

PHÂN TÍCH ĐA HÌNH VÙNG EXON 1 GEN *OsHKT1;5* TRÊN CÁC GIỐNG LÚA MÙA CHIU MẶN TỈNH KIÊN GIANG

Nguyễn Thị Pha¹, Trần Hoàng Thanh¹,
Trần Thị Thùy Dương¹, Nguyễn Hữu Minh², Trần Đình Giới^{2*}

TÓM TẮT

Nguy cơ xâm nhập mặn do biến đổi khí hậu ngày càng nghiêm trọng, đe dọa sản xuất lúa ở vùng đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Nghiên cứu đánh giá tính chống chịu mặn của 16 giống lúa mùa địa phương thu thập từ tỉnh Kiên Giang so sánh với Pokkali và RC222 đã chọn ra được các giống lúa có khả năng chống chịu mặn khác nhau. Các giống lúa này sau đó được phân tích đa hình vùng exon 1 gen *OsHKT1;5* bằng kỹ thuật giải trình tự. Kết quả đánh giá kiểu hình đã xác định được 7 giống lúa có tính chống chịu mặn khác nhau gồm: Lúa Chuối, FL478, Pokkali có khả năng chống chịu tốt; Nàng Trích, Trắng Tép, Ba Bụi, Một Bụi có tính chống chịu mặn trung gian ở các mức khác nhau; RC222 mẫn cảm với mặn. Phân tích trình tự vùng exon 1 gen *OsHKT1;5* đã xác định được 3 dấu SNP ở các vị trí nucleotide G382A, C418G và G551A. Cả 3 dấu SNP đều là đột biến sai nghĩa làm thay đổi các amino axit D128N, P140A và R184H. Các SNP G382A và G551A có thể có liên quan đến tính chống chịu mặn của các giống lúa.

Từ khóa: *SNP, gen OsHKT1;5, lúa mùa, chống chịu mặn.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo kịch bản biến đổi khí hậu tại Việt Nam được công bố năm 2020, nếu mực nước biển dâng cao thêm 100 cm thì vùng đồng bằng sông Cửu Long có 47,29% diện tích bị ngập, đặc biệt tỉnh Kiên Giang có đến 75,68% diện tích [1], chính vì vậy tỉnh Kiên Giang đã công bố tình trạng thiên tai toàn tỉnh vào năm 2016 về mặn [2]. Lúa mùa có những đặc tính ưu thế hơn các giống lúa cao sản như khả năng phát triển sinh khối, sự chống chịu với điều kiện bất lợi, đặc biệt là thích ứng với điều kiện biến đổi khí hậu [3], gạo lúa mùa còn chứa một số loại khoáng chất và vitamin như B, D, E rất có lợi cho sức khỏe, phù hợp với những người có tiền sử bệnh tiểu đường hay mắc các bệnh cần hàm lượng dinh dưỡng cao [4]. Trong các loại cây lương thực chủ yếu, lúa nhạy cảm nhất với các ảnh hưởng từ mặn, với giá trị EC xấp xỉ 3 dS/m đã làm giảm mạnh sự tăng trưởng và năng suất của cây lúa [5]. Axit abscisic điều chỉnh sự biểu hiện của

một số gen đáp ứng sự thiếu hụt muối và nước. Một số hợp chất khác như: Salicylic axit (SA) và brassinosteroid cũng tham gia vào các phản ứng chống chịu ở thực vật. Dưới tác động của mặn, mức SA nội sinh tăng lên cùng với sự gia tăng hoạt động của enzyme sinh tổng hợp SA trong cây lúa. Khả năng chống chịu mặn là một tính trạng số lượng được kiểm soát bởi nhiều gen hoặc phức hợp gen gọi là locus tính trạng số lượng (QTL) và Saltol là một QTL chính chống chịu mặn ở giai đoạn mạ [6]. QTL qSNC11 được xác định giúp giảm nồng độ Na⁺ ở chồi, tăng khả năng chịu mặn của lúa. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự tổn thương của lá do sự tích lũy Na⁺ trong chồi nhiều bởi sự vận chuyển Na⁺ từ rễ đến chồi khi nồng độ Na⁺ bên ngoài cao. Trong số các protein vận chuyển Na⁺, protein High-Affinity K⁺ Transporter đã được chứng minh là chất có vai trò quan trọng đối với cả cây một lá mầm và cây hai lá mầm trong khả năng chống chịu mặn [7]. Đoạn gen *OsHKT1;5* có độ dài tổng cộng khoảng 4.483 bp, được phân thành 3 vùng exon và 2 vùng intron, trong đó vùng exon 1 có độ dài lớn nhất là 1.235 bp. Đoạn gen này mã hóa tạo ra chuỗi polypeptide có cấu tạo gồm 554 amino axit, có khối lượng phân

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

² Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long

* Email: tdgioi@gmail.com

từ khoảng 60 kDa [8, 9]. *OsHKT1;5* vận chuyển Na^+ ra khỏi xylem vào tế bào nhu mô của xylem, sau đó được đưa đến vỏ, biểu bì và trả lại đất, làm hạn chế việc tích lũy Na^+ trong tế bào, nâng cao khả năng chống chịu mặn cho cây trồng. Nghiên cứu này tập trung vào phân tích trình tự đa hình của vùng exon 1 gen *OsHKT1;5* ở một số giống lúa mùa thể hiện sự thay đổi cấu trúc protein tương

ứng với khả năng chống chịu mặn, từ đó góp phần quan trọng vào công tác tạo chọn giống lúa.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Gồm 18 giống lúa được cung cấp bởi Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), trong đó có giống RC222 (chuẩn mẫn cảm) và giống Pokkali (chuẩn chống chịu) (Bảng 1).

Bảng 1. Danh sách các giống lúa khảo sát tính chịu mặn

TT	Tên giống	TT	Tên giống
1	RC222 (Chuẩn mẫn cảm mặn)	10	Một Bụi
2	Pokkali (Chuẩn chống chịu mặn)	11	Tiêu Chệt
3	FL478	12	Nếp 10-2
4	Móng Chim Roi	13	Bằng Đỏ
5	Nếp Thom	14	OM1352
6	Nếp Than	15	Nàng Trích
7	Một Bụi Đỏ	16	Nếp 1
8	Trắng Tép	17	Lúa Chuối
9	Ba Bụi	18	Nàng Sâu

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thanh lọc kiểu hình tính chống chịu mặn

Các giống lúa được đánh giá khả năng chống chịu mặn giai đoạn mạ theo phương pháp của IRRI (1997) [10] có cải tiến theo IRRI (2021) [11] trên môi trường thủy canh có chứa dung dịch Yoshida ở các nồng độ muối khác nhau. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 nghiệm thức được xử lý mặn ở các nồng độ muối NaCl: 0‰, 4‰, 8‰. Trong số đó, nghiệm thức với nồng độ NaCl 0‰ là nghiệm thức đối chứng.

Các chỉ tiêu theo dõi: (i) Cấp chống chịu mặn ghi nhận lúc 14 ngày sau khi xử lý mặn và khi giống chuẩn mẫn cảm đạt cấp 9 (chết hoàn toàn)

theo thang điểm của IRRI (1997) [10]; (ii) Chiều cao cây (cm): Được ghi nhận từ cổ rễ đến đỉnh sinh trưởng của chồi ngọn cao nhất vào thời điểm đánh giá cấp chống chịu mặn lần cuối; (iii) Chiều dài rễ (cm): Được ghi nhận từ cổ rễ đến đỉnh sinh trưởng của chóp rễ dài nhất vào thời điểm đánh giá cấp chống chịu mặn lần cuối; (iv) Khối lượng thân lá tươi (g): Cân và tính trung bình; (v) Khối lượng thân lá khô (g): Thân, lá được sấy khô, cân và tính trung bình; (vi) Khối lượng rễ tươi (g): Cân và tính trung bình; (vii) Khối lượng rễ khô (g): Rễ được sấy khô, cân và tính trung bình; sau khi đánh giá SES xong thì tiến hành lấy mẫu lá non thứ 2 để tính hàm lượng nước tương đối trong lá theo công thức: $WL\% = (FL - DL) / FL \times 100$ (Trong đó: FL là khối lượng lá tươi; DL là khối lượng lá khô).

2.2.2. Phân tích vùng exon 1 của gen *OsHKT1;5* ở một số giống lúa

Sau khi thanh lọc kiểu hình, dựa trên kết quả phân tích thành phần chính PCA được xử lý bằng phần mềm Statgraphics 19, chọn 5 giống lúa có tính chống chịu mặn khác nhau cùng với 2 giống Pokkali và RC222 tiến hành ly trích ADN, thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi *OsHKT1;5* giải trình tự.

Hạt lúa nảy mầm dài từ 1,5 - 2,0 cm được trồng vào chậu đất, bổ sung nước tưới mỗi ngày đến giai đoạn lá non 10 - 12 ngày tuổi thì tiến hành ly trích ADN. Lá non đạt tiêu chuẩn được lau sạch bằng cồn 70° và thực hiện ly trích ADN theo quy trình CTAB được mô tả bởi Rogers và Bendich (1988) [12]. ADN sau khi được ly trích được kiểm tra chất lượng bằng gel agarose nồng độ 1% bằng cách bơm 10 µL ADN (có 2 µL loading buffer) vào mỗi giếng của gel agarose 1% bổ sung thuốc nhuộm safeview. Điện di khoảng 15 phút ở hiệu điện thế 100 V. Sau đó, ADN được phát hiện dưới tia UV, dựa trên các băng AND để đánh giá chất lượng ADN. Những mẫu ADN đạt chất lượng được tiến hành PCR với đoạn mồi *OsHKT1;5* được thiết kế theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Pha và cs (2019) để khuếch đại vùng exon 1 của đoạn gen *OsHKT1;5* [13]. Thông tin mồi:

F: 5' GGACCTGATCTTCACGTCGG 3'

R: 5' GAGCACCATCTCACCGGAG 3' (Độ dài sản phẩm dự kiến: 1.000 bp)

Các thành phần hóa chất cho 50 µL mẫu phản ứng PCR được chuẩn bị bao gồm: 33,5 µL nước cất tiệt trùng 2 lần; 10 µL dung dịch đệm cho PCR (5X buffer), 4 µL dung dịch mồi xuôi và mồi ngược (10 pmol); 0,5 µL dung dịch Taq ADN polymerase (5 unit/µL) và 2 µL ADN tổng số (~50 ng).

Quy trình gia nhiệt được thực hiện bằng máy ADN thermal cycler - model: GeneAmp PCR System 9700 (USA) theo chương trình được thiết lập tự động bao gồm: Giai đoạn khởi đầu biến tính ở 94°C trong 2 phút và 30 chu kỳ với các bước: Biến tính, tách đôi mạch kép ADN ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 58°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 45 giây và ổn định sản phẩm ở 72°C trong 5 phút, mẫu được trữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được

điện di trên gel agarose 2% bổ sung thuốc nhuộm safeview để kiểm tra chất lượng. Các mẫu đạt tiêu chuẩn được gửi đến GENLAB để giải trình tự.

2.2.3. Xử lý số liệu

Số liệu các tính trạng đánh giá kiểu hình được tổng hợp trên phần mềm Microsoft Excel 2019. Các thống kê mô tả, phân tích thành phần chính PCA được xử lý bằng phần mềm Statgraphics 19. Trình tự vùng exon1 gen *OsHKT1;5* của các giống lúa được so sánh với trình tự gen tham chiếu của giống lúa Nipponbare trên ngân hàng gen NCBI bằng phần mềm BioEdit V7.2.6.1 để dò tìm SNP.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá kiểu hình tính chống chịu mặn của các giống lúa

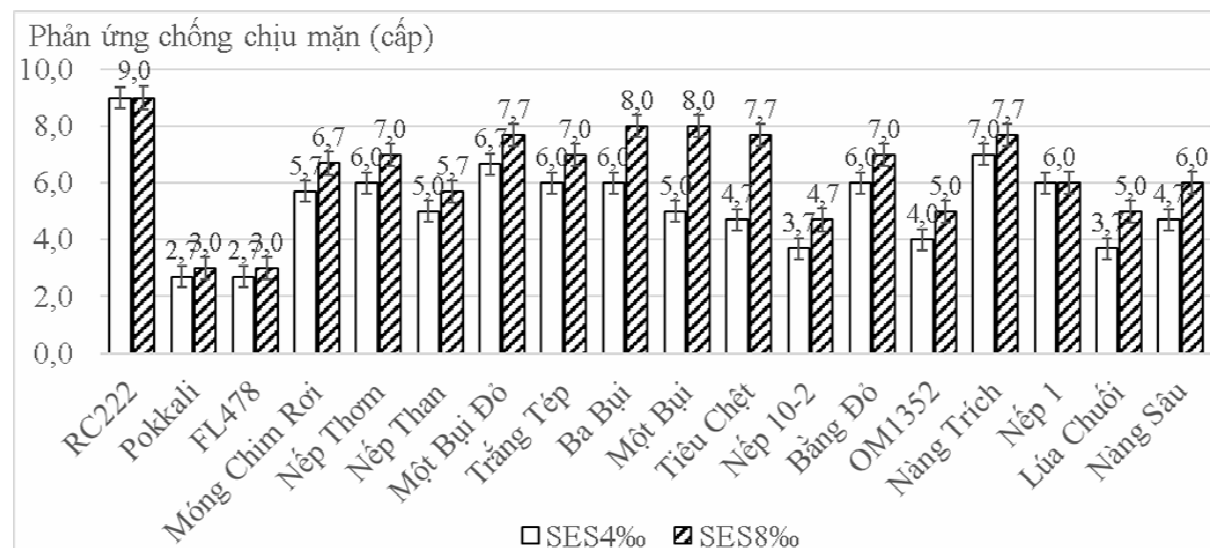
Trong số các tính trạng theo dõi, điểm đánh giá cấp chống chịu mặn và khối lượng khô của các giống lúa ở các nồng độ mặn khác nhau là biểu hiện rõ nhất tính chống chịu mặn của các giống lúa. Kết quả đánh giá các tính trạng này được tổng hợp ở hình 1 và 2.

Hình 1 cho thấy, có 5 giống lúa cho phản ứng chống chịu mặn tốt đến trung bình ở cả 2 nghiệm thức có nồng độ mặn 4‰ và 8‰ gồm giống chuẩn chống chịu Pokkali, FL478 (cấp 2 - 3), Nếp 10-2, OM1352 và Lúa Chuối (cấp 3 - 5); 7 giống có phản ứng mặn cảm nhẹ (cấp 5 - 7) gồm: Móng Chim Roi, Nếp Than, Nếp Thom, Trảng Tép, Bàng Đỏ và Nàng Sầu; các giống còn lại mặn cảm với mặn (cấp 7 - 8) nhưng vẫn nhẹ hơn giống chuẩn mặn cảm RC222 (cấp 9).

Khối lượng khô sau khi thanh lọc mặn cũng biểu hiện rất rõ sự khác biệt giữa nhóm các giống lúa chống chịu và mặn cảm với mặn (Hình 2). Ở nghiệm thức đối chứng không xử lý mặn (0‰), các giống lúa có khối lượng khô dao động từ 0,30 - 0,86 g/cây. Đặc tính này do kiểu gen của các giống lúa quy định, cao nhất là giống Pokkali và thấp nhất là giống Một Bụi Đỏ. Ở nghiệm thức bổ sung nồng độ mặn 4‰, hầu hết các giống lúa đều cho khối lượng khô thấp hơn đối chứng không xử lý mặn, riêng giống lúa Móng Chim Roi cho khối lượng khô khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Khối lượng khô của các giống lúa dao động từ 0,23 - 0,77 g/cây; thấp nhất là giống Một

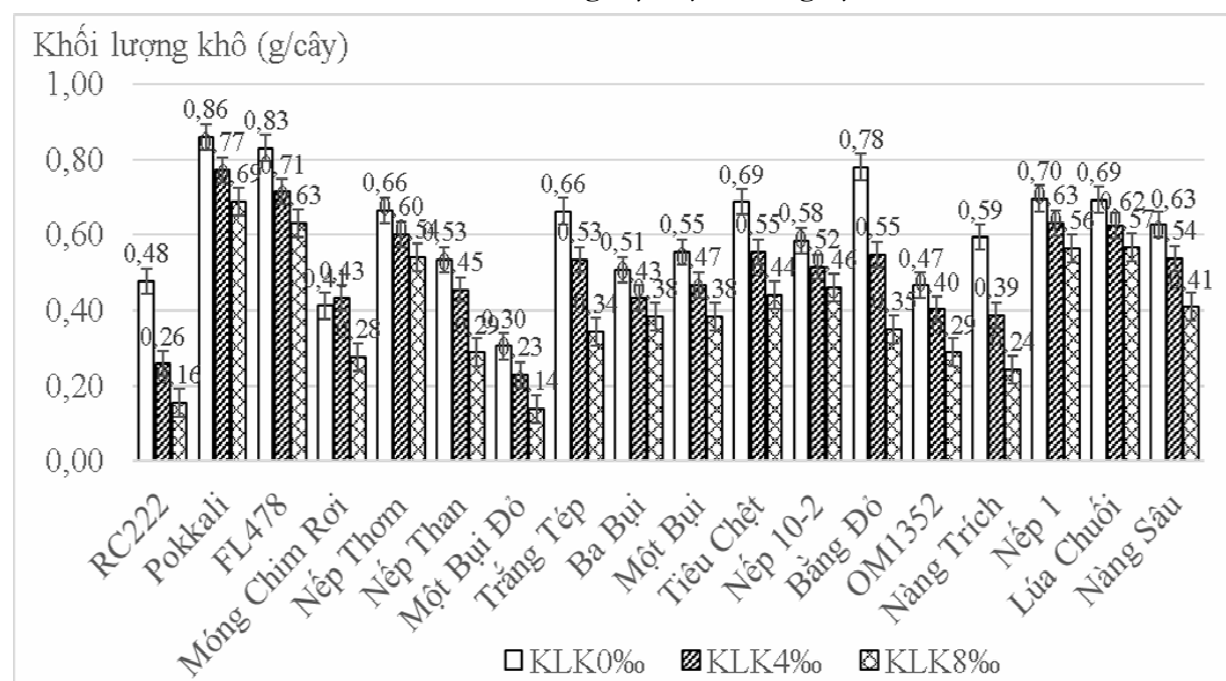
Bụi Đỏ và cao nhất là giống chuẩn chống chịu Pokkali. Các giống lúa có khối lượng khô cao gồm: FL478 (0,71 g/cây), Nếp 1 (0,63 g/cây), Lúa Chuối (0,62 g/cây), Nếp Thơm (0,60 g/cây), Tiêu Chết (0,55 g/cây),... (Hình 2). Khi xử lý ở nồng độ mặn 8‰, tất cả các giống lúa đều cho khối lượng khô

thấp hơn đối chứng không xử lý mặn, dao động từ 0,14 - 0,69 g/cây. Giống cho khối lượng khô cao nhất là Pokkali (0,69 g/cây), tiếp theo là FL478 (0,63 g/cây), Lúa Chuối (0,57 g/cây), Nếp 1 (0,56 g/cây), Nếp Thơm (0,54 g/cây) và giống cho khối lượng khô thấp nhất là Một Bụi Đỏ.



Hình 1. Phản ứng chống chịu mặn của các giống lúa

SES4‰ và SES8‰ là điểm chống chịu mặn ở các nghiệm thức 4‰ và 8‰



Hình 2. Khối lượng khô của các giống lúa sau khi thanh lọc mặn

KLK0‰, KLK4‰ và KLK8‰ là khối lượng khô toàn cây tương ứng ở các nghiệm thức đối chứng (0‰); 4‰ và 8‰.

12 chỉ tiêu theo dõi ở 2 nồng độ mặn (24 chỉ tiêu) đã được sử dụng để phân tích thành phần chính gồm cấp chống chịu mặn (SES) lúc 14 ngày sau khi xử lý mặn (1) và khi giống chuẩn mẫn cảm chết hoàn toàn (2); tỷ lệ % giảm chiều cao cây so với đối chứng (3); tỷ lệ % giảm chiều dài rễ so với đối chứng (4); khối lượng tươi (5) và khô (6) thân lá so với đối chứng (tỷ lệ %); khối lượng tươi (7) và khô (8) rễ so với đối chứng; khối lượng tươi (9) và khô (10) toàn cây so với đối chứng (tỷ lệ % thân lá + rễ so với đối chứng); tỷ lệ % về khối lượng khô của rễ so với thân lá (11) và hàm lượng nước tương đối trong lá (12). Kết quả đã xác định có 5 thành phần chính có giá trị riêng lớn hơn 1 và có đóng góp chính vào biến thiên kiểu hình của 18 giống lúa, trong đó 3 thành phần chính đóng góp lớn nhất vào biến thiên kiểu hình có thể giải thích được 77,2% biến động của quần thể (Bảng 2).

Thành phần chính thứ 1 đóng góp 54,6% sự biến động và được đặc trưng bởi cấp chống chịu mặn ở 14 ngày sau xử lý và khi giống chuẩn mẫn cảm chết hoàn toàn ở nồng độ mặn 4‰; tỷ lệ giảm chiều dài rễ, khối lượng tươi thân lá và khối lượng tươi toàn cây ở nồng độ mặn 8‰. Thành phần chính thứ 2 (PCA 2) chiếm 13,8% sự biến động và được đặc trưng bởi tỷ lệ giảm chiều cao cây, khối lượng khô thân lá và khối lượng khô toàn cây ở nồng độ mặn 4‰ và hàm lượng nước tương đối trong lá ở nồng độ mặn 8‰. Thành phần chính thứ 3 (PCA 3) chiếm 8,8% sự biến động và được đặc trưng bởi tỷ lệ giảm khối lượng tươi và khô của rễ và khối lượng tươi thân lá ở nồng độ mặn 4‰ và tỷ lệ giảm khối lượng tươi rễ, chiều cao cây và hàm lượng nước tương đối trong lá ở nồng độ mặn 8‰. Sự phân bố giá trị đặc trưng (Eigen values) của các giống lúa theo các thành phần chính được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 2. Mức độ đóng góp của các thành phần chính vào sự biến động đặc điểm chống chịu mặn của các giống lúa

Thành phần chính (PCA)	Giá trị riêng (Eigenvalue)	% biến động được giải thích	% biến động tích lũy
Thành phần chính 1 (PCA1)	13,10	54,6	54,6
Thành phần chính 2 (PCA2)	3,31	13,8	68,4
Thành phần chính 3 (PCA3)	2,12	8,8	77,2
Thành phần chính 4 (PCA4)	1,55	6,5	83,7
Thành phần chính 5 (PCA5)	1,08	4,5	88,2

Bảng 3. Các giá trị đặc trưng của ma trận tương quan đối với 12 đặc điểm chống chịu mặn của các giống lúa trong 2 nghiệm thức thanh lọc mặn

TT	Đặc điểm chống chịu mặn của các giống lúa	PCA1	PCA2	PCA3
1	Tỷ lệ giảm chiều cao cây so đc ở độ mặn 4‰	-0,10	-0,39	-0,09
2	Tỷ lệ giảm chiều cao cây so đc ở độ mặn 8‰	-0,15	-0,18	0,28
3	Tỷ lệ giảm chiều dài rễ so đc ở độ mặn 4‰	-0,24	0,19	-0,09

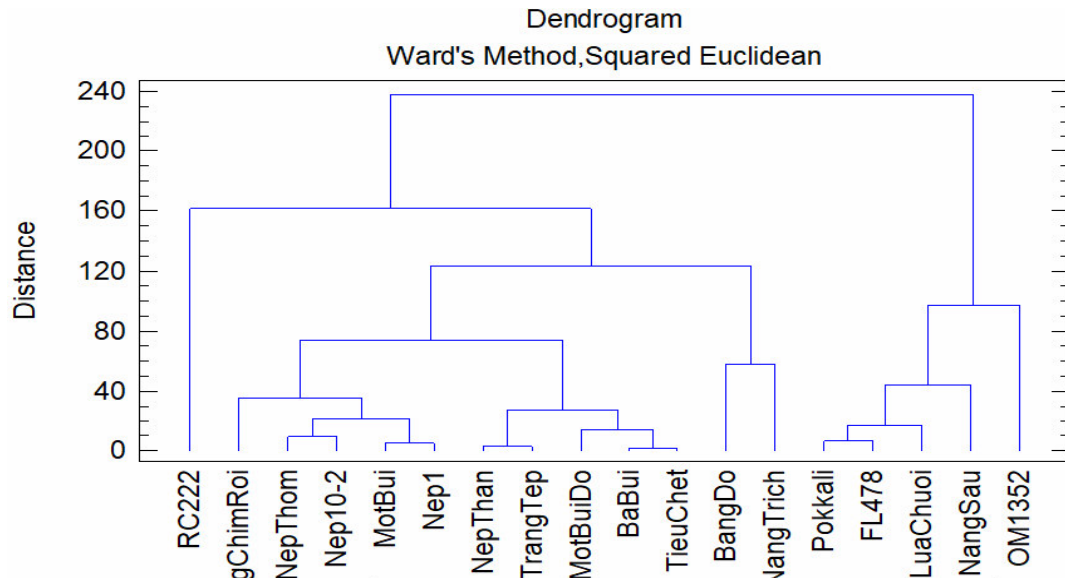
KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

TT	Đặc điểm chống chịu mặn của các giống lúa	PCA1	PCA2	PCA3
4	Tỷ lệ giảm chiều dài rễ so đc ở độ mặn 8‰	-0,25	0,18	-0,05
5	Cấp chống chịu mặn lúc 14 ngày ở nồng độ 4‰	-0,25	0,10	-0,05
6	Cấp chống chịu mặn lúc 14 ngày ở nồng độ 8‰	-0,24	0,06	-0,09
7	Cấp chống chịu mặn ở nồng độ 4‰	-0,27	0,01	-0,03
8	Cấp chống chịu mặn ở nồng độ 8‰	-0,24	0,14	-0,09
9	Tỷ lệ giảm khối lượng tươi thân lá so đc ở độ mặn 4‰	0,23	-0,16	-0,25
10	Tỷ lệ giảm khối lượng tươi thân lá so đc ở độ mặn 8‰	0,25	-0,16	-0,18
11	Tỷ lệ giảm khối lượng tươi rễ so đc ở độ mặn 4‰	0,02	-0,12	0,34
12	Tỷ lệ giảm khối lượng tươi rễ so đc ở độ mặn 8‰	0,14	0,24	-0,02
13	Tỷ lệ giảm khối lượng tươi toàn cây so đc ở độ mặn 4‰	0,23	-0,17	-0,23
14	Tỷ lệ giảm khối lượng tươi toàn cây so đc ở độ mặn 8‰	0,25	-0,14	-0,18
15	Tỷ lệ giảm khối lượng khô thân lá so đc ở độ mặn 4‰	0,18	0,33	0,04
16	Tỷ lệ giảm khối lượng khô thân lá so đc ở độ mặn 8‰	0,23	0,22	0,15
17	Tỷ lệ giảm khối lượng khô rễ so đc ở độ mặn 4‰	0,03	0,06	0,50
18	Tỷ lệ giảm khối lượng khô rễ so đc ở độ mặn 8‰	0,01	-0,03	-0,41
19	Tỷ lệ khối lượng khô rễ so với thân lá ở độ mặn 4‰	-0,21	-0,23	0,15
20	Tỷ lệ khối lượng khô rễ so với thân lá ở độ mặn 8‰	-0,22	-0,21	0,08
21	Tỷ lệ giảm khối lượng khô toàn cây so đc ở độ mặn 4‰	0,19	0,33	0,05
22	Tỷ lệ giảm khối lượng khô toàn cây so đc ở độ mặn 8‰	0,23	0,21	0,15
23	Hàm lượng nước tương đối trong lá ở độ mặn 4‰	0,21	-0,24	0,15
24	Hàm lượng nước tương đối trong lá ở độ mặn 8‰	0,19	-0,27	0,26

Ghi chú: Các hệ số có giá trị tuyệt đối lớn hơn 0,25 được in đậm; đc là đối chứng; dấu - là tương quan nghịch với tính chống chịu mặn

Dựa trên kết quả phân tích thành phần chính các giá trị đặc trưng (Eigen values) của ma trận tương quan, 14 đặc tính chống chịu mặn của các giống lúa có hệ số tuyệt đối lớn hơn 0,25 được sử dụng để phân loại (phân nhóm) các các lúa khảo sát.

Phương pháp phân nhóm thứ bậc (Hierarchical clustering) của Ward và cs (1963) [14] được sử dụng để phân nhóm các giống lúa khảo sát như trong hình 3.

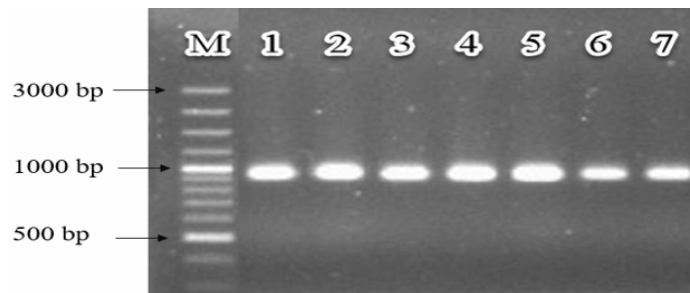


Hình 3. Phân nhóm các giống lúa dựa trên 14 chỉ tiêu theo dõi tính chống chịu mặn

Kết quả phân nhóm cho thấy, có sự hình thành của 4 nhóm chính trong đó các giống có các đặc tính chống chịu mặn tốt được xếp chung 1 nhóm gồm: Pokkali, FL478, Lúa Chuối, Nàng Sâu và OM1352, các giống có khả năng chống chịu mặn trung gian được chia thành 3 nhóm nhỏ với 12 giống và giống chuẩn mẫn cảm RC222 được xếp riêng biệt 1 nhóm. Như vậy, để lựa chọn các giống

lúa có mức độ chống chịu mặn khác nhau thì mỗi nhóm lấy ra 1 giống so sánh với các giống đối chứng là: Pokkali và RC222 và các giống được lựa chọn bao gồm: Ba Bui, Một Bui, Nàng Trích, Lúa Chuối, FL478, Pokkali và RC222 (Hình 3).

3.2. Phân tích vùng exon 1 của gen *OsHKT1;5* ở một số giống lúa



Hình 4. Kết quả điện di với môi *OsHKT1;5* ở 7 giống lúa

Ghi chú: Các giếng từ 1 - 7 tương ứng với các giống lúa RC222, Pokkali, FL478, Ba Bui, Một Bui, Nàng Trích và Lúa Chuối

Các giống được chọn để giải trình tự được thực hiện phản ứng PCR với cặp môi *OsHKT1;5* để

khuếch đại vùng exon 1 của gen *OsHKT1;5*. Sau đó, tiến hành điện di sản phẩm PCR để kiểm tra

kết quả. Kết quả điện di cho thấy, các băng ADN đều sáng, rõ, không đứt gãy, chứng tỏ sản phẩm đủ chất lượng, hàm lượng tạp chất ít, đạt tiêu chuẩn để gửi giải trình tự vùng exon 1.

Kết quả giải trình tự vùng exon 1 của gen *OshKT1;5* ở 7 giống lúa ghi nhận được vùng tín hiệu ổn định dài 635 nucleotide từ nucleotide thứ 241 đến nucleotide thứ 875. Các đoạn ADN đã được

khuếch đại và giải trình tự cho kết quả ghi nhận được 3 sự thay thế nucleotide (SNP) khi tham chiếu với trình tự giống Nipponbare trên cơ sở dữ liệu ở các vị trí của nucleotide 382, 418 và 551 (Bảng 4). Trong tổng số 7 giống được giải trình tự, có 2 giống cho 2 sự thay thế nucleotide (RC222, Pokkali) chiếm 28,6% và 5 giống còn lại không cho thấy sự khác biệt khi so sánh với giống Nipponbare.

Bảng 4. Đa hình vùng exon 1 của gen *OshKT1;5*

Vị trí SNP	382	418	551	Giống lúa
Amino axit thay đổi	D128N	P140A	R184H	
Vị trí nucleotide	G	C	G	Nipponbare
	A	G	-	RC222
	-	G	A	Pokkali
	-	-	-	FL478, Ba Bụi, Một Bụi, Nàng Trích, Lúa Chuối

Ghi chú: Dấu - là không thay đổi so với giống tham chiếu Nipponbare

Cả 3 SNPs đều dẫn đến những đột biến sai nghĩa. Cụ thể đột biến thay thế nucleotide ở vị trí thứ 382 từ Guanine thành Adenine (G382A), dẫn đến xuất hiện amino axit Asparagine ở vị trí 128 thay thế cho amino axit Aspartate ban đầu (D128N), đột biến ở nucleotide thứ 418 thay thế Cytosine thành Guanine (C418G) làm xuất hiện amino axit Alanine thay cho amino axit Proline ban đầu ở vị trí 140 (P140A), cả 2 đột biến này xuất hiện ở giống RC222. Ở giống Pokkali, đột biến ở vị trí thứ 418 làm thay thế amino axit Proline thành Alanine (giống như ở giống RC222), ở vị trí 551 đột biến thay thế nucleotide Guanine thành Adenine (G551A) làm thay thế amino axit Arginine thành Histidine ở vị trí 184 (R184H). Các giống còn lại không xuất hiện SNP. Như vậy, nghiên cứu chỉ xác định được 3 SNPs trên 2 giống đối chứng mà không tìm được SNP nào trên các giống khảo sát và ở 2 giống đối chứng đều có chung 1 SNP ở vị trí nucleotide 418 làm thay đổi amino axit thứ 140 từ Proline thành Alanine. Hai đột biến còn lại được tìm thấy ở 2 vị trí khác nhau và cũng làm thay thế các amino axit khác nhau. Có thể đây là 2 SNPs làm ảnh hưởng đến khả năng chống chịu mặn của

2 giống lúa này. Mặc dù nghiên cứu không tìm ra SNP trên các giống thử nghiệm nhưng cũng đã phát hiện được 2 SNPs có thể liên quan đến tính chống chịu mặn của các giống lúa.

Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyen Thi Pha và cs (2019) [13] đã tìm thấy 5 SNPs ở các vị trí nucleotid 382, 418, 484, 551 và 994 của vùng exon 1 gen *OshKT1;5* trên 20 giống lúa cao sản và cũng có sự thay thế của các amino axit tương tự ở các vị trí 128 và 140. Nghiên cứu của La Hoàng Trúc Ngân (2019) [9] cũng đã tìm thấy được 6 SNPs gồm có: 3 SNPs dẫn đến đột biến sai nghĩa và ba SNPs đột biến đồng nghĩa khi giải trình tự vùng exon 1 của gen *OshKT1;5* ở 10 giống lúa sau khi đã được thanh lọc kiểu hình chống chịu mặn. Nghiên cứu của Trần Xuân An (2018) [15] cũng đã phát hiện được 12 sai khác nucleotide khi so sánh trình tự gene các giống lúa trong nghiên cứu, có 6 vị trí sai khác làm ảnh hưởng đến trình tự amino axit. Gần đây, nghiên cứu đa dạng di truyền họ gen *OshKT* ở 41 giống lúa địa phương của Văn Quốc Giang và cs (2021) [16] đã ghi nhận được sự sai khác thể hiện nhiều nhất ở gen *OshKT1;5*, trong đó có nhiều loại đột

biến thay thế như: A>C, A>G, C>T, G>A và nhiều nhất là T>C.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Đánh giá tính chống chịu mặn của 18 giống lúa ở 2 nồng độ mặn 4‰ và 8‰ đã xác định được 7 giống lúa có tính chống chịu mặn khác nhau gồm: Lúa Chuối, FL478, Pokkali (chống chịu mặn tốt) Ba Bui, Một Bui, Nàng Trích (chống chịu mặn trung bình đến miễn cảm) và RC222 (rất miễn cảm). Phân tích đa hình trình tự vùng exon 1 gen *OsHKT1;5* của 7 giống lúa đã tìm thấy 3 SNPs. Tất cả các SNP đều là đột biến sai nghĩa, trong đó có 1 SNP ở vị trí nucleotide 382 làm thay đổi amino axit Aspartate thành Asparagine ở vị trí 128 trên giống lúa chuẩn miễn cảm với mặn, 1 SNP ở vị trí nucleotide 551 làm thay đổi amino axit Arginine thành Histidine ở vị trí 184 trên giống lúa chuẩn chống chịu và 1 SNP ở vị trí nucleotide 418 làm thay đổi amino axit thứ 140 từ Proline thành Alanine trên cả 2 giống lúa chuẩn chống chịu và chuẩn miễn cảm. Điều này cho thấy 2 SNPs ở vị trí 382 và 551 có thể liên quan đến tính chống chịu mặn ở các giống lúa.

4.2. Đề nghị

Tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của sự thay thế các amino axit D128N và R184H đến cấu trúc không gian 3 chiều của protein High-affinity K⁺ transporter 1;5 và chức năng sinh học của chúng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Tài nguyên và Môi trường (2021). *Kịch bản biến đổi khí hậu* (cập nhật năm 2020). Nxb Tài nguyên - Môi trường và Bản đồ Việt Nam.
2. Lê Xuân Hiền (2019). Đánh giá trình trạng xâm nhập mặn trên các sông chính tỉnh Kiên Giang. Luận văn Thạc sĩ chuyên ngành Thủy văn học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.
3. Lê Thanh Phong (2019). Cây lúa mùa, bài toán nông nghiệp đồng bằng sông Cửu Long, <https://thesaigontimes.vn/cay-lua-mua-bai-toan-nong-nghiep-dbscl/>, truy cập 12/11/2021.
4. Hồ Thanh Bình (2020). *Chất lượng và phát triển sản phẩm giá trị gia tăng từ gạo lúa mùa nổi* (*Oryza sativa* sp). Nxb Đại học Cần Thơ.

5. Lutts S., Kinet J. M. and Bouharmont J. (1995). Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany*, vol 46 (12), pp. 1843 - 1852.
6. Thomson, M. J., de Ocampo, M., Egdane, J. et al (2010). Characterizing the *Salto*/Quantitative Trait Locus for Salinity Tolerance in Rice. *Rice* 3, 148 - 160. <https://doi.org/10.1007/s12284-010-9053-8>
7. Almeida P., Katschnig D. and Boer A. H. (2013). HKT Transporters-State of the Art. *International Journal of Molecular Sciences*, vol 14, pp. 20359 - 20385.
8. Zhong-Hai Ren, Ji-Ping Gao, Le-Gong Li, Xiu-Ling Cai, Wei Huang, Dai-Yin Chao, Mei-Zhen Zhu, Zong-Yang Wang, Sheng Luan and Hong-Xuan Lin (2005). A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature Genetics*, vol 37 (10), pp. 1141 - 1146.
9. La Hoàng Trúc Ngân (2019). Ứng dụng kỹ thuật phân tử trong đánh giá tính chống chịu mặn trên một số giống lúa mùa. Luận văn Thạc sĩ chuyên ngành Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
10. IRRI (1997). Screening rice for salinity tolerance. IRRI Discussion paper series, 22-30.
11. IRRI [International Rice Research Institute] (2021). Phenotyping protocols for abiotic stress tolerance in rice. International Rice Research Institute. Los Baños, Philippines. <https://books.google.co.uk/books?id=dwMIEAAAQBAJ>.
12. Roger, S. O. and Bendich A. J. B. (1988). Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers, 6, 1 - 10.
13. Nguyen Thi Pha, Nguyen Thi Phung, Nguyen Thi Ngoc Truc, Do Tan Khang and Tran Dinh Gioi (2019). Investigation of polymorphisms of exon 1 region of *OsHKT1;5* gene in high yielding rice. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, vol 11 (1), pp. 1 - 5.
14. Ward Jr., J. H. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, vol 58, pp. 236 - 244.

15. Trần Xuân An (2018). Phân tích tính đa hình và mức độ biểu hiện của gen *OsHKT1;5* liên quan đến khả năng chịu mặn ở cây lúa (*Oryza sativa*). Luận văn Thạc sĩ chuyên ngành Di truyền học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

16. Văn Quốc Giang, Trần In Đô, Nguyễn Văn Mạnh, Nguyễn Thành Tâm, Huỳnh Như Điền, Lê Thị Hồng Thanh và Huỳnh Kỳ (2021). Đa dạng di truyền của họ gene *OsHKT* ở 41 giống lúa địa phương đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, tập 57, số (6B), trang 224 - 230.

POLYMORPHIC ANALYSIS OF THE EXON 1 REGION OF *OsHKT1;5* GENE IN KIEN GIANG SEASONAL RICE SALT TOLERANCE

Nguyen Thi Pha¹, Tran Hoang Thanh¹, Tran Thi Thuy Duong¹

Nguyen Huu Minh², Tran Dinh Gioi²

¹ *Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University*

² *Cuu Long Delta Rice Research Institute*

Summary

The increasing risk of saltwater intrusion due to climate change is a serious threat to rice production in the Mekong Delta. In order to address this issue, a study was conducted to evaluate the salt tolerance of 16 local seasonal rice varieties collected from Kien Giang province. These varieties were compared to the well-known salt-tolerant varieties Pokkali and RC222. The aim was to identify rice varieties with varying levels of salt tolerance. In addition, the study also analyzed the exon 1 region of the *OsHKT1;5* gene in these varieties using sequencing techniques. The results of the phenotypic evaluation revealed that 7 of the rice varieties showed different levels of salt tolerance. These included Lua Chuoi, FL478, and Pokkali (which showed good tolerance), as well as Nang Trich, Trang Tep, Ba Bui, and Mot Bui (which showed intermediate salt tolerance). However, RC222 was found to be sensitive to salinity. Further analysis of the exon 1 region of the *OsHKT1;5* gene identified 3 SNP markers at G382A, C418G, and G551A nucleotide positions. These markers were found to be non-synonymous mutations, resulting in changes in the amino acids D128N, P140A, and R184H, respectively.

Keywords: *OsHKT1;5 gene, salt tolerance, seasonal rice, SNP.*

Người phản biện: PGS.TS. Phạm Bích Ngọc

Ngày nhận bài: 11/5/2023

Ngày thông qua phản biện: 8/6/2023

Ngày duyệt đăng: 22/02/2024