

NGHIÊN CỨU TÍNH ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU TƯƠNG CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG BỆNH GỈ SẮT KHÁC NHAU

TRẦN THỊ PHƯƠNG LIÊN, LÊ THỊ MUỘI

Viện Công nghệ sinh học

TRẦN ĐÌNH LONG

Trung tâm nghiên cứu và thực nghiệm Đậu đỗ

Nấm *Phakospora pachyrhizi* Sydow gây ra bệnh gỉ sắt ở lá của cây đậu tương (*Glycine max* (L) Merr). Nhiều nòi nấm đã được phân lập [1]. Một số nghiên cứu về sự phân ly tính kháng bệnh gỉ sắt bằng cách lai hữu tính cho thấy các gen trội (đơn gen) kháng bệnh Rpp1, Rpp2, Rpp3 ở các dòng đậu tương khác nhau và trên các locut khác nhau [2]. Nhưng việc phân lập những gen này cũng như định vị chúng trên các nhóm liên kết gen ở cây đậu tương cho đến nay vẫn còn là vấn đề đang được nghiên cứu. Việc tìm kiếm các chỉ thị phân tử liên quan đến tính kháng bệnh gỉ sắt và tiến tới phân lập các gen này được nghiên cứu trên nhiều đối tượng cây trồng như lúa mì, ngô, đậu [3, 4].

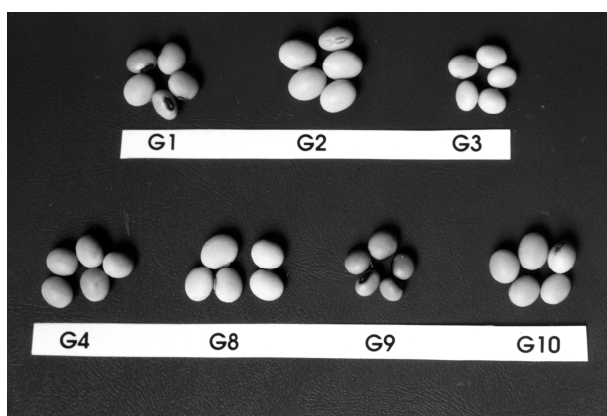
Một trong những bước tiệm cận đầu tiên để phân lập các gen kháng bệnh là nghiên cứu tính đa dạng di truyền của các giống đậu tương có khả năng kháng bệnh khác nhau bằng các chỉ thị phân

tử để tìm ra các chỉ thị phân tử cho tính đa hình giữa giống kháng và giống mẫn cảm với bệnh gỉ sắt. Trong bài này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu tính đa dạng di truyền của các giống đậu tương có khả năng kháng bệnh gỉ sắt khác nhau trong tập đoàn giống đậu tương Việt Nam.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

- Các giống đậu tương có khả năng kháng bệnh gỉ sắt khác nhau. Các giống G1, G2, G3 mẫn cảm với bệnh gỉ sắt; các giống G8, G9 - kháng bệnh ở mức trung bình còn các giống G4, G7 và G10 - kháng bệnh gỉ sắt tốt. Các giống này do Trung tâm nghiên cứu và thực nghiệm Đậu đỗ (TT ĐĐ) thuộc Viện Khoa học và Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam nhân giống và khảo sát sơ bộ về khả năng kháng bệnh gỉ sắt.



Hình 1. Các giống đậu tương với tính kháng bệnh gỉ sắt khác nhau

- Các enzym và hóa chất chuyên dụng được mua từ các hãng Fermentas, Sigma, Merk. Các cặp môi SSR được đặt tổng hợp tại hãng Invitrogen.

2. Phương pháp

- Phương pháp SSR: ADN tổng số của các giống đậu tương nghiên cứu được tách chiết theo phương pháp của Keim (1987) [5]. Phương pháp này sử dụng 12 cặp môi SSR: Satt042, Satt005, Satt146, Satt175, Satt173, Satt557, Satt489, Satt373, Satt567, Satt150, Satt009 và Satt431 [6]; trình tự của các cặp môi SSR theo công bố của Cregan và cs. (1999) [7]. Phản ứng PCR được tiến hành trong thể tích 25 μ l bao gồm: 20 ng ADN; 10 pmole mỗi tổng số; 1,6 mM MgCl₂; 250 μ M dNTP; 10 mM Tris-HCl pH 8,8; 50 mM KCl; 0,08% Nonidet P40; 1 đơn vị Taq DNA polymeraza. Chu trình nhiệt của phản ứng: 95°C: 8 phút, 35 chu kỳ gồm ba bước 95°C: 45 giây, 50°C: 45 giây, 72°C: 60 giây; sau đó 72°C: 8 phút và kết thúc ở 4°C trên máy PCT-100™ (MJ Research, Inc.).

Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarosa 1,5% và độ đa dạng được theo dõi trên điện di gel agarosa từ 2,4-3% và 12-15% polyacrylamit gel (PAGE), nhuộm bằng etidium bromit và phát hiện băng ADN trên đèn UV.

- Số liệu được xử lý bằng chương trình NTSYS 2.0 và phân tích bằng cách tính hệ số đa dạng di truyền (genetic diversity index) [8] cho mỗi chỉ thị phân tử:

$H = 1 - \sum P_i^2$ (P_i là tần xuất gặp an-len thứ i của mỗi chỉ thị phân tử)

- Đánh giá khả năng kháng bệnh gỉ sắt ở đậu tương:

Chuẩn bị nguồn bệnh: thu lá ngoài đồng ruộng; chọn lá còn xanh, bị bệnh trên 50%; cho lá vào hộp ẩm, ở nhiệt độ 25°C - 28°C trong phòng tối 12 giờ để kích thích tạo bào tử. Dùng bàn chải, chải nhẹ bào tử vào cốc nước vô trùng và tiến hành kiểm tra nồng độ. Sử dụng dung dịch có nồng độ 5×10^4 /ml để gây nhiễm bệnh trên lá.

Phương pháp nhiễm bệnh trong khu cách biệt: đậu tương được gieo trồng trong cùng một điều kiện nền đất và chăm bón. Tiến hành lây nhiễm khi cây non có 1 lá kép đã mở hoàn toàn.

Dịch bào tử được phun (hoặc dùng bông quét) đều lên 2 mặt lá với lượng 0,5 ml/dm² lá vào lúc chiều muộn. Giữ độ ẩm đều 80-90%, nhiệt độ 25°C- 28°C. Sau 15 ngày, tiến hành xác định khả năng tạo vết bệnh theo số lượng vết bệnh trên diện tích lá, đặc điểm của vết bệnh (mức độ tạo gờ, kích thước vết□) và mức độ hình thành bào tử theo phương pháp của Bộ môn Di truyền miễn dịch, Viện Khoa học và Kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam. Khả năng kháng gỉ sắt được đánh giá như sau: kháng cao: 0-20%; kháng: 21-30%, nhiễm trung bình: 31-50%; nhiễm: 51-70%; nhiễm nặng: 71-100%.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

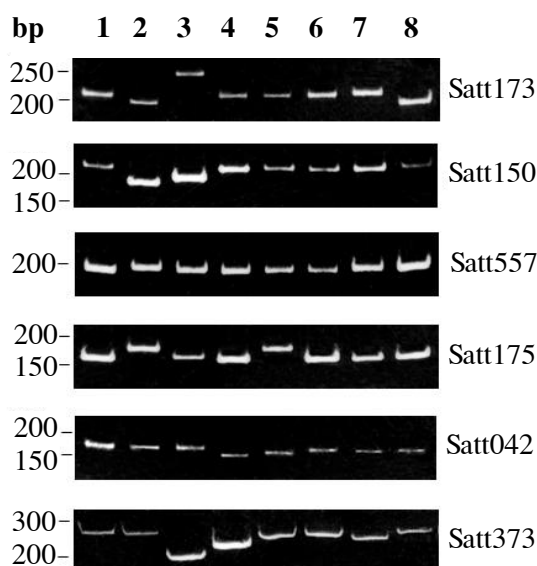
Các giống đậu tương đã được khảo nghiệm sơ bộ về khả năng kháng bệnh gỉ sắt G1-G10 và giống ĐT2000 được nghiên cứu tiếp bằng chỉ thị phân tử SSR. Sử dụng 12 chỉ thị SSR để khảo sát sự khác nhau giữa các giống này đã cho kết quả trên hình 2. Trong đó, 10 chỉ thị SSR cho sự đa dạng di truyền giữa các giống, còn hai chỉ thị Satt005 và Satt567 không phát hiện được sự đa dạng này. Các chỉ thị Satt146 và Satt373 cho sự đa dạng nhất giữa các giống nghiên cứu (5 an-len), còn chỉ thị Satt557 ít nhất (2 an-len). Hệ số đa dạng di truyền được tính trên bảng 1. Như vậy, việc nghiên cứu các giống cho thấy chỉ thị Satt557 có hệ số này thấp nhất 0,1975, còn chỉ thị Satt373 có hệ số này cao nhất 0,7655, trung bình là 0,6161.

Việc nghiên cứu bằng chương trình NTSYS 2.0 về khoảng cách di truyền giữa các giống này cho thấy chúng có thể chia thành 2 nhóm. Nhóm 1 gồm các giống G1, G2 và G3; nhóm 2 gồm các giống G4, G7, G8, G9, G10 và ĐT2000. Trong nhóm 2, có thể chia tiếp thành 2 nhánh nhỏ: hai giống G8, G9 tách riêng so với 4 giống còn lại G4, G7, G10, ĐT2000 (hình 3).

Song song với việc nghiên cứu sử dụng chỉ thị phân tử, TTĐĐ đã tiến hành thí nghiệm đánh giá khả năng kháng bệnh gỉ sắt của những giống đậu tương này (bảng 2). Các ký hiệu từ G1-G10 là những giống tương ứng trong tập đoàn đậu tương như sau: G1-V74, G2-DH4; G3-AGS332; G4-ĐT2000; G7-GC104.28; G8-GC58; G9-GC8586; G10-8600.49. Đánh giá ở điều kiện nhân tạo sử dụng nguồn bệnh gỉ sắt lấy tại khu nhà lưới của Viện Cây lương thực và Cây thực

phẩm, cơ sở 2 (Thanh Trì, Hà Nội). Khả năng kháng bệnh gỉ sắt được đánh giá như sau: kháng cao: 0-20%; kháng: 21-30%; nhiễm trung bình: 31-50%; nhiễm: 51-70%; nhiễm nặng: 71-100%. Cần lưu ý rằng bệnh gỉ sắt do nhiều nòi nấm gây

ra; những nòi nấm ở các vùng khác nhau tác động lên các giống khác nhau. Kết quả khảo sát các giống sử dụng nòi gây bệnh gỉ sắt từ Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm, cơ sở 1 (Hải Dương) có những biên độ giao động nhất định.



Hình 2. Phổ điện di sản phẩm SSR trên PAGE 12% của các giống đậu tương:
1. G1; 2. G2; 3. G3; 4. G4; 5. G7, 6. G8; 7. G9; 8. G10

Bảng 1

Kết quả phân tích sự đa dạng sử dụng các chỉ thị SSR liên quan đến tính đa dạng di truyền

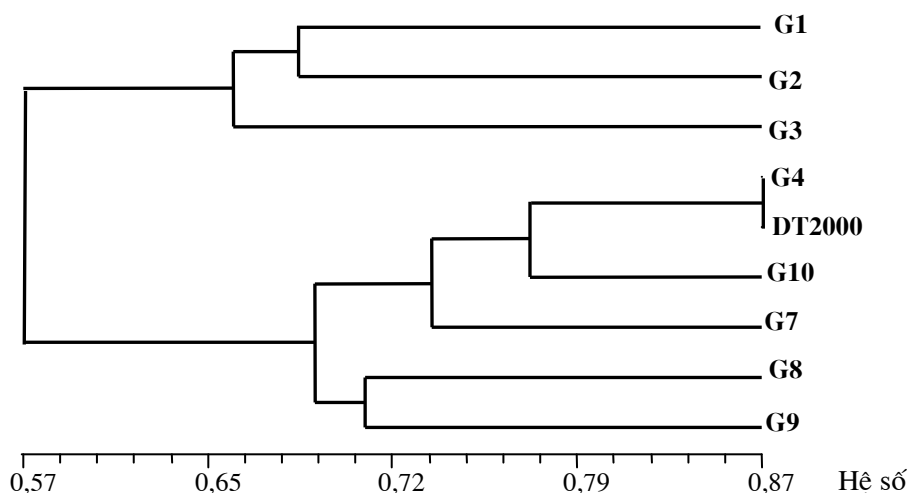
STT	SSR	Dạng SSR	Số an-len	Hệ số đa dạng (H)
1	Satt146	(Att) ₁₇	5	0,7162
2	Satt175	(Att) ₁₆	3	0,4938
3	Satt173	(Att) ₁₈	4	0,6914
4	Satt431	(Att) ₂₁	4	0,7161
5	Satt009	(Att) ₁₄	4	0,7285
6	Satt 557	(Att) ₁₇ GAT	2	0,1975
7	Satt 489	(Att) ₂₃ GTT	3	0,568
8	Satt373	(Att) ₂₁	5	0,7655
9	Satt150	(Att) ₂₀	4	0,6174
10	Satt 042	(Att) ₂₇	4	0,6668

Kết quả cho thấy ba giống G1, G2 và G3 đều bị nhiễm nặng với chỉ số bệnh 90-95%. Ba giống G4, G7 và G10 là các giống kháng bệnh gỉ sắt cao: 10-15%; trên thực tế, giống G4 chính là giống DT2000. Còn hai giống G8, G9 là các giống nhiễm trung bình: 33-36% (bảng 2). Kết quả này tương đối phù hợp với kết quả so sánh khoảng cách di truyền giữa các giống sử dụng

12 chỉ thị phân tử SSR. Để chọn cặp bố mẹ cho phép lai nhằm tìm ra gen kháng bệnh, ba giống bị nhiễm nặng G1, G2 và G3 và ba giống kháng cao G4, G7 và G10 đều có thể sử dụng trong lai tạo. Việc cần thiết là tìm được các chỉ thị phân tử cho sự đa hình giữa từng cặp lai với khả năng kháng bệnh ngược nhau. Mười chỉ thị phân tử SSR đều cho sự đa dạng giữa hai nhóm này ở

những mức độ khác nhau. Ví dụ như: chỉ thị Satt557 cho sự đa hình giữa giống bị nhiễm bệnh G2 và các giống kháng bệnh cao G4, G7 và G10; nhưng không cho sự đa dạng giữa hai giống bị nhiễm bệnh G1, G3 với các giống kể trên. Chỉ thị Satt173 cho sự đa hình giữa giống

G3 với cả ba giống G4, G7 và G10; nhưng chỉ cho sự đa hình giữa giống G2 và hai giống G4 và G7; giữa giống G1 và giống G10... Vì vậy, khả năng tìm ra sự đa hình giữa các giống bị nhiễm bệnh và các giống kháng bệnh là rất có triển vọng.



Hình 3. Tính đa dạng di truyền của một số giống đậu tương kháng bệnh gỉ sắt

Bảng 2

Khả năng kháng bệnh gỉ sắt của các giống đậu tương được nghiên cứu
(số liệu của TT Đậu đỗ)

Ký hiệu	Giống đậu tương	Chỉ số bệnh	Ký hiệu	Giống đậu tương	Chỉ số bệnh
G1	V74	95 □ 5	G7	GC 10428	10 □ 9
G2	ĐH4	95 □ 5	G8	GC58	33 □ 5
G3	AGS 332	90 □ 5	G9	GC 8586	36 □ 5
G4	ĐT2000	15 □ 5	G10	8600,49	15 □ 4

Chỉ thị phân tử SSR được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu tính đa dạng di truyền ở cây đậu tương. Abe và cs. [9] sử dụng 20 chỉ thị phân tử SSR trên 20 nhóm liên kết di truyền của đậu tương để nghiên cứu 131 giống đậu tương của các nước châu Á và cho biết trên sơ đồ phân loại hình cây, chúng phân thành nhóm: tập đoàn giống đậu tương của Trung Quốc và của Nhật Bản là những nguồn gen riêng biệt; tập đoàn giống đậu tương của Bắc Triều Tiên và của Hàn Quốc gần với cả Trung Quốc và Nhật Bản, còn các giống đậu tương của các nước Đông Nam Á và của Nam Á đều bắt nguồn từ Trung Quốc. Sử dụng 12 chỉ thị phân tử SSR để nghiên cứu một số giống đậu tương kể trên, bước đầu chúng tôi nhận thấy chúng phân thành nhóm theo mức độ kháng bệnh gỉ sắt.

Bằng cách khác, theo hướng lập bản đồ gen cho tính trạng kháng bệnh thối thân thối rễ do nấm *Phytophthora sojae* gây ra, Gordon và cs. [10] đã nghiên cứu 379 chỉ thị SSR (trong đó 104 chỉ thị SSR cho sự đa hình giữa cặp bố mẹ với khả năng kháng bệnh đối nhau) trên quần thể F2, F3 và tìm ra locut kháng bệnh Rps8 nằm trên nhóm liên kết F giữa hai chỉ thị Satt425 và Satt114. Những kết quả này rất quan trọng trong việc chọn giống với sự trợ giúp của chỉ thị phân tử (MAS-marker assisted selection). Khảo sát 12 chỉ thị phân tử SSR để tìm sự đa hình giữa cặp bố mẹ đối với bệnh gỉ sắt là một con số rất khiêm tốn. Kết quả của chúng tôi bước đầu định hướng cho việc nghiên cứu về gen kháng bệnh gỉ sắt trong tập đoàn giống đậu tương của nước ta.

III. KẾT LUẬN

Nghiên cứu các giống đậu tương có khả năng kháng bệnh gỉ sắt khác nhau bằng 12 chỉ thị phân tử SSR, cho thấy 10 chỉ thị SSR cho sự đa hình với hệ số đa dạng di truyền từ 0,1975 (Satt557) đến 0,7655 (Satt373), trung bình là 0,6161.

Về khoảng cách di truyền, các giống được chia thành 2 nhóm. Ba giống mẫn cảm với bệnh gỉ sắt G1, G2 và G3 tách thành một nhóm; nhóm 2 gồm 6 giống còn lại. Nhóm hai này được chia thành hai nhánh: hai giống nhiễm trung bình G8, G9 tách thành một nhánh, còn 4 giống kháng bệnh gỉ sắt cao G4, DT2000, G7 và G10 tạo thành nhánh 2. Như vậy, 10 chỉ thị SSR cho sự đa hình ở mức độ khác nhau giữa ba giống mẫn cảm với bệnh gỉ sắt G1, G2 và G3 với các giống kháng bệnh này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hartman G. L. et al., 1992: Plant Dis.,

76: 396-399.

2. Hartwig E. E., Bromfield K. R., 1983: Crop Sci., 23: 237-239.

3. Feuillet C. et al., 2003: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(25): 15253-15258.

4. Smith S. M., Hulbert S. H., 2005: Mol. Plant Microbe. Interact., 18(3): 220-228.

5. Keim P. et al., 1988: Soybean Genet. Newsl., 15: 150-152.

6. Trần Thị Phương Liên và cs., 2004: Tạp chí Công nghệ sinh học, 2(1): 77-84.

7. Cregan P. B. et al., 1999: Crop Sci., 39: 1464-1490.

8. Nei M., 1987: Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. NY.

9. Abe J. et al., 2003: Theor. Appl. Genet., 106: 445-453.

10. Gordon S. G. et al., 2006: Crop Sci., 46: 168-173.

STUDY OF THE GENETIC BIODIVERSITY OF SOME SOYBEAN CULTIVARS WITH DIFFERENT RUST RESISTANT ABILITIES

TRAN THI PHUONG LIEN, LE THI MUOI, TRAN DINH LONG

SUMMARY

The soybean cultivars G1, G2, G3, G4, G7, G8, G9, G10 and DT2000 were grown and tested for rust resistance. DNA isolated from the young leaves of these cultivars was also studied for the genetic diversity using 12 SSR (simple sequence repeats) markers.

The results showed the polymorphism between these cultivars. The genetic diversity index (H) values ranged from 0.1975 for Satt557 to 0.7655 for Satt373. An average of 3.8 alleles produced by SSR loci and a mean gene diversity of 0.6161 were obtained.

The genetic distance data revealed that there were two cultivar groups. Three cultivars G1, G2 and G3, which were susceptible to the rust, were in the first group. The second group consisted of six other cultivars G4, G7, G8, G9, G10 and DT2000. The second group was divided into two branches, based on their susceptibility to the rust infection. In the first branch were two varieties G8 and G9, which were moderately infected by the rust and the second branch consisted of four varieties G4, DT2000, G7 and G10, which were highly resistant to the rust.

According to the results of the investigation using fungal race provided by the Legume Research and Development Center, there were three susceptible cultivars G1, G2 and G3, with a disease index of 90 to 95% and three high resistant cultivars G4, G7 and G10, with a disease index of 10 to 15%. All of the ten SSR markers (Satt042, Satt146, Satt175, Satt173, Satt557, Satt489, Satt373, Satt150, Satt009 and Satt431) gave out polymorphism at different levels between the first and the second groups. This study has provided new data that would be useful for the selection of parents with different rust resistance abilities and high diversity of the SSR markers that were linked to the rust resistance characteristic.

Ngày nhận bài: 9-11-2005