amino acid trong sản phẩm protein OsHKT1;4 VL. Những vùng còn lại exon 1, intron 1, exon 2, intron 2, intron 3 không có SNP. Vùng exon 3 không có SNP là vùng có tính bảo tồn cao [2, tr.47].

5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Tách chiết và thu nhận được DNA tổng số của 15 mẫu thân lá cây lúa (*Oryza sativa*) thu thập tại các vùng có độ mặn khác nhau ở Đồng bằng sông Cửu Long. Thiết kế và sàng lọc thu được các cặp mồi đặc hiệu HKT1;4-1, HKT1;4-2 và HKT1;4-3 khuếch đại các vùng mã hóa gene OsHKT1;4 bằng kỹ thuật PCR. Giải trình tự, ráp nối và chú thích thành công gene OsHKT1;4. Gene OsHKT1;4 của các giống lúa (*Oryza sativa*) Long An, Tiền Giang, Bến Tre sống trong môi trường nước lợ độ mặn từ 2,4 đến 4,0 ppt có các đột biến điểm thay thế SNP ở vùng mã hóa làm thay đổi amino acid valine (V) thành glycine (G) hoặc tyrosine (Y) thành serine (S), dẫn đến thay đổi cấu trúc sản phẩm protein OsHKT1;4 theo hướng tạo nhiều kênh SG^3 để vận chuyển loại bỏ Na^+ ra khỏi lá nhanh hơn khi cây lúa chịu áp lực mặn từ môi trường. Gene OsHKT1;4 của các giống lúa (*Oryza sativa*) Vĩnh Long, Đồng Tháp sống trong môi trường nước ngọt độ mặn từ 0,1 đến 0,3 ppt có các đột biến điểm SNP không làm thay đổi cấu trúc sản phẩm protein OsHKT1;4 theo hướng không bổ sung thêm kênh SG^3 để vận chuyển loại bỏ Na^+ ra khỏi lá chậm hơn khi cây lúa không chịu áp lực mặn từ môi trường.

Nghiên cứu đa hình nucleotide đơn (SNP) gene OsHKT1;4 ở các bộ phận khác nhau của cây lúa ngoài thân lá lúa. Nghiên cứu mở rộng về SNP của các gene HKT loại 1 và loại 2 gắn với việc giải thích cơ chế vận chuyển và ổn định Na^+/K^+ trong cây lúa. Nghiên cứu ứng dụng chọn giống lúa có khả năng chịu mặn cao dựa trên gene HKT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Trương Thế Quang (2018), *Tin sinh học (Bioinformatics)*, Nxb Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- [2] Trương Thế Quang và Nguyễn Thị Thùy Vân (2020), *Đa dạng di truyền và biểu hiện gene chịu mặn high – affinity potassium transporter 1;4 (HKT1;4) của một số dòng lúa (Oryza sativa) ở Đồng bằng sông Cửu Long*, Trường Đại học Văn Lang.
- [3] Trương Thế Quang and Nguyễn Thị Thùy Vân (2020), *Biểu hiện gene chịu mặn High-affinity Potassium Transporter 1;4 (OsHKT1;4) trên cây lúa (Oryza sativa)*, Tạp chí Khoa học Đại học Văn Lang, Số 20.
- [4] Nguyễn Quang Xu (2001), *Kết quả chọn tạo giống lúa chịu mặn CM3*, Kết quả nghiên cứu khoa học Viện Di truyền Nông nghiệp 2000-2001, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
- [5] Apse M.P., et al. (1999), *Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+ / H^+ antiport in Arabidopsis*, Science 285.
- [6] Berthomieu P., Conejero G., Nublat A., et al. (2003), *Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na^+ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance*, The EMBO Journal 22.
- [7] Boursiac Y., Chen S., Luu D.T., Sorieul M., Van Den Dries N. & Maurel C. (2005), *Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression*, Plant Physiology 139.
- [8] Davis L.M., Fairfield F.R., Harger C.A., Jett J.H., Keller R.A., Hahn J.H., Krakowski L.A., Marrone B.L., Martin J.C., Nutter H.L., Ratliff R.L., Shera E.B., Simpson D.J. and Soper S.A. (1991), *Rapid DNA sequencing based upon single molecule detection*, Genetic Analysis - Biomolec. Engng 8.
- [9] Gorham J., Wyn Jones R.G. & McDonnell E. (1985), *Some mechanisms of salt tolerance in crop plants*, Plant and Soil 89.
- [10] Greenway H. and Munns R.A. (1980), *Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes*, Annual Review of Plant Physiology 31.
- [11] Horie T., Horie R., Chan W.Y., Leung H.Y. and Schroeder J.I. (2006), *Calcium regulation of sodium hypersensitivities of sos3 and athkt1 mutants*, Plant & Cell Physiology 47.
- [12] Katsuhara M., Hanba Y.T., Shiratake K. & Maeshima M. (2008), *Expanding roles of plant aquaporins in plasma membranes and cell organelles*, Functional Plant Biology: FPB 35.
- [13] Luu D.T. and Maurel C. (2005), *Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status*. Plant, Cell and Environment 28.
- [14] Rains D.W. and Epstein E. (1965), *Transport of sodium in plant tissue*, Science 148.
- [15] Ren Z.H., Gao J.P., Li L.G., Cai X.L., Huang W., Chao D.Y., Zhu M.Z., Wang Z.Y., Luan S. and Lin H.X. (2005), *A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter*, Nature Genetics 37.
- [16] Sunarpi H.T., Motoda J., Kubo M., et al. (2005), *Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na^+ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells*, The Plant Journal 44.

- [17] Tournaire-Roux C., Sutka M., Javot H., Gout E., Gerbeau P., Luu D.T., Bligny R. and Maurel C. (2003), *Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins*, Nature 425.
- [18] Tsugane K., Kobayashi K., Niwa Y., Ohba Y. and Wada K. (1999), *A recessive Arabidopsis mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification*, The Plant Cell 11.
- [19] Wegner L.H. and Raschke K. (1994), *Ion channels in the xylem parenchyma of barley roots*, Plant Physiology 105.
- [20] Wegner L.H. and De Boer A.H. (1997), *Properties of two outward-rectifying channels in root xylem parenchyma cells suggest a role in K^+ homeostasis and long-distance signaling*, Plant Physiology 115.
- [21] Olivier Cotsaftis, Darren Plett, Neil Shirley, Mark Tester, and Maria Hrmova (2012), *A Two- Staged Model of Na^+ Exclusion in Rice Explained by 3D Modeling of HKT Transporters and Alternative Splicing* (NCBI), USA, URL: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3394774.
- [22] Truong The Quang and Nguyen Thi Thuy Van (2020), *Oryza sativa Japonica Group putative sodium transporter (hkt7) gene, complete cds*, Accession MT012827, GenBank, The National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA: www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT012827.
- [23] Truong The Quang and Nguyen Thi Thuy Van (2020), *Expression of the high-affinity potassium transporter 7 gene (OsHKT7) of the rice (Oryza sativa)*, The European Nucleotide Archive, London, England, URL: www.ebi.ac.uk/ena/data/view/MT012827.
- [24] Truong The Quang and Nguyen Thi Thuy Van (2020), *Oryza sativa Japonica Group putative sodium transporter (hkt7) gene, complete cds*, The Center for Information Biology and DNA Data Bank of Japan, ddbj.nig.ac.jp/arsa/search?lang=en&cond=quick_search&operator=AND&query=MT01282.

Ngày nhận bài: 31-8-2020. Ngày biên tập xong: 02-11-2020. Duyệt đăng: 27-11-2020