

Ruiz-Carrasco K., Antognoni F., Coulibaly A.K., Lizardi S., Covarrubias A. Martínez E.A., MolinaMontenegro M.A., Biondi S., Zurita-Silva A., 2011. Variation in salinity tolerance of four lowland genotypes of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as assessed by growth, physiological traits, and sodium

transporter gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 1333-1341.

Szabados, L., and Savouré, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Science*, 15: 89-97

## Salt tolerant ability of quinoa varieties (*Chenopodium quinoa*) under nethouse condition

Truong Vinh Hai, Nguyen Binh Duy, Cao Thi Hai Yen, Tran Kim Ngoc, Tran Phuong Ly, Tran Tuan Anh, Nguyen Tien Hai, Nguyen Van Manh, Phan Duc Duy Nha, Nguyen Van An

### Abstract

The study aimed to evaluate the adaptability of 5 quinoa varieties including: 2-Want, Isluga, Titicaca, 42-Test and Atlas at different concentrations of NaCl solution (0; 2; 4; 6 g/L). The two-factor experiment was arranged in a randomized complete block design (RCBD) with 4 replications in a covered nethouse. The results showed that salt concentration of 6 g/L significantly reduced the number of panicles, 1000-grain weight and grain yield of most quinoa varieties. Among the 5 studied quinoa varieties, the Titicaca variety showed superiority over other varieties in both 1000-grain weight and grain yield. The 1000-grain weight of Titicaca variety varied from 2.145 - 1.878 g, while other varieties had grain weight from 1.655 - 1.160 g. The grain yield of Titicaca reached the highest, between 6.56 - 4.08 g/plant when salt concentration increased from 0 g/L to 6 g/L. The proline content in leaves of most quinoa varieties was significantly reduced at the salinity of 6 g/L. This study demonstrates that salt concentration and varietal nature are important factors determining the salt tolerance of quinoa varieties.

**Keywords:** Quinoa, salinity, salt tolerance, evaluation

Ngày nhận bài: 30/7/2023

Ngày phản biện: 05/8/2023

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Lộc

Ngày duyệt đăng: 28/8/2023

## PHÁT HIỆN CÁC ĐA HÌNH NUCLEOTIT ĐƠN (SNPs) TRÊN GEN WAXY Ở DÒNG LÚA ĐỘT BIẾN IONBEAM

Nguyễn Thị Hồng<sup>1</sup>, Võ Thị Minh Tuyền<sup>1</sup>, Lê Đức Thảo<sup>1</sup>, Phạm Xuân Hội<sup>1</sup>, Lê Huy Hàm<sup>1</sup>, Yoshikazu Tanaka<sup>2</sup>

### TÓM TẮT

Gen *Waxy* (BGIOGA022241) của giống lúa gốc và dòng đột biến của nó (từ chiếu xạ ionbeam liều 60Gy) được giải trình tự bằng phương pháp Sanger, sau đó sử dụng công cụ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) để so sánh. Kết quả BLAST phát hiện 4 SNPs trên tổng số 1.812 nucleotit mã hóa và 59 SNPs trên tổng số 1.675 nucleotit không mã hoá. Bốn SNPs trên vùng mã hoá bao gồm: SNPs xoá T/- tại vị trí 34 trên vùng mã hoá 3; SNPs chèn -/T giữa vị trí 70 và 71 trên vùng mã hoá 3; SNPs thay thế C/T ở vị trí 14 trên vùng mã hoá 4 và SNPs thay thế T/C tại vị trí 115 trên vùng mã hoá 9. Trong 59 SNPs trên vùng không mã hoá, quan trọng nhất là xoá nucleotit G/- tại vị trí đầu tiên của vùng không mã hoá 6 và chèn đoạn (-/GGGCCTGCGAAGAAC TGGGAGAATGTGCTCCT) vào điểm nối giữa vùng không mã hoá 12 và vùng mã hoá 13. Các SNPs này cung cấp cơ sở để thiết kế các chỉ thị phân tử hỗ trợ chọn lọc các dòng lúa đột biến có hàm lượng amylose khác nhau, phục vụ chọn giống lúa đột biến chất lượng.

**Từ khóa:** Gen *Waxy*, SNPs, lúa đột biến, chiếu xạ ionbeam

<sup>1</sup> Viện Di truyền Nông nghiệp

<sup>2</sup> Trung tâm Nghiên cứu Năng lượng Wakasa-wan, Fukui, Nhật Bản

\* Tác giả liên hệ, email: nguyenhongdhnn@gmail.com

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Gen *Waxy* là một gen quan trọng ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp tinh bột trong nội nhũ lúa và quy định hàm lượng amylose của lúa gạo (Larkin & Park, 2003; Masouleh *et al.*, 2012). Một số đa hình nucleotit đơn (SNPs) trên gen *Waxy* tạo nên các alen khác nhau, quy định sự khác biệt về hàm lượng amylose đã được nghiên cứu và công bố như: *Wxa*, *Wxin*, *Wxb*, *Wxop*, *wx* (Chen *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2010; Hirano & Sano, 1991; Mikami *et al.*, 2008), trong đó alen *Wxa*, *Wxop* xuất hiện ở loài phụ *indica* và *Wxin*, *Wxb*, *wx* xuất hiện ở loài phụ *japonica* (Sano, 1985; Ishiki *et al.*, 1998; Mikami *et al.*, 2008).

Nhiều nghiên cứu cho thấy các đột biến xuất hiện tại điểm nối giữa vùng mã hoá 1 và vùng không mã hoá 1 sẽ ảnh hưởng đến việc loại bỏ vùng không mã hoá 1 trong quá trình trưởng thành của ARN thông tin (mARN), sẽ ảnh hưởng đến hàm lượng amylose. Cụ thể, nhóm có hàm lượng amylose cao chỉ có mARN trưởng thành kích thước 2,3 kb (vùng không mã hoá 1 bị loại bỏ hoàn toàn); nhóm có hàm lượng amylose thấp (gạo nếp) chỉ có mARN kích thước 3,3 kb (vùng không mã hoá 1 không bị loại bỏ); nhóm có cả mARN 2,3 kb và 3,3 kb sẽ có hàm lượng amylose đa dạng (Wang *et al.*, 1995); các đột biến liên quan đến điểm cắt này được công bố gồm: mất 16 nucleotit (Chen *et al.*, 2008) và sự thay đổi nucleotit G thành T (Dobo *et al.*, 2010). Các SNPs T/G tại điểm cắt vùng không mã hoá 1, A/C trên vùng mã hoá 6 và C/T trên vùng mã hoá 10 cũng được cho là có ảnh hưởng lớn đến sự khác nhau về hàm lượng amylose giữa các giống (Naoko *et al.*, 2019). SNPs T/G tại điểm cắt vùng không mã hoá 1 cũng đã được ứng dụng để phân tích sự đa dạng hàm lượng amylose của 64 mẫu giống (Nguyễn Quốc Trung và *cs.*, 2021).

Ngoài ra, một số công bố cho thấy đa hình các nucleotit đơn (SNPs) ở gen *Waxy* rất phong phú quy định nên sự đa dạng của hàm lượng amylose như: SNPs ở vùng mã hoá 6 (alen *wx*), phân tách các giống có hàm lượng amylose cao và trung bình (Mikami *et al.*, 2008); SNPs ở vùng mã hoá 4, liên kết với tính trạng hàm lượng amylose thấp, được xác định là alen *Wxop* (Ayres *et al.*, 1997); SNPs (C/T) trên vùng mã hoá 10 (Larkin & Park, 1999); SNPs (C/T) tại điểm 2777 ở vị trí ranh giới của vùng không mã hoá 7/vùng mã hoá 8 (Kharabian, 2010); SNPs (A/G) ở vị trí 497 tính từ mã khởi đầu

(Liu *et al.*, 2009); SNPs (G/T) ở vị trí 497 trên vùng mã hoá 4 và SNPs (T/C) ở vị trí 595 trên vùng mã hoá 5 (Sato *et al.*, 2002); SNPs (GC/TT) trên vùng không mã hoá 6, vùng mã hoá 7, vùng không mã hoá 7, vùng mã hoá 8 và một phần của của đầu 3' (Bao *et al.*, 2006); lặp lại trình tự đơn giản (CT)<sub>(n)</sub> và (AATT)<sub>(n)</sub> (Tang *et al.*, 1989).

Đa hình các nucleotit đơn ở gen *Waxy* đã công bố rất đa dạng và được tìm thấy trên các giống lúa bản địa hoặc giống lúa phát triển khác nhau. Trong bài báo này, nghiên cứu tập trung tìm hiểu sự đa hình của gen *Waxy* (BGIOGA022241) giữa giống gốc và kiểu đột biến của nó thuộc phân loài *Oryza Sativa indica*.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hai mẫu ADN tổng số của giống lúa gốc DT82 có hàm lượng amylose cao (28,3%) và dòng lúa đột biến D14 có hàm lượng amylose trung bình (20,1%) (thế hệ M6, được chọn lọc cải tiến từ giống DT82 thông qua chiếu xạ ionbeam liều 60Gy); cùng hóa chất thí nghiệm cần thiết khác.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phương pháp PCR

Gen quan tâm được khuếch đại theo thành phần như sau: Tổng thể tích phản ứng 20 µL bao gồm: 1 µL ADN tổng số (1 ng/µL); 10 µL PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase (Takara Bio); 0,5 µL mỗi xuôi (20 pmol/µL); 0,5 µL mỗi ngược (20 pmol/µL); 8 µL H<sub>2</sub>O. Chu trình phản ứng PCR: 98°C - 2 phút; 30 chu kỳ của: 98°C - 5 giây, 60°C - 5 giây, 72°C - 30 giây; 72°C - 5 phút; giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,5% đệm TAE 1X, sử dụng thang đo 1 kb (Takara Bio) và tinh sạch theo PCR product purification Kit- QIAGEN.

#### 2.2.2. Phương pháp giải trình tự

Giải trình tự theo phương pháp Sanger sử dụng BigDye Terminator Sequencing Standard Kit (ThermoFisher) và đọc kết quả bằng máy ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer.

#### 2.2.3. Phương pháp BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Ứng dụng để tìm kiếm, khai thác dữ liệu; so sánh, phát hiện sự sai khác giữa trình tự của dòng đột biến và dòng gốc.

### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 10 năm 2016 đến tháng 02 năm 2017 tại Trung tâm Nghiên cứu năng lượng Wakasa-wan, Fukui, Nhật Bản.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

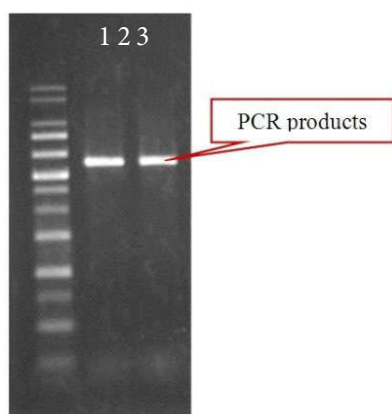
### 3.1. Nhân bản gen *Waxy*

Gen *Waxy* nằm trên nhiễm sắc thể số 6 (từ 1.931.535 đến 1.935.014), chiều dài đầy đủ 3.479 bp bao gồm 13 vùng mã hoá và 12 vùng không mã hoá (gramene.org). Dựa trên dữ liệu về gen *Waxy*, tám cặp mồi được thiết kế để khuếch đại và giải trình tự (Bảng 1). Các mồi có chiều dài từ 24 - 25 nucleotide; hàm lượng GC từ 37,5% đến 56%, nhiệt độ gắn mồi từ 52,9°C đến 63,5°C.

Bảng 1. Thông tin mồi thiết kế phục vụ nghiên cứu gen *Waxy*

TT	Tên	Trình tự (5'-3')	Chiều dài (nu)	Thành phần GC (%)	Tm (°C)
1	Wx-1F	ACAGCAACAGCTAGACAACCACCAT	25	48	61,8
	Wx-1R	CTAATCGATCTTGTGATGATCTGA	24	37,5	52,9
2	Wx-2F	TGTGGTGAATTCATTGCAGATCAA	25	40	58,8
	Wx-2R	CATCATGGATTCCCTTCGAAGAAAGT	25	40	56,3
3	Wx-3F	TGACAACAGGTGAGGATGTTGTGTT	25	44	59,6
	Wx-3R	ACGATGGACAGTAGTGCAGGGTTGT	25	52	63,5
4	Wx-4F	CATCGACGGGTATGAGTAAGATTCT	25	44	57,2
	Wx-4R	TTCGCCTCGATGCCTGAAATTTGT	25	44	61,2
5	Wx-5F	AAGTACGACGCAACCACGGTAAGAA	25	48	61,9
	Wx-5R	GTGGACTAGACGATCTGGGTTCAAA	25	48	60,1
6	Wx-6F	TTAGCCGGAAGACCTCTGAGCATTT	25	48	61,9
	Wx-6R	GTAGTGTACCGACTTATCGGTATTA	25	40	54,5
7	Wx-7F	GTCTCAGCGTCGACGTAAGCCTATA	25	52	61,9
	Wx-7R	CCAGTTCTTTCGAGGCCCTGAAAT	25	56	65,8
8	Wx-8F	GAACAAGACGAACGGTCAAACATGT	25	44	59,2
	Wx-8R	CATATGTAGATCTCAGGCTCTTCAA	25	40	55,0

Toàn bộ chiều dài của gen *Waxy* được khuếch đại bằng đoạn mồi xuôi Wx-1F và đoạn mồi ngược Wx-8R. Đoạn mồi Wx-1F được thiết kế tại ranh giới của 5'-UTR/vùng mã hóa 1 và đoạn mồi Wx-8R được thiết kế tại ranh giới của vùng mã hóa 13/3'-UTR.



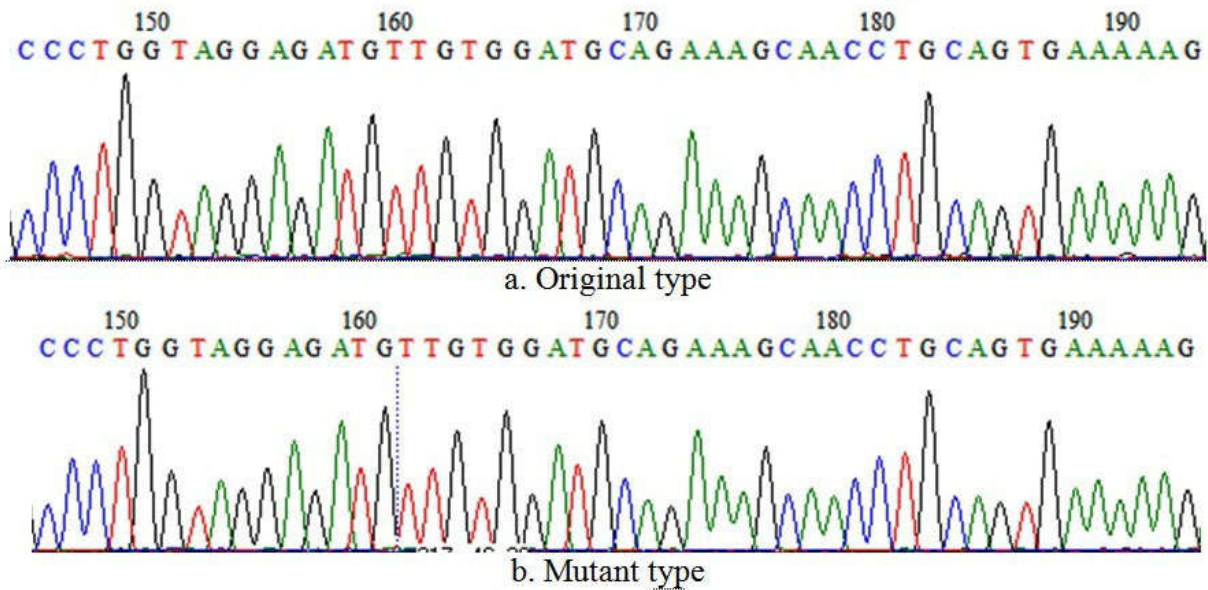
Hình 1. Sản phẩm PCR khuếch đại gen *Waxy* trên agarose gel 1,5%

Ghi chú: 1: Thang chuẩn 1 kb; 2: sản phẩm PCR giống gốc; 3: sản phẩm PCR dòng đột biến.

Sản phẩm PCR được khuếch đại bởi Wx-1F và Wx-8R chỉ xuất hiện một băng vạch đậm và rõ nét ở kích thước giữa 3 kb đến 4 kb (Hình. 2), điều đó chứng tỏ đoạn mồi Wx-1F và Wx-8R đặc hiệu và đã khuếch đại chính xác gen *Waxy*; sản phẩm PCR đạt tiêu chuẩn cho giải trình tự.

### 3.2. Giải trình tự và phát hiện SNPs trên gen *Waxy*

Gen *Waxy* được giải trình tự bằng Kit Thermofisher's BigDye Terminator Sequencing Standard trên thiết bị ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer. Phương pháp này thường cho kết quả đọc rõ ràng với đoạn có độ dài khoảng 500 bp trở xuống. Chính vì vậy, tám cặp mồi (Bảng 1) đơn xen được thiết kế, bao phủ trên toàn bộ chiều dài của gen *Waxy* nhằm thu được kết quả đầy đủ và đáng tin cậy (trung bình một cặp mồi sẽ phụ trách đọc trình tự cho đoạn khoảng 400 bp). Kết quả toàn bộ trình tự gen *Waxy* đã được đọc rõ ràng, kết quả đọc đạt chất lượng tốt khi không xuất hiện ký tự N (tức Miss calling - đọc nhầm); các đỉnh cao và cách đều nhau; độ nhiễu gần như bằng không (Hình 2).



**Hình 2.** Kết quả giải trình tự gen *Waxy* bằng máy Wx-3R

Ghi chú: a. trình tự trên giống gốc; b. trình tự trên dòng đột biến.

Trình tự 13 vùng mã hóa và 12 vùng không mã hóa gen *Waxy* của giống gốc và dòng đột biến được so sánh thông qua BLAST. Kết quả so sánh các

trình tự trên vùng mã hoá được thể hiện ở hình 3, 4, 5 và bảng 2; và trên các trình tự không mã hóa trong hình 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 và bảng 3.

```

Query 1 ATCAAGGTTGCAGACAGGTACGAGAGGGTGAGG-TTTTTCCATTGCTACAAGCGTGGAGT 59
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1 ATCAAGGTTGCAGACAGGTACGAGAGGGTGAGGTTTTTTCCATTGCTACAAGCGTGGAGT 60

Query 60 CGACCGTGTGTTTCATCGACCATCCGTCATTCCTGGAGAAG 100
      ||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 61 CGACCGTGTG-TTCATCGACCATCCGTCATTCCTGGAGAAG 100
    
```

**Hình 3.** Phát hiện SNPs trên vùng mã hoá 3  
Ghi chú: Xóa T/- vị trí 34 và chèn -/T tại vị trí 70/71.

```

Query 1 GTTTGGGGAAAGA TCGGAGAGAAGATCTACGGACCTGACACTGGAGTTGATTACAAAGAC 60
      ||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1 GTTTGGGGAAAGACCGGAGAGAAGATCTACGGACCTGACACTGGAGTTGATTACAAAGAC 60

Query 61 AACCAGATGCGTTTCAGCCTTCTTTGCCAG 90
      ||||||||||| |||||||||||||||||||
Sbjct 61 AACCAGATGCGTTTCAGCCTTCTTTGCCAG 90
    
```

**Hình 4.** Phát hiện SNPs trên vùng mã hoá 4 (thay T/C tại vị trí 14)

```

Query 1 GCAATCGAGGCGAAGGCGCTGAACAAGGAGGCGTTGCAGGCGGAGGCGGGTCTTCCGGTC 60
      |||
Sbjct 1 GCAATCGAGGCGAAGGCGCTGAACAAGGAGGCGTTGCAGGCGGAGGCGGGTCTTCCGGTC 60

Query 61 GACAGGAAAATCCCACTGATCGCGTTTCATCGGCAGGCTGGAGGAACAGAAGGGCCTGAC 120
      |||
Sbjct 61 GACAGGAAAATCCCACTGATCGCGTTTCATCGGCAGGCTGGAGGAACAGAAGGGCTCTGAC 120

Query 121 GTCATGGCCGCCGCCATCCCGGAGCTCATGCAGGAGGACGTCCAGATCGTTCTTCTG 177
      |||
Sbjct 121 GTCATGGCCGCCGCCATCCCGGAGCTCATGCAGGAGGACGTCCAGATCGTTCTTCTG 177
    
```

**Hình 5.** Phát hiện SNPs trên vùng mã hoá 9

Ghi chú: Thay T/C tại vị trí 114.

**Bảng 2.** Kết quả phân tích BLAST vùng mã hoá của gen *Waxy*

Vùng	Số lượng nucleotit	Tỷ lệ giống nhau (%)	Tỷ lệ khác nhau (%)	Ghi chú
Vùng mã hoá 1	339	339 (100%)	0 (0%)	-
Vùng mã hoá 2	81	81 (100%)	0 (0%)	-
Vùng mã hoá 3	101	99 (98%)	2 (2%)	34 (T/-); 70-71 (-/T)
Vùng mã hoá 4	90	89 (99%)	1 (1%)	14 (C/T)
Vùng mã hoá 5	64	64 (100%)	0 (0%)	-
Vùng mã hoá 6	101	101 (100%)	0 (0%)	-
Vùng mã hoá 7	122	122 (100%)	0 (0%)	-
Vùng mã hoá 8	244	244 (100%)	0 (0%)	-
Vùng mã hoá 9	177	176 (99%)	1 (1%)	115 (T/C)
Vùng mã hoá 10	192	192 (100%)	0 (0%)	-
Vùng mã hoá 11	87	87 (100%)	0 (0%)	-
Vùng mã hoá 12	129	129 (100%)	0 (0%)	-
Vùng mã hoá 13	85	85 (100%)	0 (0%)	-
Tổng	1812	1808 (99,8%)	4 (0,2%)	

Bảng 2 cho thấy, trong tổng số 1812 trình tự vùng mã hóa được so sánh, có 1808 trình tự tương đồng chiếm 99,8% và 4 trình tự sai khác (tức các SNPs) chiếm 0,2%. Bốn SNPs đó bao gồm: xóa nucleotit T

(T/-) tại điểm 34 và chèn T (-/T) vào giữa các điểm 70 và 71 trên vùng mã hoá 3 (Hình 3); sự thay thế (C/T) ở vị trí 14 trên vùng mã hoá 4 (Hình 4) và sự thay thế T/C ở vị trí 115 trên vùng mã hoá 9 (Hình 5).

```

Query 1 GTGGAGTCATCATTAGTTTACctttttt-g-ctttttACTGAATTATTAACAGTGCATTTA 58
      |||
Sbjct 1 GTGGAGTCATCATTAGTTTACCTTTTTTGTCTTTTACTGAATTATTAACAGTGCATTTA 60

Query 59 GCAGTTGGACTGAGCTTAGCTTCCACTGGTGATTTTCAG 96
      |||
Sbjct 61 GCAGTTGGACTGAGCTTAGCTTCCACTGGTGATTTTCAG 98
    
```

**Hình 6.** Phát hiện SNPs trên vùng không mã hoá 3

Ghi chú: Xóa T/- tại vị trí 29 và 31.

```

Query 1  GTGAGTTACAATTGATCTCAAGATCTTATAACTTTCTTCGAAGGAATCCATGATGATCAG 60
          |||
Sbjct 1  GTGAGTTATAATTGATCTCAAGATCTTATAACTTTCTTCGAAGGAATCCATGATGATCAG 60

Query 61 ACTAATTCCTTCCGGTTTGTTACTGACAACAG 92
          |||
Sbjct 61 ACTAATTCCTTCCGGTTTGTTACTGACAACAG 92
    
```

**Hình 7.** Phát hiện SNPs trên vùng không mã hoá 5

Ghi chú: Thay thế T/C tại vị trí 9.

```

Query 1  GTCTATGCTTGTTCCTTGCCATACCAACTCAAATCTGCATGCACACTGCATT-CTGTT-CA 58
          |||
Sbjct 2  GTCTATGCTTGTTCCTTGCCATACCAACTCAAATCTGCATGCACACTGCATTTCTGTTTCA 61

Query 59 G-AACTGACTGTCTGAATCT 78
          |
Sbjct 62 GAAACTGACTGTCTGAATCT 82
    
```

**Hình 8.** Phát hiện SNPs trên vùng không mã hoá 6

Ghi chú: Xoá T/- tại vị trí 53 và 59; xoá A/- tại vị trí 63.

```

Query 1  GTAAGAACGAATGCATTCTTACAAGATGTGCAATCTGAATTTTCTTTGAAAAAGAAATT 60
          |||
Sbjct 1  GTAAGAACGAATGCATTCTTACAAGATATGCAATCTGAATTTTC-TTTGAAAAAGAAATT 59

Query 61 ATCATCTGTCACTTCTTGATTGATTCTGACAAGGCAAGAATGAGTGACAAATTTAG 117
          |||
Sbjct 60 ATCATCTGTCACTTCTTGATTGATTCTGACAAGGCAAGAATGAGTGACAAATTTAG 116
    
```

**Hình 9.** Phát hiện SNPs trên vùng không mã hoá 8

Ghi chú: Thay thế A/G tại vị trí 29; chèn -/T giữa vị trí 45/46.

```

Query 61  CAGTGGCaaaaaaaaaCTCGAATATTAGGGAAGGACCTAAATAATATCAAATAATTAGAA 120
          |||
Sbjct 61  CAGTGGCAAAAAAAAAACTCAAATATTAGGGAAGAACC-TTAATATCAAATAATTAGAA 117

Query 121 GGGGTGAGGCTTTGAACCCAGATCGCTAGTCCACCACCTTGTGGAGTTAGCCGGAAGAC 180
          |||
Sbjct 118 GGGGTGAGGCTTTGAACCCAGGTCACTAGCCCACCACCTTGTAGAGCTAGCCGGAAGAG 177

Query 181 CTCTGAGCATTCTCAAATTCAGTGGCAAATGATGTGTATAATTTTGATCCGTGTGTGTTT 240
          |||
Sbjct 178 CTCTGAGCATTCTCGAATTCAGTGGCAAATGATGTGTATAATTTTGATCCGTGTGTGTTT 237
    
```

**Hình 10.** Phát hiện SNPs trên vùng không mã hoá 9

Ghi chú: Thay thế A/G tại vị trí 81, 95, 142, 161; thay thế G/A tại vị trí 139, 193; thay thế C/T tại vị trí 148, 165; thay thế G/C tại vị trí 177; chèn -/TAA giữa vị trí 98/99).

```

Query 1   GTAAGCCTATACATTTACATAACAATCAGATATGACACATCCTAATACCGATAAGTCGGT 60
          |||
Sbjct 1   GTAAGCCTATACATTTACATAACAATCAGATATGACACATTTCTAATACCGATAAGTCAGT 60

Query 61  ACACTACTACACATTTACATGGTTGCTGGTTATATGGtttttttGGCAG 109
          |||
Sbjct 61  ACACTACTACACATTTACATGGTTGCTGGTTATATGGTTTTTTTGGCAG 109
    
```

**Hình 11.** Phát hiện SNPs trên vùng không mã hoá 11

Ghi chú: Thay thế T/C tại vị trí 41; thay thế A/G tại vị trí 58.

```

Query 61  TATTCAACGCCGTTGTCTTTTTTAAATATGTTTGACCAATTCGTCCTATTaaaaaaTTAA 120
          |||
Sbjct 61  TATTCAACGCCGTTGTCTTTTTTAAATATGTTTGACCGTTTCGTCCTATTAAAAAAATTA 120

Query 121 ATAATTATAAAATCTTTTCCTATCATTGATTCAATGTTAAATATACTTATATGTATACA 180
          |||
Sbjct 121 ATAATTATAAAATATTTTCCTATCATTGATTCAATGTTAAATATACTTATATGTATACA 180

Query 181 TATAGTTTTACATATTTTCATAAAAATTTTTGAACAAGACGAACGGTCAAACATGTGCTAA 240
          |||
Sbjct 181 TATAGTTTTACATATTTTCATAAAAATTTTTGAACAAGACGAACGGTCAAACATGTGCTAA 240
    
```

**Hình 12.** Phát hiện SNPs trên vùng không mã hoá 12

Ghi chú: Thay thế A/T tại vị trí 83; thay thế G/A tại vị trí 9; thay thế A/C tại vị trí 134; thay thế G/T tại vị trí 206

**Bảng 3.** Kết quả phân tích BLAST trên vùng không mã hoá của gen *Waxy*

Vùng	Số lượng nucleotit	Tỷ lệ giống nhau (%)	Tỷ lệ khác nhau (%)	Ghi chú
Vùng không mã hoá 1	113	113 (100%)	0 (0%)	-
Vùng không mã hoá 2	107	107 (100%)	0 (0%)	-
Vùng không mã hoá 3	98	96 (98%)	2 (2%)	29 (T/-); 31 (T/-)
Vùng không mã hoá 4	98	98 (100%)	0 (0%)	-
Vùng không mã hoá 5	92	91 (99%)	1 (%)	9 (T/C)
Vùng không mã hoá 6	82	78 (95%)	4 (5%)	53 (T/-); 59 (T/-); 63 (A/-)
Vùng không mã hoá 7	121	121 (100%)	0 (0%)	-
Vùng không mã hoá 8	117	115 (98%)	2 (2%)	29 (A/G); 45-46 (-/T)
Vùng không mã hoá 9	243	231 (95%)	12 (5%)	81 (A/G); 95 (A/G); 98-99 (-/TAA); 139 (G/A); 142 (A/G); 148 (C/T); 161 (A/G); 165 (C/T); 177 (G/C); 193 (G/A)
Vùng không mã hoá 10	106	106 (100%)	0 (0%)	-
Vùng không mã hoá 11	109	107 (98%)	2 (2%)	41 (T/C); 58 (A/G)
Vùng không mã hoá 12	357	352 (98,6%)	5 (1,4%)	83 (A/T); 98 (G/A); 134 (A/C); 206 (G/T); chèn đoạn tại điểm nối vùng không mã hóa 12/vùng mã hóa 13
<b>Tổng</b>	<b>1643</b>	<b>1616 (98,4%)</b>	<b>27 (1,6%)</b>	

Trong tổng số 1643 trình tự không mã hóa được so sánh, có 1616 trình tự tương đồng chiếm 98,4% và 27 điểm sai khác (SNPs) chiếm 1,6% (Bảng 3). Các SNPs này bao gồm: xóa (T/-) ở vị trí 29 và 31 trong vùng không mã hoá 3; sự thay đổi (T/C) ở vị trí 9 trong vùng không mã hoá 5; xóa (T/-) ở vị trí 53 và 59; xóa (A/-) ở vị trí 63 của vùng không mã hoá 6; thay đổi (A/G) ở vị trí 29 và chèn (-/T) giữa vị trí 45 và 46 trong vùng không mã hoá 8; thay thế (A/G) ở vị trí 81, 95, 142, 161, thay thế (G/A) ở vị trí 139 và 193, thay thế (C/T) ở vị trí 148 và 165; thay thế (G/C) ở vị trí 177 và chèn (-/TAA) giữa vị trí 98 và 99 trong vùng không mã hoá 9; thay thế (T/C) ở vị trí 41 và (A/G) ở vị trí 58 trong vùng không mã hoá 11; thay thế (A/T) ở vị trí 83, (G/A) ở vị trí 98, (A/C) ở vị trí 134, (G/T) ở vị trí 206 và chèn đoạn (-/GGGCCTGCGAAGAAGACTGGGA GAATGTGCTCCT) ở điểm nối vùng không mã hoá 12 và vùng mã hoá 13.

Nhiều báo cáo chỉ ra rằng, SNPs xuất hiện tại điểm nối giữa vùng mã hoá 1 và vùng không mã hoá 1 ảnh hưởng lớn tới sự đa dạng hàm lượng amylose của giống (Wang *et al.*, 1995; Cai *et al.*, 1998) và được coi là nguồn phổ biến và quan trọng quy định sự khác biệt rõ ràng về hàm lượng amylose; còn các SNPs trong vùng mã hoá, như trong nghiên cứu này, có ảnh hưởng ít đột phá hơn, nhưng lại cung cấp nguồn gen quy định sự đa dạng hàm lượng amylose giữa các giống (Tan & Zhang, 2001).

Các SNPs ghi nhận được ở vùng mã hoá là 0,2% thấp hơn rõ rệt so với các SNPs được ghi nhận trên vùng không mã hoá (1,6%). Điều này được giải thích rằng khả năng bảo toàn trình tự ở vùng không mã hoá nói chung là kém hơn so với vùng mã hoá và các trình tự đóng góp vào cấu trúc hoặc chức năng thường được bảo tồn tốt hơn (Johnson *et al.*, 2014).

Các axit amin cấu thành protein cho sự sống được mã hóa theo mã bộ ba, thêm vào đó cấu trúc của ADN là chuỗi kép nên về mặt lý thuyết mỗi ARN thông tin sẽ có ba khung dịch mã. Bốn SNPs được phát hiện trong các vùng mã hóa sẽ ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình dịch mã. SNPs C/T ở vị trí 14 trong vùng mã hoá 4 sẽ gây ra sự thay thế axit amin "T" ở giống gốc thành axit amin "I" ở giống đột biến; hoặc "P" ở giống gốc thành "S" ở giống đột biến. SNPs T/C ở vị trí 115 trong vùng mã hoá 9 sẽ dẫn đến sự thay thế các trình tự axit amin "XAXNKX" ở giống gốc thành trình tự axit amin

"KALNKE" ở giống đột biến; hoặc "XXXTRX" ở giống gốc thành "RR\*TRR" ở giống đột biến; hoặc "XXX" ở giống gốc thành "GAE" ở giống đột biến. SNPs xóa nucleotide T ở điểm 34 và chèn T vào điểm giữa 70 và 71 trên vùng mã hoá 3 sẽ tạo ra tác động đáng kể nhất đến trình tự axit amin, bắt đầu từ vị trí sai khác trở đi. Từ đó sẽ dẫn đến ba thay đổi bao gồm: từ trình tự "PLLQAWSRPCVHR PSVIPGE" ở giống gốc sẽ thành trình tự "HCYKRGVDRVFHRPSVIPGE" ở giống đột biến; hoặc "FHCYKRGVDRVFIDHPSFLEK" thành "SIATSVESTVCFIDHPSFLEK"; hoặc từ "SIATSVESTVCSSTIRHSWRA" thành "PLLQAWSRPCVSSTIRHSWRA" (\* nghĩa là không có dịch mã).

Trong số các SNPs được xác định ở vùng không mã hóa, hai loại SNPs có tần suất cao hơn các loại khác là xóa (T/-) (với 5 ghi nhận) và thay thế (A/G) (với 6 ghi nhận). Các SNPs ở điểm nối giữa vùng không mã hoá và vùng mã hoá như xóa G/- ở đầu vùng không mã hoá 6, và chèn 32 nucleotit vào cuối vùng không mã hoá 12 được coi là nguồn phổ biến và quan trọng, tạo nên sự đa dạng hàm lượng amylose, vì những thay đổi này có thể gây ra lỗi cắt bỏ vùng không mã hoá trong quá trình trưởng thành của ARN thông tin. Tuy nhiên, để có thể làm rõ ảnh hưởng cụ thể của các SNPs được phát hiện trong nghiên cứu này đến sự thay đổi hàm lượng amylose, sẽ còn cần thêm nhiều nghiên cứu về sau.

## IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1. Kết luận

Trên vùng mã hoá ghi nhận 4 SNPs (chiếm 0,2%) bao gồm: xóa T/- tại vị trí 34 trên vùng mã hoá 3; chèn -/T giữa vị trí 70 và 71 trên vùng mã hoá 3; thay thế C/T ở vị trí 14 trên vùng mã hoá 4 và thay thế T/C tại vị trí 115 trên vùng mã hoá 9.

Trên vùng không mã hoá ghi nhận 27 SNPs (chiếm 1,6%), trong đó quan trọng nhất bao gồm: xóa G/- tại vị trí đầu tiên của vùng không mã hoá 6 và chèn đoạn -/GGGCCTGCGAAGAAGACTGGGAGA ATGTGCTCCT vào điểm nối giữa vùng không mã hoá 12 và vùng mã hoá 13.

### 4.2. Đề nghị

Dựa trên các SNPs xác định được, phát triển chỉ thị ADN nhằm khảo sát đa hình gen *Waxy* trong quần thể dòng lúa đột biến tạo ra từ chiếu xạ ionbeam.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Quốc Trung, Lưu Thị Vân, Nguyễn Chính Việt, Tống Văn Hải**, 2021. Ảnh hưởng của đột biến điểm G/T tại đầu 5' Intron 1 gen *Waxy* đến hàm lượng amylose và độ bền gel ở một số mẫu giống lúa Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 19(3): 339-346.
- Ayres N.M., A.M. Mc Clung, P.D. Larkin, H.F.J. Bligh, C.A. Jones, W.D. Park**, 1997. Microsatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylase classes in an extended pedigree of US rice germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 773-781.
- Bao J.S., Corke H., Sun M.**, 2006. Nucleotide diversity in *starch synthase IIa* and validation of single nucleotide polymorphisms in relation to starch gelatinization temperature and other physicochemical properties in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 113: 1171-1183
- Cai X.L., Z.Y. Wang, Y.Y. Xing, J.L. Zhang, M. M. Hong**, 1998. Aberrant splicing of intron 1 leads to the heterogeneous 5' UTR and decreased expression of *Waxy* gene in rice cultivars of intermediate amylose content. *The Plant Journal*, 14 (4): 459-465.
- Chen M.H., C.J. Bergman, S.R.M. Pinson, R.G. Fjellstrom**, 2008. *Waxy* gene haplotypes: Associations with apparent amylose content and the effect by the environment in an international rice germplasm collection. *Journal of Cereal Science*, 47 (3): 536-545.
- Cheng Z.Q., Liu Y.P., Chen R., Peng B., Xiong H.B., Zhang C., Zhong Q.F. and Huang X.Q.**, 2010. Diversity of *Waxy* gene alleles in the wild rice species of the *Oryza* genus. *Botanical Studies*, 51: 403-411.
- Dobo M., N. Ayres, G. Walker, W.D. Park**, 2010. Polymorphism in the GBSS gene affects amylose content in US and European rice germplasm. *Journal Cereal Science*, 52 (3): 450-456.
- Hirano H.Y., Y. Sano**, 1991. Molecular Characterization of the *Waxy* Locus of Rice (*Oryza sativa*). *Plant and Cell Physiology*, 32 (7): 989-997.
- Johnson P., Lipovich L., Grandér D., Morris K.V.**, 2014. Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840 (3):1063-71, DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.10.035. Epub 2013 Oct 27.
- Kharabian A.**, 2010. An efficient computational method for screening functional SNPs in plants. *Journal of Theoretical Biology*, 265: 55-62.
- Larkin P.D. and W.D. Park**, 1999. Transcript accumulation and utilization of alternate and non-consensus splice sites in rice granule-bound starch synthase are temperature-sensitive and controlled by a single-nucleotide polymorphism. *Plant Molecular Biology*, 40 (4): 719-727.
- Larkin P.D. and W.D. Park**, 2003. Association of *Waxy* gene single nucleotide polymorphisms with starch characteristics in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding*, 12 (4): 335-339.
- Liu L., X. Ma, S. Liu, C. Zhu, L. Jiang, Y. Wang, Y. Shen, Y. Ren, H. Dong, L. Chen, X. Liu, Z. Zhao, H. Zhai, J. Wan**, 2009. Identification and characterization of a novel *Waxy* allele from Yunnan rice landrace. *Plant Molecular Biology*, 71: 609-626.
- Mikami I., N. Uwatoko, Y. Ikeda, J. Yamaguchi, H. Y. Hirano, Y. Suzuki and Y. Sano**, 2008. Allelic diversification at the *Wx* locus in landraces of Asian rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 116 (7): 979-89. doi: 10.1007/s00122-008-0729-z. Epub 2008 Feb 28. PMID: 18305920.
- Naoko Crofts, Ayaka Itoh, Misato Abe, Satoko Miura, Naoko F. Oitome, Jinsong Bao and Naoko Fujita**, 2019. Three major nucleotide polymorphisms in the *Waxy* gene correlated with the amounts of extra-long chains of amylopectin in rice cultivars with S or L-type amylopectin. *Journal Applied Glycoscience*, 66(1): 37-46.
- Sano Y.**, 1985. Differential regulation of *Waxy* gene expression in rice endosperm. *Theoretical and Applied Genetics*, 68 (5): 467-473.
- Sato H., Suzuki Y., Sakai M., Imbe T.**, 2002. Molecular characterization of *Wx-mq*, a novel mutant gene for low-amylose content in endosperm of rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Science*, 52: 131-135.
- Tan Y.F. and Zhang Q.F.**, 2001. Correlation of simple sequence repeat (SSR) variants in the leader sequence of the *Waxy* gene with amylose of the grain in rice. *Acta Botanica Sinica*, 43: 146-150.
- Tang S.X., Khush G.S. and Juliano B.O.**, 1989. Variation and correlation of four cooking and eating quality indices of rices. *Philippine Journal of Crop Science*, 14: 45-49.
- Wang Z.Y., Zheng F.Q., Shen Q.Z., Gao J.P., Snustad D.P., Li M.G., Zhang Z.L., Hong M.M.**, 1995. The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the *Waxy* gene. *The Plant Journal*, 7 (4): 613-622.

## Identification of SNPs in the *Waxy* gene in an ionbeam mutant rice line

Nguyen Thi Hong, Vo Thi Minh Tuyen, Le Duc Thao,  
Pham Xuan Hoi, Le Huy Ham, Yoshikazu Tanaka

### Abstract

The *Waxy* gene (BGIOGA022241) of the original rice variety and its mutant line (ionbeam irradiation 60 Gy) were sequenced by the Sanger method and compared through the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) to clarify SNPs. The result of the BLAST showed 4 SNPs per 1812 coding nucleotides and 27 SNPs per 1643 non-coding nucleotides. Four SNPs in coding regions were listed: deletion T/- at position 34 and the insertion -/T between positions 70 and 71 in exon 3; change C/T at position 14 in exon 4 and change T/C at position 115 in exon 9. Among the 59 SNPs on non-coding sequences of mutant type, the most importance is deletion of nucleotide G/- at the first position of non-coding intron 6 and the insertion of (-/GGGCCTGCGAAGAACTGGGAGAATGTGCTCCT) between intron 12 and exon 13. These SNPs provide the basis for designing molecular markers to assist the selection of mutant rice lines with different amylose content and mutation breeding of high quality rice varieties.

**Keywords:** *Waxy* gene, SNPs, rice mutation, ionbeam irradiation

Ngày nhận bài: 14/6/2023

Ngày phản biện: 22/6/2023

Người phản biện: TS. Trần Đình Giới

Ngày duyệt đăng: 28/8/2023

## NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH CỦA TINH DẦU KINH GIỚI (*Elsholtzia ciliata*) TRỒNG TẠI HUYỆN LÂM THAO, TỈNH PHÚ THỌ

Hoàng Thị Kim Vân<sup>1</sup>, Lương Việt Cường<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Kim Dung<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Thanh Huyền<sup>1</sup>, Đỗ Hữu Nghị<sup>2</sup>, Đinh Thị Thu Thủy<sup>2</sup>, Lê Thị Thu Trang<sup>3</sup>

### TÓM TẮT

Tinh dầu kinh giới được chiết xuất từ lá cây kinh giới trồng tại huyện Lâm Thao, tỉnh Phú Thọ bằng phương pháp chưng cất hơi nước và được kiểm tra bằng phương pháp GC/MS. Kết quả cho thấy thành phần hóa học của tinh dầu gồm 32 hợp chất, chiếm đến 99,10% thành phần chất bay hơi, các thành phần chính gồm có (E)- $\beta$ -Ocimene (27,24%), Geranial (13,04%), Neral (10,11%), Limonene (9,41%), (Z)- $\beta$ -farnesene (9,89%), (E)- $\beta$ -Caryophyllene (7,07%) và 1-Octen-3-ol (4,55%). Tinh dầu kinh giới trồng tại huyện Lâm Thao, tỉnh Phú Thọ có hoạt tính ức chế chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*, với giá trị MIC là 250  $\mu$ g/mL.

**Từ khóa:** Kinh giới, tinh dầu, thành phần hoá học, hoạt tính kháng khuẩn

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kinh giới có tên khoa học là (*Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyland.) thuộc chi Kinh giới (*Elsoltzia*), họ Bạc hà hay Hoa môi (Lamiaceae) (Lã Đình Mối, 2002), là một loại rau thơm phổ biến ở Việt Nam, có vị cay, mùi thơm, tính ấm. Trong Y học

cổ truyền, kinh giới được sử dụng như một loại thuốc phòng và chữa bệnh (Đỗ Tất Lợi, 2011; Đỗ Huy Bích và cs., 2006). Trong rau kinh giới có chứa hợp chất thymol và carvacrol có khả năng tiêu diệt vi khuẩn cúm. Vì thế đây là loại thực phẩm giúp hỗ trợ điều trị hiệu quả các triệu chứng cúm như sốt,

<sup>1</sup> Trường Đại học Công nghiệp Việt Trì

<sup>2</sup> Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup> Học viên Cao học, Trường Đại học Công nghiệp Việt Trì, Phú Thọ

\* Tác giả liên hệ, email: hoangvan8868@gmail.com