

## KHÁC BIỆT VỀ HỆ PHIÊN MÃ DƯỚI TÁC ĐỘNG CỦA MẶN LÊN 2 GIỐNG LÚA MÙA Ở GIAI ĐOẠN CÂY CON

Huỳnh Kỳ<sup>1\*</sup>, Văn Quốc Giang<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Mạnh<sup>1</sup>, Trần In Đô<sup>1</sup>, Nguyễn Thành Tâm<sup>2</sup>, Nguyễn Châu Thanh Tùng<sup>1</sup> và Nguyễn Lộc Hiền<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bộ môn Di truyền và Chọn giống Cây trồng, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu Phát triển Đồng bằng sông Cửu Long, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Huỳnh Kỳ (email: hky@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 06/12/2020

Ngày nhận bài sửa: 07/01/2021

Ngày duyệt đăng: 25/06/2021

### Title:

Differential gene expression under salt stress at seedling stage as response of Doc Phung and nep Mo varieties

### Từ khóa:

Độc Phụng, hệ gen biểu hiện, mặn, nếp Mỡ, OsDREB

### Keywords:

Doc Phung, nep Mo, Salt, Transcriptome, OsDREB

### ABSTRACT

Climate change has seriously affected people's lives and agricultural production in the Mekong Delta, of which saline intrusion is one of the main factors affecting agricultural productivity. Therefore, it is very urgent to study the transcriptome of salt-tolerant rice varieties representing the Mekong Delta. In this study, Doc Phung (salt tolerant) and nep Mo (salt sensitive) varieties were used to treat with 100 mM of NaCl for 12 hours at 14 days of seedling, the treated samples were collected and isolated total RNA for further analysis. The results showed that the total unique transcripts in Doc Phung (1596 genes) were more genes expressed than in Nep Mo (427 genes), and most of the transcripts in the two selected varieties responded to saline stress related to GO response to stimulus. These results showed that OsBREB family gene was candidate involving in the salinity stress, and can be used for further research.

### TÓM TẮT

Biến đổi khí hậu đã và đang ảnh hưởng nghiêm trọng đến đời sống người dân và sản xuất nông nghiệp vùng Đồng bằng Sông Cửu Long, trong đó xâm nhiễm mặn là một trong những yếu tố tác động chính lên sản lượng nông nghiệp. Do đó, việc tìm ra hệ gen biểu hiện ở các giống lúa chống chịu mặn đại diện cho vùng Đồng bằng Sông Cửu Long là cấp thiết. Ở nghiên cứu này giống Độc Phụng đại diện cho kiểu gen chống chịu stress mặn, nếp Mỡ đại diện cho kiểu gen mẫn cảm stress mặn, 2 giống lúa được chọn cho nảy mầm và 14 ngày sau nảy mầm, cây con được xử lý muối NaCl ở nồng độ 100 mM cho 12 giờ, mẫu sau khi xử lý stress mặn được thu thập và ly trích RNA. Kết quả phân tích hệ gen biểu hiện cho thấy giống Độc Phụng (1596 gen) có số lượng gen biểu hiện nhiều hơn giống nếp Mỡ (427 gen), và hầu hết các gen ở hai giống thí nghiệm đều phản ứng tới stress mặn liên quan đến chức năng kích thích phản ứng bởi stress. Kết quả này bước đầu đã chọn ra được các gen liên quan đến phản ứng stress mặn như họ gen OsDREB, và có thể dùng tiếp cho nghiên cứu chuyên sâu hơn.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Cơ quan quản lý thiên tai Việt Nam (VNDMA, 2020) thuộc bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, biến đổi khí hậu đã tác động mạnh đến Việt Nam nói chung và Đồng bằng Sông Cửu Long (ĐBSCL) nói riêng, thiệt hại do xâm nhiễm mặn và hạn hán đã ảnh hưởng đến 71.656 ha lúa, 93 ha hoa màu và 762 ha cây ăn trái (tính cho đến ngày 27 tháng 07 năm 2020), và được dự đoán thiệt hại sẽ gia tăng ở những năm tới. Thêm vào đó, ước tính năm 2007 thế giới đã tiêu thụ khoảng hơn 19.055 tấn gạo (CGIAR) và theo tổng kết 10 năm tiêu thụ gạo ước tính khoảng 22.000 tấn (USDA, 2018). Để giải quyết vấn đề này, việc cải thiện năng suất lúa là rất quan trọng đối với an ninh lương thực, tăng trưởng kinh tế và nông nghiệp bền vững. Đứng trước thực trạng đó, các nhà khoa học Việt Nam đã và đang nghiên cứu chọn tạo các giống lúa có khả năng thích ứng trong điều kiện xâm nhiễm mặn, nhằm đảm bảo an ninh lương thực.

Để có thể sinh trưởng và phát triển được trong môi trường stress mặn, cây lúa cần thực hiện một số cơ chế sinh lý khác nhau như loại bỏ muối ở rễ, vận chuyển natri từ rễ đến chồi và một cơ chế khác để lưu trữ ion natri trong các mô và không bào (Shannon, 1985; Yeo & Flowers, 1986). Để vận hành được các cơ chế đó, cây lúa phải trải qua quá trình phiên mã các hệ gen liên quan đến các cơ chế chống chịu mặn khi có sự tác động của mặn. Được biết ở giai đoạn cây con, cây lúa rất mặn cảm với mặn vì vậy nghiên cứu về hệ gen biểu hiện ở giai đoạn cây con liên quan đến khả năng chịu mặn ở các giống lúa chịu mặn đã được rất nhiều nghiên cứu như trên lúa hoang Dongxiang (*Oryza rufipogon* Griff) (Zhou et al. 2016), giống lúa Chibo (Chandran et al. 2019), giống lúa Xian156 (Wang et al. 2018), và một trong những giống lúa được xem là chuẩn chống chịu mặn được rất nhiều nghiên cứu về mặn là Pokkali (Li et al. 2018). Trong khuôn khổ của nghiên cứu này, đã ứng dụng kỹ thuật nghiên cứu hệ gen biểu hiện ở giai đoạn cây con của giống lúa chịu mặn địa phương của ĐBSCL được thực hiện nhằm tìm ra các gen có phản ứng sớm liên quan đến khả năng chống chịu mặn. Kết quả nghiên cứu này là tiền đề giúp chọn tạo ra các giống lúa chống chịu mặn phục vụ cho ĐBSCL trong tương lai.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Theo nghiên cứu của (Tam 2019), giống Đốc Phụng chống chịu mặn tốt, và giống nếp Mỡ là đại

diện cho giống mặn cảm với mặn và hai giống này là giống lúa mùa của ĐBSCL và cùng hệ gen indica. Do đó, trong nghiên cứu này giống Đốc Phụng (ĐP) là giống chống chịu mặn và giống nếp Mỡ (NM) là giống mặn cảm với mặn, cả hai giống được thu thập tại ĐBSCL và hiện đang lưu giữ tại ngân hàng gen, Trường Đại học Cần Thơ.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Xử lý stress mặn

Hạt giống lúa Đốc Phụng và nếp Mỡ sau khi được lấy từ kho lạnh được để ở nhiệt độ phòng cho 24 giờ sau đó được ngâm trong nước cất trong bóng tối, và các hạt nảy mầm đồng đều được gieo trong hộp nhựa. Để dùng cho nghiên cứu hệ gen biểu hiện giai đoạn sớm của cây con (RNA-seq), cây con 14 ngày tuổi được xử lý mặn ở nồng độ 100 mM NaCl (nồng độ mặn tương đương 6‰) và 0 mM NaCl (đôi chứng) trong dung dịch dinh dưỡng Yoshida cho 12 giờ, sau đó toàn bộ phận của cây con (thân, lá và rễ được rửa sạch) được thu hoạch và làm đông ngay lập tức trong nitơ lỏng, mẫu vật được tồn trữ ở -80°C. Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện nhà kính có điều khiển nhiệt độ từ 26-33°C, với thời gian chiếu sáng là 10 giờ sáng/ngày.

#### 2.2.2. Tách chiết RNA, chuẩn bị thư viện cDNA và giải trình tự

RNA tổng số được tách chiết từ các mẫu xử lý bằng cách sử dụng bộ RNeasy® Plant Mini theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Qiagen, Đức). Định lượng và chất lượng RNA được kiểm tra bằng Nanodrop (Thermo) và Bioanalyzer 2100 (Agilent). 5 µg RNA tổng số của mỗi mẫu được gửi đến BGI để giải trình tự RNA-seq bằng hệ thống Illumina 2500 Hiseq.

#### 2.2.3. Phân tích hệ gen biểu hiện (transcriptome)

*Đọc quá trình lọc và đánh giá biểu hiện gen khác biệt*

Sau khi dữ liệu giải trình tự được xuất từ máy, dữ liệu được tiến hành kiểm soát chất lượng và xử lý trước các lần đọc đầu cuối, ghép nối thô được thực hiện bằng công cụ fastp V0.20.0, một bộ tiền xử lý FASTQ cực nhanh (Chen et al. 2018). Các lần đọc hệ phiên mã được so sánh lên hệ gen tham chiếu Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0 mới nhất (Kawahara et al. 2013), được xây trên cơ sở dữ liệu cây trồng (Ensembl Plants website) (Bolser et al. 2016) sử dụng using HISAT2 software V2.1.0 (Keel & Snelling 2018; Kim et al. 2015), và những hệ gen biểu hiện được dò tìm trên hệ gen tham chiếu có chất lượng thấp (MAPQ<30) được loại bỏ bằng phần mềm SAMtool kits (Li et al. 2009). Để nhận

dạng biến thể, các bản sao đã được xóa khỏi tệp giống hàng bằng công cụ Picard V2.18.7 (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Sau đó, thực hiện sắp xếp lại xung quanh các chèn hoặc xóa (InDels) đã được xác định trong bước mục tiêu sắp xếp lại các InDel mục tiêu. Cả biến thể (SNPs) và chèn hoặc xóa (InDel) được phân tách bằng phần mềm SAMtool kits (Li et al. 2009) và BCFtools (Li 2011) bằng phiên bản mới nhất có tại Github (<http://samtools.github.io/bcftools/bcftools.html#ca11>). Tiếp tục phân tích hệ gen phiên mã, DESeq2 (Love et al. 2014) được sử dụng để tìm mức độ biểu hiện khác nhau ở các gen biểu hiện (Differentially Expressed Genes ~ DEG) khi so sánh giữa mẫu đối chứng (không xử lý mặn) và mẫu xử lý mặn. Trước đó, số lần gen biểu hiện được tính bằng featureCounts (Liao et al. 2014), được tính là mức biểu hiện ban đầu với 1 gen được định vị trên bộ gen (gtf) có sẵn trên web (<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/download/irgsp1.html>) dùng cho phân tích này. Các mức độ biểu hiện gen đã được tiêu chuẩn hóa bằng các cơ sở số lần đọc trên Kilo trên triệu lần đọc (RPKM). Ở bước này, những thay đổi lớn hơn 2 lần của mức độ biểu hiện có sự khác biệt có ý nghĩa ( $P < 0,05$ ) làm điều kiện để sàng lọc ý nghĩa của DEG giữa stress muối và mẫu đối chứng. Bước tiếp theo là các gen biểu hiện được phân nhóm theo chức năng của chúng (Gene Ontology [GO] enrichment analysis), phương pháp Singular Enrichment Analysis (SEA) được thực hiện nhờ phần mềm AgriGO V.2, với các mặc định cài đặt hệ số (False-Discovery Rate ~ FDR) với hệ số giá trị  $p < 0.05$ , trong phân tích này các gen được nhận dạng

dựa vào các ID của gen tham chiếu trên lúa được ghi nhận trên NCBI (Tian et al. 2017).

**2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu**

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 8 đến tháng 12 năm 2019 tại phòng thí nghiệm Di truyền và Chọn giống cây trồng, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Dữ liệu hệ gen được giải trình tự**

Nhằm tìm hiểu cơ chế chống chịu stress mặn của các giống lúa chịu mặn mùa đại diện cho ĐBSCL ở cấp độ phân tử, kỹ thuật RNA-seq giải trình tự hệ gen biểu hiện ở giai đoạn cây con được thực hiện. Trong nghiên cứu này hệ thống giải trình tự thế hệ mới (NGS) Illumina Hiseq 2500 được sử dụng đã được tổng số hệ gen biểu hiện từ 66.985.319 - 67.291.969 ở giống Đốc Phụng, trong khi đó tổng số hệ gen được biểu hiện đọc được từ 65.736.921 - 66.836.598 ở nếp Mỡ, tương tự (Bảng 1). Ở phân tích này, bộ gen của giống Nipponbare được sử dụng làm hệ gen tham chiếu, trong đó hệ gen biểu hiện trong nghiên cứu này khi so với hệ gen tham chiếu thì số lần gen biểu hiện từ 58 triệu đến 60 triệu gen, trong khi đó số gen biểu hiện mà không tìm thấy được trong bộ gen tham chiếu từ 6 triệu đến 7 triệu gen. Chất lượng trung bình của hệ gen biểu hiện đều > 50 %, trong đó tỉ lệ GC > 50 % (Bảng 1), chứng tỏ số lần đọc được của hệ gen biểu hiện đủ chất lượng để tiếp tục cho phân tích tiếp theo (Zhou et al. 2016).

**Bảng 1. Tóm tắt tổng số hệ gen phiên mã so sánh với bộ gen tham chiếu bằng hệ thống Illumina**

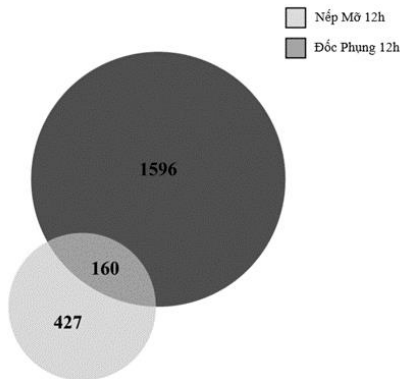
So sánh hệ gen tham chiếu	Đốc Phụng 12 giờ sau xử lý		Nếp Mỡ 12 giờ sau xử lý	
	0 mM NaCl	100 mM NaCl	0 mM NaCl	100 mM NaCl
Tổng số hệ gen được đọc (transcriptomes)	66.985.319	67.291.969	66.836.598	65.736.921
Tổng số hệ gen biểu hiện đọc được so với bộ gen tham chiếu	59.762.742	60.405.527	60.229.216	58.748.296
Tổng số hệ gen biểu hiện gen không có trong bộ gen tham chiếu	7.222.577	6.886.442	6.607.382	6.988.625
Chất lượng trung bình khi so với bộ gen tham chiếu	58.78	58.77	58.77	58.75
Tỉ lệ GC	51.36 %	51.06 %	51.33 %	51.45 %

**3.2. Nhận diện mức độ biểu hiện khác nhau của hệ gen của mẫu sau xử lý mặn bằng RNA-seq**

Mức độ biểu hiện gen có thể được xác định từ dữ liệu trình tự Illumina đọc được dựa trên số lần đếm được ban đầu (Bloom et al. 2009). Khác biệt

mức độ gen biểu hiện (DEG) được xác định trong các điều kiện kiểm soát và xử lý stress bằng muối để nhằm tìm ra sự khác biệt về hệ phiên khi so sánh giữa các giống mang kiểu chịu đựng và mặn cảm ở 12 giờ sau khi xử lý muối NaCl ở nồng độ 100 mM. Nhìn chung, biểu đồ Venn cho thấy Đốc Phụng có

1596 unigen biểu hiện khác biệt so với nếp Mỡ chỉ có 427 unigen (Hình 1).

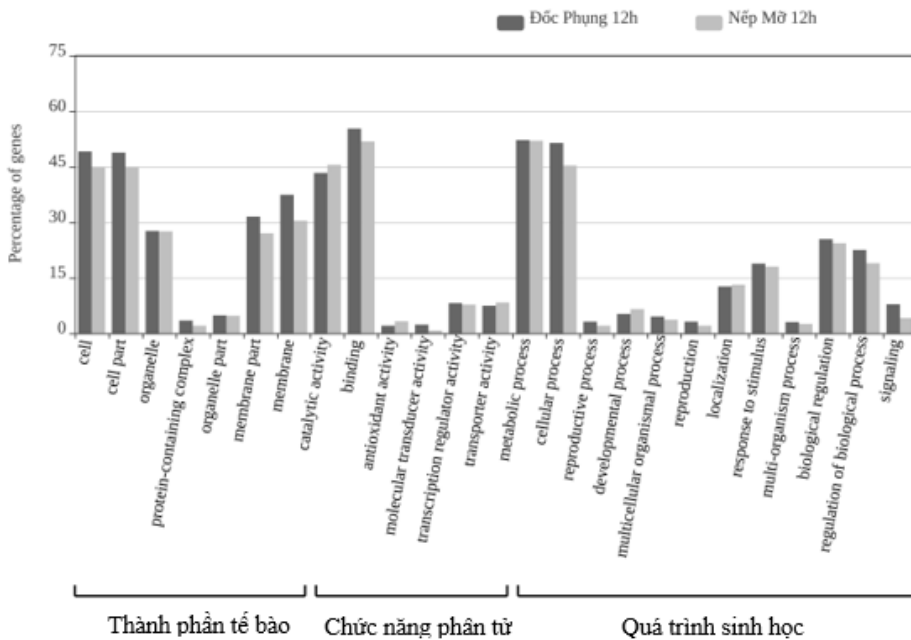


**Hình 1. Biểu đồ Venn thể hiện unigen biểu hiện của giống Đốc Phụng và nếp Mỡ khi xử lý mặn 100 mM ở thời điểm 12 giờ**

**3.3. So sánh phân loại bản thể học gen (GO) của DEG trong 2 kiểu gen**

Khi phân tích bản thể học gen (GO) chỉ chọn lọc các nhóm GO có ít nhất 3 gen biểu hiện trở lên và

các gen đó phải có giá trị  $P < 0.05$  mới được xếp nhóm và so sánh giữa Đốc Phụng và nếp Mỡ ở giai đoạn 12 giờ sau khi xử lý mặn, trong giai đoạn này hầu hết các GO đều được xếp vào trong 3 nhóm chính đó là thành phần tạo nên tế bào (cellular components), chức năng phân tử (molecular function) và quá trình sinh học (biological process). Nhìn chung tổng số gen biểu hiện ở ba nhóm chức năng của Đốc Phụng đều cao hơn nếp Mỡ khi gặp stress mặn, trong đó nhóm gen chức năng cấu phần tế bào, màng tế bào và nhóm gen mang chức năng phân tử biểu hiện cao nhất trong vai trò gắn kết các phân tử trong phản ứng hóa học. Trong khi đó chức năng quá trình sinh học nhóm gen được biểu hiện chỉ tập trung vào quá trình chất sinh hóa và quá trình tế bào (Hình 2). Trong khi nghiên cứu khả năng chịu mặn ở giống lúa Nhật Chilbo ở thời điểm 5 ngày sau xử lý mặn cho thấy hầu hết các nhóm gen biểu hiện đều thuộc trong chu trình tổng hợp chất sinh dưỡng (Metabolic process) (GO: GO:0006519) (Chandran et al. 2019)



**Hình 2. Nhóm gen biểu hiện được phân loại theo nhóm chức năng GO ở mẫu thí nghiệm.**

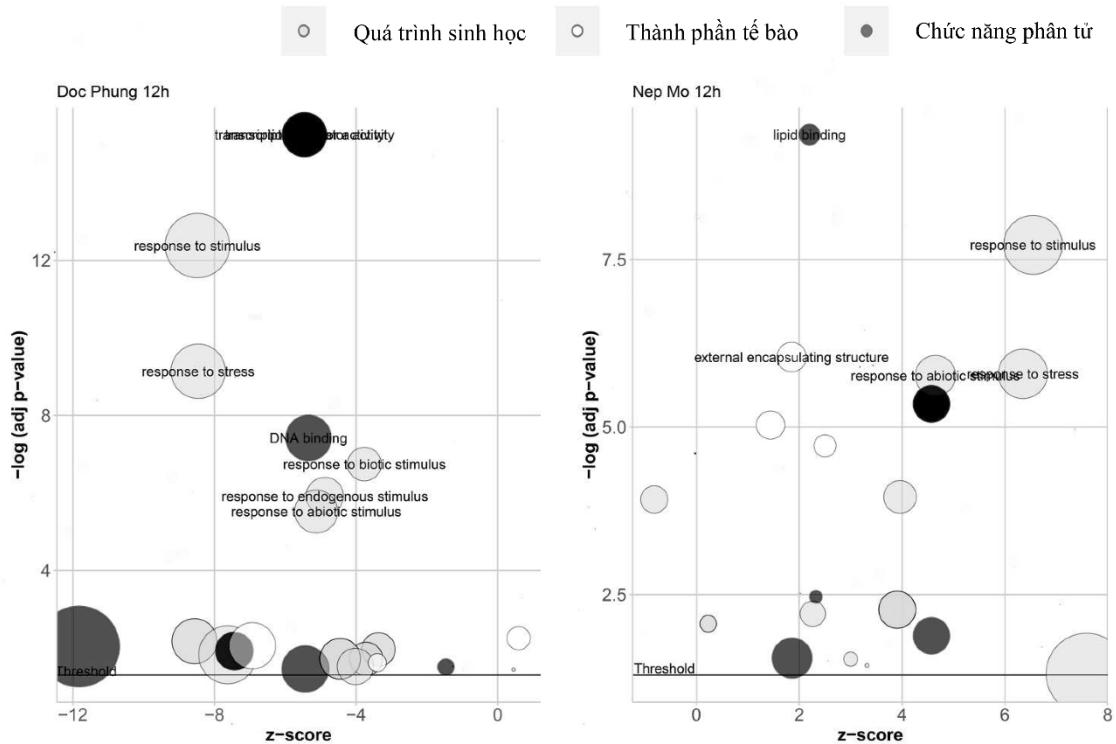
**3.4. Phân tích chú giải bộ dữ liệu gen biểu hiện theo chức năng GO**

Biểu đồ bong bóng cho thấy khác biệt ở mỗi giống có nhóm gen chức năng chuyên biệt phản ứng với stress sau khi xử lý muối với 100 mM NaCl ở thời điểm 12 giờ (Hình 3). Đối với giống lúa Đốc

Phụng hầu hết các hệ gen biểu hiện giảm có ý nghĩa đều tập trung vào tiến trình sinh học với nhóm chức năng phản ứng kích hoạt (GO term: response to stimulus) và giảm sự biểu hiện nhiều nhất thuộc vào nhóm gen có chức năng phân tử, đặc biệt là nhóm gen liên quan đến yếu tố phiên mã (GO term: molecular function), ngược lại giống mẫn cảm với

mặn NM hầu hết các nhóm gen biểu hiện đều tăng và đều thuộc vào nhóm tiến trình sinh học với nhóm chức năng phản ứng kích hoạt (GO term: response to stimulus). Điều đó chứng tỏ mỗi kiểu gen khác

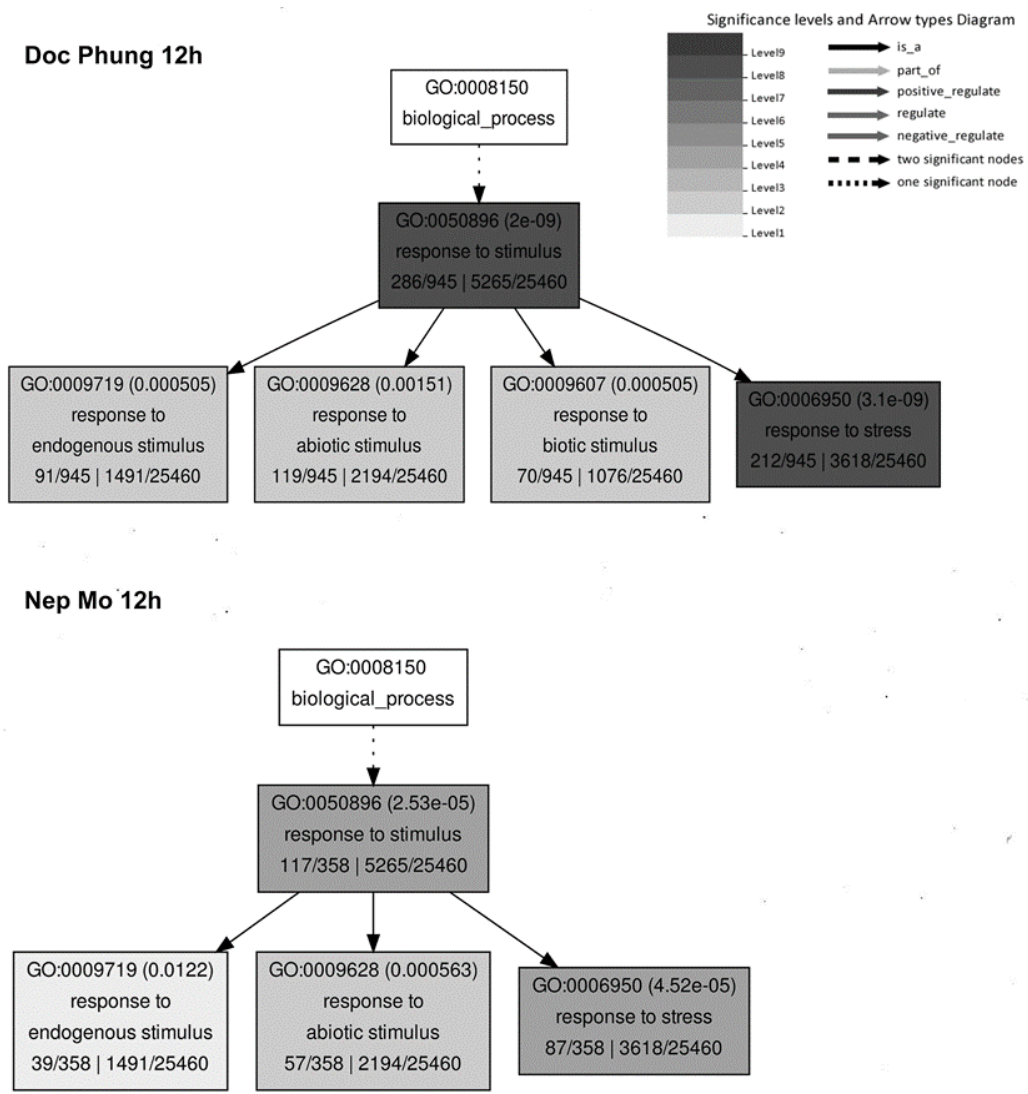
nhau sẽ có phản ứng với stress mặn khác nhau và điều này giống như nghiên cứu trước đây (Hussain et al. 2019; Li et al. 2018).



**Hình 3. Biểu đồ bong bóng thể hiện các nhóm chức năng biểu hiện tăng và giảm khi xử lý mặn ở nồng độ muối NaCl 100 mM vào thời điểm 12 giờ sau khi xử lý**

Thêm vào đó, dựa vào nhóm unigen được phân nhóm chức năng theo biểu đồ bong bóng, nhóm gen biểu hiện chức năng sinh học được phân tích mỗi liên kết đơn bằng phương pháp Singular Enrichment Analysis (SEA) được cung cấp bởi AgriGo V2 (Tian et al. 2017), phân tích này dựa vào bộ cơ sở dữ liệu 25.465 gen chức năng được công bố trên MSU Rice Genome Annotation (Kawahara et al. 2013). Nhìn chung cả Độc Phụng và nếp Mỡ khi bị xử lý stress mặn điều biểu hiện nhóm gen chức năng liên quan đến quá trình sinh học tuy nhiên mức độ biểu hiện của hai kiểu gen khác nhau và điều liên quan đến chức năng phản ứng kích thích của stress

(GO:0050896) và cuối cùng là đi đến nhóm gen phản ứng với stress (GO: 0006950) (Hình 4). Tuy nhiên, mức độ phản ứng lại stress mặn ở hai kiểu gen có khác nhau. Tóm lại các gen biểu hiện có ý nghĩa trong nghiên cứu này khi gặp stress mặn điều liên quan đến nhóm gen yếu tố phiên mã và các chuyên hóa sinh học (Bảng 2). Kết quả này cũng tương tự như những nghiên cứu trước cho thấy yếu tố phiên mã điều liên quan trực tiếp đến phản ứng stress phi sinh học như hạn mặn như họ gen *DREB* (Moon et al. 2019; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki 2006; Wang et al. 2008)



**Hình 4. Phân tích Singular Enrichment Analysis (SEA) của ĐP và NM khi xử lý mặn ở nồng độ muối NaCl 100 mM vào thời điểm 12 giờ sau khi xử lý**

**Bảng 2. Danh sách các gen được biểu hiện của Độc Phụng và nếp Mỡ tại thời điểm 12 giờ sau xử lý 100 mM NaCl**

Độc Phụng 12 giờ sau xử lý mặn			Nếp Mỡ 12 giờ sau xử lý mặn		
Mã số gen	Tên gen	Giảm	Mã số gen	Tên Gen	tăng
LOC_Os02g38392		Os02g0597300	LOC_Os01g62600	OsLAC6	Os01g0843800
LOC_Os02g45420	OsERF#020	Os02g0676800	LOC_Os02g43330	HOX24	Os02g0649300
LOC_Os02g45450	OsDREB1G	Os02g0677300	LOC_Os04g28520	OsRALF-2	Os04g0353600
LOC_Os03g08310	TIFY11A	Os03g0180800	LOC_Os04g33920	OsLTPd6	Os04g0415800
LOC_Os03g08330	OsJAZ4	Os03g0181100	LOC_Os05g31670	AWPM-19	Os05g0381400
LOC_Os03g52410		Os03g0734500	LOC_Os05g46480	OsLEA3-1	Os05g0542500
LOC_Os04g40630		Os04g0482300	LOC_Os06g21250		Os06g0317400
LOC_Os06g03670	OsDREB1C	Os06g0127100	LOC_Os07g19000		Os07g0290500
LOC_Os07g48280		Os07g0680600	LOC_Os11g42220	OsLAC24	Os11g0641800
LOC_Os08g36920	DERF3	Os08g0474000			

#### 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Tóm lại, phản ứng của giống lúa Đốc Phụng khi gặp tác động của stress mặn ở giai đoạn sớm thì hầu hết nhóm gen biểu hiện đều liên quan đến phản ứng kích thích stress và chủ yếu là nhóm gen yếu tố phiên mã và các gen này biểu hiện lại giảm hơn so với đối chứng. Trong khi giống lúa nếp Mỡ thể hiện phản ứng lại stress mặn chủ yếu ở các gen liên quan đến quá trình sinh học. Kết quả này cho thấy giống chống chịu mặn Đốc Phụng khi gặp stress mặn sẽ được các yếu tố phiên mã như họ gen *OsDREB* tiếp nhận tín hiệu ở giai đoạn sớm và giúp cây trồng chống chịu lại mặn. Vâng họ gen *OsDREB* là yếu tố phiên mã liên kết vào vùng promoter cis-AGCCGCC, được gọi là hộp GCC, kích hoạt sự phiên mã gen *P5SC* và gen này là enzyme giúp tăng khả năng tích lũy proline trong cây.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 (vốn vay ODA từ Chính phủ Nhật Bản). Chân thành cảm ơn GS. TS. Tetsuya Yamada đã chỉ dẫn phân tích số liệu và GS. TS. Yuji Kishima đã hỗ trợ thiết kế thí nghiệm.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bloom, J.S., Khan, Z., Kruglyak, L., Singh, M., & Caudy, A.A. (2009). Measuring differential gene expression by short read sequencing: quantitative comparison to 2-channel gene expression microarrays. *BMC Genomics*, 10, 221. 10.1186/1471-2164-10-221

Bolser, D., Staines, D.M., Pritchard, E., & Kersey, P. (2016). Ensembl Plants: Integrating Tools for Visualizing, Mining, and Analyzing Plant Genomics Data. In: Edwards D, ed. *Plant Bioinformatics: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York, 115-140.

Chandran, A.K.N., Kim, J.-W., Yoo, Y.-H., Park, H.L., Kim, Y.-J., Cho, M.-H., & Jung, K.-H. (2019). Transcriptome analysis of rice-seedling roots under soil-salt stress using RNA-Seq method. *Plant Biotechnology Reports* 13, 567-578. 10.1007/s11816-019-00550-3

Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34, i884-i890. 10.1093/bioinformatics/bty560

Hussain, S., Zhu, C., Bai, Z., Huang, J., Zhu, L., Cao, X., Nanda, S., Hussain, S., Riaz, A., Liang, Q., Wang, L., Li, Y., Jin, Q., & Zhang, J. (2019). iTRAQ-Based Protein Profiling and Biochemical Analysis of Two Contrasting Rice Genotypes Revealed Their Differential Responses to Salt

Stress. *International journal of molecular sciences* 20, 547. 10.3390/ijms20030547

Kawahara, Y., de la Bastide, M., Hamilton, J.P., Kanamori, H., McCombie, W.R., Ouyang, S., Schwartz, D.C., Tanaka, T., Wu, J., Zhou, S., Childs, K.L., Davidson, R.M., Lin, H., Quesada-Ocampo, L., Vaillancourt, B., Sakai, H., Lee, S.S., Kim, J., Numa, H., Itoh, T., Buell, C.R., & Matsumoto, T. (2013). Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice (New York, NY)* 6, 4-4. 10.1186/1939-8433-6-4

Keel, B.N., & Snelling, W.M. (2018). Comparison of Burrows-Wheeler Transform-Based Mapping Algorithms Used in High-Throughput Whole-Genome Sequencing: Application to Illumina Data for Livestock Genomes. *Frontiers in genetics* 9, 35-35. 10.3389/fgen.2018.00035

Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S.L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods* 12, 357-360. 10.1038/nmeth.3317

Li, H. (2011). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* 27, 2987-2993. 10.1093/bioinformatics/btr509

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & Genome Project Data Processing, S. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics (Oxford, England)* 25, 2078-2079. 10.1093/bioinformatics/btp352

Li, Y.-F., Zheng, Y., Vemireddy, L.R., Panda, S.K., Jose, S., Ranjan, A., Panda, P., Govindan, G., Cui, J., Wei, K., Yaish, M.W., Naidoo, G.C., & Sunkar, R. (2018). Comparative transcriptome and translome analysis in contrasting rice genotypes reveals differential mRNA translation in salt-tolerant Pokkali under salt stress. *BMC genomics* 19, 935-935. 10.1186/s12864-018-5279-4

Liao, Y., Smyth, G.K., & Shi, W. (2014). FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)* 30, 923-930. 10.1093/bioinformatics/btt656

Love, M.I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* 15, 550-550. 10.1186/s13059-014-0550-8

Moon, S. J., Min, M. K., Kim, J., Kim, D. Y., Yoon, I. S., Kwon, T. R., ... & Kim, B. G. (2019). Ectopic expression of OsDREB1G, a member of the OsDREB1 subfamily, confers cold stress

- tolerance in rice. *Frontiers in plant science*, 10, 297. 10.3389/fpls.2019.00297
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Gen networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58, 221-227. 10.1093/jxb/erl164
- Tam, N.T. (2019). The genome constitution of rice resources in the Mekong Delta and their association with salinity stress (Doctoral dissertation). Hokkaido University.
- Tian, T., Liu, Y., Yan, H., You, Q., Yi, X., Du, Z., ... & Su, Z. (2017). agriGO v2. 0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic acids research*, 45(W1), W122-W129.
- VNDMA. (2020). Báo cáo thông kê thiệt hại do thiên tai năm 2020 (truy cập ngày 27 tháng 07 năm 2020).
- USDA. (2018). Grain World Markets and Trade report.
- Wang, J., Zhu, J., Zhang, Y., Fan, F., Li, W., Wang, F., Zhong, W., Wang, C., & Yang, J. (2018). Comparative transcriptome analysis reveals molecular response to salinity stress of salt-tolerant and sensitive genotypes of indica rice at seedling stage. *Scientific reports* 8, 2085-2085. 10.1038/s41598-018-19984-w
- Wang, Q., Guan, Y., Wu, Y., Chen, H., Chen, F., & Chu, C. (2008). Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. *Plant Molecular Biology* 67, 589-602. 10.1007/s11103-008-9340-6
- Zhou, Y., Yang, P., Cui, F., Zhang, F., Luo, X., & Xie, J. (2016). Transcriptome Analysis of Salt Stress Responsiveness in the Seedlings of Dongxiang Wild Rice (*Oryza rufipogon* Griff.). *PLOS ONE* 11, e0146242. 10.1371/journal.pone.0146242