

NGHIÊN CỨU LIÊN KẾT TRÊN TOÀN HỆ GEN HÀM LƯỢNG SILIC TRONG THÂN CỦA CÂY LÚA

Dương Xuân Tú¹, Nguyễn Văn Tuất², Nguyễn Thị Hương¹, Lê Thị Thanh¹, Nguyễn Thị Thu¹, Phạm Thiên Thành¹, Nguyễn Thế Dương¹, Nguyễn Văn Khôi¹, Đào Trọng Nhân¹, Nguyễn Thanh Tuấn³, Simon McQueen Mason⁴, Leonardo D. Gomez⁴, Andrea Harper⁴, Caragh Whitehead⁴, Claire Halpin⁵, Robbie Waugh⁵

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, GWAS về hàm lượng silic trong thân của cây lúa dựa trên cơ sở dữ liệu kiểu gen (genotyping by sequencing - GBS) và hàm lượng silic trong thân của 170 mẫu giống lúa được tiến hành khảo sát. Kết quả GWAS đã xác định được 9 SNP nằm trên NST số 1, số 6 và số 11 với tần số alen từ 18% đến 48% có ý nghĩa tạo nên sự khác nhau về hàm lượng silic trong thân của các giống lúa. 9 gen đã được dự kiến cho hàm lượng silic trong thân của cây lúa ở các vị trí SNP tương ứng. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo để phát triển chi thị phân tử trong chọn tạo giống lúa có hàm lượng silic trong rơm rạ phù hợp

Từ khóa: Lúa, nghiên cứu trên hệ gen, Silic, SNP

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Silic đóng vai trò quan trọng đối với cây trồng, giúp cho cây sinh trưởng và phát triển bình thường, chống chịu với điều kiện môi trường bất thuận và sâu bệnh (Cooke and Leishman, 2011). Ở cây lúa, có sự khác nhau về hàm lượng silic trong rơm rạ ở các giống lúa (Ma, 2004). Từ đây đã có những nghiên cứu về di truyền kiểm soát hàm lượng silic trong các thành phần sinh khối cây lúa.

Rơm rạ của cây lúa sau khi đốt cháy còn lại khoảng 14,7% tro, trong đó SiO₂ chiếm 82% (Mohamed and Taher, 2006). Hàm lượng SiO₂ trong cây lúa khoảng 8 - 10% là đủ để cho cây lúa sinh trưởng bình thường. Để rơm rạ có thể sử dụng được nhiều hơn cho chế biến nhiên liệu sinh học và thức ăn chăn

nuôi thì yêu cầu hàm lượng silic càng thấp càng tốt. Tuy nhiên, silic là thành phần quan trọng của thành tế bào, vai trò của nó là làm cho thành tế bào cứng, như một lớp bảo vệ cho sự xâm nhập của các yếu tố gây hại cho tế bào như tia cực tím, kim loại nặng, các vi khuẩn, virus cũng như các chất độc tố. Do đó, nếu hàm lượng silic quá thấp sẽ ảnh hưởng đến sinh trưởng và khả năng chống chịu của cây lúa (Massey *et al.*, 2009).

Nghiên cứu của Dai và cộng tác viên (2008) đã xác định hàm lượng silic trong rễ, thân, lá và vỏ trấu của cây lúa có tỷ lệ đóng góp di truyền từ 14,8% đến 28,6% và đã xác định được 2 QTL trên NST số 6 liên quan đến hàm lượng silic trong vỏ trấu của hạt lúa. Bryant và cộng tác viên (2011) đã tìm ra 6 chi

¹Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm; ²Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

³Học Viện Nông nghiệp Việt Nam; ⁴Đại học York, Vương quốc Anh; ⁵Đại học Dundee, Vương quốc Anh

thị SSR trên NST số 10 có liên quan chặt với hàm lượng silic trong vỏ trấu ở cây lúa. Wu và cộng tác viên (2010) cũng đã tìm ra 3 QTL trên NST số 6 liên quan đến hàm lượng silic trong vỏ trấu của cây lúa. GWAS là một công cụ mới cho việc xây dựng bản đồ liên kết các QTL kiểm soát các tính trạng trên toàn hệ gen với sự tiếp cận kiểu gen và kiểu hình mức phân giải cao (Alqudah *et al.*, 2019). Nhóm tác giả Juan và cộng tác viên (2018) đã ứng dụng GWAS tìm ra được các QTL kiểm soát các tính trạng quan trọng như thời gian sinh trưởng, chiều cao cây, số bông trên cây, số hạt trên bông và độ dài bông của 193 mẫu giống lúa thuộc loài phụ *Japonica*. Đối với nhóm giống lúa *Indica*, cũng đã có những ứng dụng thành công GWAS để xác định các QTL kiểm soát các tính trạng quan trọng của cây lúa (Huang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2019).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đưa ra kết quả GWAS về hàm lượng silic trong thân của 170 mẫu giống lúa. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở để phát triển chỉ thị phân tử cho chọn giống lúa với hàm lượng silic được kiểm soát.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

170 mẫu giống lúa, bao gồm các giống lúa trồng phổ biến ở Việt Nam, các giống lúa bản địa và các dòng lúa mới chọn tạo. Các mẫu giống lúa được gieo trồng tại Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm, được thu mẫu ADN từ lá non trong vụ Xuân 2016 cho giải trình tự kiểu gen GBS và thu mẫu thân cây trong vụ Xuân và vụ Mùa 2017.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Gieo trồng 170 mẫu giống lúa trên đồng ruộng: Được bố trí theo khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh, 5 lần nhắc lại, diện tích ô là 5m², mật độ 45 cây/m². Kỹ thuật gieo trồng được áp dụng theo qui trình của Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm.

Tách chiết ADN cho giải trình tự kiểu gen: Mẫu lá lúa được thu ở tại thời điểm 30 ngày tuổi để tách chiết ADN, 2g/cây. Sử dụng bộ kit DNeasy Plant Mini Kit and DNeasy Plant Maxi Kit Handbook 08/2000 để tách chiết.

Thu mẫu thân cây: Thu thân của 10 cây mẫu trong mỗi ô thí nghiệm ngay sau khi thu hoạch hạt ở giai đoạn chín 90%; thu phần thân cây từ đốt thứ 2 tính từ mặt đất, loại bỏ đốt mang bông và lá. Các mẫu thân cây được sấy khô đến khối lượng không đổi, sau đó gửi sang đại học York (Vương Quốc Anh) cho phân tích.

Phân tích hàm lượng silic: Được thực hiện tại đại học York, Vương Quốc Anh. Mẫu được nghiền nhỏ, ép thành các viên tròn, đẹt. Sử dụng máy chiếu tia X có kết nối với máy tính để xác định hàm lượng silic.

Giải trình tự kiểu gen (GBS): Được thực hiện trên Illumina platform tại đại học Cornell (Mỹ), theo phương pháp được miêu tả bởi Elshire và cộng tác viên (2011). Số liệu sau giải trình tự được xử lý theo Tassel 3.0 (Glaubitz *et al.*, 2014).

Phân tích GWAS và dự kiến các QTL/gen: GWAS dựa trên dữ liệu GBS và hàm lượng silic trong thân của 170 mẫu giống lúa theo phần mềm TASSEL (Bradbury *et al.*, 2007); Dự kiến các gen dựa vào MSU rice database (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) và cơ sở dữ liệu nguồn gen cây lúa (Wang *et al.*, 2018).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 01 năm 2016 đến tháng 12 năm 2019. Gieo trồng, tách chiết ADN và thu mẫu rom rạ của 170 mẫu giống lúa được thực hiện tại Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm. Phân tích hàm lượng silic, phân tích GWAS được thực hiện tại Đại học York và Đại học Dundee Vương Quốc Anh

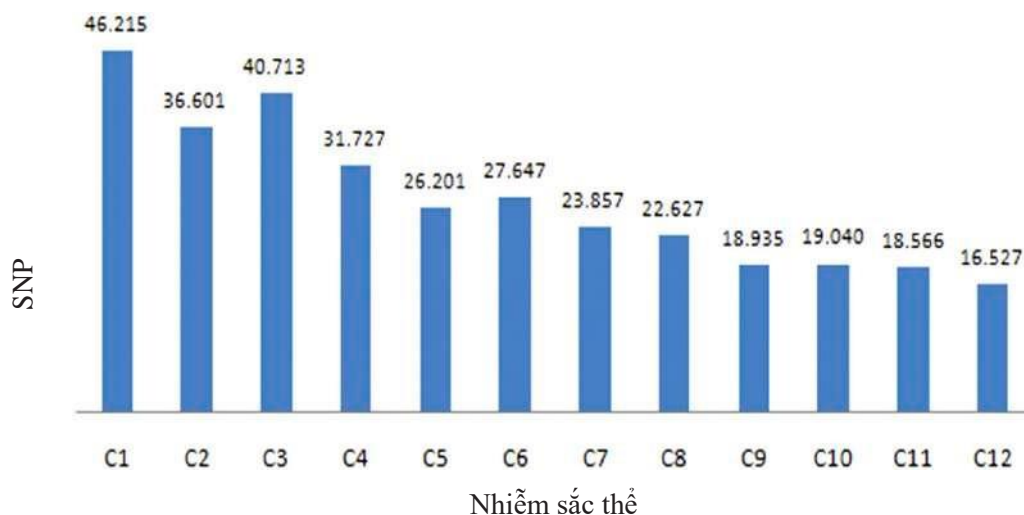
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Giải trình tự kiểu gen (GBS) của 170 mẫu giống lúa

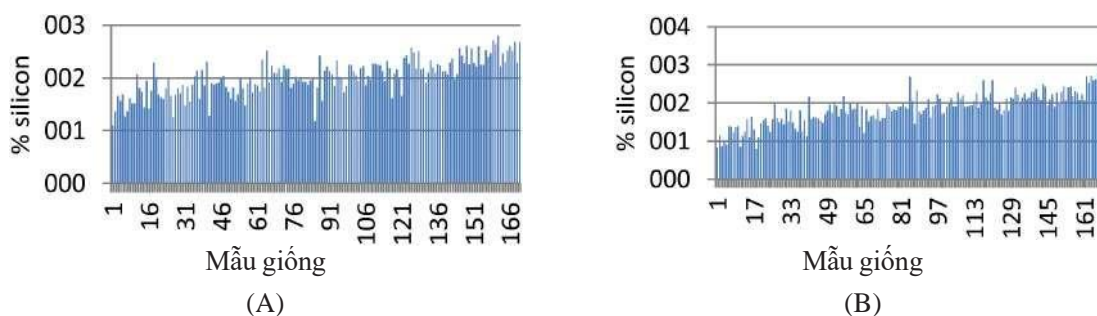
Kết quả giải trình tự kiểu gen (GBS) của 170 mẫu giống lúa đã thu được tổng số 328.656 SNP trên 12 NST với mật độ trung bình là 1 SNP/1kb trên hệ gen (Hình 1).

3.2. Hàm lượng silic trong thân cây của 170 mẫu giống lúa

Hàm lượng silic trong thân của các mẫu giống thu trong vụ Xuân 2017 biến động từ 1,1% (giống Khâu Mu Nương) đến 2,68% (giống BB4-10). Mẫu thân cây thu trong vụ Mùa 2017 có sự biến động về hàm lượng silic từ 0,83% (giống Khâu Mu Nương) đến 3,1% (giống BB4-11) (Hình 2). Sự khác nhau về hàm lượng silic trong thân của các mẫu giống trong cùng điều kiện canh tác, thể hiện rất rõ ở nhóm có hàm lượng silic trong thân thấp và nhóm cao (Bảng 1). Kết quả phân tích này đã góp phần khẳng định về tính trạng hàm lượng silic trong thân cây lúa được kiểm soát bởi di truyền. Điều này cũng phù hợp với các nghiên cứu đã công bố về di truyền tính trạng hàm lượng silic trong thân, lá và rễ của cây lúa (Dai *et al.*, 2008; Bryant *et al.*, 2011).



Hình 1. Số lượng các SNP được tìm ra trên 170 mẫu giống lúa nghiên cứu



Hình 2. Hàm lượng Silic trong thân của 170 mẫu giống lúa: (A) các mẫu được thu hoạch trong vụ Xuân 2017; (B) các mẫu được thu trong vụ Mùa 2017

Bảng 1. Danh sách mẫu giống có hàm lượng silic trong thân thấp nhất và cao nhất

TT	Tên giống	Hàm lượng silic trong thân (%)			TT	Tên giống	Hàm lượng silic trong thân (%)		
		Vụ Xuân 2017	Vụ Mùa 2018	Trung bình			Vụ Xuân 2017	Vụ Mùa 2018	Trung bình
<i>Nhóm mẫu giống có hàm lượng Silic trong thân thấp nhất</i>					<i>Nhóm mẫu giống có hàm lượng Silic trong thân cao nhất</i>				
1	Khâu munuong	1,10	0,83	0,96	1	BB5-154	2,21	2,70	2,45
2	IR76346	1,37	1,15	1,26	2	CL8/AC5	2,46	2,53	2,49
3	Khâu mumoong	1,66	0,87	1,26	3	OM2517	2,30	2,71	2,51
4	U17	1,57	0,99	1,28	4	Jasmin/AC5	2,52	2,59	2,56
5	Nếp pước chia	1,69	0,91	1,30	5	1094-1	2,61	2,61	2,61
6	Pẹ ngừng	1,27	1,39	1,33	6	Nếp đỏ đuôi trâu	2,51	2,78	2,65
7	AC5/149-13	1,37	1,37	1,37	7	Quế thơm	2,68	2,68	2,68
8	Lúa nương-2	1,61	1,22	1,42	8	BB4-11	2,29	3,10	2,69
9	Tẻ ka chăm pi	1,52	1,36	1,44	9	BB4-10	2,68	2,91	2,79

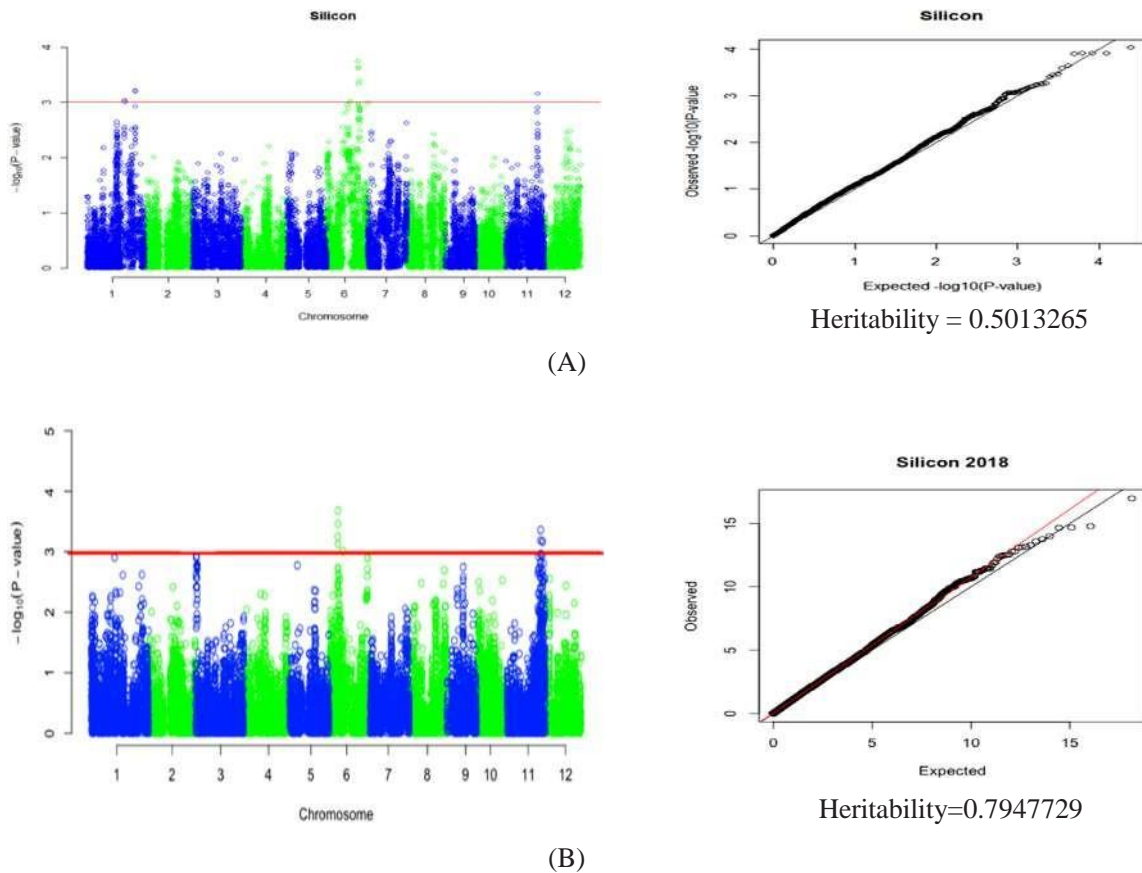
3.3. GWAS tính trạng hàm lượng silic trong thân của cây lúa

GWAS được thực hiện trên dữ liệu GBS thu được gồm 328.656 SNP và kết quả phân tích hàm lượng

silic trong thân của 170 mẫu giống lúa trong vụ Xuân 2017 và vụ Mùa 2017 (Hình 3). Hàm lượng silic trong thân của các mẫu giống lúa có hệ số di truyền là tương đối lớn (từ 0,5013 - 0,7948), thể hiện được

kiểm soát bởi di truyền. Tại giá trị $\text{Log}_{10}(\text{P-value}) \geq 3$ chúng tôi đã thu được 9 SNPs trong liên kết không cân bằng có ý nghĩa ở mức $P < 0,001$ với

tần số alen từ 18% đến 48% tạo nên sự khác nhau về hàm lượng silic trong thân của các giống lúa (Bảng 2).



Hình 3. GWAS hàm lượng silic trong thân của của 170 mẫu giống lúa. (A) mẫu rom rạ được thu trong vụ Xuân 2017; (B) Mẫu rom rạ được thu trong vụ Mùa 2017

3.4. Dự kiến các gen kiểm soát hàm lượng silic trong thân của cây lúa

Dự kiến các gen tại các vùng QTL được lựa chọn dựa vào MSU rice database (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) và từ “Genomic variation in 3,010 diverse

accessions of Asian cultivated rice” (Wang *et al.*, 2018). Tại 9 SNP trong liên kết không cân bằng ở mức có ý nghĩa đã được tìm ra từ kết quả GWAS, chúng tôi đã dự kiến được 9 gen ứng viên (candidate genes) trên các NST số 1, số 6 và số 11 (Bảng 2).

Bảng 2. Các SNP trong liên kết không cân bằng và các gen dự kiến về tính trạng hàm lượng silic trong thân cây lúa được tình ra trên toàn hệ gen

TT	Nhiễm sắc thể	Vị trí SNP	Alen chính	Alen thay thế	Tần xuất alen thay thế (%)	Gen ứng viên (candidate genes)
1	1	36166940	C	T	41	LOC_Os01g62480
2	1	36270423	A	T	18	LOC_Os01g62640
3	6	23205192	C	G	27	LOC_Os06g39080
4	6	23338130	T	C	29	LOC_Os06g39390
5	6	23441394	A	G	33	LOC_Os06g39470
6	11	23845567	T	A	28	LOC_Os11g39990
7	11	23866428	C	G	32	LOC_Os11g40030
8	11	23944833	C	T	48	LOC_Os11g40150
9	11	23983620	G	A	40	LOC_Os11g40210

Kết quả nghiên cứu của Dai và cộng tác viên (2008) đã công bố có 2 QTL là *qHUS-1-1* và *qHUS-1-2* nằm trong vị trí RM587 - RM6119 trên NST số 6 liên quan đến hàm lượng silic trong cây lúa. Tác giả Wu và cộng tác viên (2010) cũng đã công bố 3 QTL liên quan hàm silic ở cây lúa là *qHUS6-1* trong vị trí RM510 - RM19417, *qHUS6-2* trong vị trí RM19706 - RM19795 và *qHUS6-2b* trong vị trí RM314 - RM19665. Trong nghiên cứu này, các gen LOC_Os06g39080, LOC_Os06g39390 và LOC_Os06g39470 trên NST số 6 cũng được dự kiến kiểm soát hàm lượng silic trong thân của cây lúa.

IV. KẾT LUẬN

Có sự khác nhau về hàm lượng silic trong thân của các mẫu giống lúa trong cùng điều kiện canh tác và thời vụ. Tỷ lệ silic trong thân của giống cao nhất so với của giống thấp nhất là từ 2,43 lần đến 3,73 lần. Kết quả GWAS đã đưa ra hệ số tương quan di truyền về hàm lượng silic trong thân cây của các mẫu giống lúa nghiên cứu là từ 0,501 đến 0,794. Kết quả GWAS cũng đã xác định được 9 SNP trong liên kết không cân bằng ở mức có ý nghĩa tạo nên sự khác biệt về hàm lượng silic trong thân của cây lúa. Tại vị trí của các SNP này, 9 candidate gen đã được xác định trong các vùng QTL liên quan đến hàm lượng silica trong thân của cây lúa. Kết quả nghiên cứu này là quan trọng cho các nghiên cứu tiếp theo để phát triển chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa có hàm lượng silic trong rơm rạ được kiểm soát.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi chân thành cảm ơn sự đóng góp của các tác giả thuộc Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm, Đại học York và Đại học Dundee của Vương Quốc Anh trong sự phối hợp thực hiện đề tài “Nghiên cứu phát triển các nguồn gen lúa thích ứng với biến đổi khí hậu”, Bộ Khoa học và Công nghệ (MOST) và Quỹ Newton (Newton Fund) đã cấp kinh phí cho chúng tôi thực hiện Đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alqudah A, Sallam A, Baenziger PS and Andreas Börner, 2019. GWAS: Fast-forwarding gene identification and characterization in temperate Cereals: lessons from Barley - A review. *Journal of Advance Research*, 22: 119-135

Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y and Buckler ES, 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23(19): 2633-2635

Bryant A., A. Proctor, M. Hawkrigde, A. Jackson, K. Yeater, P. Counce, W. Yan, A. McClung and R. Fjellstrom, 2011. Genetic variation and association mapping of silica concentration in rice hulls using a germplasm collection. *Genetica*, 139: 1383-1398.

Cooke, J. and Leishman, M. R., 2011. Is plant ecology more siliceous than we realise. *Trend in Plant Science*, 16(2): 61-68.

Dai Wei-Min, Ke-Qin Zhang, Ji-Rong Wu, Lei Wang, Bin-Wu Duan, Kang-Le Zheng, Run Cai and Jie-Yun Zhuang, 2008. Validating a segment on the short arm of chromosome 6 responsible for genetic variation in the hull silicon content and yield traits of rice. *Euphytica*, 160: 317-324.

Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K and Buckler ES, 2011. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS ONE*, 6(5): e19379.

Glaubitz JC, Casstevens TM, Lu F, Harriman J, Elshire RJ and Sun Q, 2014. TASSEL-GBS: A High Capacity Genotyping by Sequencing Analysis Pipeline. *PLoS ONE*, 9(2): e90346

Huang X, Wei X, Sang T, Zhao Q, Feng Q, Zhao Y, Li C, Zhu C, Lu T, Zhang Z, Li M, Fan D, Guo Y, Wang A, Wang L, Deng L, Li W, Lu Y, Weng Q, Liu K, Huang T, Zhou T, Jing Y, Li W, Lin Z, Buckler ES, Qian Q, Zhang QF, Li J and Han B, 2010. Genomewide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. *Nat Genet*, 42:961-967.

Juan L Reig-Valiente, Luis Marqués, Manuel Talón and Concha Domingo, 2018. Genome-wide association study of agronomic traits in rice cultivated in temperate regions. *BMC Genomics*, 19:706. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5086-y>

Ma, J.F., 2004. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(1): 11-18.

Massey, F.P., Massey, K., Ennos, A.R. & Hartley, S.E., 2009. Impacts of silica-based defences in grasses on the feeding preferences of sheep. *Basic and Applied Ecology*, 10: 622-630.

Mohamed A. EI-Sayed and Taher M. EI-Samni, 2006. Physical and Chemical Properties of Rice Straw Ash and Its Effect on the Cement Paste Produced from Different Cement Types. *J. King Saud Univ.*, 19(I): 21-30.

Wang W., Mauleon R., Hu Z., Tai S., Wu Z., Li M., Zheng T., Fuentes RR., Zhang F, Mansueto L., Copetti D., Sanciango M., Palis KC., Xu J., Sun C., Fu B., Zhang H., Gao Y., Zhao X., Shen F., Cui X., Yu H., Li Z., Chen M., Detras J., Zhou Y., Zhang

X., Zhao Y., Kudrna D., Wang C., Li R., Jia B., Lu J., He X., Dong Z., Xu J., Li Y., Wang M., Shi J., Li J., Zhang D., Lee S., Hu W., Poliakov A., Dubchak I., Ulat VJ., Borja FN., Mendoza JR., Ali J., Li J., Gao Q., Niu Y., Yue Z., Naredo MEB., Talag J., Wang X., Li J., Fang X., Yin Y., Glaszmann JC., Zhang J., Li J., Hamilton RS., Wing RA., Ruan J., Zhang G., Wei C., Alexandrov N., McNally KL., Li Z. And Leung H., 2018. Genomic variation in 3,010 diverse accessions of Asian cultivated rice. *Nature*, 557: 43-49.

Wu Ji Jong, Fang Jun Fan, Jing Hong Du, Ye Yang Fan and Jie Yun Zhuang, 2010. Dissection of QTLs for Hull Silicon Content on the Short Arm of Rice Chromosome 6. *Rice Science*, 17: 99-104. [https://doi.org/10.1016/S1672-6308\(08\)60111-0](https://doi.org/10.1016/S1672-6308(08)60111-0).

Zhang Peng, Kaizhen Zhong, Zhengzheng Zhong and Hanhua Tong, 2019. Genome-wide association study of important agronomic traits within a core collection of rice (*Oryza sativa L.*). *BMC Plant Biology*, 19: 259. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1842-7>.

Genome wide association study (GWAS) for silica content in rice stem

Duong Xuan Tu, Nguyen Van Tuat, Nguyen Thi Huong, Le Thi Thanh, Nguyen Thi Thu, Pham Thien Thanh, Nguyen The Duong, Nguyen Văn Khoi, Dao Trong Nhan, Nguyen Thanh Tuan, Simon McQueen Mason, Leonardo D. Gomez, Andrea Harper, Caragh Whitehead, Claire Halpin, Robbie Waugh

Abstract

In this study, GWAS for silica content was investigated in the stem of 170 rice accessions collected in Vietnam. In the GBS result, a total of 328,656 SNPs stored in HapMap on 12 chromosomes was obtained. The silica content in the stems of 170 rice accession ranged from 1.1% to 2.68% (for samples harvested in the Spring season) and from 0.83% to 3.1% (for samples harvested in the Summer season). The results of GWAS for silica content in the stems of 170 rice accessions, at $\text{Log}_{10}(\text{P-value}) \geq 3$ with significant $P < 0.001$ showed that 9 SNPs on Ch.1, Ch.6 and Ch.11 were identified with the frequency of minor allele from 18% to 48% in the LD causing trait difference. Based on the position of SNPs peak, 9 candidate genes for silica content in rice stem were identified, including LOC_Os01g62480, LOC_Os01g62640, LOC_Os06g39080, LOC_Os06g39390, LOC_Os06g39470, LOC_Os11g39990, LOC_Os11g40030, LOC_Os11g40150 and LOC_Os11g40210. These candidate genes can be used for further research to develop molecular markers in rice breeding with the traits of silica content and to detect genes for silica content in rice stem.

Keywords: Genome-wide association study, linkage disequilibrium, rice, silica

Ngày nhận bài: 09/7/2020
Ngày phản biện: 17/7/2020

Người phản biện: PGS. TS. Trần Đăng Khánh
Ngày duyệt đăng: 23/7/2020