

PHÂN TÍCH LIÊN KẾT TOÀN HỆ GEN VỀ KHẢ NĂNG HẤP THỤ PHOSPHATE TRONG ĐIỀU KIỆN TỰ NHIÊN Ở CÁC GIỐNG LÚA BẢN ĐỊA CỦA VIỆT NAM

Mai Thị Phương Nga, Lê Quốc Khang, Chu Thị Quỳnh Anh, Tô Thị Mai Hương✉

Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: to-thi-mai.huong@usth.edu.vn

Ngày nhận bài: 15.8.2020

Ngày nhận đăng: 30.10.2020

TÓM TẮT

Phốt pho là một trong ba nguyên tố dinh dưỡng đa lượng quan trọng bậc nhất đối với quá trình sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây trồng. Tuy nhiên, việc lạm dụng phân bón Phosphate (Pi) gây ảnh hưởng tiêu cực đến chất lượng đất, nước, đồng thời làm cạn kiệt nguồn cung cấp Pi ở các mô tự nhiên. Điều này đã thúc đẩy những nghiên cứu chuyên sâu về chu trình Pi và cách tận dụng tối đa nguồn Pi trong đất đối với cây lúa. Trong nghiên cứu này, phương pháp nghiên cứu di truyền liên kết toàn hệ gen (GWAS) được sử dụng để khảo sát sự đa dạng di truyền trong việc hấp thụ tự nhiên Pi của 157 giống lúa bản địa của Việt Nam. Cây lúa được trồng trong các ống cát trong điều kiện nhà lưới và được tưới môi trường dinh dưỡng Yoshida 3 ngày một lần trong vòng 6 tuần với ba lần lặp lại và bố trí ngẫu nhiên vị trí các cây. Sau đó, khả năng hấp thụ tự nhiên nguồn Pi của các giống lúa được đo đạc và đánh giá. Nghiên cứu GWAS đã tìm được 19 đa hình đơn nucleotide (SNP), 9 tính trạng số lượng (QTL) và 22 gen ứng viên tiềm năng tham gia vào quá trình hấp thụ tự nhiên nguồn Pi ở cây lúa. Việc tìm ra những QTL và gen này có ý nghĩa rất lớn trong việc tạo các giống lúa mới có khả năng hấp thụ Pi cao - là giải pháp tiềm năng cho vấn đề an ninh lương thực.

Từ khóa: Cây lúa, đa hình đơn nucleotide, hấp thụ phosphate, QTL, GWAS

MỞ ĐẦU

Cây lúa (*O. sativa* L.) được xếp vào danh sách một trong những cây lương thực quan trọng nhất do gần một nửa dân số thế giới tiêu thụ lúa gạo. Lúa gạo đóng vai trò then chốt trong nền kinh tế của Việt Nam với lượng gạo xuất khẩu đạt 9 triệu tấn trong năm 2019 (<http://www.fao.org>), giá trị tương đương với 3 tỷ đô la Mỹ. Tuy nhiên, tình hình an ninh lương thực hiện nay đang trở thành một vấn đề toàn cầu mang tính cấp bách do tốc độ tăng dân số cũng như ảnh hưởng của biến đổi khí hậu.

Phốt pho (P) là một trong những nguyên tố dinh dưỡng đa lượng cần thiết cho sự tăng trưởng và phát triển của thực vật bởi nó là thành phần chính của các phân tử sinh học như (Taiz, Zeiger 2002). Do vậy, việc thiếu hụt phosphate vô cơ (Pi) - dạng cây có thể hấp thụ được - sẽ ảnh hưởng nghiêm trọng đến sinh trưởng và phát triển của cây trồng (Dobermann, Fairhurst, 2000). Sự cạn kiệt các mô Pi tự nhiên (Herrera-Estrella, López-Arredondo, 2016) cùng với việc lạm dụng sử dụng phân bón hóa học trong nông nghiệp (Brears, 2015) đã thúc đẩy những nghiên cứu

chuyên sâu về chu trình Pi và cách tận dụng tối đa nguồn Pi trong đất đối với cây trồng (Giles *et al.*, 2011). Việc tạo ra các cây trồng có hiệu suất hấp thụ Pi cao, có khả năng phát triển tốt trong đất có lượng Pi hòa tan thấp là giải pháp tiềm năng nhằm cải thiện đáng kể các vấn đề về phân bón Pi hiện nay (Lynch, 2011).

Nhiều nghiên cứu nhằm tìm ra các gen liên quan đến khả năng chống chịu của cây với điều kiện môi trường thiếu Pi đã được rất nhiều các nhóm trên thế giới thực hiện (Shimizu *et al.*, 2008; Wissuwa *et al.*, 2015). Một trong những phát hiện quan trọng nhất là việc tìm ra gen *phosphorus starvation tolerance 1* (*OsPSTOL1*) nằm trên nhiễm sắc thể số 12, liên quan trực tiếp đến việc cải thiện hấp thụ Pi (Gamuyao *et al.*, 2012). *OsPSTOL1* mã hóa cho proteins thuộc nhóm serine/threonine kinase. Việc biểu hiện quá mức *OsPSTOL1* ở giống lúa Nipponbare và IR64 (giống lúa không mang gen *OsPSTOL1*) làm tăng 60% năng suất của cây lúa trồng trong điều kiện môi trường thiếu Pi, chứng tỏ *OsPSTOL1* tham gia vào quá trình hấp thụ Pi ở cây lúa (Gamuyao *et al.*, 2012). Việc phát hiện một QTL khác là “*root elongation under*

phosphorus deficiency 6 (qREP-6) chứng minh mối liên quan chặt chẽ giữa chiều dài của rễ và hàm lượng Pi trong thân cây cũng như giữa chiều dài của rễ và số lượng nhánh cây lúa trồng trong điều kiện môi trường thiếu Pi (Li *et al.*, 2009). Một vài QTLs khác cũng được phát hiện trong điều kiện môi trường thiếu Pi như *qMRL6a* (chiều dài rễ tối đa), *qRN8b* (số lượng rễ), và *qRN4* (Li *et al.*, 2009)

Phương pháp nghiên cứu liên kết toàn hệ gen (GWAS) là một công cụ tin sinh học hữu ích nghiên cứu di truyền liên kết trên các tập đoàn giống lớn có tính đa dạng cao có mục đích tìm ra những SNP liên quan đến các tính trạng kiểu hình cụ thể (Rosenberg *et al.*, 2010). Đây là cơ sở để phát hiện ra các QTL và các gen tiềm năng liên kết với các tính trạng quan tâm trên toàn bộ hệ gen của loài. Trong nghiên cứu này, khả năng hấp thụ Pi của tập đoàn gồm 157 giống lúa bản địa Việt Nam đã được khảo sát nhằm tìm ra các QTL và gen tiềm năng liên quan đến khả năng này của cây lúa. Kết quả thu được có thể cung cấp thêm những thông tin quan trọng góp phần tìm ra giải pháp nhằm cải thiện sản lượng lúa tại những vùng đất thiếu Pi hòa tan.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Bộ sưu tập gồm 157 giống lúa sử dụng trong nghiên cứu này do Trung tâm Tài nguyên Thực vật, Hà Nội, Việt Nam cung cấp. Bộ sưu tập các giống lúa (92 giống thuộc nhóm *indica*, 59 giống thuộc nhóm *japonica* và 6 giống thuộc nhóm *admix*) gồm các giống truyền thống được thu thập từ nhiều tỉnh, thành và hệ sinh thái khác nhau, bao gồm hệ sinh thái tưới tiêu, vùng cao, vùng trũng ngập nước và rừng ngập mặn. Nghiên cứu này cũng đã sử dụng dữ liệu mở với 25.971 SNP được công bố bởi Phùng và đồng tác giả (2014).

Phương pháp bố trí thí nghiệm và trồng cây và thu hoạch mẫu

Hạt giống trong tập đoàn 157 giống lúa Việt Nam được phá ngủ bằng cách sấy ở 45°C trong 3 ngày và tiếp tục được ủ nảy mầm trong vòng 3 ngày ở 37°C. Sau giai đoạn nảy mầm, các cây con được chuyển sang trồng trong các ống PVC (16 x 68 cm) chứa cát trong điều kiện nhà kính ở điều kiện 28-30°C và độ ẩm khoảng 70-80% (Mai *et al.*, 2020; To *et al.*, 2020). Nhằm tránh hiệu ứng khối xảy ra, mỗi giống lúa được trồng với 3 lần lặp lại với vị trí trồng của các cây lúa được phân bố một cách ngẫu nhiên. Sơ đồ phân bố trên diện tích trồng được thiết lập bằng việc sử dụng phần mềm IRRISTAT v4.0 (Viện Nghiên cứu lúa gạo

quốc tế (IRRI), Los Baños, Philippines). Cây lúa được trồng và tưới 3 ngày một lần bằng môi trường dinh dưỡng Yoshida (Yoshida *et al.*, 1971) trong khoảng thời gian 6 tuần nhằm đánh giá khả năng hấp thụ Pi tự nhiên. Sau khi thu hoạch, phần thân của cây lúa được đem sấy khô ở nhiệt độ 70°C đến khối lượng không đổi (SHW).

Phương pháp xác định hàm lượng Pi

Hàm lượng Pi trong thân cây được xác định bằng phương pháp đo màu axit vanadomolybdo photphoric (Rice *et al.*, 2017). Đường chuẩn được xây dựng sử dụng KH_2PO_4 . Tổng 0,3 g khối lượng thân khô của mỗi giống lúa được sử dụng để định lượng Pi. Mẫu sau khi được nung trong lò nung Muffle furnace (Nabertherm, Mỹ) trong vòng 6 h nhằm tro hóa hoàn toàn mẫu. Sau đó, mẫu được làm nguội hòa tan với 40 ml dung dịch axit clohydric (37%; Merck, Mỹ) và vài giọt axit nitric (69%; Merck, Mỹ) rồi đun đến khi sôi, sau đó được định mức đến 100 ml. Tiếp theo, 20 ml thuốc thử molybdovanadat được thêm vào 20 ml dung dịch cần đo và định mức đến 100 ml. Độ hấp thụ của mẫu được đo ở bước sóng 420 nm bằng máy đo quang phổ UV-1800 UV-VIS (Shimadzu, Kyoto, Japan). Nồng độ Pi trong mẫu được xác định dựa trên đường chuẩn xây dựng sử dụng KH_2PO_4 .

Hiệu quả hấp thụ phosphate (PUpE) của cây (mg Pi g⁻¹ Pi) được tính bằng công thức như sau (Neto *et al.*, 2016):

$$PUpE = \frac{[Pi] \times SHW}{[Pi \text{ sử dụng}]}$$

Phương pháp phân tích liên kết toàn hệ gen

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng phương pháp nghiên cứu liên kết toàn hệ gen để thấy được mối liên hệ giữa các SNPs đã biết và khả năng hấp thụ Pi tự nhiên của các giống lúa. Mối tương quan này được thiết lập bằng cách sử dụng mô hình tuyến tính hỗn hợp (MLM) nhằm loại bỏ các dương tính giả trong phần mềm TASSEL v5.2.55. Giá trị $-\log(p) > 6$ được sử dụng để lựa chọn những SNPs có độ tin cậy cao liên quan đến khả năng hấp thụ Pi của cây lúa.

Phương pháp phân tích mất cân bằng liên kết (LD) giữa các SNP

Phương pháp mất cân bằng liên kết (LD - Linkage Disequilibrium) được thực hiện trên dữ liệu kiểu gen cho các SNP quan trọng vừa tìm được, nhằm tìm ra các QTL và đánh giá sự di truyền cùng nhau của các SNP (To *et al.*, 2019). Hệ số tương quan giữa 2 chỉ thị phân tử cạnh nhau được biểu hiện bằng hệ số R^2 , nằm

trong khoảng từ 0-1, được sử dụng để phân tích liên kết giữa các SNP quan trọng trong biểu đồ nhiệt LD. Giá trị $R^2 > 0.6$ tương ứng với một vùng gồm các SNP liên kết chặt chẽ với nhau được coi là một QTL. Sau đó, hai chuỗi trình tự đơn bội chính được so sánh với kiểu hình tương ứng để đánh giá ảnh hưởng của các biến thể trong trình tự của đoạn gen lên tính trạng quan tâm.

Phương pháp sàng lọc các gen ứng viên

Để sàng lọc các gen tiềm năng chịu trách nhiệm cho khả năng hấp thụ Pi, chúng tôi đã sử dụng ngân hàng dữ liệu về bộ gen lúa giống lúa Nipponbare của Đại học bang Michigan (MSU) phiên bản 7 (<http://rice.plantbiology.msu.edu>) để sàng lọc các gen liên quan nằm trong khoảng 25 kb về phía trước và 25 kb về phía sau của SNP quan trọng (Kawahara *et al.*, 2013). Từ đó, danh sách các gen ứng viên tiềm năng cùng với chức năng của chúng được thiết lập sau khi đã loại bỏ các gen nhảy, các gen mã hóa protein giả định và protein biểu hiện.

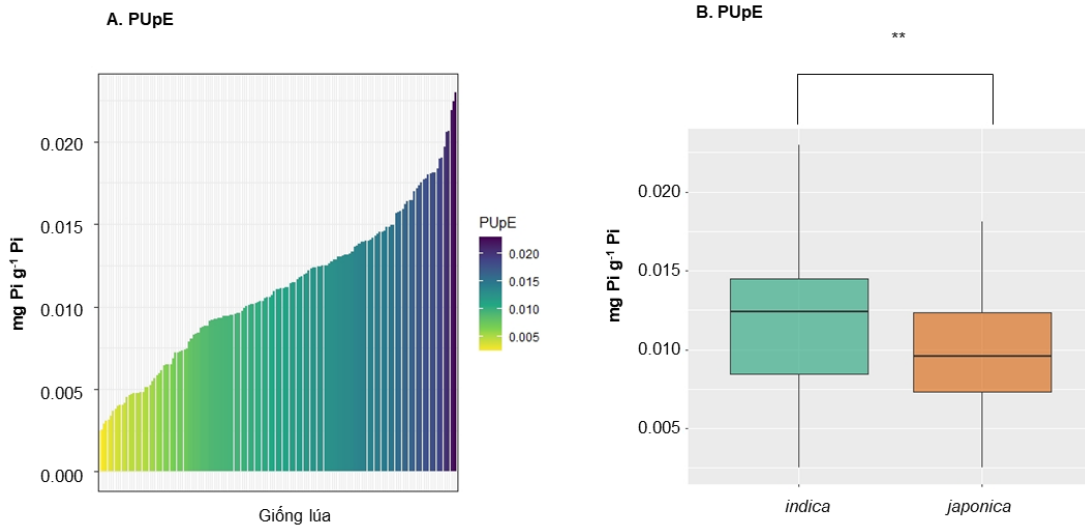
Phương pháp phân tích thống kê

Phương pháp phân tích phương sai một yếu tố và *t*-test được phân tích bằng phần mềm R v3.6.

KẾT QUẢ

Khảo sát sự đa dạng về kiểu hình các tính trạng hấp thụ tự nhiên Pi ở tập đoàn lúa Việt Nam

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã trồng 157 giống lúa bản địa trong điều kiện đầy đủ dinh dưỡng. Mẫu được thu hoạch sau 6 tuần và hàm lượng Pi có trong thân của từng giống được định lượng nhằm xác định khả năng hấp thụ Pi. Dữ liệu kiểu hình của 157 giống lúa được phân tích và biểu diễn dưới dạng cột nhằm đánh giá mức độ hấp thụ Pi (Hình 1A). Từ kết quả thu được, các giống lúa có khả năng hấp thụ Pi tốt nhất cũng như các giống lúa có khả năng hấp thụ Pi kém nhất đã được xác định. Ngoài ra, hiệu suất hấp thụ Pi của các giống lúa có sự biến thiên rất lớn, trải rộng trong phổ từ 0,002 - 0,023 mg Pi/g Pi. Những phân tích về ảnh hưởng của các phân nhóm phụ (*indica* và *japonica*) đến khả năng hấp thụ Pi của các giống lúa (Hình 1B) đã cho thấy nhóm *indica* có chỉ số PUpE cao hơn đáng kể so với nhóm *japonica* ($P < 0,01$).

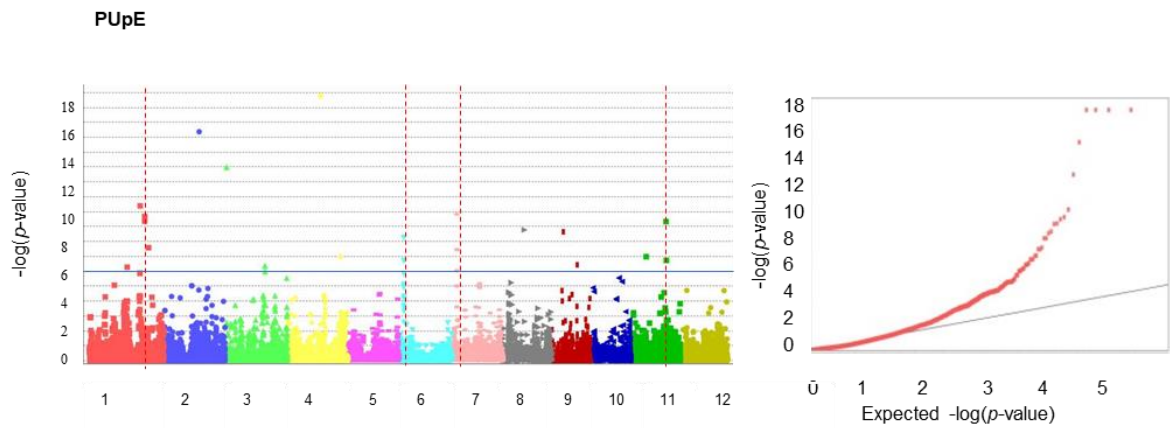


Hình 1. Đa dạng kiểu hình về khả năng hấp thụ Pi (PUpE) của các giống lúa trong tập đoàn và của 2 nhóm phụ *indica* và *japonica* tương ứng (B).

Kết quả phân tích GWAS

Để tìm ra các chỉ thị quan trọng có ảnh hưởng trong sự hấp thụ tự nhiên Pi ở 157 giống lúa, phân tích GWAS đã được tiến hành trên bộ dữ liệu kiểu hình nói trên. Kết quả thu nhận được thể hiện trên Hình 2, cho thấy có tổng số 19 SNPs. Phân tích mất cân bằng

liên kết LD được thực hiện trên dữ liệu kiểu gen cùng với dữ liệu các SNPs quan trọng vừa phát hiện đã chỉ ra được 9 vùng QTL nằm rải rác trên các NST 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9 và 11. Trong các QTL trên, *qPUpE7.5* nằm trên NST số 7 có số lượng chỉ thị phân tử quan trọng nhiều nhất với 5 chỉ thị. Kích thước của QTL này là 1,5 Mb.



Hình 2. Phân tích GWAS với tính trạng PUPe trên 157 giống lúa. Biểu đồ Manhattan (trái) và Q-Q (phải). Trục Ox biểu diễn vị trí của các SNPs trên 12 nhiễm sắc thể có màu sắc khác nhau, trục Oy biểu diễn giá trị logarit của *P* trong kiểm định liên kết tại mỗi locus trong biểu đồ Manhattan. Đường màu xanh da trời biểu hiện giá trị ngưỡng. Trong biểu đồ Q-Q, trục O biểu diễn giá trị mong đợi theo lý thuyết của logarit *P* trong kiểm định liên kết tại mỗi locus.

Các gen ứng viên

Các gen ứng cử viên được tìm kiếm trong phạm vi 25 kb xung quanh vị trí của 9 QTL dựa vào cơ sở dữ liệu di truyền về lúa được cung cấp trên cơ sở dữ liệu MSU phiên bản 7 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>). Sau

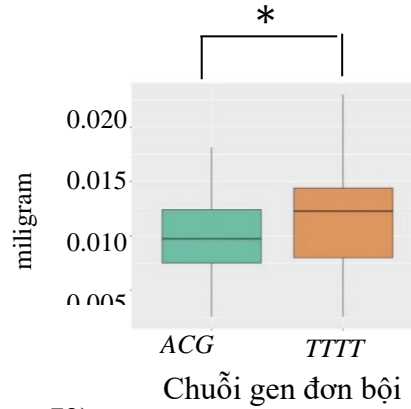
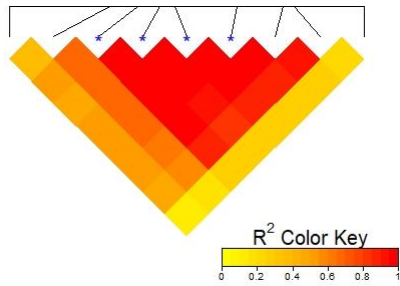
khí sàng lọc các gen nhảy, các gen mã hóa protein giả định, protein biểu hiện và các gen không liên quan, 22 gen ứng viên quan trọng đã được phát hiện (**Bảng 1**), trong đó 7 gen mã hóa cho protein kinase và 2/7 gen mã hóa cho protein liên quan tới đường truyền tín hiệu Calmodulin.

Bảng 1. Danh sách một số gen ứng cử viên quan trọng tương quan với PupE.

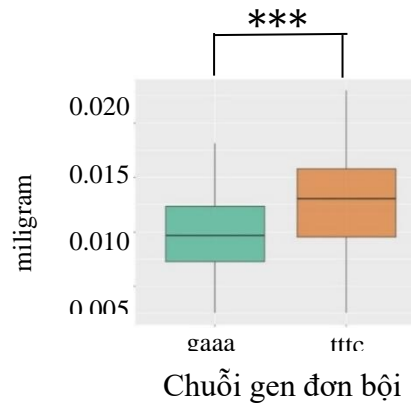
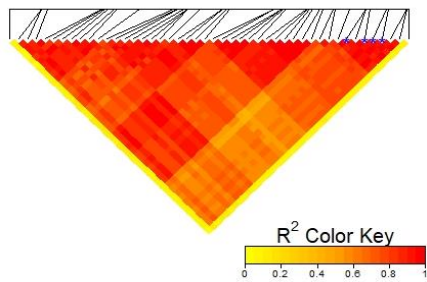
STT	QTL	Chỉ thị	Giá trị <i>P</i>	Mã ID trong dữ liệu MSU (http://rice.plantbiology.msu.edu)	Chức năng gen trong dữ liệu MSU (http://rice.plantbiology.msu.edu)
1	<i>qPUpE1.1</i>	Dj01_34435745F	5.95E-08	LOC_Os01g59530.1	OscML1: Protein cảm biến liên quan đến Calmodulin, biểu hiện
				LOC_Os01g59550.1	Tiền chất của protein kinase thuộc nhóm serine/threonine bị kích hoạt trong quá trình già hóa, biểu hiện giả định
				LOC_Os01g59560.1	Protein chứa miền kinase, biểu hiện
				LOC_Os01g59570.1	Tiền chất của protein kinase thuộc nhóm serine/threonine bị kích hoạt trong quá trình già hóa, biểu hiện giả định
2	<i>qPUpE3.2</i>	Sj03_00877981R	5.68E-13	LOC_Os03g02410.1	GHMP protein kinase liên kết ATP, biểu hiện giả định
3	<i>qPUpE4.3</i>	Sj04_19271832R	5.73E-20	LOC_Os04g32110.1	Protein chứa miền ACT, biểu hiện
		Sj04_19286435R	5.73E-20	LOC_Os04g32140.1	Protein microneme Sm70, biểu hiện giả định

		Sj04_19296066F	5.73E-20	LOC_Os04g32150.1	Protein thuộc họ amidohydrolase, biểu hiện
		Sj04_19337452F	5.73E-20	LOC_Os04g32270.1	Protein nếp gấp ubiquitin có màng neo, biểu hiện giả định
4	<i>qPUρE6.4</i>	Sj06_02940078R	2.01E-07	LOC_Os06g06300.1	osFTL3 FT-Like3 tương đồng với gen định vị ra hoa; chứa định dạng PfamPF01161: protein liên kết với phosphatidylethanolamine, biểu hiện
		Dj06_02946720F	5.31E-09	LOC_Os06g06320.1	osFTL3 FT-Like3 tương đồng với gen T định vị ra hoa; chứa định dạng Pfam PF01161: protein liên kết với phosphatidylethanolamine, biểu hiện
		Dj06_02972689F	2.01E-07		
		Sj06_02975240F	5.31E-09		
5	<i>qPUρE7.5</i>	Sj07_02568177F	1.13E-11	LOC_Os07g05420.1	CAMK_KIN1/SNF1/Nim1_like.28: CAMK bao gồm protein kinase phụ thuộc canxi/calmodulin, biểu hiện
		Dj07_02609124R	2.30E-07	LOC_Os07g05640.1	Protein họ vận chuyển, biểu hiện giả định
		Dj07_02620316F	2.30E-07		
		Sj07_02663376R	3.65E-09		
		Sj07_02665268F	3.65E-09		
6	<i>qPUρE8.6</i>	Dj08_12372981R	1.23E-09	LOC_Os08g20570.1	Protein kênh clorit, biểu hiện giả định
				LOC_Os08g20580.1	Protein ngón tay kẽm ZOS8-04-C2H2, biểu hiện
				LOC_Os08g20610.1	Protein chứa pentatricopeptide, biểu hiện giả định
7	<i>qPUρE9.7</i>	Sj09_14775135R	3.64E-07	LOC_Os09g24800.1	Yếu tố phiên mã thuộc họ MYB, biểu hiện giả định
				LOC_Os09g24810.1	Protein chứa vùng dimer hóa protein ZF, biểu hiện
8	<i>qPUρE11.8</i>	Sj11_09104815F	6.69E-09	LOC_Os11g16420.1	Protein chưa biết chức năng, biểu hiện
				LOC_Os11g16430.1	Protein sinh tổng hợp diphthamide, biểu hiện giả định
				LOC_Os11g16470.2	MLA10, biểu hiện giả định
9	<i>qPUρE11.9</i>	Dj11_20709473R	7.12E-11	LOC_Os11g35290.1	OsWAK119 kinase tế bào chất giống thụ thể OsWAK, biểu hiện

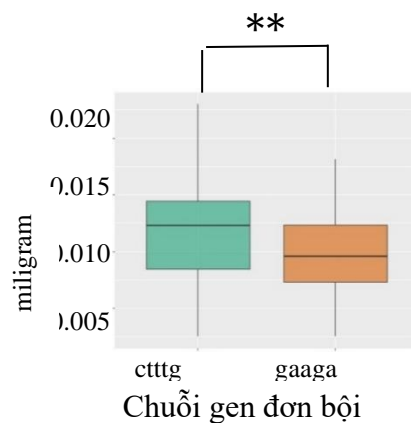
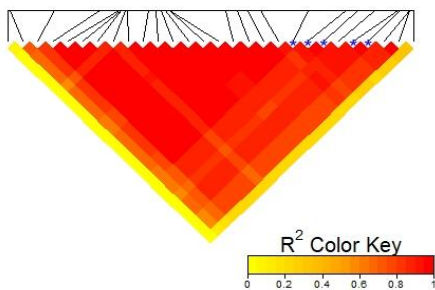
(A) **qPUpE4.3:** *ACGC* (n = 66); *TTTT* (n = 91)



(B) **qPUpE6.4** *GAAA* (n = 82); *TTTC* (n = 72)



(C) **qPUpE7.5** *ctttg* (n = 86); *gaaga* (n = 66)



Hình 3. Tương quan của chuỗi kiểu gen đơn bội chính và kiểu hình trên tại 3 QTLs có nhiều chỉ thị phân tử nhất bao gồm (A). *qPUpE4.3*, (B) *qPUpE6.4* và (C) *qPUpE7.5*. Kiểm định Student *t*-test được thực hiện nhằm đánh giá mức độ khác nhau giữa 2 nhóm phụ. (*), (**) và (***) tương ứng với các giá trị *P* < 0,05, 0,01 và 0,001.

Phân tích tương quan của chuỗi kiểu gen đơn bội và kiểu hình trên 3 QTL có nhiều chỉ thị phân tử nhất

Kiểu gen đơn bội của các QTL được xác định dựa trên trình tự nucleotide của các chỉ thị quan trọng trong QTL đó. Dựa vào dữ liệu giải trình tự cùng dữ liệu kiểu hình thu được của 157 giống lúa, tương quan giữa chuỗi các kiểu gen đơn bội đã được phân tích và thể hiện cho 3 QTL có nhiều chỉ thị phân tử nhất bao gồm *qPUpE4.3* (Hình 3A), *qPUpE 6.4* (Hình 3B) và *qPUpE7.5* (Hình 3C). Dựa theo Hình 3A, *qPUpE4.3* gồm chuỗi SNP tương ứng với 4 chỉ thị quan trọng, trong đó ACGC và TTTT là 2 chuỗi trình tự đơn bội chính. Kết quả phân tích tương quan cho thấy các giống lúa mang kiểu gen đơn bội ACGC có khả năng hấp thụ Pi tự nhiên kém hơn về mặt thống kê so với các giống lúa mang kiểu gen đơn bội TTTT ($P < 0,05$).

QPUpE6.4 có 2 kiểu chuỗi gen đơn bội chính là GAAA và TTTC, trong đó những giống lúa mang kiểu gen đơn bội GAAA có mức độ hấp thụ tự nhiên Pi thấp hơn một cách có ý nghĩa thống kê so với những giống lúa mang kiểu gen đơn bội TTTC ($P < 0,001$) (Hình 3B). Trong khi ở *qPUpE7.5*, các giống lúa mang kiểu gen đơn bội CTTTG có khả năng hấp thụ Pi cao hơn nhiều so với các giống lúa mang kiểu gen đơn bội GAAGA ($P < 0,001$) (Hình 3C).

THẢO LUẬN

Nghiên cứu đã chỉ ra sự đa dạng trong khả năng hấp thụ Pi trên 157 giống lúa Việt Nam. Dựa vào phân tích GWAS, 9 QTL, 19 SNP và 22 gen ứng viên quan trọng đã được tìm ra. Trong 9 QTL, có 3 QTL *qPUpE4.3*, *qPUpE 6.4* và *qPUpE7.5* mang nhiều chỉ thị phân tử nhất liên kết với nhau chặt chẽ. Đồng thời, trong số 22 gen ứng viên có 7 gen mã hóa cho protein kinase và 3 gen mã hóa cho yếu tố phiên mã thuộc họ MYB, ZF-HD và C2H2.

Protein kinase là một họ enzyme quan trọng có chức năng tham gia vào vận chuyển nhóm Pi từ phân tử năng lượng cao (ATP) đến các protein có năng lượng thấp, đồng thời đóng vai trò thiết yếu trong việc dẫn truyền tín hiệu và điều tiết hầu hết các khía cạnh chức năng tế bào bình thường (; Swulius, Waxham, 2008; McClendon *et al.*, 2014; Wang, Cole, 2014). Trong nghiên cứu về khả năng hấp thụ Pi này, một gen mã hóa cho protein kinase phụ thuộc Calcium/calmodulin (*LOC_Os07g05620*) cũng được tìm thấy nằm trên *qPUpE7.5*, bên cạnh chỉ thị Sj07_02568177F. Điều này cho thấy kinase này có khả năng tham gia vào điều tiết quá trình hấp thụ Pi

của cây, tuy nhiên cần có những nghiên cứu về chức năng gen để làm rõ hơn giả thuyết này. Trong một nghiên cứu khác ở điều kiện môi trường thủy canh, gen *LOC_Os07g05620* được tìm thấy biểu hiện mạnh ở rễ trưởng thành ở giai đoạn phát triển sớm của giống lúa *Oryza sativa* L. cv. Nipponbare (Kyndt *et al.*, 2012) cho thấy việc biểu hiện mạnh ở rễ có thể liên quan đến khả năng tìm nguồn dinh dưỡng Pi và hấp thụ Pi của lúa. Ngoài ra, gen *LOC_Os07g05620* cũng được tìm thấy bị kích hoạt trên cây lúa để đối phó với các stress, bao gồm các stress sinh học như: rầy nâu (*Nilaparvata lugens* Stål) (Lv *et al.*, 2014), tuyến trùng sần rễ (Zhou *et al.*, 2020), nấm đạo ôn (*Magnaporthe oryzae* RB22) (Shi *et al.*, 2018) và stress phi sinh học như: nhiệt độ thấp (Moraes de Freitas *et al.*, 2019). Những nghiên cứu này đã chỉ ra vai trò quan trọng của kinase, cụ thể là gen *LOC_Os07g05620* trong việc vận chuyển nhóm Pi để điều tiết sự sinh trưởng phát triển và đáp ứng với các stress của cây lúa.

Yếu tố phiên mã là nhân tố điều hòa thiết yếu trong quá trình phiên mã của gen. Trong nghiên cứu này, gen mã hóa cho yếu tố phiên mã MYB (*LOC_Os09g24800.1*) được tìm thấy nằm trên *qPUpE9.7*, bên cạnh chỉ thị Sj09_14775135R. Họ yếu tố phiên mã MYB là một trong những họ phổ biến nhất, đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển, sản xuất các hợp chất thứ cấp, dẫn truyền hormone, đồng thời chống lại các stress sinh học và phi sinh học ở thực vật (Allan *et al.*, 2008; Katiyar *et al.*, 2012). *LOC_Os09g24800.1* nằm trong nhóm R2R3-MYB - là nhóm được biết đến với vai trò chuyển hóa phenylpropanoid, xác định hình thái tế bào biệt hóa và phản ứng với các stress sinh học, phi sinh học (Yanhui *et al.*, 2006). Trong một nghiên cứu gần nhất, gen *LOC_Os09g24800.1* được tìm thấy tăng mức độ phiên mã trong môi trường stress arsenic và giảm phiên mã trong môi trường stress với cả arsenic và selenium (Chauhan *et al.*, 2020). Đặc biệt, một gen thuộc nhóm R2R3-MYB là *OsMYB5P* được biết đến là tham gia vào quá trình chống chịu với điều kiện môi trường thiếu Pi (Yang *et al.*, 2018). Biểu hiện quá mức gen này ở lúa và *Arabidopsis thaliana* Col-0 làm tăng khả năng chống chịu với môi trường thiếu Pi, trong khi đột biến bất hoạt gen này sử dụng RNAi làm cho cây lúa trở nên mẫn cảm với môi trường thiếu Pi. *OsMYB5P* còn làm tăng khả năng hấp thụ Pi bằng cách điều tiết các protein vận chuyển Pi (Yang *et al.*, 2018). Ngoài ra, *OsMYB5P* còn tham gia vào quá trình phát triển chồi và kiến trúc bộ rễ lúa (một bộ phận quan trọng tham gia vào việc hấp thụ Pi) (Yang *et al.*, 2018). Một yếu tố phiên mã khác cũng được tìm

thấy trong nghiên cứu này là ZF-HD (*LOC_Os09g24810*) nằm trên *qPUpE9.7*. Yếu tố phiên mã này bị giảm biểu hiện ở cây lúa đột biến gen *OsPP18* (gen mã hóa cho enzym chuyển hóa Pi, và tham gia vào quá trình phản ứng của cây trồng với stress phi sinh học (You *et al.*, 2014), đồng thời cũng giảm biểu hiện ở giống lúa Digu khi phản ứng với nấm *Magnaporthe oryzae* (Li *et al.*, 2015). Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào tìm thấy vai trò của ZF-HD trong phản ứng của cây lúa đối với điều kiện môi trường thiếu Pi. Yếu tố phiên mã thứ ba được tìm thấy là ZOS8-04 - C2H2 (*LOC_Os08g20580*) thuộc nhóm yếu tố phiên mã zinc, nằm trên *qPUpE8.6*. Yếu tố phiên mã này tăng cường mạnh biểu hiện trong điều kiện stress lạnh. Cây lúa biểu hiện quá mức yếu tố phiên mã này có khả năng chống chịu tốt với môi trường nhiệt độ thấp, có nhiều nhị có khả năng thụ phấn và cho nhiều hạt hơn cây không chuyển gen (Jin *et al.*, 2018).

Như vậy, nghiên cứu đã tìm thấy 7 gen tiềm năng mã hóa cho protein kinase và 3 gen mã hóa yếu tố phiên mã - là một trong những protein quan trọng nhất tham gia vào điều hòa quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lúa, trong đó có quá trình hấp thụ Pi cung cấp nguyên liệu cơ bản cho cấu trúc của phân tử cao năng lượng ATP cũng như cho vật liệu di truyền của tế bào. Do vậy, nghiên cứu này đã góp phần cung cấp thêm những hiểu biết sâu hơn về các gen tham gia vào điều tiết quá trình hấp thụ Pi ở cây lúa.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Đây là một trong những nghiên cứu đầu tiên đánh giá khả năng hấp thụ Pi trong môi trường tự nhiên của tập đoàn 157 giống lúa Việt Nam sử dụng phương pháp phân tích GWAS. Nghiên cứu đã tìm 9 QTLs và 22 gen tiềm năng có khả năng liên quan đến khả năng tự nhiên trong việc hấp thụ Pi, chủ yếu bao gồm các gen thuộc họ kinase. Việc tìm ra các gen và QTLs này có ý nghĩa rất quan trọng cho việc cải tiến giống lúa có khả năng hấp thụ Pi thấp đặc biệt trong tình hình nguồn Pi tự nhiên đang bị cạn kiệt nhanh chóng như hiện nay. Các nghiên cứu về chức năng gen cần được tiến hành sau đó nhằm cung cấp thêm thông tin về cơ chế phân tử của quá trình hấp thụ Pi và các gen có vai trò then chốt trong quá trình này. Nghiên cứu này đóng góp thêm thông tin giúp các nhà lai tạo giống phát triển được các giống lúa mới có khả năng phát triển tốt trong đất thiếu Pi.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội

đã tài trợ kinh phí cho Đề tài nghiên cứu mã số USTH.BIO.01/19-20 cho TS. Mai Thị Phương Nga. Nhóm tác giả cũng xin cảm ơn USTH Consortium và Đại sứ quán Pháp tại Hà Nội đã tài trợ một phần cho dự án này thông qua tài trợ của dự án KH&CN hợp tác năm 2021 (LS-PT-02-IRD). Đồng thời chúng tôi cũng xin chân thành gửi lời cảm ơn đến các em sinh viên: Kiều Thị Hạnh, Dương Việt Linh, Nguyễn Văn Hiệp, Trần Phương Trang, Nguyễn Văn Anh, Ngô Lê Na đã giúp chúng tôi thực hiện thí nghiệm phân tích kiểu hình Pi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Allan AC, Hellens RP, Laing WA (2008) MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends Plant Sci* 13: 99–102.
- Brears RC (2015) The circular economy and the water-food nexus. *Futur Food J Food, Agric Soc* 3:53–59.
- Chauhan R, Awasthi S, Indoliya Y, Chauhan AS, Mishra S, Agrawal L, Srivastava S, Dwivedi S, Singh PC, Mallick S, Chauhan PS, Pande V, Chakrabarty D, Tripathi RD (2020) Transcriptome and proteome analyses reveal selenium mediated amelioration of arsenic toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). *J Hazard Mater* 390:122122.
- Gamuyao R, Chin JH, Pariasca-Tanaka J, Pesaresi P, Catausan S, Dalid C, Slamet-Loedin I, Tecson-Mendoza EM, Wissuwa M, Heuer S (2012) The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. *Nature* 488:535–539.
- Giles CD, Cade-Menun BJ, Hill JE (2011) The inositol phosphates in soils and manures: Abundance, cycling, and measurement. *Can J Soil Sci* 91:397–416.
- Herrera-Estrella L, López-Arredondo D (2016) Phosphorus: The Underrated Element for Feeding the World. *Trends Plant Sci* 21:461–463.
- Jin YM, Piao R, Yan YF, Chen M, Wang L, He H, Liu X, Gao XA, Jiang W, Lin XF (2018) Overexpression of a New Zinc Finger Protein Transcription Factor OsCTZFP8 Improves Cold Tolerance in Rice. *Int J Genomics* 2018.
- Katiyar A, Smita S, Lenka SK, Rajwanshi R, Chinnusamy V, Bansal KC (2012) Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics* 13:544–544.
- Kawahara Y, de la Bastide M, Hamilton JP, Kanamori H, Mccombie WR, Ouyang S, Schwartz DC, Tanaka T, Wu J, Zhou S, Childs KL, Davidson RM, Lin H, Quesada-Ocampo L, Vaillancourt B, Sakai H, Lee SS, Kim J, Numa H, Itoh T, Buell CR, Matsumoto T (2013) Improvement of the *oryza sativa* nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice* 6:3–10.

- Kyndt T, Denil S, Haegeman A, Trooskens G, De Meyer T, Van Criekinge W, Gheysen G (2012) Transcriptome analysis of rice mature root tissue and root tips in early development by massive parallel sequencing. *J Exp Bot* 63:2141–2157.
- Li J, Xie Y, Dai A, et al (2009) Root and shoot traits responses to phosphorus deficiency and QTL analysis at seedling stage using introgression lines of rice. *J Genet Genomics* 36:173–183.
- Li W, Liu Y, Wang J, He M, Zhou X, Yang C, Yuan C, Wang J, Chern M, Yin J, Chen W, Ma B, Wang Y, Qin P, Li S, Ronald P, Chen X (2015) The durably resistant rice cultivar Digu activates defence gene expression before the full maturation of *Magnaporthe oryzae* appressorium. *Mol Plant Pathology* 17:354–368.
- Lv W, Du B, Shangguan X, Zhao Y, Pan Y, Zhu L, He Y, He G (2014) BAC and RNA sequencing reveal the brown planthopper resistance gene BPH15 in a recombination cold spot that mediates a unique defense mechanism. *BMC Genomics* 15:1–16.
- Lynch JP (2011) Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: Tools for future crops. *Plant Physiol* 156:1041–1049.
- Mai NTP, Mai CD, Nguyen HV, Le KQ, Duong LV, Tran TA, To HTM (2021) Discovery of new genetic determinants of morphological plasticity in rice roots and shoots under phosphate starvation using GWAS. *J Plant Physiol* 257:153340.
- McClendon CL, Kornev AP, Gilson MK, Taylor SS (2014) Dynamic architecture of a protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E4623–E4631.
- Moraes de Freitas GP, Basu S, Ramegowda V, Thomas J, Benitez LC, Braga EB, Pereira A (2019) Physiological and transcriptional responses to low-temperature stress in rice genotypes at the reproductive stage. *Plant Signal Behav* 14:e1581557.
- Neto AP, Favarin JL, Hammond JP, Tezotto T, Couto HTZ (2016) Analysis of Phosphorus Use Efficiency Traits in Coffea Genotypes Reveals Coffea arabica and Coffea canephora Have Contrasting Phosphorus Uptake and Utilization Efficiencies. *Front Plant Sci* 7:408.
- Phung NTP, Mai CD, Mournet P, Frouin J, Droc G, Ta NK, Jouannic S, Lê LT, Do VN, Gantet P, Courtois B (2014) Characterization of a panel of Vietnamese rice varieties using DArT and SNP markers for association mapping purposes. *BMC Plant Biol* 14:1–16.
- Rice EW, Baird RB, Eaton AD (2017) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition. In: Am. Public Heal. Assoc. Am. Water Work. Assoc. *Water Environ. Fed.*
- Rosenberg NA, Huang L, Jewett EM, Szpiech ZA, Jankovic I, Boehnke M (2010) Genome-wide association studies in diverse populations. *Nat. Rev. Genet* 11:356–366.
- Shi X, Long Y, He F, Zhang C, Wang R, Zhang T, Wu W, Hao Z, Wang Y, Wang G-L, Ning Y (2018) The fungal pathogen *Magnaporthe oryzae* suppresses innate immunity by modulating a host potassium channel. *PLOS Pathog* 14:e1006878.
- Shimizu A, Kato K, Komatsu A, Motomura K, Ikehashi H (2008) Genetic analysis of root elongation induced by phosphorus deficiency in rice (*Oryza sativa* L.): Fine QTL mapping and multivariate analysis of related traits. *Theor Appl Genet* 117: 987-996.
- Swulius MT, Waxham MN (2008) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Cell. Mol. Life Sci* 65: 2637-2657.
- Taiz L, Zeiger E (2002) Plant physiology, 3rd edn. *Ann Bot* 91: 750-751.
- To HTM, Le KQ, Van Nguyen H, Duong LV, Kieu HT, Chu QAT, Tran TP, Mai NTP (2020) A genome-wide association study reveals the quantitative trait locus and candidate genes that regulate phosphate efficiency in a Vietnamese rice collection. *Physiol Mol Biol Plants* 26(11):2267-2281.
- Wang Z, Cole PA (2014) Catalytic mechanisms and regulation of protein kinases. *Methods Enzymol* 548:1–21.
- Wissuwa M, Kondo K, Fukuda T, Mori A, Rose MT, Pariasca-Tanaka J, Kretzschmar T, Haefele SM, Rose TJ (2015) Unmasking novel loci for internal phosphorus utilization efficiency in rice germplasm through genome-wide association analysis. *PLoS One* 10:e0124215.
- Yang WT, Baek D, Yun D-J, Lee KS, Hong SY, Bae KD, Chung YS, Kwon YS, Kim DH, Jung KH, Kim DH et al (2018) Rice OsMYB5P improves plant phosphate acquisition by regulation of phosphate transporter. *PLoS One* 13:e0194628.
- Yanhui C, Xiaoyuan Y, Kun H, Meihua L, Jigang L, Zhaofeng G, Zhiqiang L, Yunfei Z, Xiaoxiao W, Xiaoming Q, Yunping S, Li Z, Xiaohui D, Jingchu L, Xing-Wang D, Zhangliang C, Hongya G, Li-Jia Q (2006) The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: Expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol* 60:107–124.
- Yoshida S, Forno DA, Cock J (1971) Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice.
- You J, Zong W, Hu H, Li X, Xiao J, Xiong L (2014) A stress-responsive nac1-regulated protein phosphatase gene rice protein phosphatase18 modulates drought and oxidative stress tolerance through abscisic acid-independent reactive oxygen species scavenging in rice. *Plant Physiol* 166:2100–14.
- Zhou Y, Zhao D, Shuang L, Xiao D, Xuan Y, Duan Y, Chen L, Wang Y, Liu X, Fan H, Zhu X (2020) Transcriptome Analysis of Rice Roots in Response to Root-Knot Nematode Infection. *Int J Mol Sci* 21:848.

GENOME WIDE ASSOCIATION STUDIES ANALYSIS OF THE NATURAL ABILITY OF UPTAKING THE PHOSPHATE IN VIETNAMESE RICE LANDRACES

Mai Thi Phuong Nga, Le Quoc Khang, Chu Thi Quynh Anh, To Thi Mai Huong

University of Science and Technology of Hanoi, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Phosphorus is the one of the most important macro-elements for the growth, development as well as productivity of plants. However, the overuse of fertilizer negatively affects soil and water quality, and the run-out of natural phosphates (Pi). Therefore, it is necessary to study on Pi cycle and find out the way to use Pi efficiently for rice as well as other crops. In this work, genome wide association studies (GWAS) was used to investigate the diversity in uptaking phosphate of 157 Vietnamese rice cultivars in order to find genes involved in this process. Rice plants were grown in sand columns and irrigated with Yoshida nutrient medium every three days during 6 weeks. The experiment was conducted with three repetitions in a randomized complete block design. The natural ability of uptaking the phosphate was then quantified and evaluated. GWAS analysis was conducted using the Mix Linear Model that combine both kinship and population architecture of the panel with 6 Principale Component as co-factors. Results obtained from the association mapping revealed a total of 19 important single nucleotide polymorphism (SNPs), 9 quantitative trait locus (QTLs) and 22 genes. The obtained findings may provide genetic tools for the development of rice varieties which can use phosphate effectively.

Keywords: GWAS, phosphate uptake efficiency, quantitative trait locus, rice, single nucleotide polymorphism.