

Nghiên cứu mức độ biểu hiện của gen *OsHKT2;1* đáp ứng điều kiện mặn ở cây lúa bằng phương pháp RT-PCR bán định lượng

Đỗ Thị Phúc*, Phạm Quỳnh Hoa

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 28.8.2015, ngày chuyển phản biện 10.9.2015, ngày nhận phản biện 20.10.2015, ngày chấp nhận đăng 26.10.2015

Lúa là cây lương thực quan trọng và có giá trị kinh tế của Việt Nam. Do ảnh hưởng của biến đổi khí hậu toàn cầu mà nguy cơ đất bị nhiễm mặn đã và sẽ trở thành yếu tố gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất, chất lượng lúa gạo ở nước ta. Vì vậy, việc chọn tạo giống lúa chịu mặn là vấn đề cần được quan tâm nghiên cứu. HKT (high affinity potassium transporter) là họ protein có vai trò vận chuyển ion ở thực vật. Protein HKT được chứng minh tham gia vận chuyển ion Na^+ vào tế bào và có liên quan đến khả năng chịu mặn của cây lúa. Trong nghiên cứu này, các tác giả tiến hành đánh giá mức độ biểu hiện của gen *OsHKT2;1* mã hóa cho protein HKT2;1 ở cây lúa bằng phương pháp RT-PCR bán định lượng. Thí nghiệm được tiến hành trên giống lúa Nipponbare (giống chuẩn nhiễm mặn) và Pokkali (giống chuẩn kháng mặn) với điều kiện xử lý mặn ở nồng độ 50 và 100 mM NaCl trong dải thời gian là 24, 48 và 72 giờ. Kết quả cho thấy, mức độ biểu hiện của gen *OsHKT2;1* ở giống Nipponbare tăng lên sau 24 giờ xử lý mặn ở nồng độ 100 mM NaCl nhưng lại giảm dần và trở về mức bình thường sau 72 giờ xử lý mặn. Tuy nhiên, ở giống Pokkali thì mức độ biểu hiện của gen *OsHKT2;1* lại không thay đổi trong điều kiện mặn. Trong điều kiện bình thường (không xử lý mặn), mức độ biểu hiện của *OsHKT2;1* ở mô lá của giống Nipponbare là cao hơn so với giống Pokkali. Như vậy, sự khác biệt trong mức độ biểu hiện của gen *OsHKT2;1* có thể có liên quan đến mức độ kháng mặn khác nhau ở hai giống lúa nghiên cứu. Kết quả của nghiên cứu bước đầu cung cấp thông tin hữu ích cho công tác chọn tạo giống lúa chịu mặn.

Từ khóa: biểu hiện gen, HKT, lúa, *OsHKT2;1*, RT-PCR bán định lượng, stress mặn.

Chỉ số phân loại 1.6

Đặt vấn đề

Lúa là cây lương thực đóng vai trò quan trọng của nền kinh tế Việt Nam. Tuy nhiên, hiện tượng đất nhiễm mặn do biển xâm thực đã và đang ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và diện tích canh tác lúa. Nồng độ Na^+ cao trong đất làm tăng cao áp suất thẩm thấu khiến cho rễ cây không hút được nước và Na^+ tích tụ trong các mô lá gây ảnh hưởng đến bộ máy quang hợp, hoạt động của khí khổng, chức năng của các enzyme và mất cân bằng nồng độ ion K^+ [1]. Do vậy, để tồn tại và phát triển trong điều kiện mặn, cây trồng có cơ chế chống mất nước, hạn chế sự vận chuyển của Na^+ từ rễ lên lá và cô lập Na^+ vào các túi nội bào nhằm hạn chế nồng độ của Na^+ trong mô, đặc biệt là mô giậu [2].

HKT là họ protein có vai trò vận chuyển ion Na^+ ở thực vật. Các nghiên cứu cho thấy mối liên quan giữa HKT protein và khả năng kháng mặn ở thực vật [3, 4]. Đột biến mất chức năng của gen *AtHKT1;1* ở *A.thaliana*

được tìm thấy ở những dòng mẫn cảm mặn [5] và biểu hiện quá mức của *AtHKT1;1* ở *A.thaliana* và lúa làm tăng sức kháng mặn của cây [6]. Đột biến chèn yếu tố di truyền vận động *Tos17* vào gen *OsHKT1;1* ở lúa gây gián đoạn khung đọc mở của gen làm cây đột biến trở nên mẫn cảm hơn với điều kiện mặn [7]. Gen *HKT1;5* và *HKT1;4* ở ngũ cốc đóng vai trò cô lập Na^+ ở rễ và các lá già, tế bào quanh bó mạch nhằm hạn chế sự vận chuyển Na^+ lên lá non [8]. Biểu hiện quá mức của gen *HvHKT2;1* ở lúa mạch giúp tăng tốc độ sinh trưởng của cây lên 25-30% trong điều kiện mặn và thiếu K^+ so với kiểu dại [9].

Ở lúa, họ gen *HKT* gồm 9 thành viên nằm trên các nhiễm sắc thể khác nhau [10]. Gen *OsHKT2;1* là một thành viên của họ gen *HKT* ở lúa mã hóa cho protein HKT2;1 vận chuyển Na^+/K^+ . Thí nghiệm lai tại chỗ cho thấy, gen *OsHKT2;1* có biểu hiện ở lớp ngoại bì của rễ và mạch rây (cả yếu tố mạch và tế bào quanh bó mạch)

*Tác giả liên hệ: Email: dothiphuc13380@yahoo.com

STUDY ON EXPRESSION LEVEL OF OSHKT2;1 GENE IN RESPONSE TO SALT STRESS IN RICE BY SEMI-QUANTITATIVE RT-PCR ANALYSIS

Summary

Rice is one of the most important and high economic value food crops in Vietnam. Due to the global climate change, the negative effects of salted soil on yield and quality of rice have become more seriously; therefore, the enhancement in salt tolerant rice is always the research topic of interest. HKT (high affinity potassium transporter) is a protein family which plays role in ion transport in plants. It is proven that HKT proteins involve in ion Na^+ influx and salt tolerance in rice plants. In this study, the expression level of *OsHKT2;1* gene coding HKT protein in rice was investigated using semi-quantitative RT-PCR technique. Experiments were conducted on two rice cultivars, including Nipponbare (the standard salt sensitive cultivar) and Pokkali (the standard salt resistant cultivar) with two different salt concentrations of 50 mM and 100 mM NaCl for different periods of exposure time (24, 48, and 72 hrs of salt treatment). The results showed that in Nipponbare cultivar the expression level of *OsHKT2;1* gene was increased after 24 hours of 100 mM-salt treatment, but decreased to normal level after 72 hours of treatment. However, the *OsHKT2;1* expression level was unchanged over different salt stress conditions and at different time periods in Pokkali cultivar. In control condition, the expression level of *OsHKT2;1* gene in leaves of Nipponbare was higher than that in Pokkali. It might be likely that the differences in *OsHKT2;1* gene expression level involve in the differences in salt tolerance in two investigated rice cultivars. The results of initial studies provide useful information for salt tolerant rice breeding in the future.

Keywords: gene expression, HKT, *OsHKT2;1*, rice, salt stress, Semi-quantitative RT-PCR.

Classification number 1.6

[11]. Hiện tại, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào liên quan đến gen *OsHKT2;1* trong khả năng kháng mặn ở lúa. Do vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp RT-PCR bán định lượng để phân tích mức độ biểu hiện của gen *OsHKT2;1* ở cây lúa trong các điều kiện mặn khác nhau trên đối tượng là hai giống lúa chuẩn kháng mặn Pokkali và chuẩn mặn cảm mặn Nipponbare.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Hai giống lúa Nipponbare và Pokkali (cung cấp bởi Viện Di truyền Nông nghiệp); các cặp mồi đặc hiệu cho phản ứng PCR (cung cấp bởi hãng IDT - Hoa Kỳ). Trình tự các cặp mồi được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: trình tự các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự
IntHKT2;1-F	TAAGTTACTGCGCATCAAGC
IntHKT2;1-R	GCTTGCTCCTGGCAGATGCT
HKT2;1-F	TGGCCTTATGGCTTCCTTGG
HKT2;1-R	CCCTACATTCCCATATGCACTGAT
ACT-F	CTGATGGACAGGTTATCACC
ACT-R	CAGGTAGCAATAGGTATTACAG

Phương pháp nghiên cứu

Trồng lúa thủy canh và xử lý mặn: hạt lúa được ngâm ủ trong tối trong 48 giờ. Sau khi nảy mầm, hạt lúa được đặt vào trong các ô trên tấm xốp có đan lưới, đặt trong hộp chứa dung dịch dinh dưỡng Yoshida [12]. Độ pH của dung dịch dinh dưỡng được điều chỉnh trong khoảng 5,0-5,5. Dung dịch dinh dưỡng được thay mới hàng tuần. Thí nghiệm được bố trí thành 2 nhóm: nhóm cây đối chứng (không xử lý mặn) và nhóm cây bị xử lý mặn. Sau 14 ngày trồng trong dung dịch dinh dưỡng, thí nghiệm xử lý mặn được tiến hành ở nhóm cây bị xử lý mặn bằng cách bổ sung NaCl vào dung dịch dinh dưỡng để đạt nồng độ 50 hoặc 100 mM; trong khi ở nhóm cây đối chứng không bổ sung NaCl vào dung dịch dinh dưỡng. Mẫu lá được thu thập tại các thời điểm 24, 48 và 72 giờ sau khi xử lý mặn ở cả 2 nhóm cây và cất giữ ở -80°C.

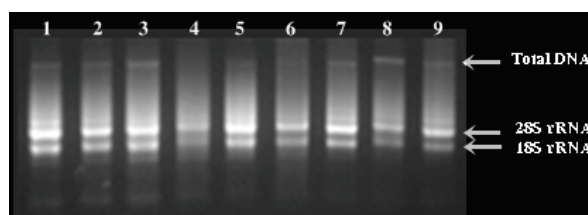
Kỹ thuật RT-PCR bán định lượng: mẫu lá lúa thu thập được nghiền bằng máy nghiền mẫu Mixer mill (Retsch, CHLB Đức) trong nitơ lỏng. Sau đó, ARN tổng số được tách chiết bằng kit GeneJET Plant RNA

Purification Mini Kit (Thermo Scientific). ADN hệ gen lẫn trong các mẫu ARN được xử lý với enzyme DNase I và được kiểm tra sau xử lý enzyme bằng cặp mồi IntHKT2;1 (nhân bản vùng intron của gen *OsHKT2;1*) (bảng 1) với chu kỳ nhiệt: 94°C 3 phút; 35 chu kỳ (94°C 15 giây, 58°C 30 giây, 72°C 30 giây), 72°C trong 5 phút. 2 µg ARN tổng số sau khi xử lý DNase I được sử dụng để tổng hợp cDNA bằng kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). cDNA tổng hợp được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu HKT2;1F/R (nhân bản gen *OsHKT2;1*) và ACTF/R (nhân bản gen *Actin1* - đối chứng) (bảng 1). Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR: 94°C 3 phút, các chu kỳ lặp lại (94°C 10 giây, 55°C 30 giây, 72°C 40 giây), 72°C 5 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2%. Sản phẩm PCR của cả 2 gen được tinh sạch bằng GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) và gửi đi giải trình tự tại Công ty 1st base, Singapore. Độ sáng của các băng điện di trên gel agarose được phân tích bằng phần mềm ImageJ.

Kết quả và thảo luận

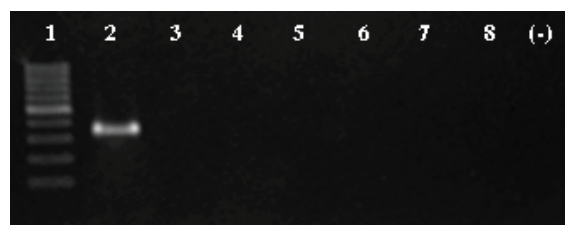
Hạt của hai giống lúa Nippobare và Pokkali được ngâm ủ và trồng trong dung dịch dinh dưỡng Yoshida. Thí nghiệm xử lý mặn được tiến hành khi cây lúa được 14 ngày tuổi ở 2 mức nồng độ muối khác nhau là 50 và 100 mM NaCl. Kết quả cho thấy, sau khi xử lý mặn được 24 giờ, hiện tượng xoắn nhẹ ở đầu lá được quan sát thấy ở giống Nipponbare ở nhóm thí nghiệm xử lý mặn 100 mM NaCl và tăng hơn 1/3 lá bị xoắn sau 72 giờ xử lý mặn. Tuy nhiên, ở giống chuẩn kháng Pokkali, cây có kiểu hình giống cây ở nhóm đối chứng, không thấy xuất hiện dấu hiệu bị ảnh hưởng của điều kiện mặn.

Mức độ biểu hiện của gen *OsHKT2;1* được phân tích sử dụng kỹ thuật RT-PCR bán định lượng. Kết quả điện di sản phẩm tách chiết ARN tổng số cho thấy, các mẫu ARN thu được đều có băng ARN riboxom sáng rõ, chứng tỏ ARN thu được có chất lượng tốt (hình 1). Đồng thời kết quả đo OD bằng máy đo Nanodrop Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Mỹ) cho thấy, các mẫu ARN có chỉ số A260/A280 trong khoảng 1,9~2,2 và A260/A230>2. Như vậy, ARN tách chiết được có chất lượng tốt để sử dụng cho các bước tiếp theo của thí nghiệm.



Hình 1: kết quả điện di sản phẩm tách chiết ARN tổng số (1-9) từ mô lá trên gel agarose 1%

Để loại bỏ ADN hệ gen trong mẫu ARN, tất cả các mẫu ARN đều được xử lý với enzyme DNase I. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân bản đoạn intron của gen *OsHKT2;1* cho thấy, không có băng nào ở các mẫu đã xử lý DNase I (hình 2, mẫu 3-8). Như vậy, sau khi xử lý DNase I, các mẫu ARN không còn lẫn ADN hệ gen, do đó đảm bảo chất lượng để tiến hành tổng hợp cDNA.

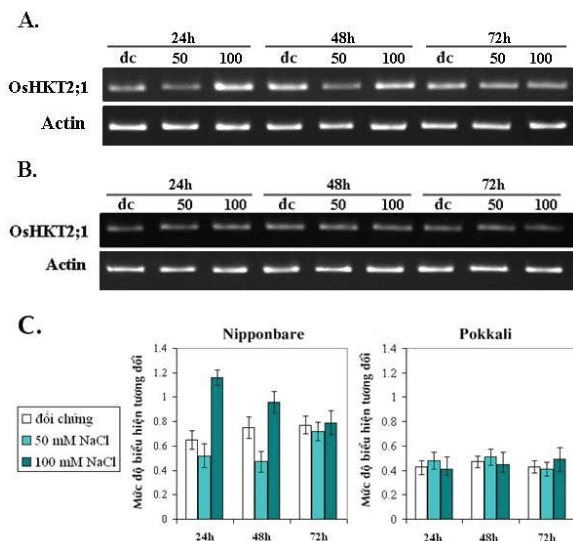


Hình 2: kết quả PCR sử dụng khuôn là ARN tách chiết và cặp mồi IntHKT2;1
1: Marker 100 bp; 2: mẫu ARN chưa xử lý DNase I; 3-8: các mẫu ARN đã xử lý DNase I; (-): đối chứng âm không có khuôn

cDNA được tổng hợp và làm khuôn cho phản ứng PCR nhân bản gen *OsHKT2;1* sử dụng cặp mồi đặc hiệu. Vì mục đích của nghiên cứu là đánh giá mức độ biểu hiện của gen *OsHKT2;1*, so sánh mức độ biểu hiện của gen giữa các điều kiện mặn khác nhau, tại các thời điểm xử lý mặn khác nhau và giữa hai giống lúa khác nhau, nên việc kiểm soát lượng khuôn cDNA dùng cho phản ứng PCR, hiệu suất phản ứng PCR, lượng mẫu để điện di là rất quan trọng và cần thiết để đảm bảo tính chính xác của kết quả thu được. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng gen *Actin1* làm đối chứng để kiểm soát kết quả thu được. Do đó, phản ứng PCR nhân bản gen *Actin1* được tiến hành đồng thời với phản ứng PCR nhân bản gen *OsHKT2;1*. Sản phẩm PCR được gửi đi giải trình tự để kiểm tra đúng là đã nhân bản gen *OsHKT2;1* và gen *Actin1*.

Kết quả sản phẩm PCR nhân bản gen *OsHKT2;1* và gen *Actin1* ở các điều kiện môi trường (0, 50 và 100 mM NaCl), ở các thời điểm xử lý mặn (sau 24, 48 và 72 giờ) được trình bày ở hình 3 (3A: giống Nipponbare, 3B: giống Pokkali). Trong kỹ thuật RT-PCR bán định lượng, độ sáng của băng điện di sản phẩm PCR được

sử dụng để đánh giá tương đối mức độ biểu hiện của gen. Do đó, đồng thời với việc đánh giá độ sáng của băng điện di ở hình 3 bằng mắt thường, chúng tôi tiến hành phân tích hình ảnh bằng phần mềm ImageJ (hình 3C).



Hình 3: phân tích biểu hiện của gen *OsHKT2;1* ở 2 giống lúa Nipponbare và Pokkali ở các điều kiện mặn khác nhau theo thời gian

A: ảnh điện di sản phẩm PCR nhân bản gen *OsHKT2;1* và gen *Actin1* (đối chứng) ở Nipponbare; B: ảnh điện di sản phẩm PCR nhân bản gen *OsHKT2;1* và gen *Actin1* (đối chứng) ở Pokkali;

C: kết quả phân tích với ImageJ trong đó độ sáng của băng điện di gen *OsHKT2;1* được chuẩn hóa với băng điện di gen *Actin1* tương ứng

Kết quả cho thấy, mức độ biểu hiện của gen *Actin1* là không thay đổi ở các điều kiện nghiên cứu và ở cả hai giống lúa. Điều này cho phép chúng tôi hoàn toàn tin tưởng vào kết quả đánh giá mức độ biểu hiện của gen *OsHKT2;1*, vì gen *Actin1* là gen quản gia đã được chứng minh là không thay đổi mức độ biểu hiện ở điều kiện mặn và ở các mô khác nhau [13]. Kết quả ở hình 3A và 3C cho thấy, mức độ biểu hiện của gen *OsHKT2;1* ở giống Nipponbare trong điều kiện bình thường là không có sự thay đổi theo thời gian (so sánh giữa các thời điểm thu mẫu), nhưng mức độ biểu hiện của gen này có sự thay đổi đáp ứng với điều kiện mặn. Cụ thể, khi điều kiện mặn là 50 mM NaCl, thì mức độ biểu hiện của gen *OsHKT2;1* bị giảm dần so với mức độ biểu hiện ở cây đối chứng (ở thời điểm 24 và 48 giờ sau xử lý mặn), sau đó trở về mức độ biểu hiện tương đương với mức độ biểu hiện ở cây đối chứng. Khi nồng độ muối tăng lên 100 mM NaCl thì mức độ biểu hiện của gen *OsHKT2;1* lại tăng mạnh (gấp 2 lần) so với cây đối chứng ở 24 giờ sau xử lý, sau đó giảm dần và trở về mức biểu hiện giống với cây đối chứng. Ngược lại với giống Nipponbare, ở giống Pokkali, chúng tôi

không quan sát thấy sự thay đổi mức độ biểu hiện của gen *OsHKT2;1* trong điều kiện mặn. Đồng thời, mức độ biểu hiện của gen *OsHKT2;1* ở giống Pokkali thấp hơn so với mức độ biểu hiện của gen này ở giống Nipponbare (so sánh giữa các cây đối chứng). Sự khác biệt trong mức độ biểu hiện của gen *OsHKT2;1* giữa hai giống Nipponbare và Pokkali có thể liên quan đến sự khác biệt về mức độ kháng mặn. Protein *OsHKT2;1* được chứng minh có khả năng vận chuyển Na^+ từ môi trường vào tế bào [14]. Vì vậy, ở giống Pokkali gen *OsHKT2;1* không tăng cường biểu hiện nên lượng Na^+ đi vào tế bào sẽ được duy trì ổn định hơn, không gây hại cho tế bào; trong khi đó ở giống Nipponbare, sự tăng cường biểu hiện của gen *OsHKT2;1* sẽ là bất lợi vì có thể dẫn tới sự tăng cường vận chuyển Na^+ vào tế bào, gây độc cho tế bào. Mặc dù cần những nghiên cứu sâu tiếp theo để làm sáng tỏ cơ chế, chức năng của *OsHKT2;1* trong khả năng chịu mặn ở lúa, nhưng kết quả thu được trong nghiên cứu này đã bước đầu cho thấy sự biểu hiện của gen *OsHKT2;1* có liên quan đến tính chống chịu mặn ở cây lúa.

Kết luận

Như vậy, chúng tôi đã đánh giá được mức độ biểu hiện của gen *OsHKT2;1* đáp ứng với các điều kiện mặn ở cây lúa bằng kỹ thuật RT-PCR bán định lượng. Ở giống lúa mặn cảm mặn Nipponbare, gen *OsHKT2;1* có mức độ biểu hiện cao hơn so với giống lúa kháng mặn Pokkali. Sự biểu hiện của gen *OsHKT2;1* đáp ứng lại điều kiện mặn có mức độ thay đổi tùy thuộc nồng độ muối và thời gian xử lý mặn ở giống lúa mặn cảm mặn Nipponbare và không có thay đổi về mức độ ở giống kháng mặn Pokkali.

Lời cảm ơn

Tập thể tác giả trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ tài chính từ Quỹ Phát triển KH&CN quốc gia thông qua đề tài mã số 106-NN.02-2013.47.

Tài liệu tham khảo

- [1] Narendra Tuteja (2007), "Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants", *Methods in Enzymology*, **428**, pp.421-422.
- [2] Rana Munns (2008), "Mechanisms of Salinity Tolerance", *Annual Review of Plant Biology*, **59**, pp.651-658.
- [3] 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, Hong-Xuan Lin (2005), "A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter", *Nature Genetics*, **37**, pp.1141-1146.

- [4] Berthomieu P, Conéjéro G, Nublat A, Brackenbury W.J, Lambert C, Savio C, Uozumi N, Oiki S, Yamada K, Cellier F, Gosti F, Simonneau T, Essah P.A, Tester M, Véry A.A, Sentenac H, Casse F (2003), “Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance”, *The EMBO Journal*, **22**, pp.2004-2014.
- [5] Ana Rus, Shuji Yokoi, Altanbadralt Sharkhuu, Muppala Reddy, Byeong-ha Lee, Tracie K Matsumoto, Hisashi Koiwa, Jian-Kang Zhu, Ray A Bressan (2001), “AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots”, *PNAS*, **98(24)**, pp.14150-14155.
- [6] Darren Plett, Darren Plett, Gehan Safwat, Matthew Gilliam, Inge Skrumager Møller, Stuart Roy, Neil Shirley, Andrew Jacobs, Alexander Johnson, Mark Tester (2010), “Improved salinity tolerance of rice through cell type-specific expression of *AtHKT1;1*”, *PLoS ONE*, **5(9)**, e12571. doi:10.1371/journal.pone.0012571.
- [7] Rong Wang, Wen Jing, Longyun Xiao, Yakang Jin, Like Shen, Wenhua Zhang (2015), “The Rice High-Affinity Potassium Transporter1;1 Is Involved in Salt Tolerance and Regulated by an MYB-Type Transcription Factor”, *Plant Physiology*, **168(3)**, pp.1076-1090.
- [8] Michael V Mickelbart, Paul M Hasegawa, Julia Bailey-Serres (2015), “Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability”, *Nature Reviews Genetics*, **16**, pp.224-236.
- [9] Afaq Mian, Ronald J.F.J Oomen, Stanislav Isayenkov, Hervé Sentenac, Frans J.M Maathuis, Anne-Aliénor Véry (2011), “Over-expression of an Na⁺- and K⁺-permeable HKT transporter in barley improves salt tolerance”, *Plant Journal*, **68(3)**, pp.468-479.
- [10] Blanca Garciadeblás, María E Senn, María A Bañuelos, Alonso Rodríguez-Navarro (2003), “Sodium transport and HKT transporters: The rice model”, *The Plant Journal*, **34**, pp.788-801.
- [11] Horie T, Costa A, Kim T.H, Han M.J, Horie R, Leung H.Y (2007), “Rice OsHKT2,1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth”, *The EMBO Journal*, **26**, pp.3003-3014.
- [12] Shouichi Yoshida, Douglas A Forno, James H Cock, Kwanchai A Gomez (1976), *Laboratory manual for physiological studies of rice*, pp.61-62.
- [13] Mukesh Jain, Aashima Nijhawan, Akhilesh K Tyagi, Jitendra P Khurana (2006), “Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **345**, pp.646-651.
- [14] Dortje Gollack, Hua Su, Françoise Quigley, Uma R Kamasani, Carlos Muñoz-Garay, Enrique Balderas, Olga V Popova, John Bennett, Hans J Bohnert, Omar Pantoja (2002), “Characterization of a HKT-type transporter in rice as a general alkali cation transporter”, *The Plant Journal*, **31(4)**, pp.529-542.