LẬP BẢN ĐỒ CÁC LOCUT TÍNH TRẠNG SỐ LƯỢNG (QTL) QUY ĐỊNH TÍNH KHÁNG BỆNH ĐỐM LÁ MUỘN Ở LẠC (*ARACHIS HYPOGAEA* L.)

LƯU MINH CÚC, VŨ ĐỨC QUANG

Viện Di truyền Nông nghiệp

Lạc trồng (*Arachis hypogaea* L), là một cây lấy dầu quan trọng, được trồng rộng khắp trên hơn 100 nước trên thế giới. Trong số các bệnh hại lạc, bệnh đốm lá muộn do nấm *Phaeoisariopsis personata* (Berk. & M.A. Curtis van Arx) là một trong những bệnh lá hay gặp nhất. Một số nghiên cứu về di truyền tính kháng bệnh đốm lá muộn cho rằng, có hai gen lặn [10], trong khi Nevill lại giả định rằng có tới 5 locut quy định tính kháng để lý giải cho sự di truyền tính kháng bệnh với toàn bộ các alen lặn [9]. Coffelt và Porter lại cho rằng sự di truyền tính kháng bệnh có ảnh hưởng của nhân tố tế bào chất [3]. Như vậy nhìn chung các tác giả đều thống nhất tính kháng bệnh là do tác động gen cộng tính quy định.

Trong những năm gần đây, công tác chọn tạo giống lạc kháng với các bệnh hại đã đạt được một số thành công nhất định. Một số giống lạc kháng vừa với bệnh đốm lá muộn đã được công nhận ở Trung Quốc, Ấn Độ, Mauritius và Mỹ. Trong thực tế, có rất nhiều giống lạc dại kháng cao với bệnh đốm lá muộn. Nhưng việc chuyển các gen kháng từ lạc dại vào lạc trồng lại gặp nhiều khó khăn do khó tương thích về bộ gen và tính kháng bệnh lại thường đi kèm với một số tính trạng như ít hạt, chín muộn□ mà các nhà chọn giống không mong muốn. Chính vì thế, xây dựng bản đồ di truyền liên kết với gen kháng có thể đẩy nhanh tốc độ và hiệu quả quá trình chọn tạo giống, góp phần vào việc quy tụ các gen kháng để chọn ra được giống lạc có tính kháng bệnh cao. Kết quả nghiên cứu về di truyền tính kháng bệnh đốm lá muộn trên cây lạc đã được chúng tôi tiến hành từ năm 2003 đến nay cho thấy tính kháng bệnh đốm lá muộn được kiểm soát không phải bởi 1 hay vài gen chính (major genes), mà được quy định bởi các gen phụ (minor genes) hay còn gọi là các locut tính trạng số lượng (QTL). Trong công trình này, chúng tôi tiến hành xây dựng bản đồ nhóm liên kết dựa trên cơ sở các chỉ thị SSR ở cây lạc và thiết lập bản đồ các locut tính trạng số lượng liên quan đến tính kháng bệnh đốm lá muộn trên cây lạc.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu: Sử dụng giống chuẩn nhiễm TMV2 làm cây mẹ và giống kháng ICG99001 làm cây bố trong phép lai tạo quần thể nghiên cứu F_2 của tổ hợp lai (ICG99001 x TMV2). Các chỉ thị vi vệ tinh SSR ở lạc được dùng để đánh giá độ đa hình giữa hai giống bố mẹ, trên cơ sở đó lựa chọn các chỉ thị để lập bản đồ di truyền đối với quần thể F_2.

Phương pháp: ADN hệ gen của hai giống bố mẹ và các con lai F_2 được tách chiết và tinh sạch bằng phương pháp CTAB với một số thay đổi theo Mace và cs. [7]. Khảo sát đa hình ADN của các cây bố mẹ và phân tích kiểu gen của các cá thể F_2 thông qua kết quả phản ứng PCR với các chỉ thị SSR, điện di sản phẩm PCR trên gel polyacrylamide và hiện băng ADN bằng phương pháp nhuộm bạc theo Kolodny và cs. [5] với một số cải tiến, sau đó ghi nhận các alen của từng locut SSR đối với cây bố mẹ và mỗi cá thể F_2.

Số liệu phân tích SSR trong quần thể F_2 được xử lý trong chương trình MAPMAKER/EXP 3.0 [6] để thiết lập bản đồ nhóm liên kết.

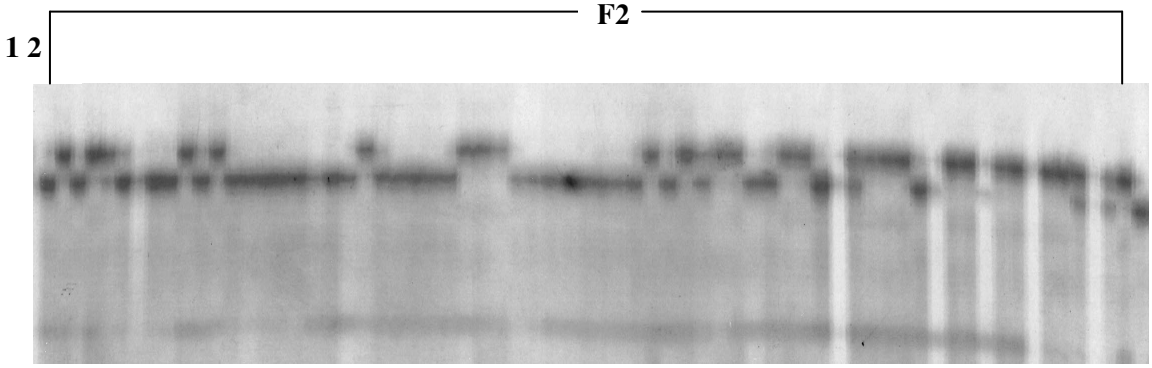
Số liệu các giá trị quan sát của các tính trạng LF3, LC3 và LAD5 cùng với số liệu phân tích SSR trong quần thể F_2 được xử lý trong chương trình MAPMAKER/QTL 1.1 [6] để thiết lập bản đồ các locut tính trạng số lượng (QTL) quy định tính kháng bệnh đốm lá muộn.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Xây dựng bản đồ nhóm liên kết

Để khảo sát đa hình ADN của cặp cây bố

mẹ, chúng tôi sử dụng 363 chỉ thị SSR, bao gồm 193 chỉ thị của Ferguson và cs. [4] cùng với 170 chỉ thị SSR mới phát hiện bởi Cuc và cs. [2]. ADN hệ gen của các cây bố mẹ được dùng làm ADN khuôn cho phản ứng PCR, với mồi là mồi của 363 chỉ thị SSR nói trên. Sau đó sản phẩm PCR được điện di trên gel polyacrylamide rồi tiến hành nhuộm bạc để phát hiện các băng ADN. Kết quả cho thấy, có 85 chỉ thị SSR (23,4%) gồm 50 chỉ thị SSR của Ferguson và cs. và 35 chỉ thị SSR mới phát hiện bởi Cuc và cs. cho đa hình ADN giữa 2 cây bố mẹ. Như vậy 85 chỉ thị SSR "đa hình" này thích hợp để sử dụng cho thiết lập bản đồ nhóm liên kết và xác định chỉ thị SSR liên kết với tính kháng bệnh đốm lá muộn ở lạc. Để tiến hành đánh giá kiểu gen (genotyping) của từng cá thể F_2, ADN hệ gen của các cây bố mẹ và 178 cá thể F2 được dùng làm ADN khuôn cho phản ứng PCR với mồi là mồi của 85 chỉ thị SSR "đa hình" kể trên. Tiếp theo là điện di sản phẩm PCR và nhuộm bạc (hình 1). Cuối cùng là ghi nhận các alen của từng locut SSR đối với các cây bố mẹ và mỗi cá thể F2.

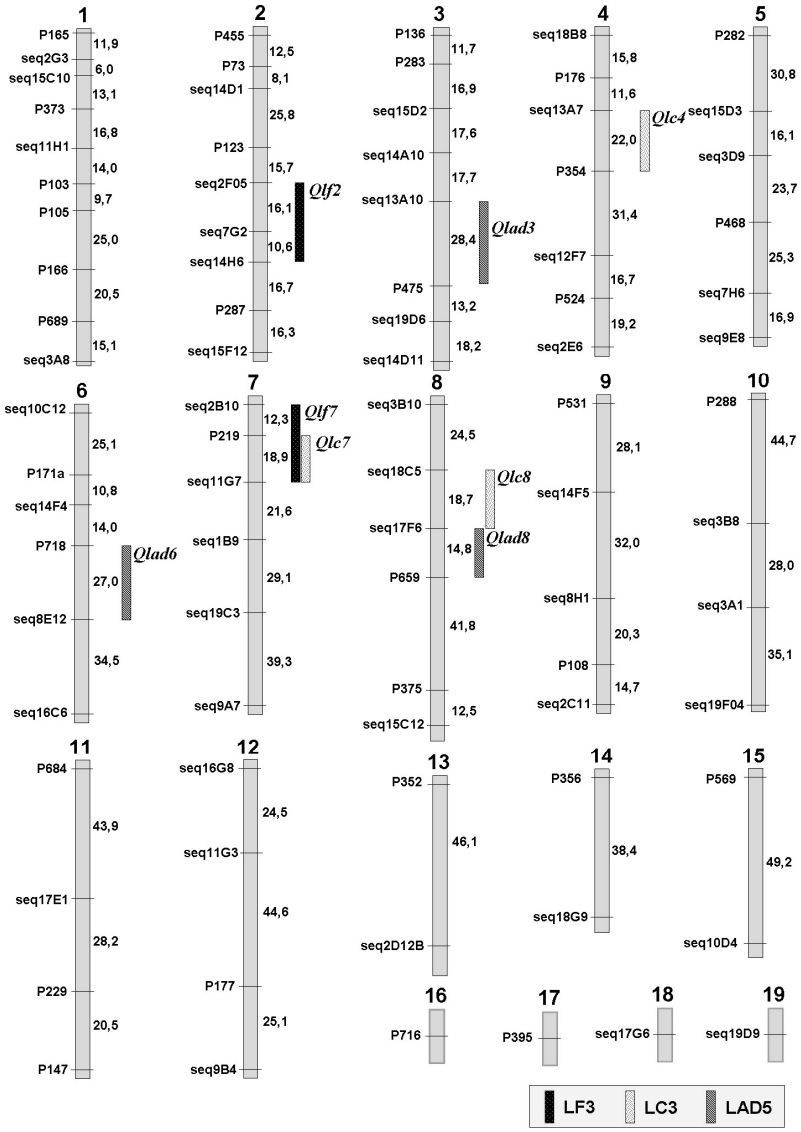


Hình 1. Ảnh điện di ADN trên gel polyacrylamide (mồi SSR P354):
làn gel 1: ICG99001; làn gel 2: TMV2; các làn gel còn lại: các cây F2

Các số liệu kiểu gen của 85 chỉ thị SSR ở 178 cá thể F2 được xử lý trên chương trình MAPMAKER/EXP 3.0 [6]. Với khoảng cách tối đa giữa 2 chỉ thị là 50 cM và LOD = 3, bản đồ liên kết được thiết lập bao gồm 81 chỉ thị SSR phân thành 15 nhóm liên kết, mỗi nhóm chứa từ 2 tới 10 chỉ thị (hình 2). Bốn chỉ thị còn lại đứng độc lập với nhau và không thuộc về 15 nhóm liên kết trên. Tổng chiều dài của bản đồ liên kết là 1475,4 cM, với khoảng cách trung bình giữa 2 chỉ thị SSR bằng 18,4 cM. Nhóm liên kết 1 có 10 chỉ thị SSR với tổng chiều dài là 132,1 cM. Nhóm liên kết 2 có 9 chỉ thị với tổng chiều dài là 121,8 cM. Nhóm liên kết 3 có 8 chỉ thị liên kết với tổng chiều dài là 123,7 cM. Nhóm liên kết 4 có 7 chỉ thị liên kết với tổng chiều dài là 116,7 cM. Các nhóm liên kết 4, 6, 7 và 8 có 6 chỉ thị liên kết với tổng chiều dài tương ứng là 112,8 cM, 111,4 cM, 121,2 cM và 112,3 cM. Nhóm liên kết 9 có 5 chỉ thị với tổng chiều dài là 95,1 cM. Ba nhóm liên kết 10, 11 và 12 có 4 chỉ thị liên kết với tổng chiều dài tương ứng là 107,8 cM, 92,6 cM và 94,2 cM. Ba nhóm liên kết 13, 14 và 15 chỉ có 2 chỉ thị SSR. Các chỉ thị SSR liền kề gần nhau nhất là các chỉ thị seq2G3 và seq15C10 (cách nhau 6 cM) nằm trên nhóm liên kết số 1. Các chỉ thị SSR liền kề cách nhau xa nhất là các chỉ thị P352 và seq2F05 (cách nhau 49,2 cM) nằm trên nhóm liên kết số 15 (hình 2).

2. Lập bản đồ các locut tính trạng số lượng (QTL) liên quan đến tính kháng bệnh đốm lá muộn

Chúng tôi đã khảo sát 7 tính trạng liên quan đến tính kháng/nhiễm bệnh đốm lá muộn, bao gồm: IP - thời gian xuất hiện triệu chứng bệnh đầu tiên (ngày); LP - thời gian bào tử đầu tiên hình thành (ngày); LF3 - tần xuất vết bệnh/cm^2 lá vào ngày thứ 20; LC3 - số vết bệnh/lá vào ngày thứ 30; LAD5 - tỷ lệ diện tích lá bị bệnh vào ngày thứ 50 (%); DF5 - tỉ lệ lá rụng vào ngày thứ 50 (%). Phân tích thống kê cho thấy 3 tính trạng LF3, LC3 và LAD5 có sự phân bố các giá trị quan sát phù hợp với hàm phân bố chuẩn nên chúng được sử dụng để thiết lập bản đồ QTL quy định tính kháng bệnh đốm lá muộn ở lạc.



Hình 2. Bản đồ nhóm liên kết và các QTL quy định tính kháng bệnh đốm lá muộn đối với các tính trạng LF3, LC3 và LAD5 trên cây lạc

Các số liệu quan sát của 3 tính trạng LF3, LC3 và LAD5 ở 178 cá thể F_2 được nhập vào bản đồ nhóm liên kết để xử lý trong chương trình MAPMAKER/QTL 1.1 [6]. Kết quả cho thấy trên bản đồ liên kết có 8 QTL chi phối các tính trạng LF3 (gồm 2 QTL), LC3 (gồm 3 QTL) và LAD5 (gồm 3 QTL) (hình 2 và bảng 1).

a. Các QTL quy định tính trạng tần xuất vết bệnh/cm² lá (LF3)

Hai QTL là *Qlf2* và *Qlf7* quy định 32,7% sự biến động kiểu hình về tần xuất vết bệnh trên cm² lá ở ngày thứ 20 (LF3). QTL thứ nhất là *Qlf2* định vị trên nhóm liên kết 2, trong vùng trung gian giữa 3 chỉ thị SSR seq2F05 - seq7G2 và seq14H6 với khoảng cách giữa 3 chỉ thị đó khoảng 26,7 cM. Còn QTL thứ hai - *Qlf7* được định vị trên nhóm liên kết 7, trong vùng trung gian giữa 2 chỉ thị seq2B10 và seq11G7 với khoảng cách giữa 2 chỉ thị đó khoảng 31,1 cM.

b. Các QTL quy định tính trạng số vết bệnh/lá (LC3)

Các QTL tìm được quy định cho tính trạng số vết bệnh/lá chi phối tới 40,3% sự biến động kiểu hình bao gồm *Qlc4, Qlc7, Qlc8*. QTL *Qlc4* định vị trên nhóm liên kết 4, trong vùng trung gian giữa 2 chỉ thị SSR seq13A7 và P354 với

khoảng cách giữa 2 chỉ thị đó khoảng 22 cM. QTL *Qlc7* định vị trên nhóm liên kết 7, trong vùng trung gian giữa 2 chỉ thị P219 và seq11G7 với khoảng cách giữa 2 chỉ thị đó khoảng 18,9 cM. Còn QTL thứ ba - *Qlc8* định vị trên nhóm liên kết 8, trong vùng trung gian giữa 2 chỉ thị seq18C5 và seq17F6 với khoảng cách giữa 2 chỉ thị đó khoảng 18,7 cM.

c. *Các QTL quy định tính trạng diện tích lá bị bệnh (LAD5)*

So với các QTL tìm được đối với cả ba tính trạng nghiên cứu, các QTL quy định tính trạng diện tích lá bị bệnh chỉ quy định 29,1% biến động kiểu hình. QTL thứ nhất là *Qlad3* định vị trên nhóm liên kết 3, trong vùng trung gian giữa 2 chỉ thị SSR seq13A10 và P475 với khoảng cách giữa 2 chỉ thị đó khoảng 28,4 cM. QTL *Qlad6* định vị trên nhóm liên kết 6, trong vùng trung gian giữa 2 chỉ thị P718 và seq8E12 với khoảng cách giữa 2 chỉ thị đó khoảng 27 cM. QTL thứ ba - *Qlad8* định vị trên nhóm liên kết 8, trong vùng trung gian giữa 2 chỉ thị seq17F6 và P659 với khoảng cách giữa 2 chỉ thị đó khoảng 14,8 cM.

Bảng 1

Đặc điểm của các QTL quy định tính kháng bệnh đốm lá muộn ở quần thể F_2 từ tổ hợp lai ICGV99001xTMV2

Tính trạng	Locut	Nhóm liên kết	Chỉ thị SSR kề 2 phía của QTL	d	Peak LOD	MBĐ1 (%)	MBĐ2 (%)
LF3	***Qlf2***	2	Seq2F5 - seq14H6	26,7	4,62	16,8	32,7
	Qlf7	7	Seq2B10 - seq11G7	31,2	3,51	15,9	
LC3	***Qlc4***	4	Seq13A7 - P354	22,0	3,79	10,6	40,3
	Qlc7	7	P219 - seq11G7	18,9	6,47	17,8	
	Qlc8	8	seq18C5 - seq17F6	18,7	5,05	11,9	
LAD5	***Qlad3***	3	seq13A10 - P475	28,4	4,05	11,1	29,1
	Qlad6	6	P718 - seq8E12	27,0	2,95	9,2	
	Qlad8	8	Seq17F6 - P659	14,8	2,79	8,8	

Ghi chú: d. Khoảng cách giữa 2 chỉ thị kề (cM); MBĐ1. Mức biến động kiểu hình của QTL; MBĐ2. Mức biến động kiểu hình của tính trạng

Nhìn tổng thể, các QTL của mỗi tính trạng chưa kiểm soát được 50% biến động kiểu hình của từng tính trạng. Rất có thể vẫn còn có thêm một vài QTL nữa quy định cho mức biến động còn lại ứng với mỗi tính trạng kể trên. Ngoài ra, hai QTL *Qlf7* và *Qlc7* nằm chồng lên nhau trên nhóm liên kết 7, còn hai QTL khác là *Qlc8* và *Qlad8* nằm kế tiếp nhau trên nhóm liên kết 8. Điều này chứng tỏ có mối liên quan giữa các tính trạng LF3 với LC3, cũng như giữa LC3 với LAD5. Có một số chỉ thị phân tử nằm ở những vị trí khá đặc biệt đối với các QTL. Đó là chỉ thị seq7G2 - nằm gần khoảng giữa của *Qlf2*; hay P219 - nằm gần khoảng giữa của *Qlf7* và đồng thời kề với 1 đầu của *Qlc7*; hoặc seq3B10 - nằm giữa 2 QTL là *Qlc8* và *Qlad8*. Như vậy là các chỉ thị này có giá trị thực tiễn cao khi áp dụng cho quy trình chọn giống nhờ chỉ thị phân tử đối với các QTL quy định tính kháng bệnh đốm lá muộn.

Cho tới nay, mới chỉ có rất ít bản đồ liên kết được công bố đối với cây lạc. Burow và cs. đã công bố bản đồ liên kết của 370 lôcut RFLP thành 23 nhóm liên kết khi nghiên cứu quần thể tứ bội được tạo ra khi lai giữa dòng nhận gen *A. batizocoi* x *(A. cardenasii* x *A. diogoi)* với *A. hypogaea* [1]. Gần đây, Moretzsohn và cs. nghiên cứu lập bản đồ của 80 chỉ thị SSR thành 11 nhóm liên kết với khoảng cách trung bình của hai chỉ thị là 7,24cM [8]. Như vậy công trình này của chúng tôi là một trong những công trình đầu tiên xây dựng được bản đồ liên kết với 85 chỉ thị SSR, cũng như thiết lập bản đồ sơ bộ cho các QTL quy định tính kháng bệnh đốm lá muộn trên cây lạc.

III. KẾT LUẬN

Qua đánh giá đa hình ADN giữa các cây bố mẹ của tổ hợp lai "ICG99001 x TMV2" đã tìm

được 85 chỉ thị SSR (trên tổng số 363 chỉ thị SSR khảo sát) cho đa hình giữa các cây bố mẹ.

Đã xây dựng được bản đồ liên kết ở cây lạc bao gồm 81 chỉ thị SSR (4 chỉ thị SSR còn lại đứng độc lập). Bản đồ liên kết bao gồm 15 nhóm liên kết với tổng chiều dài là 1475,4 cM, với khoảng cách trung bình giữa 2 chỉ thị SSR bằng 18,4 cM.

Xác định được 8 QTL quy định 32,7%, 40,3% và 29,1% sự biến động kiểu hình của các tính trạng LF3, LC3 và LAD5 tương ứng. Tám QTL này được định vị trên các nhóm liên kết số 2, 3, 4, 6, 7 và 8. Chúng nằm trong khoảng trung gian giữa các chỉ thị SSR với khoảng cách giữa các chỉ thị kề 2 đầu QTL từ 14,8 tới 31,2 cM.

Kết quả này có thể làm tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về lập bản đồ liên kết và bản đồ QTL, cũng như cho việc ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống kháng bệnh đốm lá muộn ở lạc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Burow M. D. et al.**, 2001: Genetics, 159: 823-837.
2. **Cuc L. M. et al.** 2008a: Isolation and characterization of novel microsatellite markers and their application for diversity assessment in cultivated groundnut (Arachis hypogaea). BMC Plant Biology, 8: 55.
3. **Coffelt G. T.** and **Porter D. M.**,1982: Plant Dis., 66: 385-387.
4. **Ferguson M. E. et al.**, (2004). Theor. Appl. Genet., 108: 1064-1070.
5. **Kolodny G. M.**, 1984: Anal. Biochem., 138(1): 66-67.
6. **Lander E. S. et al.**, 1993: MAP MAKER/ EXP.3.0 AND MAP MAKER/QTL 1.1 computer programme. Whitehead Institute. 9 Cambridge Center, Cambridge MA 02142. Copyright 1987-1993.
7. **Mace E. S. et al.**, 2003: Plant Molec. Biol. Rep., 21: 459a-459h.
8. **Moretzsohn M. C. et al.**, 2005: Theor. Appl. Genet., 111: 1060-1071.
9. **Nevill D. J.**, (1982). Oleagineux, 37: 355-362.
10. **Tiwari S. P. et al.,** 1984: Journal of Cytology and Genetics, 19: 97-101.

QTL MAPPING OF RESISTANCE TO LATE LEAF SPOT IN GROUNDNUT (*ARACHIS HYPOGAEA* L.)

LUU MINH CUC, VU ĐUC QUANG

SUMMARY

Cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.) is an important oilseed crop grown extensively throughout the semi-arid tropics of Asia, Africa and Latin America. Late leaf spot (LLS) caused by *Phaeoisariopsis personata* is one of the major diseases significantly decreasing in groundnut yields. This study aimed to construct a linkage map as well as a map for QTLs conferring resistance to late leaf spot in groundnut. Parental polymorphism survey of the two lines of ICG99001 (LLS-resistant) and TMV2 (LLS-susceptible) showed that 85 out of 363 SSR markers used were polymorphic for the 2 parental lines. A population of 178 F_2 plants from the cross of ICG99001xTMV2 was used to construct a linkage map. A map of 15 linkage groups with 81 SSR markers was built. The total length of the map was 1475.4 cM with the average distance between two markers being 18.4 cM. The traits LF3 (lesion frequence per cm^2 of leaf), LC3 (lesion number per leaf) and LAD5 (leaf area of damage) were used for QTL analysis and mapping. It showed that these three traits appeared to be controlled by 8 QTLs that located on the linkage groups 2, 3, 4, 6, 7 and 8. The two QTLs namely *Qlf2* and *Qlf7* explained 32.7% of the total phenotypic variation for the LF3 trait, while the three QTLs such as *Qlc4*, *Qlc7* and *Qlc8* explained 40.3% of the total phenotypic variation for the LC3 trait, and the other three QTLs such as *Qlad3*, *Qlad6* and *Qlad8* explained 31.2% of the total phenotypic variation for the LAD5 trait. A possibility for practical utilization of the SSR markers closely located to the QTLs was discussed.

Ngày nhận bài: 19-3-2008