

PHÁT HIỆN MỘT SỐ ĐỘT BIẾN TRÊN GEN WAXY (BGIOSGA022241) Ở DÒNG LÚA ĐỘT BIẾN

Nguyễn Thị Hồng^{a,*}, Yoshikazu Tanaka^b, Võ Thị Minh Tuyền^a, Lê Huy Hàm^a
^a Viện Di truyền Nông nghiệp, đường Phạm Văn Đồng, Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam
^b Trung tâm Nghiên cứu Năng lượng Wakasa-wan, Fukui, Nhật Bản
*Email: nguyenhongdhnn@gmail.com

Tóm tắt: Gen *Waxy* của giống gốc và dòng lúa đột biến được giải trình tự bằng phương pháp Sanger, sau đó sử dụng công cụ BLASTN (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) để so sánh và phát hiện đột biến. Kết quả tìm thấy 4 đột biến trên vùng mã hóa và 59 đột biến trên vùng không mã hóa. Bốn đột biến trên vùng mã hóa bao gồm: xóa T/- tại vị trí 34 trên vùng exon 3; chèn -T giữa vị trí 70 và 71 trên vùng exon 3; thay thế C/T ở vị trí 14 trên vùng exon 4; thay thế T/C tại vị trí 115 trên vùng exon 9. Trong tổng số 59 nucleotit đột biến thuộc vùng không mã hóa đáng chú ý nhất là: xóa G/- tại vị trí đầu tiên của intron 6 và thêm 32 trình tự “GGGCCTGCGAAGAAGAACTGGGAGAATGTGCTCCT” ở cuối của intron 12. Để đánh giá và thử nghiệm bước đầu, một chi thị ADN mới đã được phát triển dựa trên đột biến thay thế C/T ở vị trí 14 của exon 4 và T/C ở vị trí 115 của exon 9 với mục tiêu nâng cao hiệu quả của chọn giống đột biến liên quan đến hàm lượng amylose.

Từ khóa: Gen *Waxy*, BGIOSGA022241, hàm lượng amylose, BLASTN, phát triển chi thị ADN

I. MỞ ĐẦU

Lúa gạo là thực phẩm quan trọng cung cấp dinh dưỡng cho phần lớn dân số trên thế giới và nhu cầu ngày một tăng trên thị trường toàn cầu [1]. Chất lượng gạo chủ yếu được đánh giá thông qua thành phần của nội nhũ hạt mà quan trọng nhất là hàm lượng amylose [2], trong đó hàm lượng amylose thấp là mong muốn của các nhà chọn giống [3]. Có bảy gen liên quan đến việc tổng hợp nên các chất của nội nhũ hạt [4], trong đó gen *Waxy* giữ vai trò chủ đạo [2,5].

Một số SNP và đột biến trên gen *Waxy* liên quan đến sự khác biệt về hàm lượng amylose đã được nghiên cứu và công bố. Một số alen của gen *Waxy* đã được liệt kê như *Wxa*, *Wxin*, *Wxb*, *Wxop* và *wx* [6, 7, 8, 9]. Alleles *Wxa* và *Wxop* được xác định trên phân loài Indica trong khi alen *Wxin*, *Wxb* và *wx* xuất hiện trong phân loài Japonica [9, 10, 11]. Mikami [9] tìm thấy một số SNPs liên quan gen *Waxy* như SNP trên vùng exon 6 (quy định hàm lượng amylose cao và trung bình); và SNP trên vùng exon 4 (quy định hàm lượng amylose thấp). Một số tác giả khác cũng tìm và mô tả cụ thể hơn về các SNP có ảnh hưởng đáng kể tới hàm lượng amylose đó là SNP trên exon 6 (A / C) và SNP trên exon 10 (C / T) [15, 16, 17, 18]. Ngoài ra, một số SNPs liên quan đến gen *Waxy* cũng đã được nhắc tới như SNP (C / T) tại điểm 2777 ở vị trí nối của intron 7 / exon 8 [19]; SNP (A / G) tại vị trí 497 từ codon bắt đầu, dẫn đến thay thế Asp-165 / Gly-165 [3]; SNP (G / T) tại vị trí 497 (thay thế Arg-158 / His-158 trong exon 4) và SNP (T / C) ở vị trí 595 (Tyr-191 / His-191 thay đổi trong exon 5) [20]; SNP (GC / TT) trên intron 6, exon 7, intron 7, exon 8 và một phần của đầu 3' [21] hoặc lặp lại chuỗi đơn giản (CT)_n và (AATT)_n [1] .. có vai trò quan trọng quy định nên sự đa dạng của hàm lượng amylose.

Khi nghiên cứu sự biểu hiện của gen *Waxy*, tác giả Cai và Wang nhận thấy có sự khác biệt của mARN giữa các nhóm có hàm lượng amylose khác nhau. Cụ thể ở nhóm có hàm lượng amylose cao thì xuất hiện nhiều mARN 2,3 kb; trong khi đó ở nhóm có hàm lượng amylose thấp (nếp) chỉ có mARN 3,3 kb; nhóm có hàm lượng amylose trung bình thì có cả hai dạng mARN 2,3 kb và mARN 3,3 kb [12, 13]. Khi nghiên cứu sâu hơn theo hướng này một số tác giả đã phát hiện ra đột biến tại điểm nối của exon 1 và intron 1 gây ra sự nhiễu

loạn trong việc cắt bỏ intron 1 khỏi ARN sơ khai đó là đột biến xóa bỏ 16 nucleotit [6] và thay đổi G / T [14].

Sự đa dạng của gen *Waxy* trong chi *Oryza* rất phong phú và có thể có các cơ chế điều chỉnh khác nhau giữa các giống lúa [7]. Các đột biến tự phát của gen *Waxy* được tìm thấy trong các giống lúa địa phương từ các quốc gia châu Á và châu Phi [4, 10, 22, 23, 24] nhưng có rất ít các công bố liên quan đến các đột biến nhân tạo. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung vào làm rõ những thay đổi có thể có trong gen *Waxy* (BGIOGA022241) giữa hai kiểu gen thuộc phân loài *Oryza Sativa Indica* giống gốc và loại đột biến của nó thông qua một số kỹ thuật như: PCR, chuỗi, BLASTN ...

II. NỘI DUNG

1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu gồm 2 mẫu dòng/ giống lúa là giống gốc DT82 (có hàm lượng amylose cao) và dòng đột biến D14 (có hàm lượng amylose thấp hơn).

2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết ADN: ADN tổng số của vật liệu được chiết xuất bằng DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) [25].

Phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR): Toàn bộ gen *Waxy* của các giống gốc và đột biến được khuếch đại bằng phương pháp PCR với cặp mồi được thiết kế trên cơ sở dữ liệu của *Oryza sativa Indica*. Tổng thể tích phản ứng là 20 μ l bao gồm: 1 μ l ADN tổng số (1 ng/ μ l); 10 μ l Prime STAR MAX; mồi xuôi 0,5 μ l (20 pmol/ μ l hoặc 20 μ M); mồi ngược 0,5 μ l (20 pmol / μ l hoặc 20 μ M); 8 μ l H₂O. Chu trình phản ứng PCR: 98°C - 2 phút; 30 chu kỳ (98°C - 5 giây, 60°C - 5 giây, 72°C - 30 giây) và 72°C - 5 phút; giữ mẫu ở 4°C. Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% và được tinh sạch bằng QIAquick Kit (QIAGEN) [25].

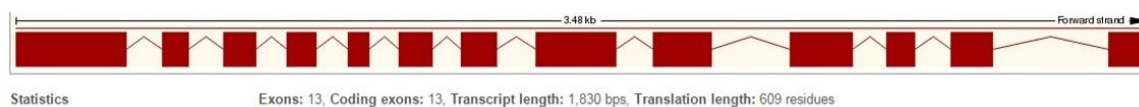
Phương pháp giải trình tự: Gen *Waxy* được giải trình tự bằng phương pháp BigDye Terminator, Thermofisher (dựa theo phương pháp Sanger) trên hệ thống máy giải trình tự ABI PRISM 3100. Phản ứng giải trình tự được tiến hành như sau: tổng thể tích 20 μ l bao gồm: DNA 1 μ l (khoảng 20 ng/ μ l); 4 μ l Terminator Ready Reaction Mix; 4 pmol Primer; 11 μ l H₂O. Chu trình phản ứng: 94°C - 2 phút; 25 chu kỳ (96°C - 10 giây, 50°C - 5 giây, 60°C - 4 phút); giữ mẫu ở 4°C. Tiếp theo, các sản phẩm của các phản ứng giải trình tự được tinh sạch bằng DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN) [25] và cuối cùng trình tự gen được đọc bằng máy ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer.

Xử lý số liệu/ dữ liệu: Dữ liệu trình tự của gen *Waxy* được xử lý thông qua phần mềm BLASTN (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool).

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Thiết kế mồi và khuếch đại gen *Waxy* (BGIOGA022241)

Gen *Waxy* (BGIOGA022241) được khai thác từ cơ sở dữ liệu của *Oryza sativa Indica* [26] với thông tin: vị trí trên nhiễm sắc thể 6 (từ 1,931,535 đến 1,935.014), chiều dài 3479 bp bao gồm 13 exon và 12 intron (Hình 1).



Hình 1. Cấu trúc gen *Waxy* (BGIOGA022241) khai thác từ cơ sở dữ liệu

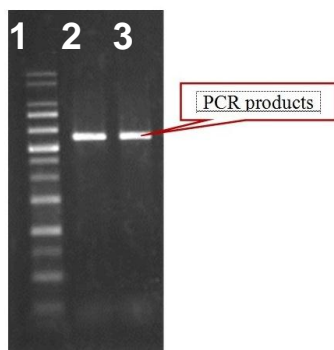
(Nguồn: <http://www.gramene.org>)

Dựa trên thông tin khai thác của gen *Waxy*, tám cặp mồi (mười sáu mồi) được thiết kế để khuếch đại và giải trình tự (Bảng 1). Các mồi có chiều dài 24-25 nucleotit; hàm lượng GC từ 37,5% đến 56%, và nhiệt độ gắn mồi từ 52,9 °C đến 63,5°C.

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

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

Toàn bộ gen *Waxy* (BGIOGA022241) được khuếch đại bởi mồi xuôi W_x-1F và mồi ngược W_x-8R. Trên gel agarose chỉ xuất hiện duy nhất một băng với kích thước ở giữa vị trí 3kb và 4kb so với thang chuẩn (Hình. 2).

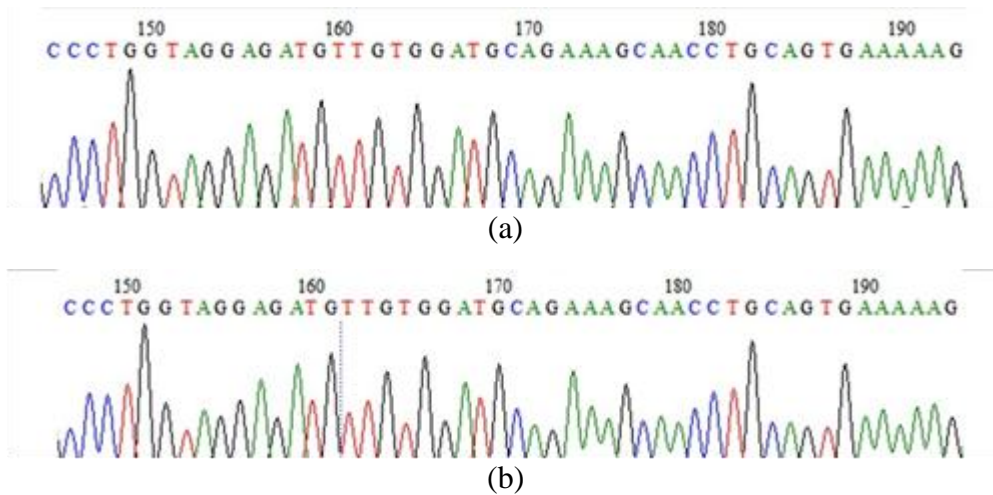


Hình 2. Sản phẩm khuếch đại gen *Waxy* trên gel agarose 1,5%

(1: thang chuẩn 1kb; 2: sản phẩm PCR từ khuôn ADN của giống gốc; 3: sản phẩm PCR từ khuôn ADN của dòng đột biến)

3.2. Giải trình tự gen *Waxy* (BGIOGA022241)

Gen *Waxy* được giải trình tự theo phương pháp BigDye Terminator của ThermoFisher và được đọc bằng máy ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Hình 3).

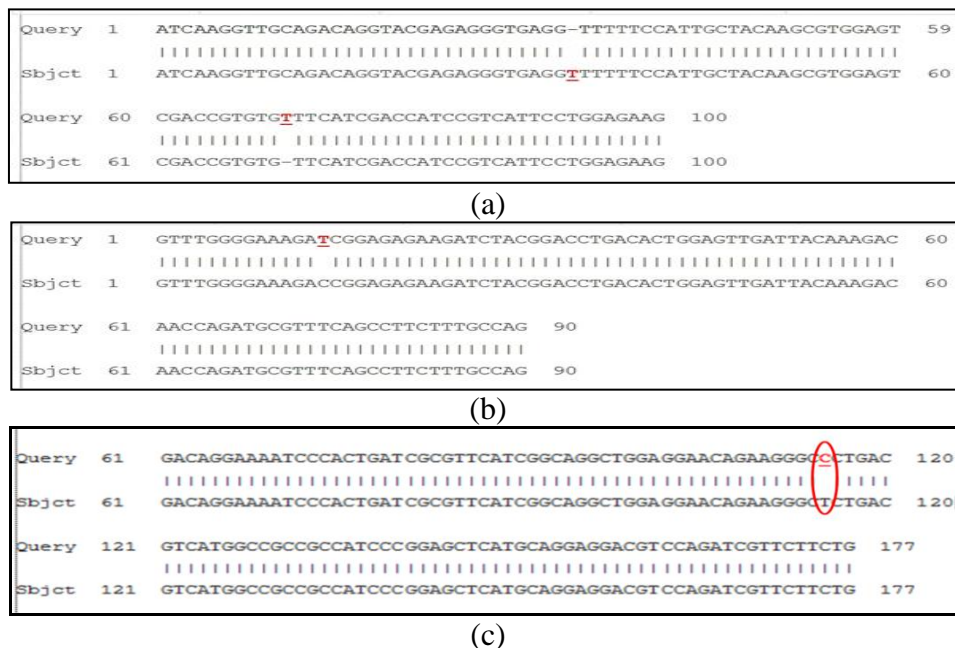


Hình 3. Kết quả đọc trình tự đoạn gen *Waxy* bằng môi Wx-3R

(a): Trình tự đoạn gen của dòng gốc; (b): Trình tự đoạn gen của dòng đột biến

3.3. BLASTN và xác định đột biến trong gen *Waxy* (BGIOGA022241)

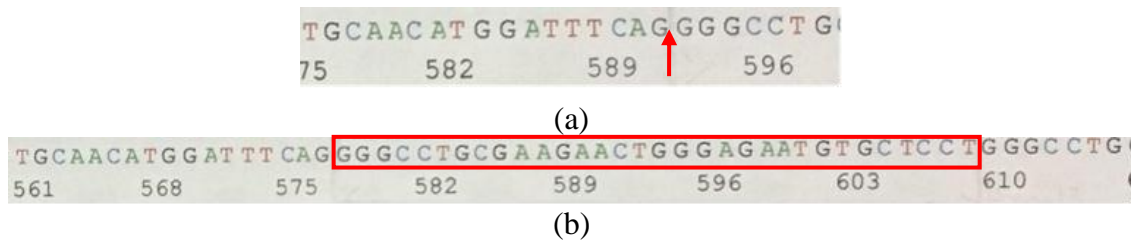
Do kích thước của gen *Waxy* lớn nên chúng tôi tiến hành giải trình tự thành các đoạn nhỏ, sau đó loại bỏ các trình tự lặp và lắp ráp thành trình tự hoàn chỉnh. Trình tự hoàn chỉnh được đối chiếu với trình tự trên cơ sở dữ liệu để xác định các vùng exon, intron. Để thuận tiện cho phân tích, từng đoạn exon, intron được đưa vào phân tích BLASTN riêng rẽ. Một số đột biến đã được tìm thấy được thể hiện tại hình 4, hình 5 và bảng 2.



Hình 4. Phân tích BLASTN và phát hiện đột biến trên vùng exon của gen *Waxy*

(a): Đột biến trên vùng exon 3; (b): Đột biến trên vùng exon 4; (c): Đột biến trên vùng exon 9

(Chú thích: Query- dòng đột biến; Subject-dòng gốc)



Hình 5. Đột biến chèn thêm 32 nucleotit vào điểm cuối intron 12 của gen Waxy

(a): Trình tự một phần đoạn intron 12 của giống gốc; (b): Trình tự một phần đoạn intron 12 của dòng đột biến

(Chú thích: hình mũi tên chỉ vị trí chèn; khung hình chữ nhật khoanh vùng đoạn chèn)

Bảng 2. Kết quả phân tích và phát hiện đột biến gen Waxy trên dòng lúa đột biến

Vùng gen	Trình tự phân tích	Trình tự sai khác	Chi tiết sai khác
Exon	1810	4 (0,22%)	- Exon 3: 34 (T/-); 71 (-/T) - Exon 4: 14 (C/T) - Exon 9: 115 (T/C)
Intron	1670	59 (3,53%)	- Intron 3: 29 (T/-); 31 (T/-) - Intron 5: 9 (T/C) - Intron 6: Exon6/intron6 junction (G/-); 53 (T/-); 59 (T/-); 63 (T/-) - Intron 8: 29 (A/G); 46 (-/T) - Intron 9: 81 (A/G); 95 (A/G); 99 (-/TAA); 139 (G/A); 142 (A/G); 148 (C/T); 161 (A/G); 165 (C/T); 177 (G/C); 193 (G/A) - Intron 11: 41 (T/C); 58 (A/G) - Intron 12: 83 (A/T); 98 (G/A); 134 (A/C); intron12/exon13 junction (chèn đoạn 32 nucleotit)
Tổng	3480	63 (1,81%)	

3.4. Phát triển chỉ thị ADN mới nâng cao hiệu quả cho chọn giống lúa đột biến

Nhằm đánh giá, thử nghiệm bước đầu, một chỉ thị ADN mới được phát triển dựa trên đột biến trên vùng exon 4 và exon 9 (bảng 3).

Bảng 3. Thông tin chỉ thị ADN mới phát triển dựa trên đột biến gen Waxy

Trình tự (5' - 3')	Đột biến mục tiêu	Tm (°C)	Kt. (bp)
W _x -F: GATTT <u>C</u> AGGTTTGGGGAAAGAT <u>T</u>	Nucleotit <u>T</u> at position 14 in exon 4	49,4	1271
W _x -R: TGGCGGCGGCCATGACGTCAG <u>G</u>	Nucleotit <u>C</u> at position 115 in exon 9		

(Chú thích: Đậm & gạch chân - điểm đột biến; Kt.: Kích thước)

Mỗi xuôi W_x-F được thiết kế dựa trên đột biến C / T ở vị trí 14 trên exon 4 với chiều dài 22 nucleotit. Mỗi ngược W_x-R được thiết kế dựa trên đột biến T / C ở vị trí 115 trên exon 9 với chiều dài 22 nucleotit. Kích thước dự kiến của sản phẩm PCR được khuếch đại bởi cặp mồi mới này là 1271 bp.

III. THẢO LUẬN

3.1. Khuếch đại và giải trình tự gen *Waxy*

Mỗi xuôi Wx-1F được thiết kế bao phủ điểm nối 5'-UTR / exon 1 và mỗi ngược Wx-8R được thiết kế bao phủ điểm nối giữa exon 13 / 3'-UTR. Trên hình 2 hiển thị duy nhất một băng sản phẩm PCR rõ nét, với kích thước khoảng 3500 bp. Điều này chứng tỏ cặp mồi Wx-1F và Wx-8R là đặc hiệu, đã khuếch đại thành công toàn bộ gen *Waxy* và không xảy ra đột biến ở điểm gắn mồi. Ngoài ra, sản phẩm PCR được hiển thị trong hình 2 đậm nét là một trong những tiêu chí để có được kết quả giải trình tự chính xác.

Gen *Waxy* đã được giải trình tự hoàn chỉnh dựa trên các mồi thiết kế ở bảng 1. Từ hình 3 cho thấy kết quả giải trình tự rất tốt thể hiện ở một số tiêu chí cơ bản: các “peak” cao, rõ ràng – cách đều nhau, nhiễu động “noise” rất nhỏ và không khuyết kết quả (missing “N”).

3.2. Phân tích và xác định đột biến trên gen *Waxy*

Gen *Waxy* của hai dòng/ giống vật liệu sau khi được đọc trình tự hoàn chỉnh đã được phân tích BLASTN để phát hiện các đột biến (hình 4, hình 5, bảng 2).

Trong tổng số 1810 trình tự thuộc exon được so sánh chỉ có 4 trình tự sai khác giữa giống gốc và dòng đột biến (chiếm 0,22%). Các sai khác này thuộc exon 3, 4 và 9. Đột biến tại exon 3 là xóa nucleotit T (T/-) tại vị trí 34 và chèn T (-/T) tại vị trí 74. Đột biến tại exon 4 là thay C bằng T (C/T) tại vị trí 14. Và cuối cùng là thay nucleotit T bằng C (T/C) tại vị trí 115 thuộc exon số 9. Cả 4 thay đổi này đều là đột biến điểm, xảy ra tại một vị trí xác định của một nucleotit.

Thông tin di truyền là các mã bộ ba, do đó, dựa trên mỗi mRNA sẽ có ba cách dịch mã khác nhau. Thêm vào đó, cấu trúc DNA là các sợi đôi, vì vậy với mỗi trình tự ADN sẽ có tổng cộng sáu cách dịch mã. Trong nghiên cứu này, bốn đột biến điểm xảy ra ở các exon sẽ dẫn đến việc thay đổi của các axit amin (aa) tương ứng. Ví dụ, đột biến thay thế C/T tại vị trí 14 của exon số 4 sẽ tạo nên sự thay thế aa G ở giống gốc thành aa D ở dòng đột biến; hoặc aa V thành aa I. Đột biến T/C tại vị trí 115 trong exon 9 dẫn đến sự thay thế aa E ở giống gốc thành aa G ở dạng đột biến; hoặc aa S thành aa G. Trong khi đó các đột biến trong exon 3 bao gồm việc xóa nucleotit T ở điểm 34 và chèn T ở điểm 71 sẽ tạo nên sự thay đổi trong trình tự dịch mã từ điểm 34 trở đi.

Ngoài ra, đối với vùng intron, trong tổng số 59 sai khác được xác định (chiếm 3,51%), có hai loại đột biến có tần số cao hơn so với các đột biến khác là xóa (T / -) (với năm quan sát) và sự thay thế (A / G) (với sáu quan sát). Các đột biến tại điểm nối intron / exon cũng được xác định và liệt kê: việc xóa G / - ở đầu intron 6 và chèn 32 nucleotit vào cuối intron 12. Những đột biến này có vẻ quan trọng hơn vì ảnh hưởng của chúng lên chức năng cắt intron như phân tích ở trên. Theo quan điểm của một số tác giả, đột biến tại vị trí nối được coi là một trong những đột biến phổ biến và quan trọng tạo nên sự đa dạng hàm lượng amylose. Tuy nhiên, để xác định rõ vai trò của các đột biến này còn cần phải tiến hành nhiều thí nghiệm mới có thể đi đến kết luận cuối cùng.

3.3. Phát triển chỉ thị ADN mới cho giống lúa có liên quan đến hàm lượng amylose

Bước đầu, chúng tôi phát triển chỉ thị ADN mới dựa vào đột biến điểm trên exon 4 và exon 9. Mỗi xuôi Wx-F dựa vào đột biến C / T ở vị trí 14 trong exon 4 (nucleotit T - in đậm và gạch chân) và mỗi ngược Wx-R dựa vào đột biến T / C ở vị trí 115 trong exon 9 (nucleotit G - in đậm và gạch dưới) (Bảng 3). Do đầu 3' của mồi là phần bảo thủ hơn vì gắn với sợi ADN đầu tiên trong quá trình phiên mã, vì vậy việc thiết kế sao cho vị trí đột biến thuộc vào mã bộ ba đầu tiên trên đầu 3' của mồi là rất quan trọng để đảm bảo tính chính xác của việc sàng lọc

đột biến khi tiến hành phản ứng PCR. Chỉ thị ADN mới được phát triển này sẽ được ứng dụng để nâng cao hiệu quả của chọn giống lúa đột biến có liên quan đến hàm lượng amylose.

IV. KẾT LUẬN

- (1) Bốn đột biến điểm trên vùng mã hóa đã được xác định bao gồm: xóa T (T/-) tại vị trí 34 và chèn T (-/T) tại vị trí 74 trên exon 3; thay thế (C/T) tại vị trí 14 trên exon 4; thay thế (T/C) tại vị trí 115 trên exon số 9.
- (2) Trên vùng không mã hóa, phát hiện được 59 đột biến, trong đó đáng chú ý nhất là: xóa G/- tại vị trí đầu tiên của intron 6 và thêm 32 nucleotit ở cuối của intron 12.
- (3) Với mục đích đánh giá, thử nghiệm bước đầu, một chỉ thị ADN mới đã được phát triển dựa trên đột biến trên vùng exon 4 và exon 9 nhằm nâng cao hiệu quả của chọn giống lúa đột biến có liên quan đến hàm lượng amylose.

LỜI CẢM ƠN

Công trình này được tiến hành tại Trung tâm nghiên cứu năng lượng Wakasa-wan, Fukui, Nhật Bản, với sự hỗ trợ Học bổng của Trung tâm phát triển nguồn nhân lực quốc tế Fukui về năng lượng nguyên tử (FIHRDC) năm 2016.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. X. Tang, G.S. Khush, and B.O. Juliano, "Variation and correlation of four cooking and eating quality indices of rices", *Philipp J. Crop Sci.* 14 (1989) 45-49
- [2] P. D. Larkin and W. D. Park, "Association of *Waxy* gene single nucleotit polymorphisms with starch characteristics in rice (*Oryza sativa* L.)", *Molecular Breeding*, 12 (4) (2003) 335-339
- [3] L. Liu, 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, "Identification and characterization of a novel *Waxy* allele from Yunnan rice landrace", *Plant Mol Biol.* 71 (2009) 609-626
- [4] M. Nakagahara and T. Nagamine, "Spontaneous occurrence of low amylose genes and geographical distribution of amylose content in Asian rice", *Rice Genet. Newsl.* 3 (1986) 46-48
- [5] Kharabian Ardashir Masouleh, Daniel L. E. Waters, Russell F. Reinke, Rachelle Ward & Robert J. Henry, "SNP in starch biosynthesis genes associated with nutritional and functional properties of rice", *Scientific Reports* 2 (2012) Article number: 557
- [6] M. H. Chen, C. J. Bergman, S. R. M. Pinson, R. G. Fjellstrom, "*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) (2008) 536-545
- [7] Cheng Zai Quan, Liu Yan Ping, Chen Rui, Peng Bo, Xiong Hua Bin, Zhang Cheng, Zhong Qiao Fang and Huang Xing Qi, "Diversity of *Waxy* gene alleles in the wild rice species of the *Oryza* genus", *Botanical Studies.* 51 (2010) 403-411
- [8] H. Y. Hirano, Y. Sano, "Molecular Characterization of the *Waxy* Locus of Rice (*Oryza sativa*)", *Plant and Cell Physiology.* 32 (7) (1991) 989-997
- [9] I. Mikami, N. Uwatoko, Y. Ikeda, J. Yamaguchi, H. Y. Hirano, Y. Suzuki and Y. Sano, "Allelic diversification at the *Wx* locus in landraces of Asian rice", *Theoretical and Applied Genetics.* 116 (7) (2008) 979-89

- [10] M. Isshiki, K. Morino, M. Nakajima, R. J. Okagaki, S. R. Wessler, T. Izawa and K. Shimamoto, "A naturally occurring functional allele of the rice *Waxy* locus has a GT to TT mutation at the 5' splice site of the first intron", *The Plant Journal*. 15 (1) (1998) 133–8
- [11] Y. Sano, "Differential regulation of *Waxy* gene expression in rice endosperm", *Theoretical and Applied Genetics*, 68 (5) (1985) 467-473
- [12] X. L. Cai, Z. Y. Wang, Y. Y. Xing, J. L. Zhang, M. M. Hong, "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) (1998) 459-465
- [13] Z. Y. Wang, F. Q. Zheng, G. Z. Shen, J. P. Gao, D. P. Snustad, M. G. Li, J. L. Zhang, M. M. Hong, "The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the *Waxy* gene", *The Plant Journal*. 7(4) (1995) 613-622
- [14] M. Dobo, N. Ayres, G. Walker, W. D. Park, "Polymorphism in the GBSS gene affects amylose content in US and European rice germplasm", *Journal Cereal Science*. 52(3) (2010) 450–456
- [15] N. M. Ayres, A. M. Mc Clung, P. D. Larkin, H. F. J. Bligh, C. A. Jones, W. D. Park, "Microsatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylase classes in an extended pedigree of US rice germplasm", *Theoretical and Applied Genetics*. 94 (1997) 773–781
- [16] C. Biselli, D. Cavalluzzo, R. Perrini, A. Gianinetti, P. Bagnaresi, S. Urso, G. Orasen, F. Desiderio, E. Lupotto, L. Cattivelli, "Improvement of marker-based predictability of Apparent Amylose Content in *japonica* rice through *GBSSI* allele mining", *Rice*, 7 (1) (2014)
- [17] P. D. Larkin and W. D. Park, "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) (1999) 719–727
- [18] Tran Thi Thu Hoai, Hiroaki Matsusaka, Yoshiko Toyosawa, Tran Danh Suu, Hikaru Satoh and Toshihiro Kumamaru, "Influence of single-nucleotide polymorphisms in the gene encoding granule-bound starch synthase I on amylose content in Vietnamese rice cultivars", *Breeding science*. 64(2) (2014) 142–148
- [19] A. Kharabian, "An efficient computational method for screening functional SNPs in plants", *Journal of Theoretical Biology*. 265 (2010) 55–6
- [20] H. Sato, Y. Suzuki, M. Sakai, T. Imbe, "Molecular characterization of *Wx-mq*, a novel mutant gene for low-amylose content in endosperm of rice (*Oryza sativa* L.)", *Breeding Science*. 52 (2002) 131–135
- [21] J. S. Bao, H. Corke, M. Sun, "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 (2006) 1171–1183
- [22] T. T. Hoai, A. Nishi and H. Satoh, "Diversity of granule bound starch synthesis (GBSS) levels in North Vietnam local rice cultivars", *Rice Genet. Newsl.* 24 (2008) 62–64

[23] M. S. Jahan, T. Kumamaru, A. Hamid and H. Satoh, “Diversity of granule bound starch synthase (GBSS) level in Bangladesh rice cultivars”, *Rice Genet. Newsl.* 19 (2002) 69–71

[24] H. Satoh, R. X. Ronald and T. C. Katayama, “On amylose content of cultivated rice collected in Madagasca, Kagoshima University Research Center South Pacific”, *Occasional Papers.* 18 (1990) 83–91

[25] <https://www.qiagen.com>

[26] <http://www.gramene.org>

IDENTIFICATION OF SOME NUCLEOTIDE MUTATIONS IN WAXY GENE (BGIOSGA022241) OF A MUTANT RICE LINE

Nguyen Thi Hong^{a,*}, Yoshikazu Tanaka^b, Vo Thi Minh Tuyen^a, Le Huy Ham^a
^a *Agricultural Genetics Institute, Pham Van Dong, Bac Tu Liem, Hanoi, Vietnam*
^b *The Wakasa-wan Energy Research Center, Fukui, Japan*
**Email: nguyenhongdhnn@gmail.com*

Abstract: *Waxy* genes of the original variety and its mutant type were sequenced by Sanger method and compared through Nucleotit Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN) to clarify differences. The result of BLASTN showed 4 mutations in coding regions and 59 mutations in non- coding regions. Four point mutations in coding regions were listed: the deletion of T/- at position 34 and the insertion of -/T between positions 70 and 71 in exon 3; the substitution of C/T at position 14 in exon 4 and the substitution of T/C at position 115 in exon 9. In 59 non-coding mutant sequences, some significant alterations were list: the deletion of nucleotide G at the first of intron 6 and the addition of 32 nucleotides “GGGCCTGCGAAGAAGAACTGGGAGAATGTGCTCCT” at the end of intron 12. For first trial, a new DNA marker was developed based on the mutation C/T at at position 14 in exon 4 and the substitution of T/C at position 115 in exon 9 to improve efficiency of rice breeding relevant to *Waxy* gene.

Keywords: *Waxy* gene, BGIOSGA022241, amylose content, BLASTN, DNA marker development