



# **Nghiên cứu chức năng của một số gen liên quan đến sự phát triển bộ rễ lúa và xác định QTL liên quan đến khả năng chịu hạn, mặn ở bộ giống lúa Việt Nam**

**TS. Hoàng Thị Giang**

Phòng thí nghiệm Việt – Pháp LMI RICE-2, Viện Di truyền Nông nghiệp (AGI)

Hà Nội, 10/03/2017

# XUẤT XỨ

PHÒNG THÍ NGHIỆM HỢP TÁC VIỆT – PHÁP NGHIÊN CỨU CHỨC NĂNG GEN,  
CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC VẬT VÀ SỰ TƯƠNG TÁC VỚI VI SINH VẬT



LMI Rice Functional Genomics and Plant Biotechnology

UMR DIADE  
IRD/UM2 

Vietnamese Rice Diversity  
in collaboration with  
the PRC (VAAS)

Education  
Master/Doctorate

**USTH**

Dept. Biotech/Pharmaco  
Plant Biotechnology

*Rice Panicle and  
Root Branching*



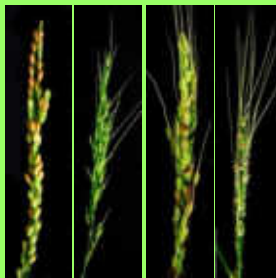
LMI  
RICE GENOMICS

**New projects:**

- Aquaporines (BPMP)
- Xanthomonas (RPB)
- Magnaporatae (BGPI)

AGI  
(VAAS)

PPRI  
(VAAS)



*Rice virus and  
nematode  
interactions*

**International  
Collaborations**

- CIRAD, IRRI, CIAT, CNRS
- AfricaRice,
- GRiSP  
(Global Rice  
Science Partnership)
- PPR SELTAR  
etc



UMR RPB  
IRD/UM2/CIRAD

ERASMUS  
MUNDUS  
PANACEA

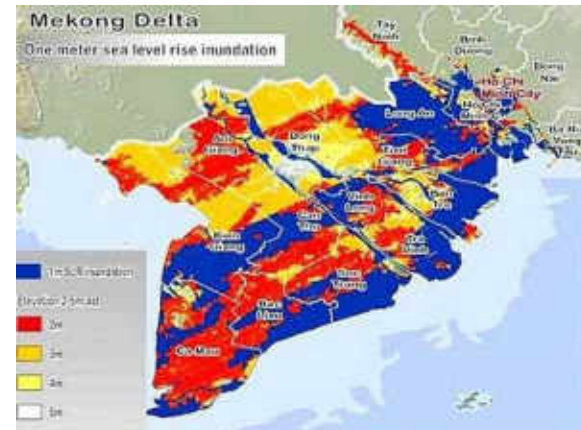
# GIỚI THIỆU



Oryza sativa



Cảnh khô hạn ở Trung bộ và Tây Nguyên năm 2015



Bản đồ các vùng chịu ảnh hưởng nước biển dâng ở ĐBSCL

([http://khoa hoc.tv/sukien/su-kien/35745\\_chia-se-thong-tin-ve-bien-doi-khi-hau.aspx](http://khoa hoc.tv/sukien/su-kien/35745_chia-se-thong-tin-ve-bien-doi-khi-hau.aspx))

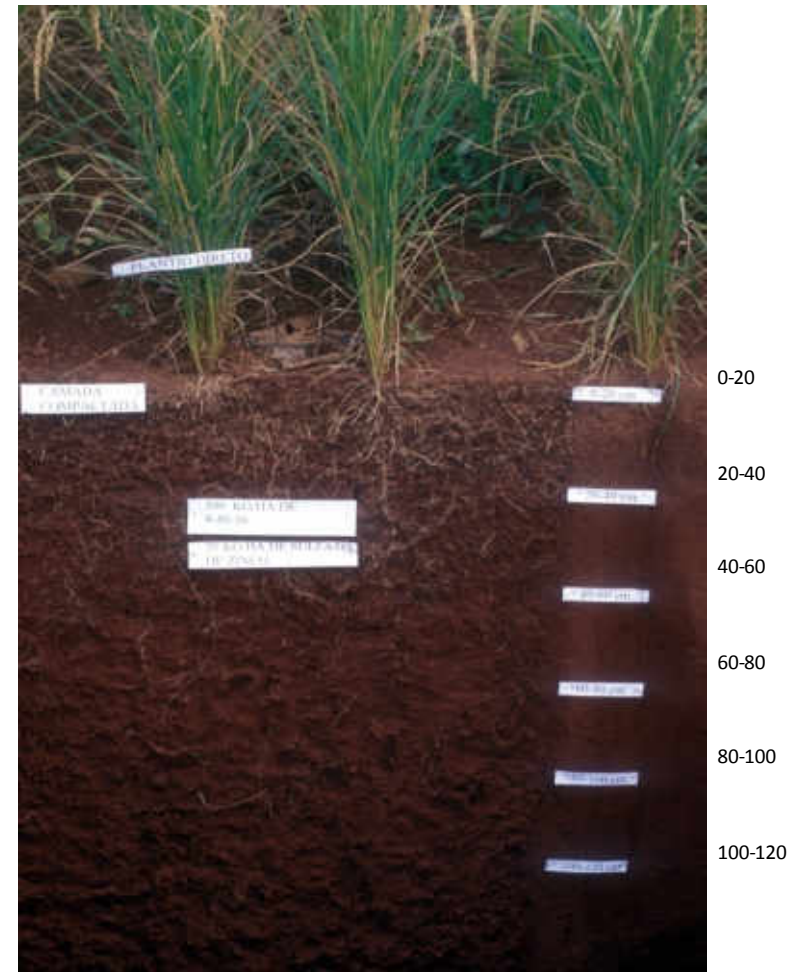


Chọn tạo giống chống chịu hạn, mặn ???



# Tầm quan trọng của việc nghiên cứu sự phát triển rễ lúa

- Giữ vai trò thiết yếu trong việc hấp thu nước và muối khoáng từ đất
- Đóng vai trò quan trọng để cây trồng có thể đạt được năng suất cao
- Độ ăn sâu và phân nhánh của bộ rễ = Tính trạng quan trọng nhất giúp thực vật khỏi bị hạn hán



Root development

Water transport

QTL detection

## Phát hiện các gen mới tham gia vào sự phát triển rễ lúa

- ➔ Do bộ rễ phát triển dưới đất, khó quan sát nên không được chú trọng trong chương trình chọn tạo giống
- ➔ Do gặp khó khăn trong việc quan sát các tính trạng của hệ rễ nên phương pháp chọn giống MAS là công cụ gián tiếp nhưng thực sự mang lại hiệu quả
- ➔ Mới chỉ có một vài gen hay QTL quy định sự phát triển rễ được nghiên cứu ở các cây ngũ cốc
- ➔ Xác định được các gen liên quan đến cấu trúc và chức năng bộ rễ và khả năng chịu hạn, mặn của cây lúa

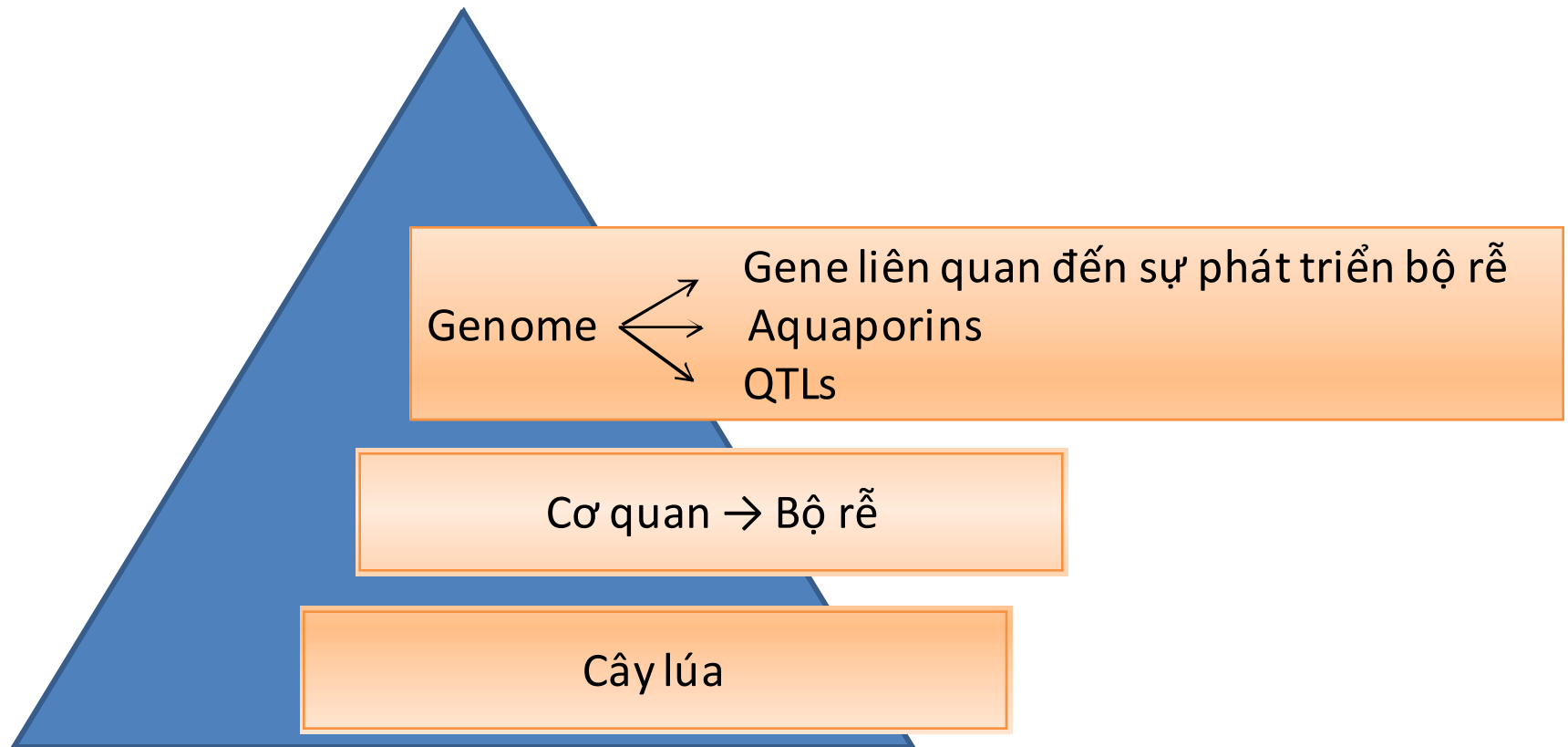


Root development

Water transport

QTL detection

# ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU



➔ Làm sáng tỏ các cơ chế tham gia vào sự phát triển rễ, tính chống chịu hạn, mặn

➔ Phát hiện các gen mới phục vụ công tác chọn tạo giống lúa dựa vào sự phát triển bộ rễ, khả năng chịu hạn, chịu mặn

## MỤC TIÊU

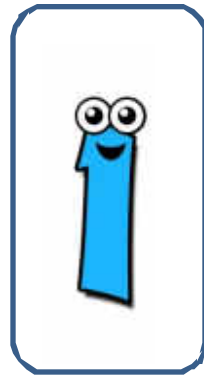
■ **Mục tiêu chung:** Xác định được một số gen liên quan đến cấu trúc và chức năng bộ rễ và phát hiện QTL liên quan đến khả năng chịu hạn, mặn của bộ giống lúa Việt Nam.

■ **Mục tiêu cụ thể:**

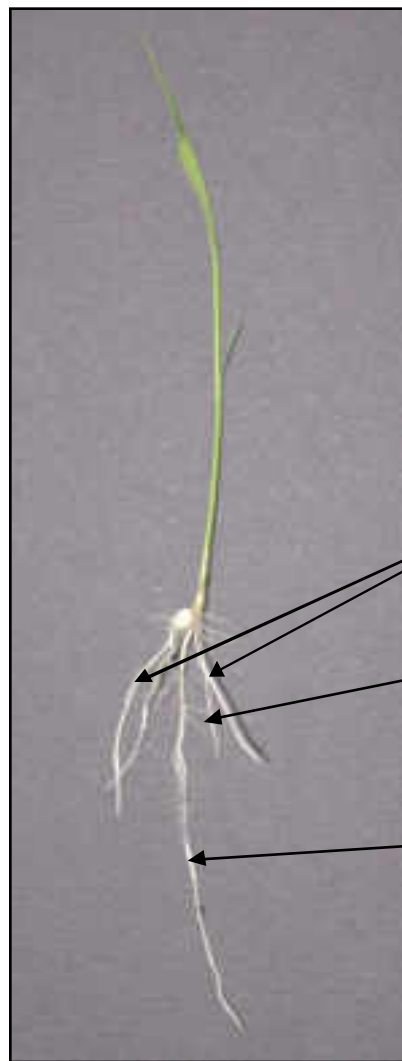
- (i) Xác định chức năng của một số gen tham gia vào sự phát triển bộ rễ lúa.
- (ii) Xác định vai trò của các gen mã hóa aquaporin với khả năng điều tiết áp suất thẩm thấu ở rễ lúa.
- (iii) Xác định QTLs liên quan đến cấu trúc bộ rễ, khả năng chịu hạn, chịu mặn và duy trì năng suất trong điều kiện hạn ở bộ giống lúa Việt Nam.



**XÁC ĐỊNH CHỨC NĂNG CỦA MỘT SỐ GEN THAM GIA VÀO SỰ  
PHÁT TRIỂN BỘ RỄ LÚA**



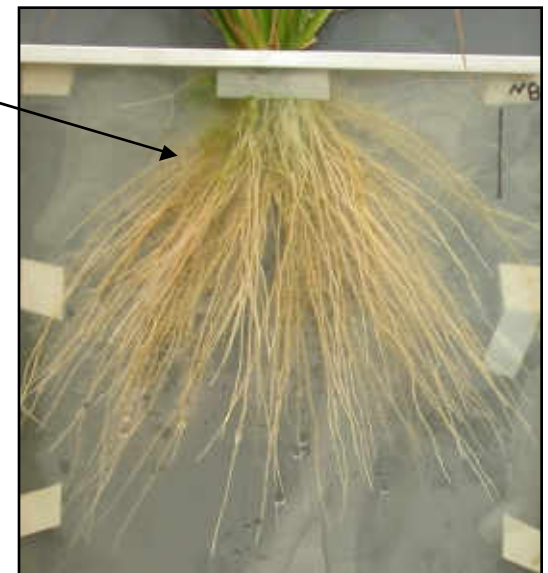
# Cấu trúc hệ rễ lúa



**Rễ phụ**  
(crown roots)

**Rễ bên**  
(lateral roots)

**Rễ chính**  
(seminal roots)



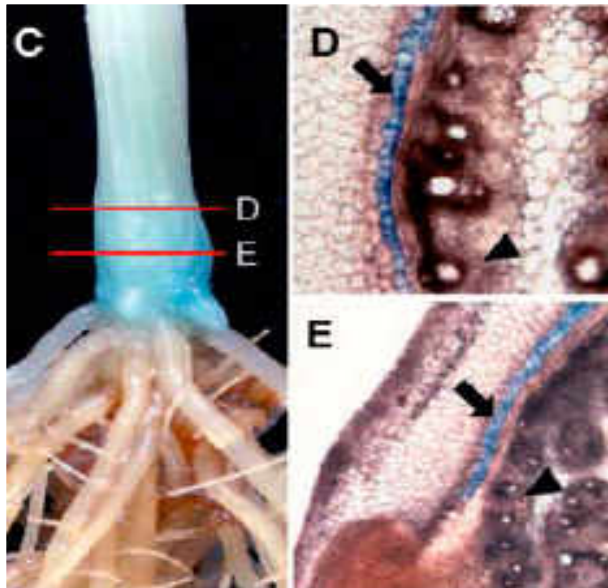
*Pascal Gantet, LMI RICE, Hanoi, 5 Sept 2012*

Root development

Water transport

QTL detection

# CROWN ROOTLESS1 (*cr1*) - gen mã hóa yếu tố phiên mã LBD/LOB điều khiển sự phát sinh rễ phụ ở cây lúa



*proCRL1::GUS*

***CRL1* biểu hiện ở vùng phát sinh rễ phụ**

Liu et al., *Plant J* 2005  
Inukai et al., *Plant Cell* 2005 (*GUS* staining)



Crown root primordia

WT

*crown rootless1*

**Cr1**

**Thể đột biến không có rễ phụ**

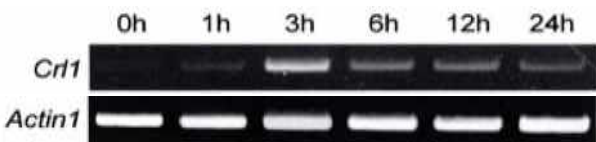
Root development

Water transport

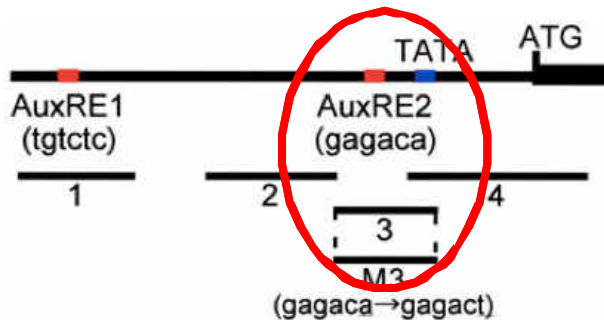
QTL detection

# CRL1 là gen đáp ứng rất sớm với auxin

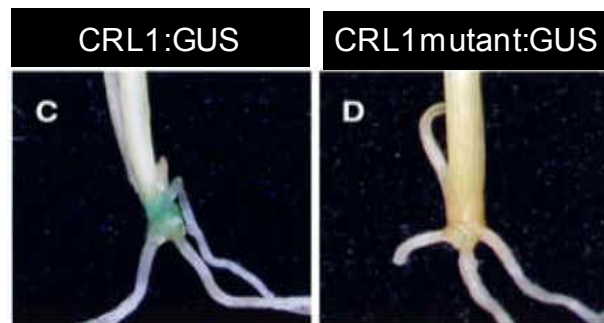
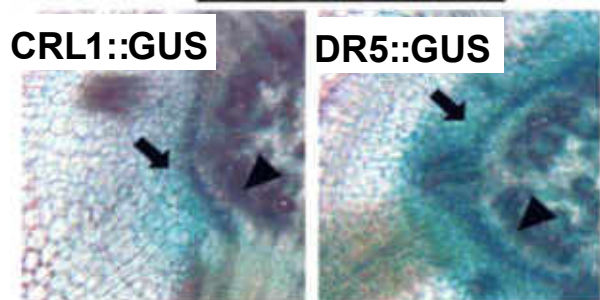
RT\_PCR *cr1*: Auxin kích hoạt biểu hiện của gen *Crl1*



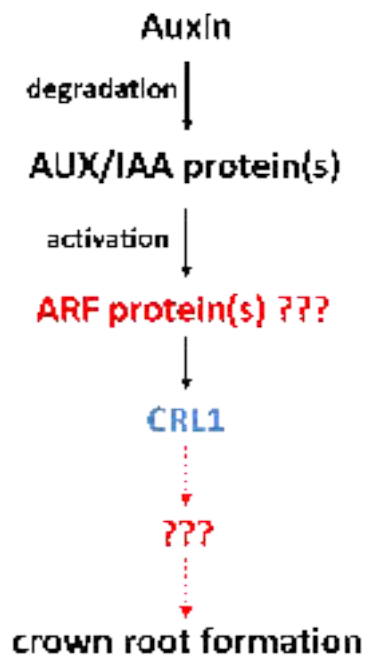
*OsARF1* bám vào AuxRE2 ở thí nghiệm *in vitro*



*CRL1* biểu hiện ở vùng đáp ứng tín hiệu của auxin



AuxRE2 cần thiết cho sự biểu hiện của gen *Crl1* *in vivo*



Inukai, 2005

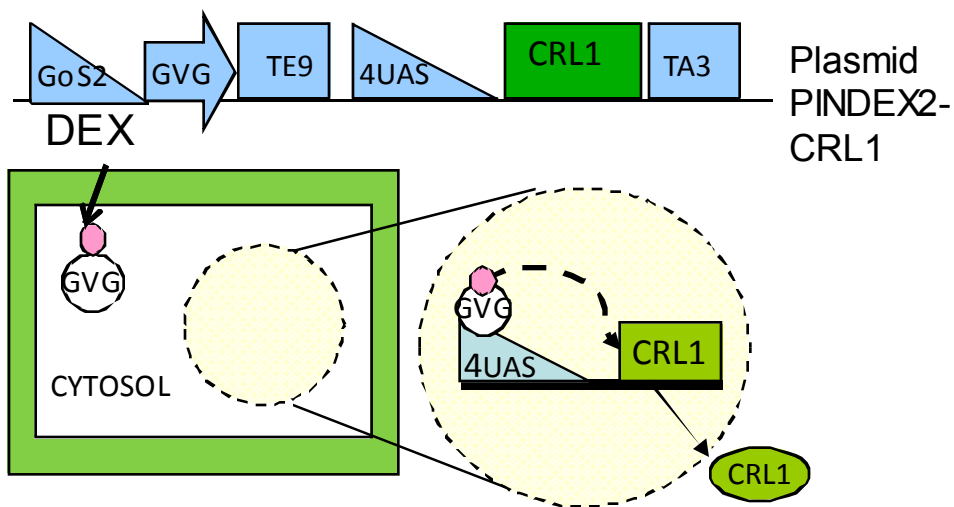
→ *Crl1* được điều khiển trực tiếp bởi auxin

Root development

Water transport

QTL detection

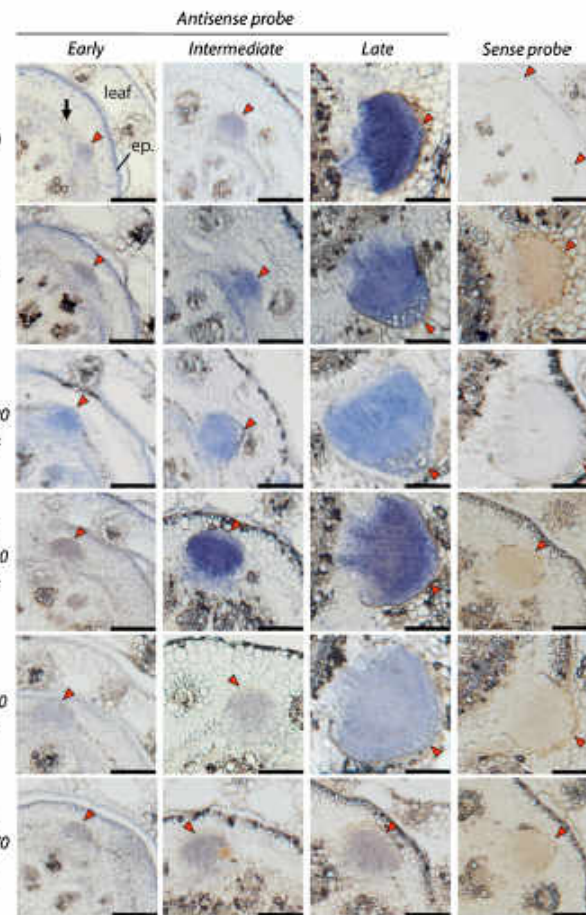
# Mạng lưới điều hòa gen liên quan với CRL1



277 gen điều hòa bởi CRL1  
(4-7% là gen mã hóa TF)

The validation by  
q-RT-PCR

Lai tại chỗ để tìm gen biểu hiện  
tại mô phân sinh bên của rễ



**Xác định các triển vọng được điều hòa bởi gen *crl1* liên quan đến sự phát triển rễ???**

Root development

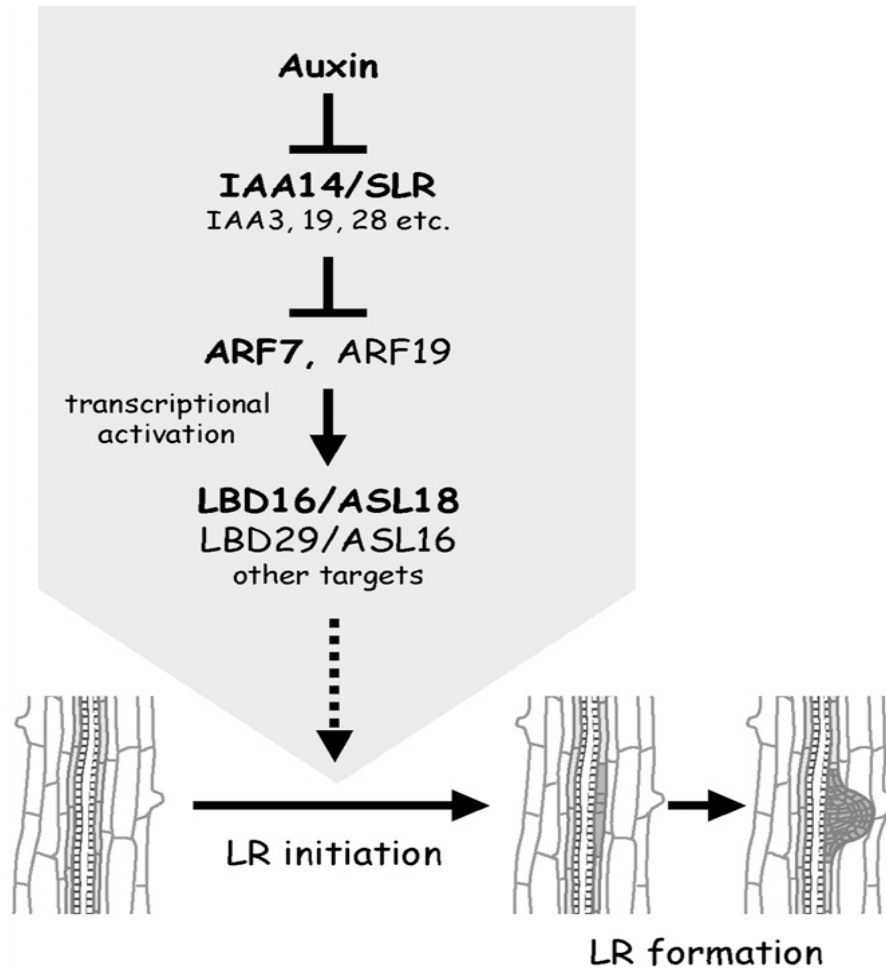
Water transport

QTL detection



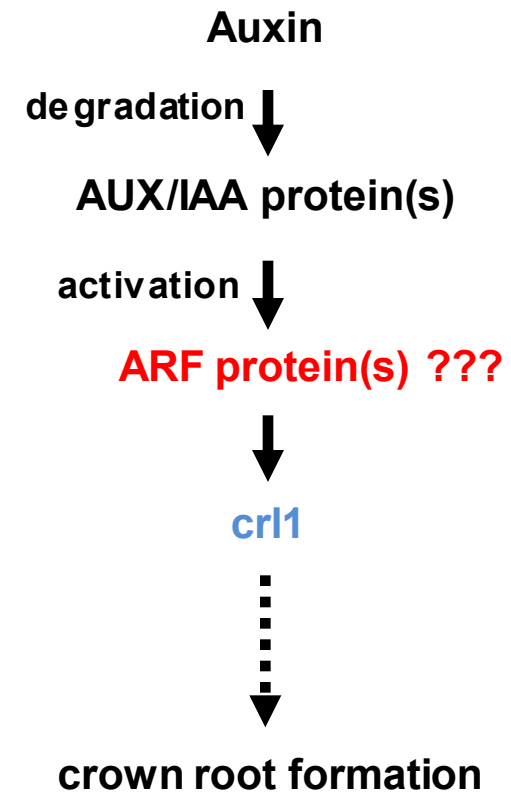
# Sự tương đồng trong cơ chế hình thành rễ bên ở cây *Arabidopsis thaliana* và rễ phụ ở cây lúa

## *Arabidopsis thaliana*



Okushima et al., *Plant Cell* 2007

## *Oryza sativa*



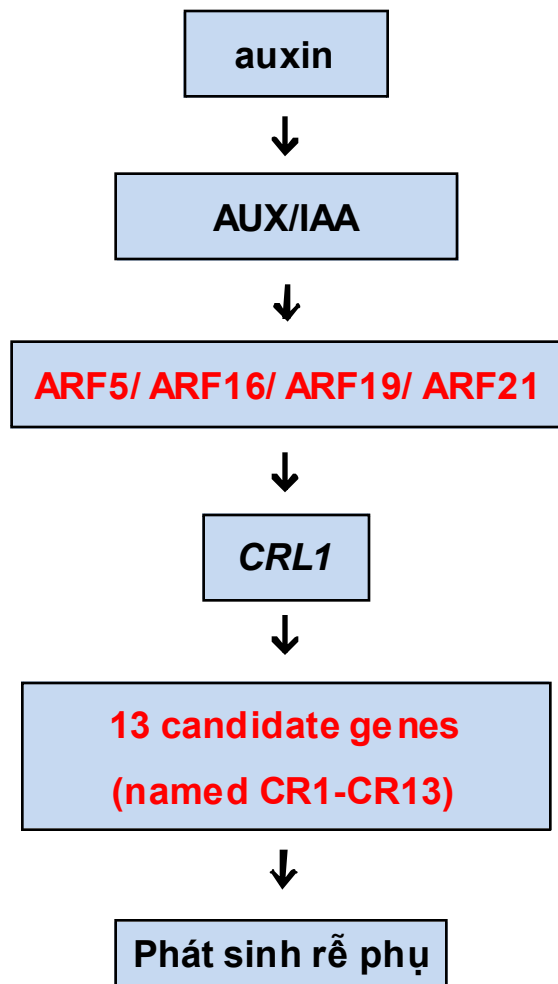
Inukai et al., *Plant Cell* 2005

Root development

Water transport

QTL detection

# Potential candidates:



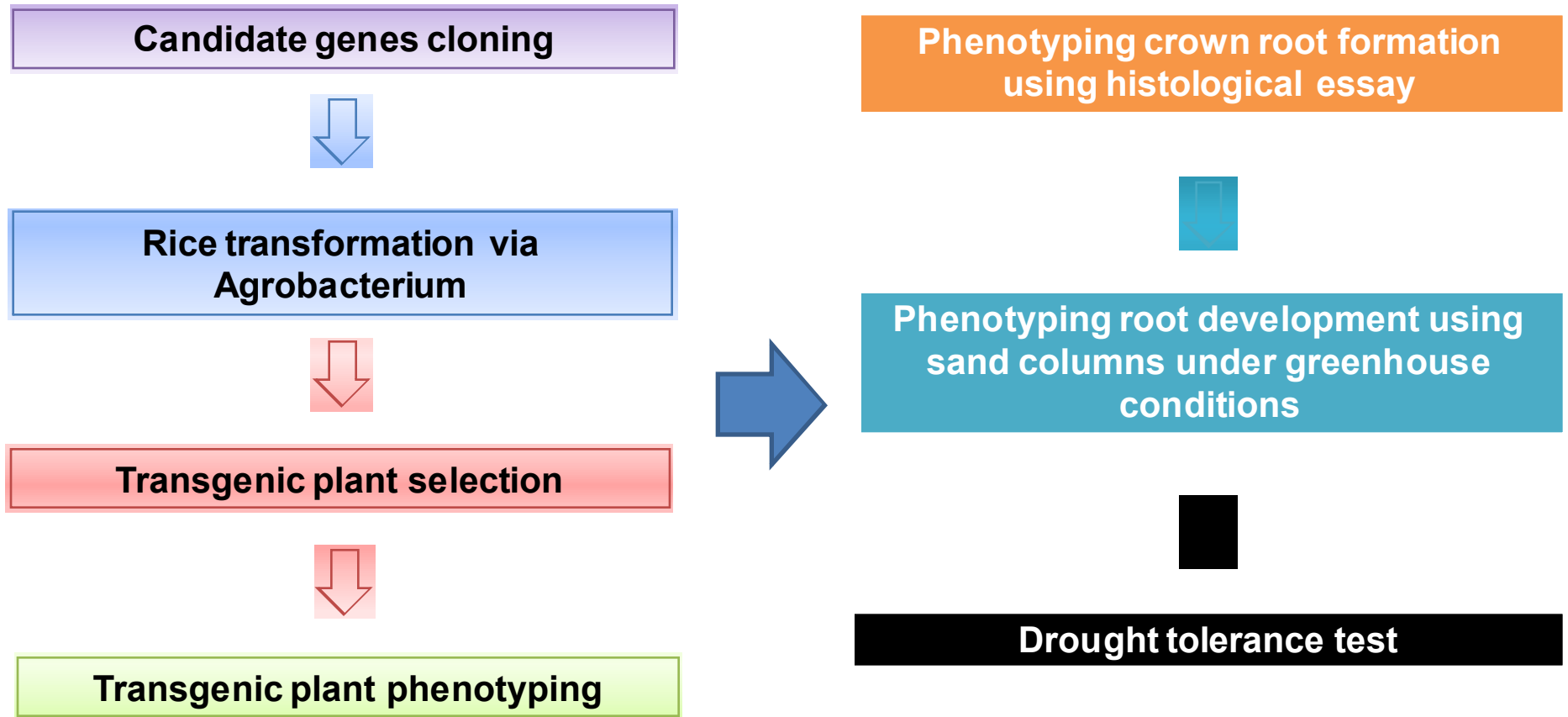
CR genes	Putative function
CR1	Rho-GTPase-activating protein-related
CR2	N2, N2-dimethylguanosine tRNA
CR3	Homeobox associated leucine zipper
CR4	Nodulin MtN3 family protein
CR5	Endonuclease/exonuclease/phosphatase family domain containing
CR6	E2F family transcription factor
CR7	Dof zinc finger domain containing
CR8	MYB family transcription factor
CR9	Transposon protein
CR10	Homeobox and START domains
CR11	Homeobox domain containing protein
CR12	Helix-loop-helix DNA-binding protein
CR13	AP2 domain containing protein

Root development

Water transport

QTL detection

# Sơ đồ thí nghiệm nghiên cứu chức năng gen rễ

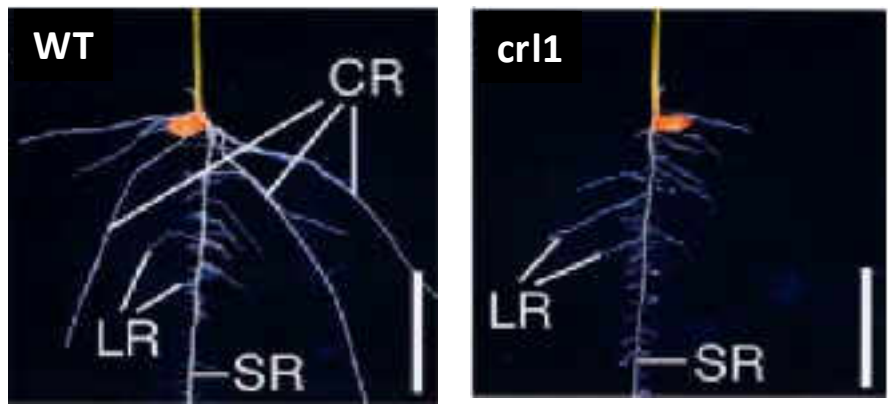
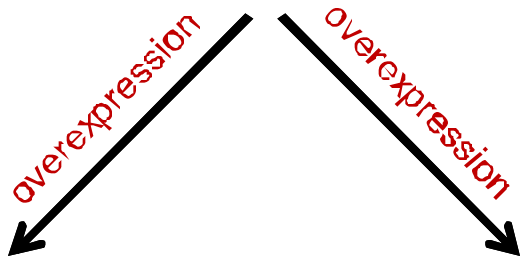


Root development

Water transport

QTL detection

13 CRL1-regulated candidate genes

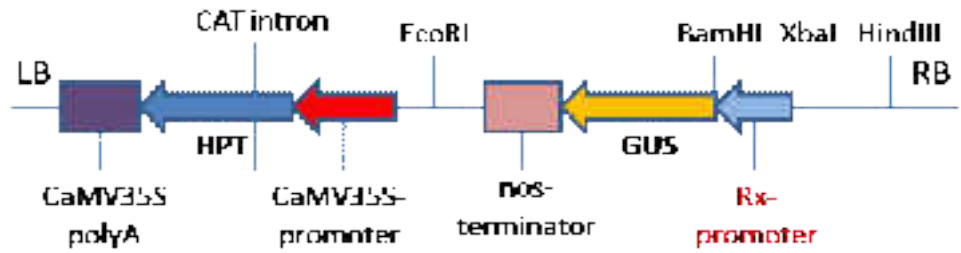


What CR genes affect the development of crown roots when overexpressed in WT and/or *crl1* mutant background???

Expression patterns of candidate genes



Use of promoter :: GUS construction



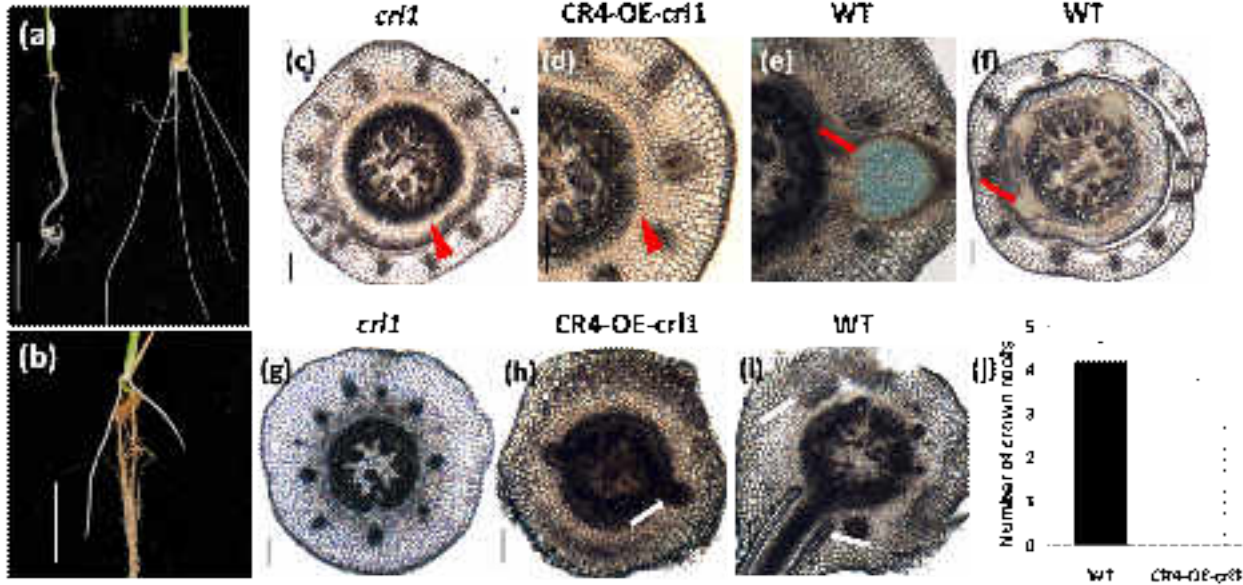
What candidate genes are expressed in crown root primordia???

Root development

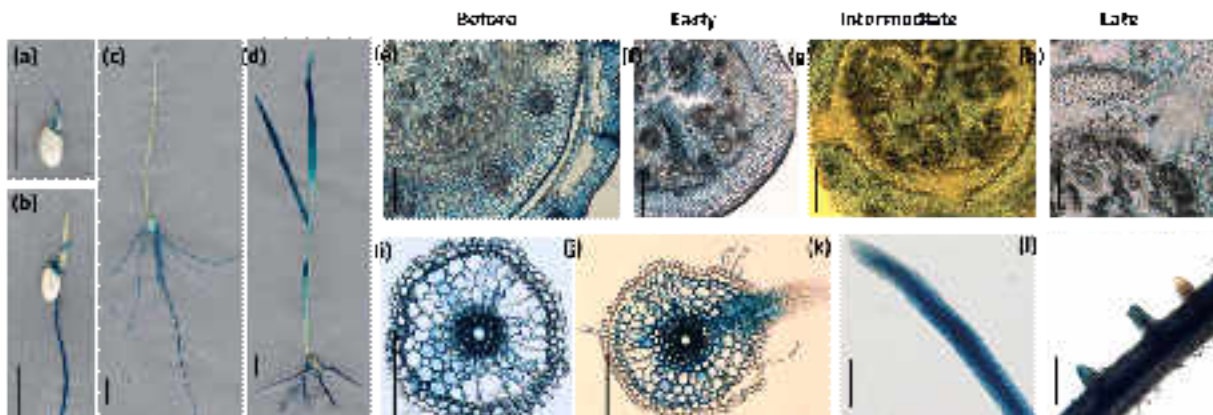
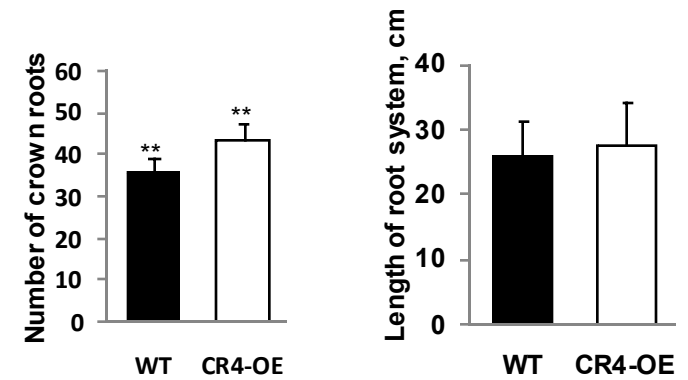
Water transport

QTL detection

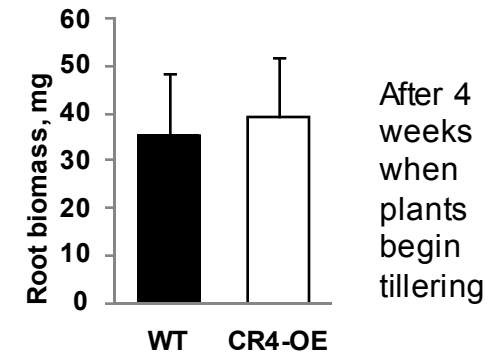
# Ex: Characterization of CR4 gene regulated by CRL1 and involved in crown root formation



CR4 overexpression restores crown root formation in *cr11* mutant



CR4 is expressed in shoot and roots



CR4 overexpression enhances crown root number



**XÁC ĐỊNH VAI TRÒ CỦA CÁC GEN MÃ HÓA AQUAPORIN VỚI KHẢ  
NĂNG ĐIỀU TIẾT ÁP SUẤT THẨM THẤU Ở RỄ LÚA**



# Mô hình vận chuyển nước

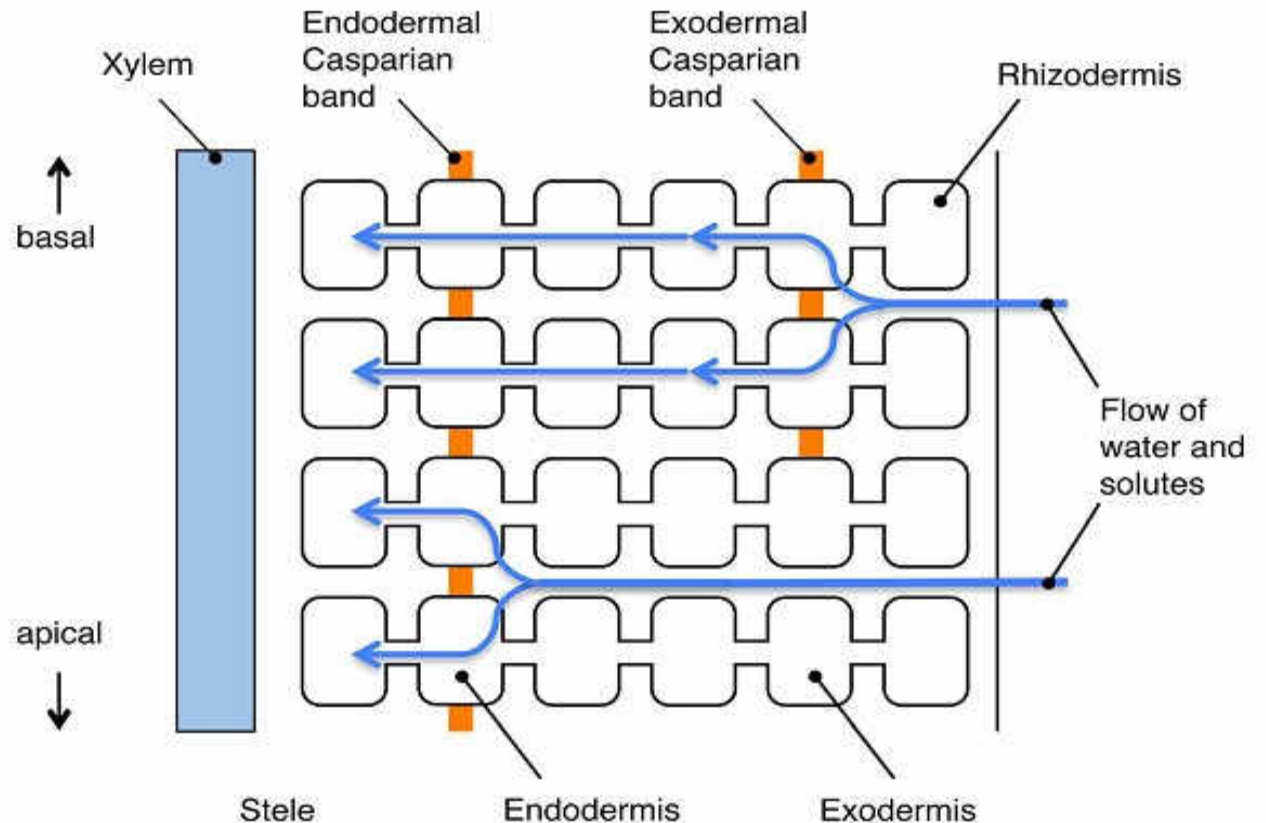
Nước được vận chuyển qua:

- Mạch dẫn

- Qua các tế bào sống:

+ Con đường apoplast

+ Con đường qua các tế bào



*Horie et al., 2012*

**Vai trò của con đường qua các tế bào trong sự vận chuyển nước ở cây lúa ???**

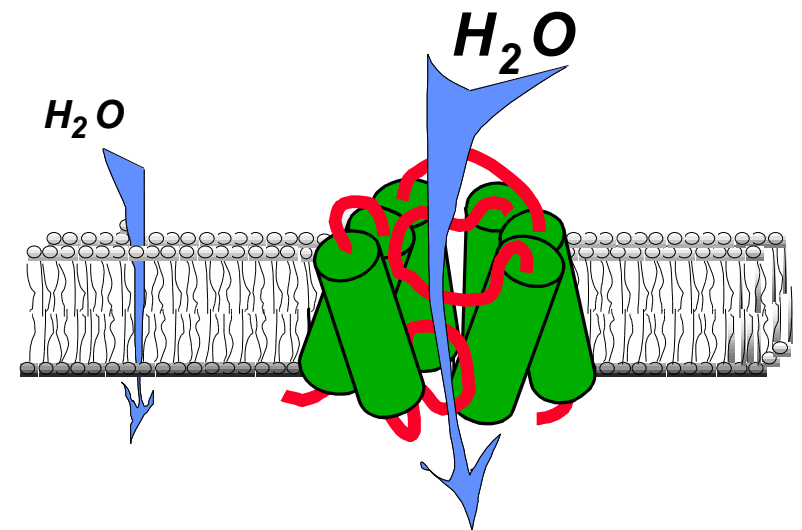
# Aquaporins

- Aquaporins – là các protein màng – thúc đẩy quá trình vận chuyển nước theo phương thức thụ động qua màng sinh học – là yếu tố chủ yếu điều chỉnh sự di chuyển nước qua các tế bào
- Phân loại aquaporins:
  - ▶ PIPs – Plasma membrane intrinsic proteins
  - ▶ TIPs – Tonoplast membrane intrinsic proteins
  - ▶ NIPs – Nod26-like intrinsic proteins
  - ▶ SIPs – Small basic intrinsic proteins
  - ▶ XIPs – X intrinsic proteins
- Cây lúa: 33 gen aquaporin

## **Oryza sativa L. cv. Nippobare**

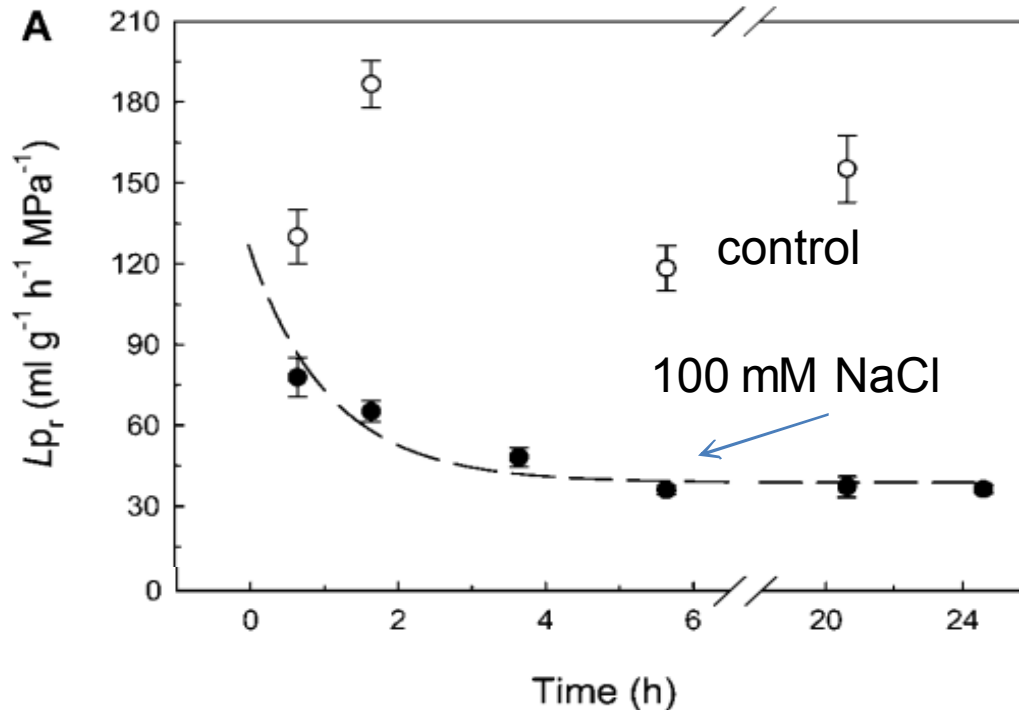
11 PIPs, 10 TIPs, 10 NIPs và 2 SIPs

(Sakurai et al., 2005)

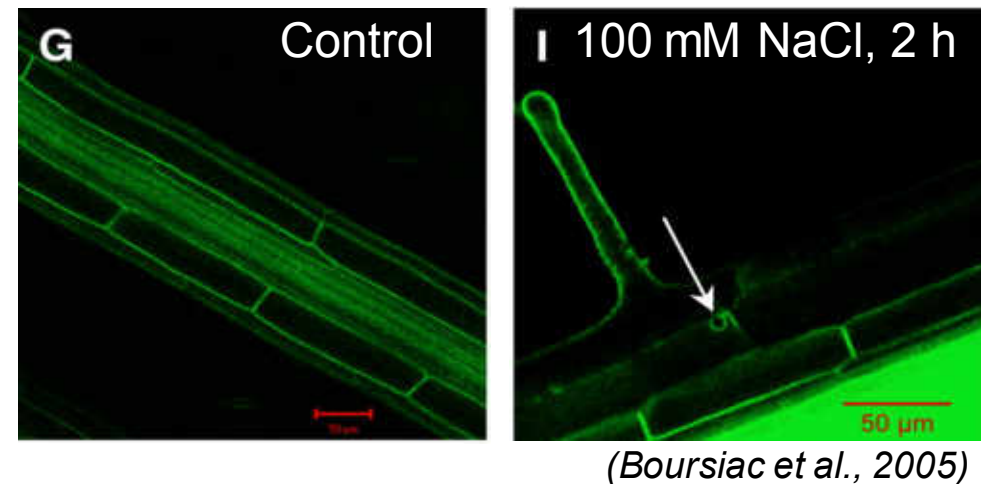


# Ảnh hưởng của độ mặn đến sự điều hòa của aquaporin ở rễ cây *Arabidopsis*

Đo hệ số thấm ( $L_{p_r}$ ) khi xử lý muối

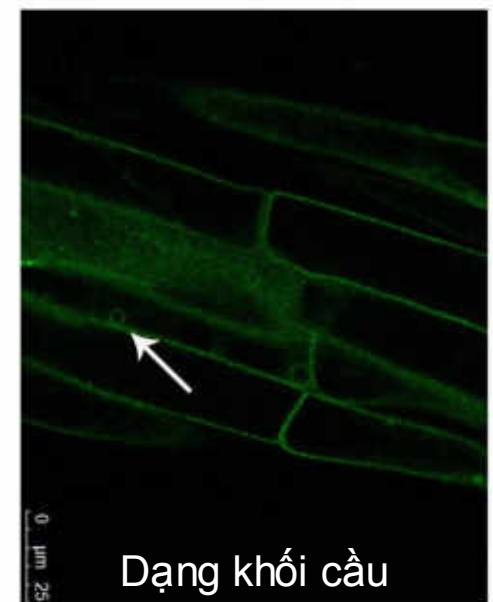
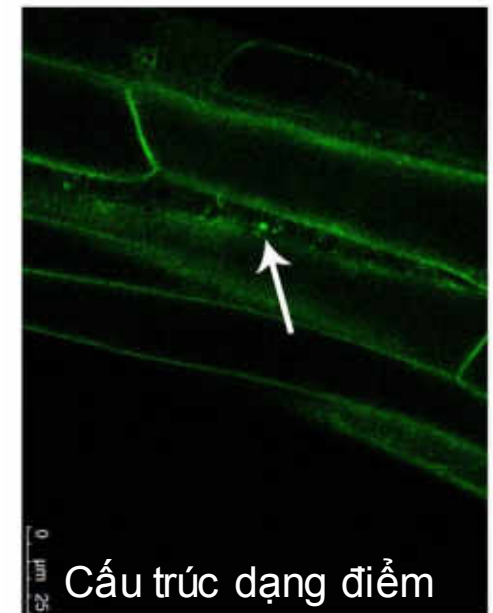
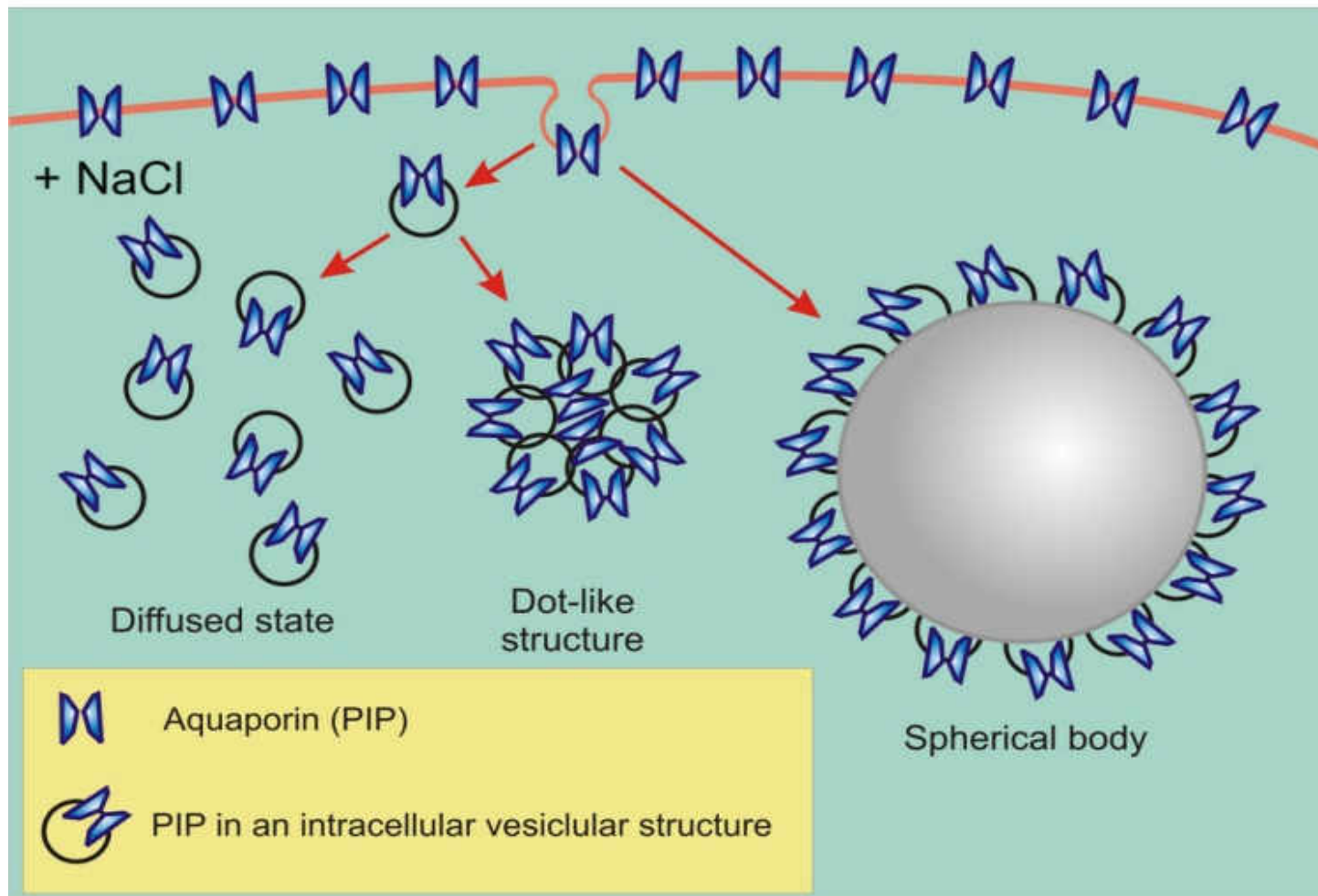


Rễ cây *Arabidopsis* khi xử lý muối  
(AtPIP2;1-GFP)



- Muối làm giảm nhanh hệ số thấm  $L_{p_r}$  ở cây *Arabidopsis*
- Có mối liên hệ giữa việc hệ số thấm  $L_{p_r}$  bị giảm với hiện tượng tái định vị của aquaporins

## Sự tái định vị (relocalization) của aquaporins từ màng sinh chất



Root development

Water transport

QTL detection

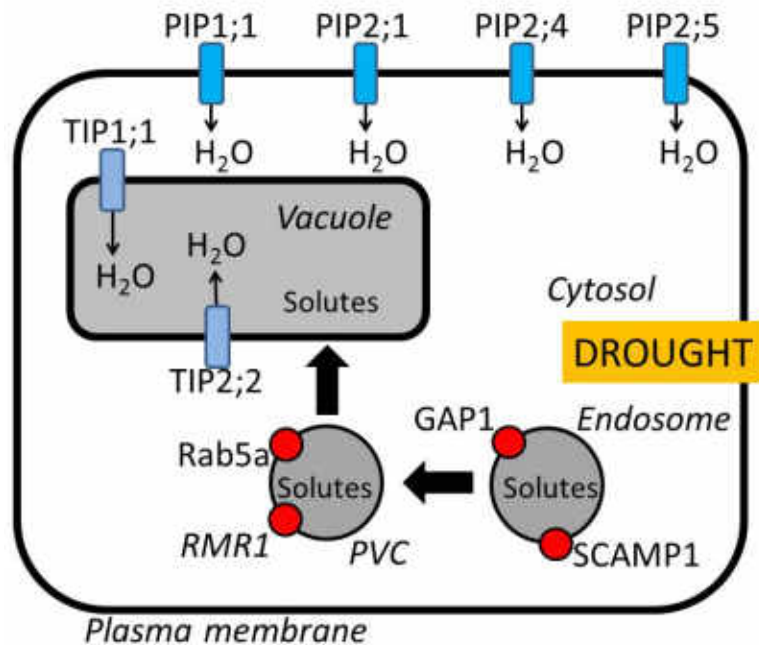


# Potential candidates:

Over-expression of proteins suspected to be involved in:

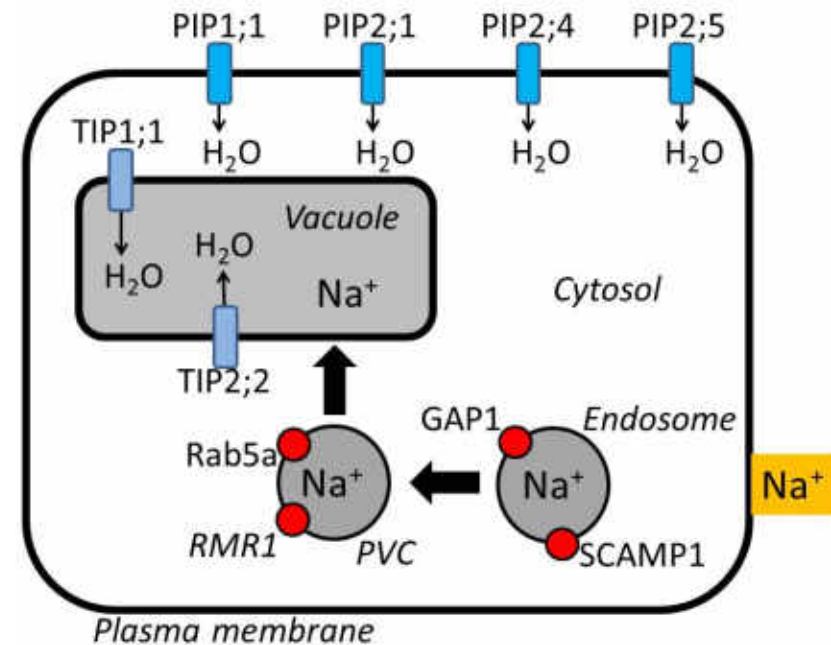
## 1. Osmotic adjustment:

OsPIP1;1, OsPIP2;1, OsPIP2;4, OsPIP2;5, OsTIP1;1, OsTIP2;2



## 2. Membrane trafficking:

OsRab5a, OsRMR1, OsGAP1, OsCAMP1



# Nghiên cứu chức năng của các gen aquaporins

Thiết kế vector

Biến nạp gen vào cây lúa

Chọn lọc các dòng lúa chuyển gen

LSCM – Rễ - Control/NaCl/Hạn

*CaMV35Sx2::OsPIP1;1-GFP*   *OsPIP2;1-GFP*  
*OsPIP2;4-GFP*  
*OsPIP2;5-GFP*

*CaMV35Sx2::OsRab5-mCherry*  
*OsGAP1-mCherry*  
*OsRMR1-mCherry*  
*OsSCAMP1-mCherry*  
*OsNST1-mCherry*  
*OsTIP1;1-mCherry*  
*OsTIP2;2-mCherry*

- Is there any relocalization of OsPIPs upon salt/drought compared to control?
- In which subcellular compartments are aquaporins relocalized?

**XÁC ĐỊNH QTLs LIÊN QUAN ĐẾN CẤU TRÚC BỘ RỄ, KHẢ NĂNG  
CHỊU HẠN, CHỊU MẶN VÀ DUY TRÌ NĂNG SUẤT TRONG ĐIỀU  
KIỆN HẠN Ở BỘ GIỐNG LÚA VIỆT NAM**



# Nghiên cứu đa dạng di truyền của bộ giống lúa bản địa Việt Nam



Phenotyping năm 2011 tại PRC

**270 accessions**  
**Độ đa dạng cao, gồm các giống đại diện cho các nhóm lúa khác nhau**



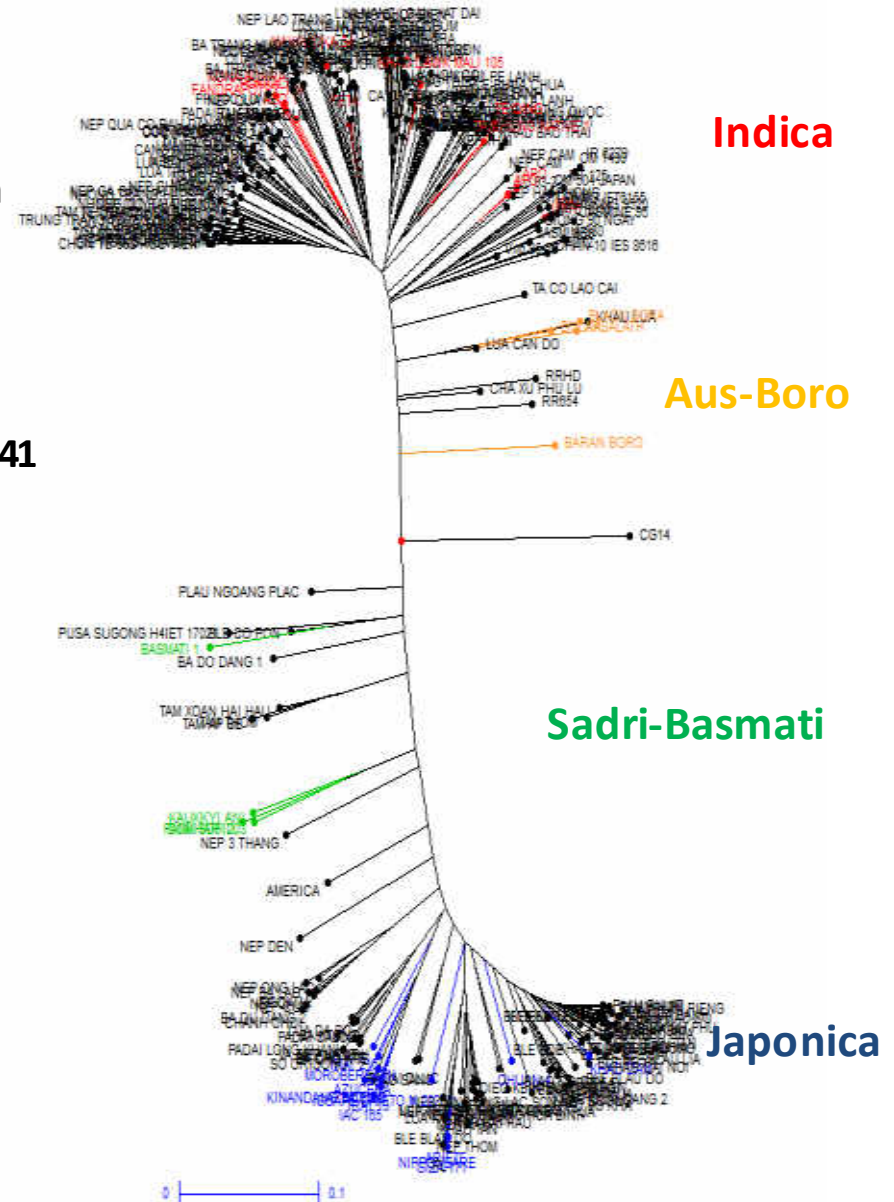
**Phân tích microarray bằng 241 chỉ thị DArT**



**Chọn được một bộ gồm 185 giống phục vụ cho nghiên cứu**

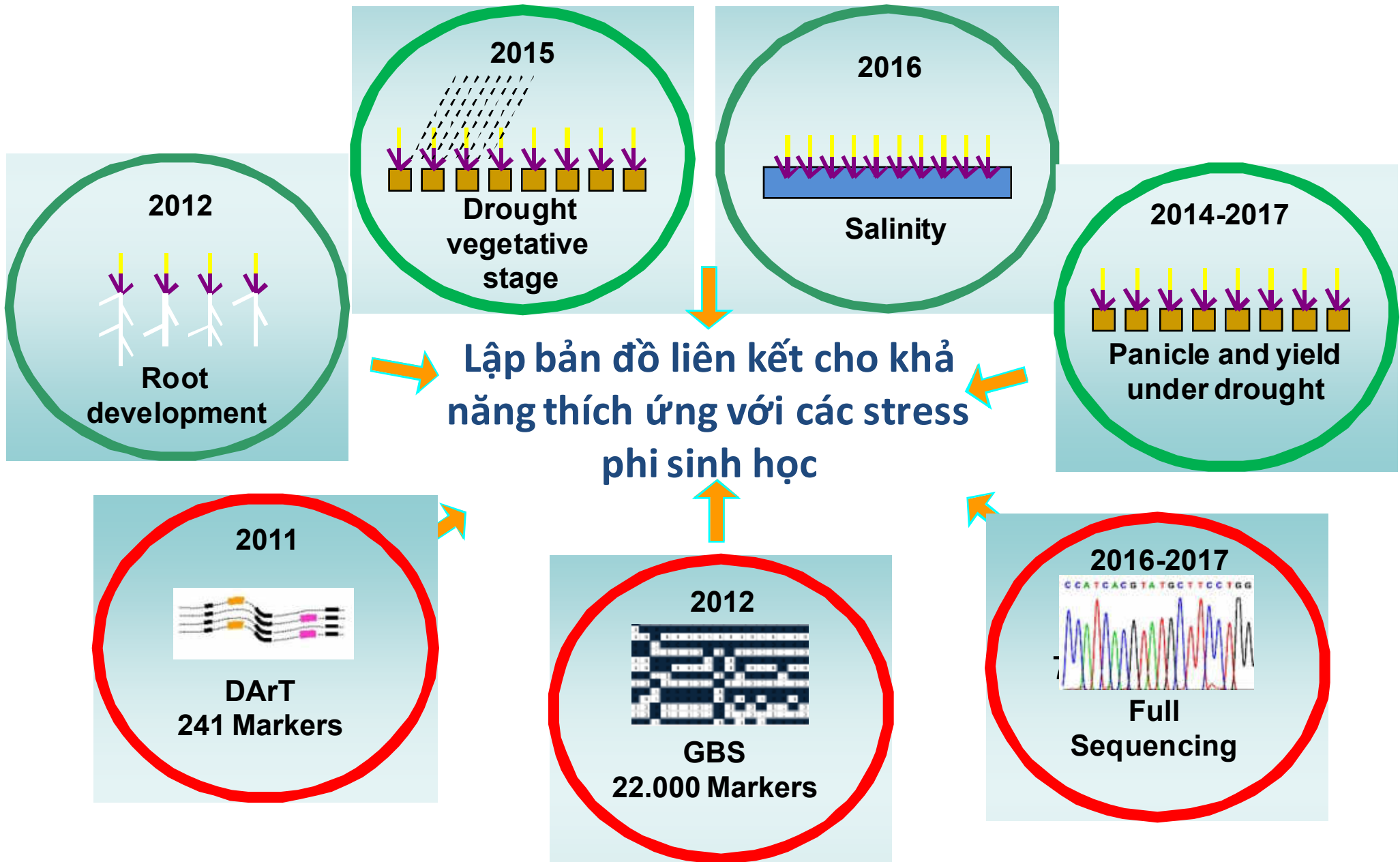


**Genotyping 185 giống bằng 21,623 SNP**



Phùng Thị Phương Nhung, LMI RICE, Sept 2014

# Nghiên cứu di truyền liên kết của bộ giống lúa bản địa Việt Nam

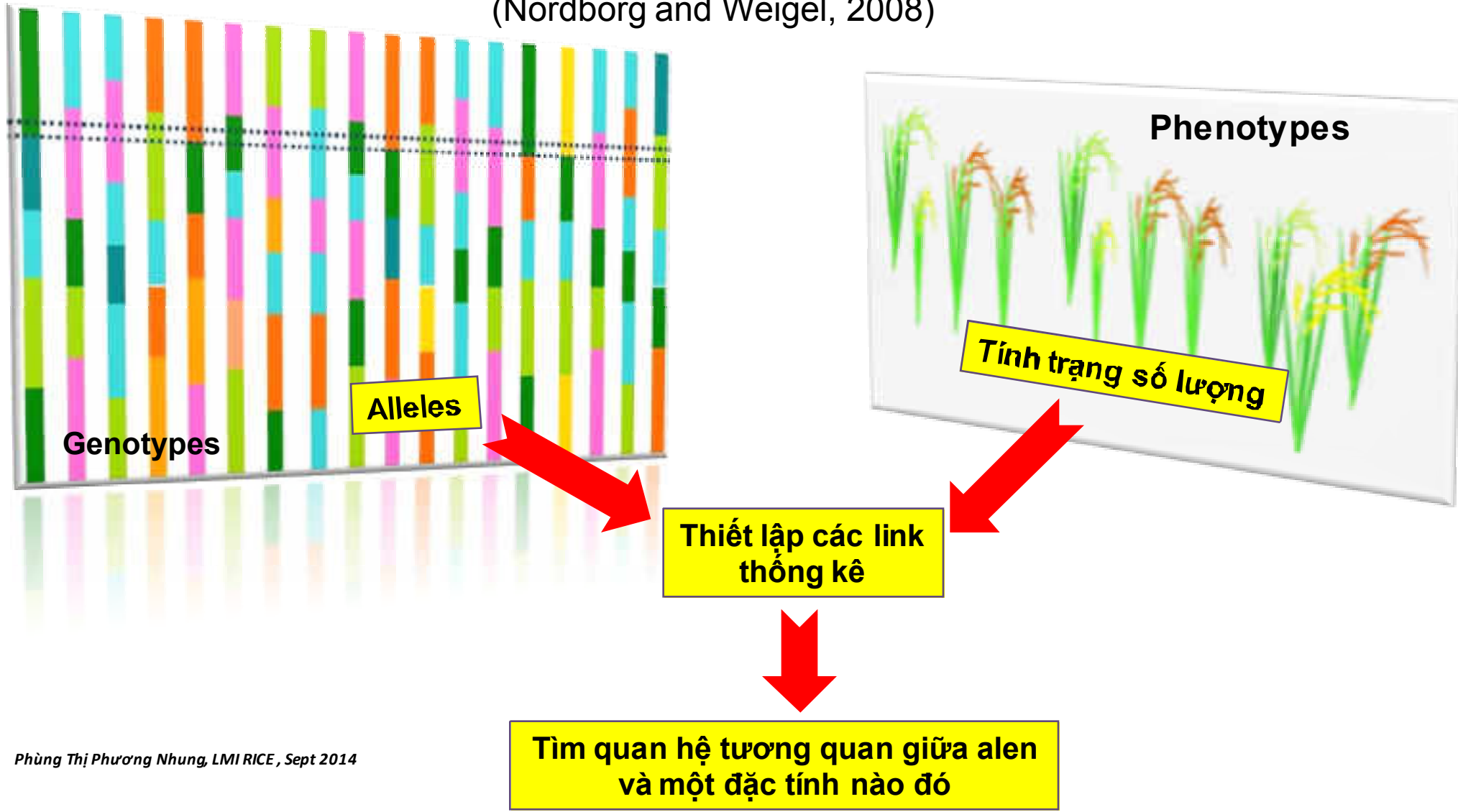




# Genome – Wide Association mapping

A method to dissect the genetic basis of the variation of complex quantitative traits

(Nordborg and Weigel, 2008)



Phùng Thị Phương Nhung, LMI RICE, Sept 2014

Root development

Water transport

QTL detection

# Công cụ phân tích dữ liệu

The screenshot displays the RStudio environment with the TASSEL software interface. The main window shows a Manhattan plot titled "P-Values by Chromosome for TW\_T2". The plot displays  $-\log_{10}(P\text{-value})$  on the y-axis (ranging from 0.00 to 3.80) and Position on the x-axis (ranging from 0 to 24,875,791). The plot is color-coded by chromosome (1-12) and shows several significant markers. A legend at the bottom of the plot identifies the chromosomes by color: 1 (red), 2 (blue), 3 (green), 4 (yellow), 5 (magenta), 6 (cyan), 7 (grey), 8 (dark red), 9 (dark blue), 10 (dark green), 11 (yellow-green), and 12 (yellow).

Below the plot, a table titled "Marker Statistics - PC\_VietnamV3\_07042014\_ more than 21600 mks\_with\_Probability + drought2015\_TW\_full + VietnamV3\_07042014\_ more than 21600 mks\_with\_Probability" is visible. The table has 15 columns: Trait, Marker, Chr, Pos, df, F, p, add\_effect, add\_F, add\_p, dom\_effect, dom\_F, dom\_p. The first few rows are:

Trait	Marker	Chr	Pos	df	F	p	add_effect	add_F	add_p	dom_effect	dom_F	dom_p
TW_T1	None			0	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
TW_T1	Sj01_0000...	1	4300	1	0.45864	0.49915	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
TW_T1	Sj01_0001...	1	16350	1	1.84205	0.17644	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN

The console window shows the following R code:

```
> Spectral <- colorRampPa
> pdf("heatmaply cluster (full panel).pdf")
> heatmaply(cor(droughtsub3, c(2:28))), margins = c(80, 80),
+ k_col = 2, k_row = 2,
+ colors = BrBG(256),
+ limits = c(-1,1),
+ left.label.s,
+ bottom.label.s,
+ dev.off()
##Indica
dro_hm_indi <- dro
<
599:1 (Top Level) >
```



## Đánh giá kiểu hình rễ của bộ giống lúa bản địa Việt Nam



Túi bầu 16 cm x 80 cm  
Cát + NPK 5:10:3 (20 kg/1m<sup>3</sup> cát)



- **Đánh giá chỉ tiêu:**  
10 tính trạng rễ và  
3 tính trạng thân
- **Xử lý số liệu bằng**  
chương trình Excel,  
XLSTAT, SAS.



Root development

Water transport

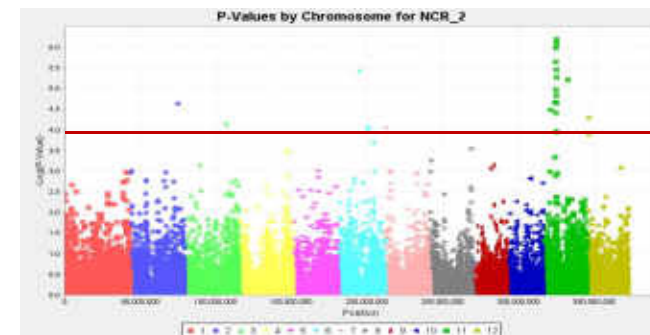
QTL detection

*Phùng Thị Phương Nhung, LMI RICE, Sept 2014*

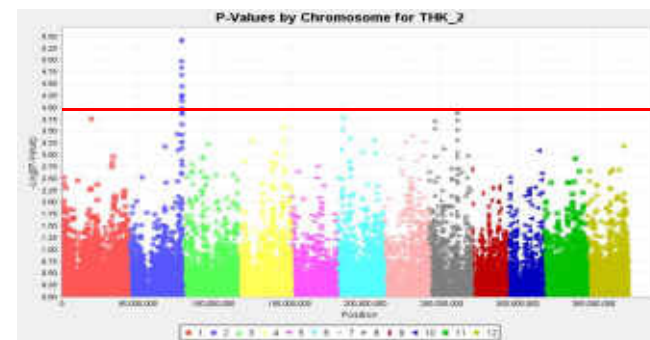
# Phát hiện QTLs quy định sự phát triển bộ rễ



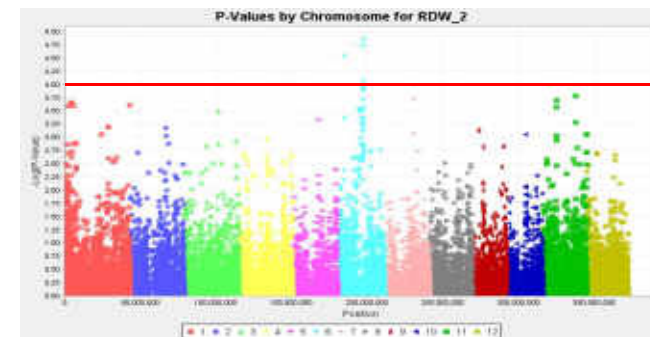
- Association analysis done with Tassel
- Mixed model with control of structure and kinship
- Markers are significant at P-value  $\leq 1e-04$



NCR



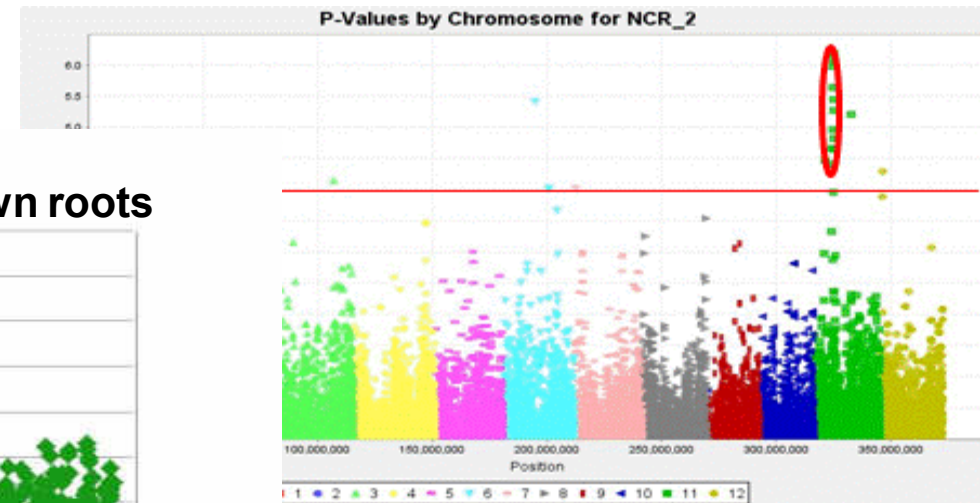
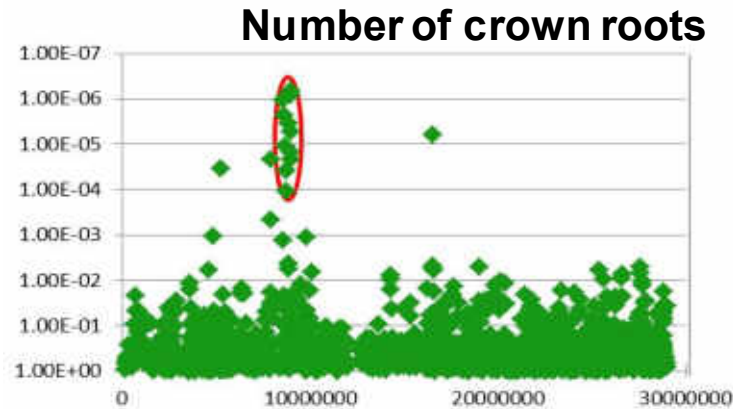
THK



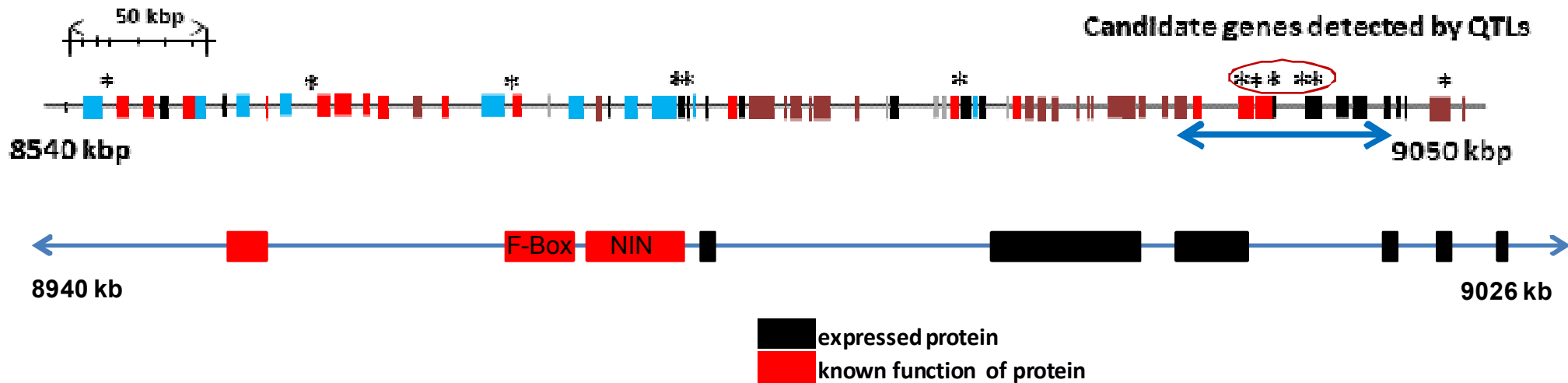
RDW

# Detection of candidate genes

- Found 889 genes for all QTLs
- 412 genes predicted function



\* : Significant marker's position



Root development

Water transport

QTL detection



## Đánh giá khả năng chịu hạn của bộ giống lúa bản địa Việt Nam



Trước khi ngừng tưới



2 tuần sau khi ngừng tưới



4 tuần sau khi ngừng tưới



2 tuần sau khi tưới nước trở lại

### ➤ Chỉ tiêu đánh giá:

- RWC = hàm lượng nước tương đối trong lá sau mỗi tuần
- Độ cuộn lá
- Độ khô của lá
- Khả năng phục hồi sau khi tưới nước trở lại 2 tuần



➤ **Xác định QTLs liên quan đến khả năng chịu hạn???**

➤ **QTLs sẽ có cùng vị trí với QTL quy định tính chịu hạn???**

Root development

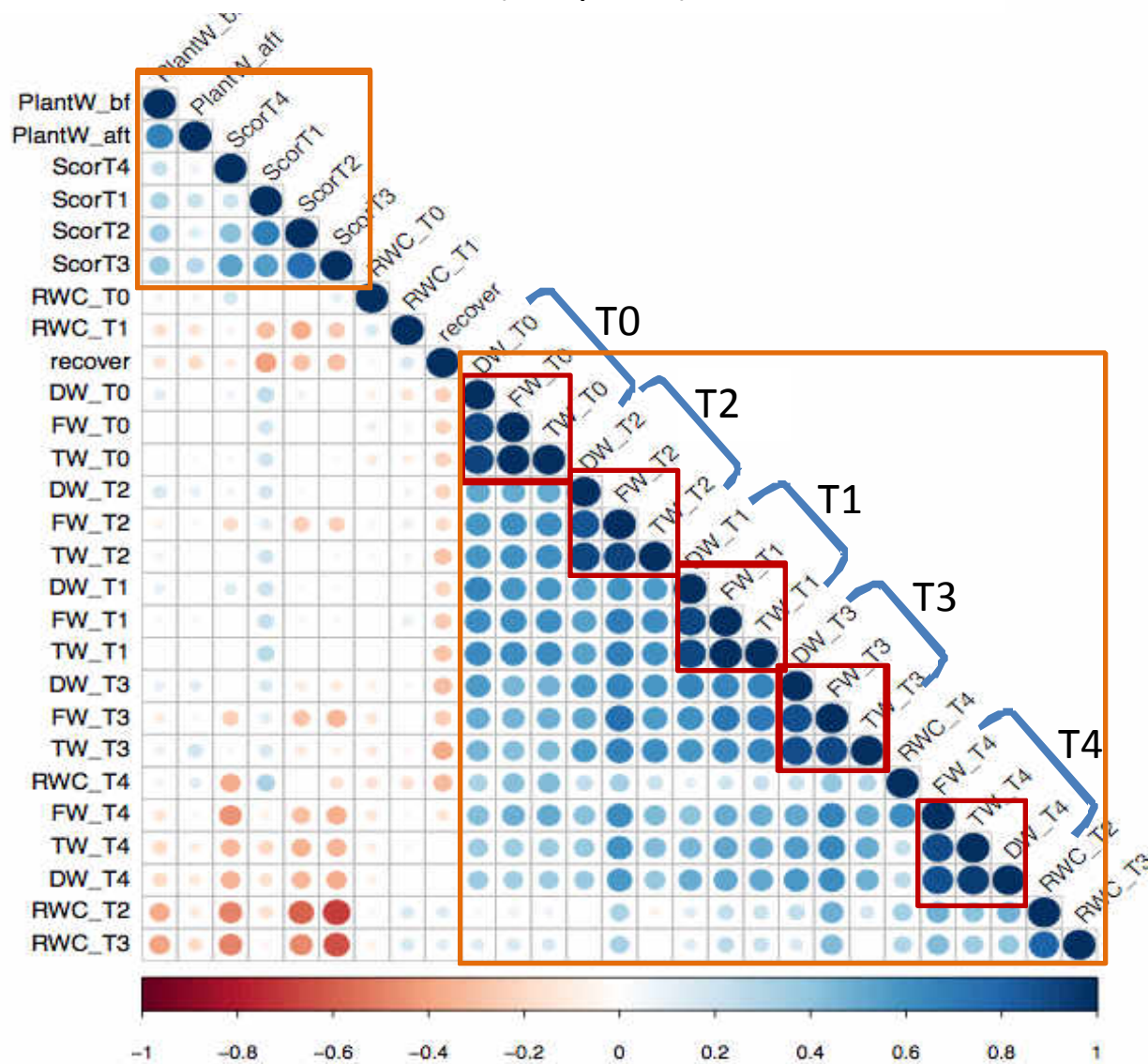
Water transport

QTL detection



# Phenotype describe by R

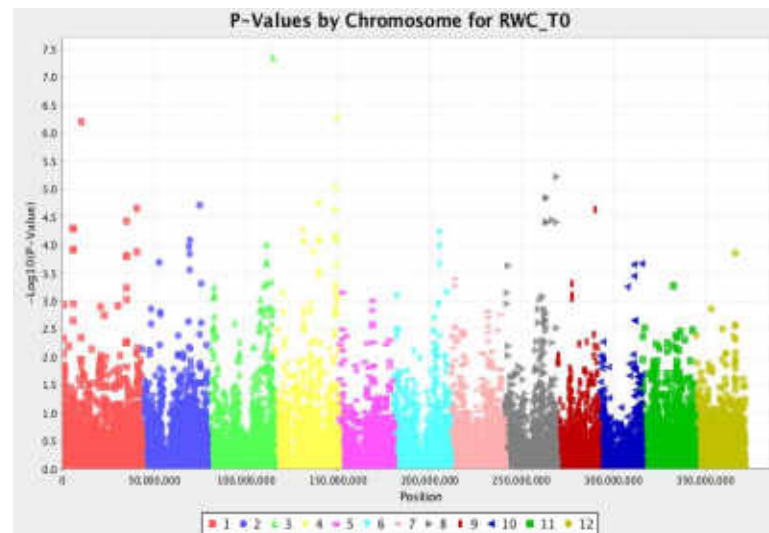
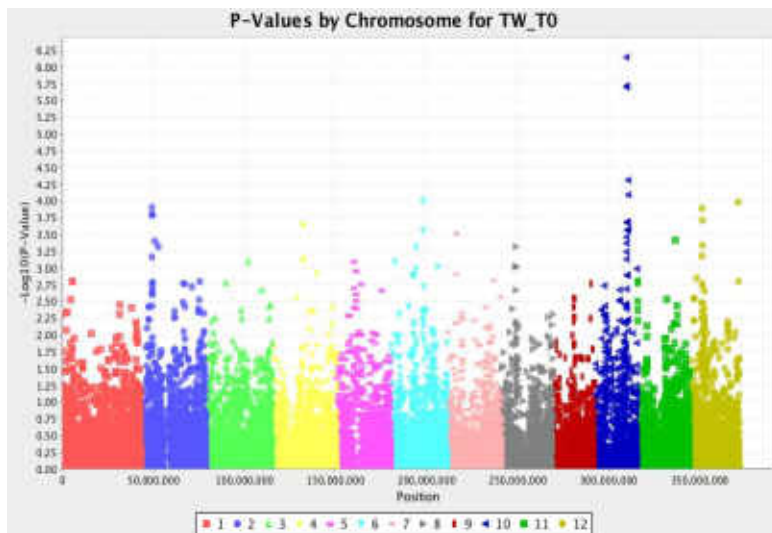
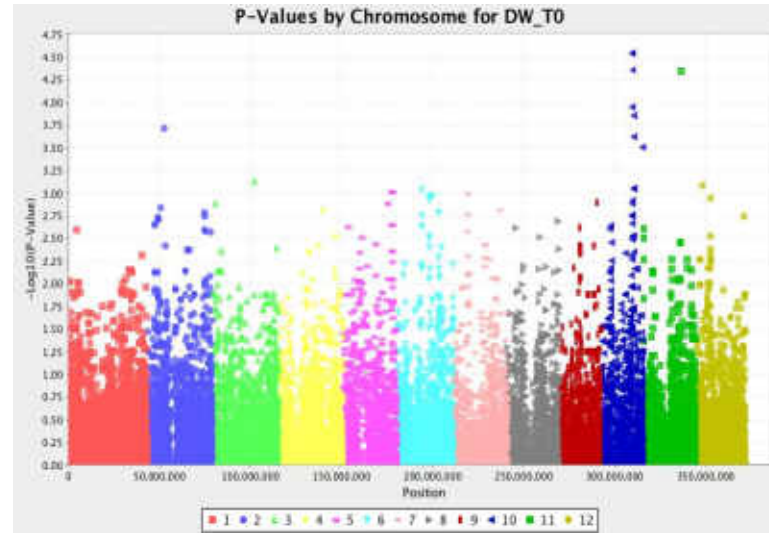
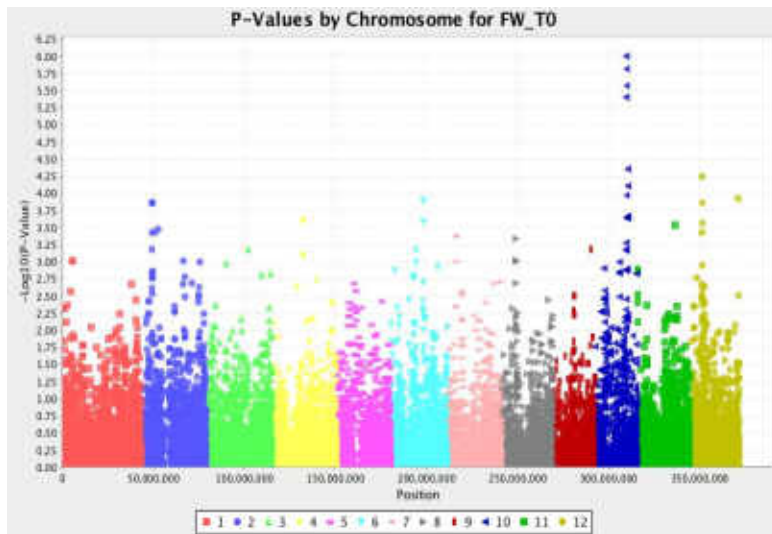
The correlation between traits (full panel)



The heatmap and corrplot show 2 big groups of phenotype:

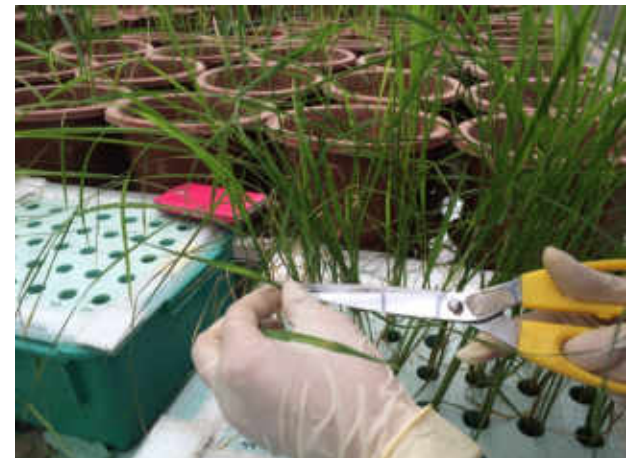
1. score correlate with weight of plant before and after stress;
2. DW, TW, DW correlate and the correlation really close in each time sampling

## GWAS by TASSEL \_ Sampling T0 (full panel)



TW\_T0, DW\_T0, TW\_T0 have a strong maker in chr10,  
RWT\_T0 have maker on chr3 and 4.

## Đánh giá khả năng chịu mặn của bộ giống lúa bản địa Việt Nam



### ➤ Chỉ tiêu đánh giá:

- Đánh giá mức độ chống chịu mặn
- Hàm lượng nước trong lá
- Hàm lượng Na và K trong lá



SES Score

- Xác định QTLs liên quan đến khả năng chịu mặn???
- QTLs rấ có cùng vị trí với QTL quy định tính chịu mặn???

Root development

Water transport

QTL detection



## Đánh giá khả năng duy trì năng suất trong điều kiện hạn của bộ giống lúa bản địa Việt Nam



- **Chỉ tiêu đánh giá:**
- Chiều cao cây
  - Chiều dài bông
  - Thời gian ra hoa
  - Tổng số nhánh
  - Số nhánh hữu hiệu
  - Năng suất cá thể
  - Trọng lượng 1000 hạt

➤ **Năng suất trong điều kiện hạn**   ➤ **Năng suất trong điều kiện thường**

- **Xác định QTLs liên quan đến khả năng duy trì năng suất trong đk hạn???**
- **QTLs rấ có cùng vị trí với QTL quy định khả năng duy trì năng suất trong đk hạn???**

## CÁC CÁ NHÂN THAM GIA THỰC HIỆN



**GS.TS. Do Nang Vinh,  
TS. Hoang Thi Giang  
TS. Mai Duc Chung  
PhD. Phùng Thị Phương Nhung  
TS. Tạ Kim Nhung  
ThS. Nguyễn Thị Huế  
ThS. Nguyễn Thị Thơm  
KS. Đinh Văn Lâm  
KS. Đỗ Văn Toàn  
KS. Hà Thị Loan**

**TS. To Thi Mai Huong**

**GS.TS. Pascal Gantet  
TS. Stéphane Jouanic  
TS. H elene Adam  
TS. Guyomarch Souazig  
TS. Laplaze Laurent  
TS. Lucas Mickael  
TS. Champion Anthony  
ThS. Floran Gathignol  
GS.TS. Michel Lebrun**



**TS. Brigitte Courtois**



**TS. Doan Trung Luu  
TS. Herv  Sentenac  
TS. Anne Alienor  
very**



A close-up photograph of a person's hand holding a rice panicle. The hand is positioned in the lower-left foreground, with fingers gently cradling the golden-brown grains. The background is a lush green rice field with many other panicles, some in focus and some blurred. The lighting is bright and natural, suggesting a sunny day. The overall mood is peaceful and grateful.

**XIN CHÂN THÀNH CẢM ƠN!**