

LẬP BẢN ĐỒ QTL KHÁNG ĐỘC NHÔM TRONG QUẦN THỂ RIL ĐẬU TƯƠNG (*Glycine max* L.) BỞI TRÌNH TỰ RAD

Xinxin Wang, Yanbo Cheng, Ce Yang, Cunyi Yang, Yinghui Mu, Qiuju Xia, Qibin Ma

- 1 Phòng thí nghiệm trọng điểm nhà nước về bảo tồn và sử dụng các nguồn sinh học nông nghiệp cận nhiệt đới, Đại học Nông nghiệp Nam Trung Quốc, Quảng Châu, Quảng Đông, Trung Quốc,
- 2 Phòng thí nghiệm trọng điểm về tạo giống phân tử thực vật của Tỉnh Quảng Đông, Cao đẳng Nông nghiệp, Đại học Nông nghiệp Nam Trung Quốc, Quảng Châu, Quảng Đông, Trung Quốc,
- 3 Trung tâm Nghiên cứu Kỹ thuật Quốc gia về Nhân giống Thực vật trong Không gian, Đại học Nông nghiệp Nam Trung Quốc, Quảng Châu, Quảng Đông, Trung Quốc,
- 4 Viện Genomics Bắc Kinh (BGI) - Thâm Quyển, Thâm Quyển, Trung Quốc

TÓM TẮT

Độc tính nhôm (Al^{3+}) là một độc tính phi sinh học điển hình làm hạn chế nghiêm trọng sản lượng cây trồng ở đất chua. Trong nghiên cứu này, một quần thể RIL (dòng lai tái tổ hợp, F_{12}) có nguồn gốc từ tổ hợp lai Zhonghuang 24 (ZH 24) x Huaxia 3 (HX 3) (160 dòng) đã được thử nghiệm bằng cách trồng thủy canh. Độ dài rễ tương đối (RRE) và hàm lượng Al^{3+} đỉnh (AAC) được đánh giá cho mỗi dòng và mối tương quan âm đáng kể đã được phát hiện giữa hai chỉ số. Dựa trên bản đồ liên kết di truyền mật độ cao, dữ liệu kiểu hình được sử dụng để xác định các locus tính trạng số lượng (QTLs) liên quan đến các tính trạng này. Với khoảng thời gian tổng hợp ánh xạ (CIM) của bản đồ liên kết, năm QTL giải thích 39,65% biến thể RRE và AAC được phát hiện trên nhiễm sắc thể (Chrs) Gm04, Gm16, Gm17 và Gm19. Hai QTLs mới, $qRRE_04$ và $qAAC_04$, nằm trên cùng một vùng của bin93-bin94 trên Chr Gm04, giải thích sự biến đổi kiểu hình lần lượt là 7,09% và 8,98%. Hơn nữa, kết quả phân tích biểu hiện của các gen ứng viên trong năm vùng di truyền của QTLs cho thấy sáu gen (*Glyma.04g218700*, *Glyma.04g212800*, *Glyma.04g213300*, *Glyma.04g217400*, *Glyma.04g216100* và *Glyma.04g220600*) thể hiện sự khác biệt đáng kể biểu hiện liên quan giữa việc xử lý Al^{3+} và sự kiểm soát của giống bố mẹ. Kết quả của phân tích qRT -PCR chỉ ra rằng *Glyma.04g218700* được điều chỉnh bằng cách xử lý Al^{3+} với mức độ biểu hiện tăng lên hàng trăm lần và có thể là gen ứng cử viên có tiềm năng vai trò trong phản ứng với ngộ độc nhôm. Do đó, những nỗ lực của chúng tôi sẽ cho phép phân tích các gen ứng cử viên và sẽ đóng góp vào các chiến lược cải thiện khả năng chống chịu nhôm ở đậu tương.

GIỚI THIỆU

Độc tính của nhôm (Al^{3+}) là một trong những yếu tố chính ảnh hưởng đến sản xuất cây trồng trên đất chua trên toàn thế giới. Khi độ pH của đất giảm xuống nhỏ hơn 5,0, Al được hòa tan như Al^{3+} gây độc thực vật, có ảnh hưởng xấu đến cây trồng. Người ta thấy rằng sự kéo dài của rễ có thể bị ức chế trong vài giây ở nồng độ vi cực của Al^{3+} . Vị trí chính của độc tính Al^{3+} ở đầu rễ nơi Al^{3+} liên kết với thành tế bào. Những thay đổi trong một số thành phần của thành tế bào dẫn đến khả năng hấp thụ đủ nước của rễ bị hạn chế và chất dinh dưỡng từ đất. Ngoài ra, rễ bị hư hại cản trở sự phát triển của chồi và cuối cùng làm giảm năng suất cây trồng.

Đậu tương là một trong những cây trồng quan trọng nhất trong tiểu vùng nhiệt đới và cũng bị phá hoại do độc tính của Al^{3+} trong đất chua. Do đó, điều tra về các đặc điểm liên quan đến độc tính của Al^{3+} thông qua sự kết hợp của các mầm đậu tương đã được xác định và công nghệ giải trình tự có ý nghĩa to lớn.

Ai cũng biết rằng hai loại cơ chế kháng Al^{3+} trong đậu tương có liên quan đến loại trừ Al^{3+} khỏi đỉnh gốc (loại trừ bên ngoài) hoặc tạo khả năng chịu đựng cho Al^{3+} trong

cây giao hưởng (tính kháng bên trong). Cơ chế loại trừ bên ngoài bao gồm bài tiết các axit hữu cơ để giải phóng Al^{3+} từ tế bào rễ, làm tăng pH của khí quyển và loại trừ bên ngoài các ô biên giới. Tuy nhiên, cơ chế dung nạp nội phụ thuộc vào sự che lấp của các axit hữu cơ và sự phân ly của Al^{3+} trong không bào. Sự trao đổi chất chống oxy hóa cũng như truyền tín hiệu hormone cũng góp phần vào việc kháng nhôm.

Khả năng chống chịu nhôm của đậu tương là một đặc điểm số lượng phức tạp với sự biến đổi di truyền đáng kể. Các nghiên cứu về cấu trúc di truyền của khả năng chống chịu nhôm của đậu tương vẫn còn đang thách thức do sự tương tác của môi trường và kiểu gen. Chọn giống thông thường có dựa vào việc lựa chọn các giống cây trồng có khả năng chống chịu Al^{3+} cao để cải thiện cây trồng, nhưng phương pháp này tốn kém và mất thời gian. Trong những năm gần đây, nghiên cứu liên kết toàn bộ bộ gen (GWAS) và lập bản đồ QTL thường được sử dụng để lập bản đồ các dấu hiệu di truyền liên quan đến các tính trạng định lượng. Phân tích GWAS thường liên quan đến các quần thể tự nhiên để phát hiện mối tương quan giữa tính di truyền đa hình và sự biến đổi kiểu hình bằng các phương pháp thống kê dựa trên mối liên hệ mất cân bằng. Một số locus GWAS quan trọng và các gen ứng cử viên cho kháng Al^{3+} đã được báo cáo trong thập kỷ gần đây. Trong khi đó, chiến lược của bản đồ QTL đã nâng cao trình độ về cấu trúc di truyền của các đặc điểm phức tạp, điều này đã thúc đẩy cải tiến cây trồng. Theo đó, những nỗ lực sâu rộng đã được hướng vào lập bản đồ QTL cho khả năng chống chịu nhôm ở *Arabidopsis thaliana* và một số cây trồng, bao gồm cả lúa, lúa mì, lúa mạch, ngô, đậu tương và cỏ linh lăng (alfalfa).

Ở đậu tương, một số QTL của khả năng chống chịu nhôm đã được xác định bằng cách sử dụng quần thể từ các nền tảng di truyền khác nhau, mà các đặc điểm của sự kéo dài rễ thường được sử dụng để thể hiện khả năng chịu đựng của nhôm. Vào đầu những năm 2000, một bản đồ liên kết di truyền có chứa 155 điểm đánh dấu đa hình độ dài đoạn bị hạn chế (RFLP) được xây dựng bằng cách sử dụng quần thể có nguồn gốc từ tổ hợp lai Young \times PI 416937 (Bianchihall và cs) đã phát hiện ra cơ sở di truyền của các tính trạng kháng Al^{3+} ở đậu tương bằng cách sử dụng bản đồ và chỉ ra năm liên kết đánh dấu RFLP độc lập kèm theo sự kéo dài của rễ (Qi và cs, Korir và cs tập trung vào các thể hệ con của tổ hợp Kefeng No.1 \times Nannong 1138-2 và sử dụng bản đồ liên kết di truyền với RFLP và trình tự đơn giản lặp lại các điểm đánh dấu (SSR) để phát hiện một QTL chính và hai QTL nhỏ cho khả năng kháng nhôm. Nói chung, các khám phá về bản đồ QTL chỉ ra rằng khoảng hai đến năm locus kiểm soát sự thay đổi trong các mức kháng Al.

Tuy nhiên, các chỉ thị phân tử truyền thống, bao gồm RFLP, SSR và đoạn khuếch đại đa hình chiều dài (AFLP), thể hiện mật độ thấp và phân bố không đồng đều trong bộ gen. Bản đồ QTL của các đặc điểm định lượng phức tạp như khả năng kháng nhôm trên đậu tương vẫn khó nắm bắt do hiệu quả và độ chính xác của định vị QTL hạn chế. Trong những năm gần đây, các dấu hiệu đa hình đơn nucleotide (SNP) đã xuất hiện với sự hỗ trợ của công nghệ giải trình tự thông lượng cao và đã được lập bản đồ trên các bộ gen thực vật với mật độ cao và phân bố tương đối đồng đều, do đó cần cải thiện độ chính xác của bản đồ QTL. Trong vài năm qua, bản đồ gen mật độ cao đã được xây dựng bằng cách sử dụng tái tổ hợp như những marker. Giải trình tự DNA liên kết với vị trí hạn chế (RAD-seq), một trong những phương pháp giải trình tự thế hệ tiếp theo (NGS), đã được sử dụng hiệu quả cho khám phá marker mật độ cao SNP và phân tích QTL. Trong lúa mạch và lúa mì, bản đồ gen mật độ cao đã được thành lập bằng công nghệ RAD-seq với hàng trăm nghìn marker SNP cũng như các marker đa hình khác. Abdel-Haleem và cs cải thiện bản đồ liên kết sử dụng các thể hệ con có nguồn gốc từ tổ hợp Young \times PI416937

và hơn nữa đã phát triển *Glyma08g42400* -SNP như một QTL chính được sử dụng để lựa chọn có sự hỗ trợ của marker kháng nhôm. Gần đây, một bản đồ liên kết di truyền mật độ cao dựa trên công nghệ RAD-seq đã được xây dựng để lập bản đồ các QTL cho cả các đặc điểm liên quan đến năng suất và chất lượng. Các bản đồ di truyền với mật độ cực cao cho các cây trồng đa bội phức tạp với marker DNA cho thấy công nghệ RAD-seq có thể được áp dụng thực tế để xác định cơ sở di truyền của tính trạng số lượng phức tạp.

Mục tiêu của nghiên cứu này là phát triển bản đồ di truyền mật độ cao sử dụng các marker với công nghệ RAD-seq để xác định QTLs cho các đặc điểm của khả năng kháng nhôm trong Quần thể tái tổ hợp F₁₂ có nguồn gốc từ tổ hợp lai Zhonghuang 24 (ZH 24) x Huaxia 3 (HX 3) và để phân tích các gen ứng cử viên có thể ảnh hưởng đến khả năng kháng nhôm bằng các phân tích làm giàu Gene Ontology (GO).

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Một quần thể tái tổ hợp với 160 dòng thuộc thế hệ F₁₂ có nguồn gốc từ tổ hợp lai giữa ZH 24 (mẹ) x HX 3 (bố) đã được sử dụng trong nghiên cứu hiện tại. ZH 24 là giống mẫn cảm với Al³⁺, có nguồn gốc từ tổ hợp Fendou 31 × Zhongdou 19, trong khi HX 3 là giống kháng Al³⁺, có nguồn gốc từ tổ hợp Guizao 1 × BRSMG68 (một giống cây trồng năng suất cao của Brazil). Tất cả các dòng F₁₂ của quần thể tái tổ hợp và giống bố mẹ được cung cấp bởi Trung tâm Cải tiến Đậu tương Quốc gia Quảng Đông, Đại học Nông nghiệp Nam Trung Quốc.

Phương pháp

Thử nghiệm thiết kế thử nghiệm để xác định kiểu hình

Một thử nghiệm sơ bộ được thiết kế để xác định nồng độ thích hợp của Al³⁺ và xử lý Al³⁺ cho phương pháp trồng thủy canh. Hai giống bố mẹ và năm dòng được chọn ngẫu nhiên (L10, L70, L154, L206 và L245) được sử dụng để xác định tính kháng Al³⁺ với RRE làm chỉ số phát hiện.

Nồng độ của AlCl₃ (0,5mM CaCl₂, pH 4,5) được đặt là 0, 5, 15, 20, 25 và 30μM. RRE của mỗi dòng và bố mẹ được đo bằng phân tích hình ảnh trong quá trình thí nghiệm liên tiếp trong 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ. Nồng độ và thời gian Al³⁺ cung cấp khoảng cách rộng nhất trong số các dòng này đã được chọn để sàng lọc quần thể RIL.

Kiểu hình của quần thể RIL được ước tính bởi RRE và AAC sau khi trồng thủy canh cùng với bố mẹ. Đối với mỗi dòng cũng như giống bố mẹ, các thí nghiệm thủy canh được thực hiện với ba lần lặp lại. Đối với mỗi lần lặp lại, 6 cây con với chiều dài rễ gần bằng nhau (khoảng 8cm) được cố định bằng cách sử dụng miếng xốp trong các hộp nhựa có hoặc không có xử lý AlCl₃ (0,5 mM CaCl₂, pH 4.5). Các giá trị trung bình của dữ liệu kiểu hình cho RRE và AAC được sử dụng để lập bản đồ và xác định các QTL cho khả năng kháng nhôm.

Thủy canh và đo tính trạng

Tổng số 80–100 hạt chắc của mỗi dòng và bố mẹ được nảy mầm trong môi trường tiệt trùng miculite trong ba ngày ở 26°C trong điều kiện bóng tối. Sáu cây con có chiều dài rễ giống nhau sau đó được giữ trong phao đỡ bằng bọt được treo trong các thùng nhựa 2,5 lít không có Al³⁺ để thích nghi với điều kiện thủy canh (0,5mM CaCl₂, pH 4,5, 16 giờ sáng/8 giờ tối). Sau 24 giờ thích nghi, cây con được chụp ảnh cẩn thận bằng máy ảnh

(Nikon, COOLPIX A1000) để xác định độ dài rễ chính bằng thước kẻ đúng tỉ lệ. Sau đó, cây con được chuyển sang dung dịch có hoặc không có $AlCl_3$ (0,5mM $CaCl_2$, pH 4,5). Rễ của cây con được chụp lại sau khi phơi nhiễm Al^{3+} . Đảm bảo độ chính xác của hai loại phép đo trước và sau khi tiếp xúc với Al^{3+} , chúng tôi đã đánh dấu gốc tại vị trí ban đầu của phép đo. Trong quá trình trồng, dung dịch chất dinh dưỡng được sục khí liên tục bằng một ống mềm nối với máy bơm không khí.

Độ dài rễ chính được xác định từ các bức ảnh bằng phần mềm ImageJ (Viện Y tế Quốc gia, <http://imagej.nih.gov/ij/>). Sự kéo dài của rễ được định nghĩa là chênh lệch giữa chiều dài ban đầu trước khi xử lý Al^{3+} và cuối cùng sau khi xử lý Al^{3+} . Sự kéo dài của rễ được kiểm soát (REC) và sự kéo dài của rễ nhiễm Al^{3+} (REA) đã được tính toán và RRE bằng $REA/REC \times 100\%$.

Sau khi xử lý Al^{3+} , rễ đỉnh (0–2cm) được cắt bỏ bằng dao mổ, rửa ba lần bằng dung dịch $CaCl_2$ 0,5M, và làm khô trên giấy lọc. Sau đó, sáu mẫu rễ của mỗi dòng và bố mẹ được đặt trong một ống ly tâm siêu nhỏ (1,5ml) có chứa 1,0ml HCl 2M và được chiết xuất trong 48 h với lắc liên tục để giải phóng Al^{3+} từ rễ đậu tương. Mức Al^{3+} trong các chất chiết xuất được xác định bằng thông số kỹ thuật phát xạ quang plasma kết hợp đo phổ phát xạ (ICP-OES) (VARIAN 710-ES, Mỹ).

Bản đồ di truyền và phát hiện QTL

Phân loại gen SNP. Việc phân loại gen đã được thực hiện như đã mô tả trước đây. Bộ gen mẫu đậu tương từ Williams 82 được sử dụng để đọc ánh xạ để so sánh với trình tự thẻ bằng phần mềm SOAP (Viện Genomic Bắc Kinh, <http://soap.genomics.org.cn/>). Dữ liệu đầu vào cho cuộc gọi SNP với realSFS đã được SAMtools chuẩn bị. RealSFS đã được sử dụng cho việc gọi SNP của mọi locus trong quần thể RIL. Khả năng xuất hiện các kiểu gen của mỗi cá thể đã được tích hợp và trích xuất dưới dạng ứng viên SNPs sau đó được lọc bằng cách sử dụng các tiêu chí sau: $40 \leq$ độ sâu ≤ 2500 , xác suất $\geq 95\%$. Những SNPs có độ tin cậy cao được sử dụng để thu được kiểu gen của bố mẹ và quần thể RIL. Hơn nữa, kiểu gen của tất cả SNP từ bộ gen mẫu đậu tương được phân tích bằng phương pháp cửa sổ trượt và tiếp tục được sử dụng cho mỗi cá thể để phát ra thông tin. Cuối cùng, một bản đồ gen tốt bao gồm 3.426 marker được xây dựng bằng MSTMap (<http://alumni.cs.ucr.edu/yonghui/mstmap.html>) và phần mềm MapChart (Đại học Wageningen, <https://www.wur.nl/vi/show/Mapchart.htm>).

Phân tích QTL. Một bản đồ di truyền mật độ cao đã được xây dựng như đã mô tả trước đây. Bản đồ khoảng thời gian tổng hợp ánh xạ (CIM) được thực hiện để phát hiện các QTL bằng WinQTLCart phần mềm (Đại học Bang North Carolina, <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>). Ngưỡng LOD có ý nghĩa 2,5 đối với QTLs được xác định bởi toàn bộ bộ gen phép thử hoán vị với 1.000 lần lặp lại với mức ý nghĩa 5%. Kết quả phân tích cũng cho thấy tác động của các QTL, giải thích tỷ lệ biến đổi kiểu hình của các QTL và sự tương tác của các QTL. Kết quả lập bản đồ QTL được so sánh toàn diện với được xuất bản trên Soybase (<http://www.soybase.org/>).

Phát hiện gen trong số các QTL.

Các gen trong toàn bộ vùng QTL được liệt kê bởi trang web Soybase (<http://www.soybase.org/>). Ngoài ra, dữ liệu từ NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) và Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) được sử dụng để xác định các miền bảo tồn của protein và các chức năng có thể có của các miền này. Các đoạn mô tả cụ

thể cho RT-PCR của các gen này được thiết kế bằng cách sử dụng phần mềm Premier 5 (PREMIER Biosoft, <http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/index.html>).

Chiết xuất RNA

Các điều kiện thủy canh để trồng cây đậu tương cũng giống như các điều kiện được sử dụng để phân tích kiểu gen, như được mô tả trong phần "Thủy canh và đo tính trạng". Lấy mẫu rễ đỉnh (0–2cm) của hai cây bố mẹ và được đông lạnh ngay bằng cách sử dụng nitơ lỏng. RNA tổng số được chiết xuất từ rễ đỉnh của cây con được trồng xử lý Al^{3+} hoặc xử lý hỗ trợ bằng thuốc thử TRIzol (TIANGEN, Trung Quốc). Sợi cDNA thứ nhất được tổng hợp bằng Bộ thuốc thử PrimeScript™ RT reagent Kit với gDNA Eraser (TAKARA, Trung Quốc) và được sử dụng để phân tích sâu hơn các mẫu biểu hiện cho các gen ứng viên.

Thử nghiệm sự biểu hiện gen

Thử nghiệm RT-PCR được thực hiện để phân tích sự biểu hiện của các gen trong rễ ngọn từ cây con bố mẹ, với gen β -*Tubulin* đậu tương làm tham chiếu nội bộ, với các môi cụ thể 5'-AACCTCCTCCTCATCGTACT-3' và 5'-GACAGCATCAGCCATGTTCA-3'.

Tổng thể tích của hỗn hợp PCR là 20 μ l, chứa 1 μ l sợi cDNA đầu tiên, 1 μ l mỗi đoạn môi, 7 μ l ddH₂O và 10 μ l hỗn hợp chứa Taq DNA polymerase. Phản ứng khuếch đại được thực hiện như sau: biến tính trước ở 95°C trong 3 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ (đối với hầu hết các gen; đối với β -*Tubulin*, sử dụng 26 chu kỳ) trong 15 giây ở 95°C, 15 giây ở 54°C và 30 giây ở 72°C với thời gian kéo dài cuối cùng là 5 phút ở 72°C. Các sản phẩm PCR được tách bằng điện di trên gel agarose. Hơn nữa, qRT-PCR tiếp tục được sử dụng để phân tích sự biểu hiện của các gen ứng viên. Tất cả các PCR đều được thực hiện trong các phản ứng 20 μ l bao gồm 1 μ l cDNA, 0,8 μ M cho mỗi môi gen cụ thể và hỗn hợp từ SYBR Green Supermix Kit (Takara, Nhật Bản). Điều kiện phản ứng như sau: biến tính trước ở 94°C trong 3 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ biến tính ở 94°C trong 10 giây và biến tính ở 54°C trong 10 giây; khi kết thúc phản ứng, hệ thống được duy trì ở 95°C trong 10 giây, tiếp theo là hạ nhiệt độ xuống 65°C trong 5 giây. Gen *Actin 3* của đậu tương được sử dụng như một tham chiếu nội bộ, với môi 5'-GTGCACAATTGATGGACCAG-3' và môi ngược 5'-GCACCACCGGAGAGAAAATA-3'. Các đoạn môi cụ thể cho RT-PCR và qRT-PCR của các gen này đã được thiết kế sử dụng phần mềm Premier 5 (PREMIER Biosoft, <http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/index.html>).

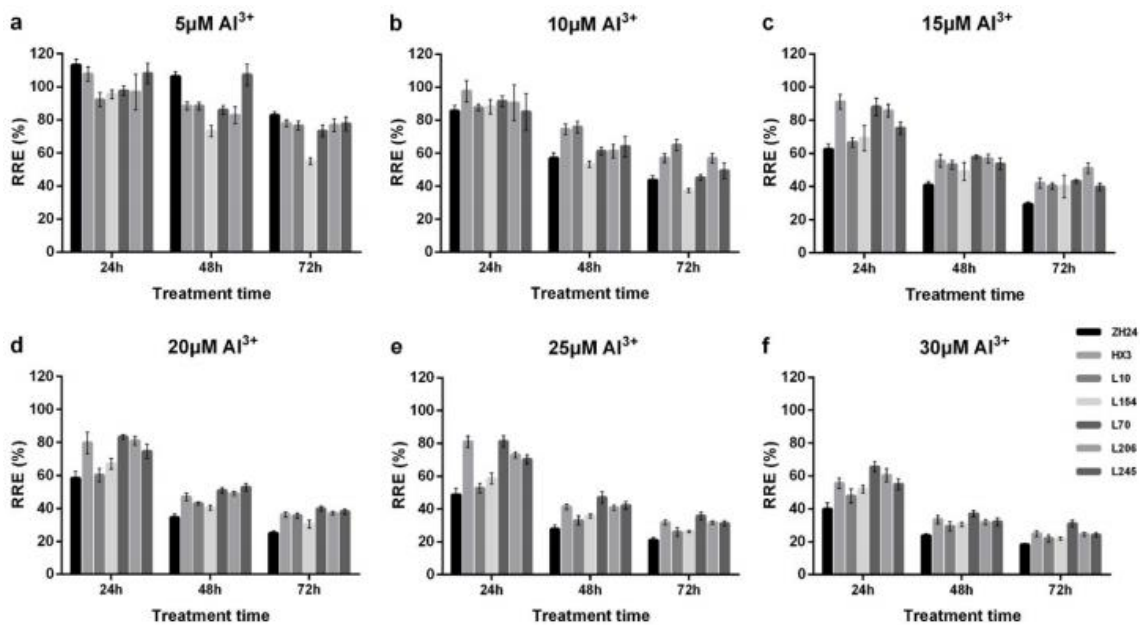
Phân tích dữ liệu

Phân tích phương sai (ANOVAs) được thực hiện bằng SAS 9.4 bằng quy trình mô hình tuyến tính tổng quát (GLM) với một phép biến đổi logarit của dữ liệu nếu cần. Hệ số di truyền nghĩa rộng (h^2) của RRE và AAC theo Knapp và cs. Hệ số di truyền được tính toán theo công thức sau: $h^2 = \sigma_g^2 / ((\sigma_e^2/n) + \sigma_g^2)$, trong đó σ_g^2 biểu thị phương sai di truyền; σ_e^2 biểu thị phương sai lỗi; và n là số lần sao chép. Các Hệ số biến thiên được ước tính là σ_g/μ , trong đó μ đại diện cho giá trị trung bình. Các mối tương quan kiểu hình của Pearson được tính toán bằng cách sử dụng tùy chọn 'PROC CORR' của chương trình SAS giữa hai đặc điểm khác nhau. Phân tích hồi quy tuyến tính được vẽ bằng cách sử dụng MASS và R 3.5.4.

KẾT QUẢ

Sự biến đổi kiểu hình

Để khám phá nồng độ AlCl_3 và thời gian xử lý thích hợp, bố mẹ và năm dòng được chọn ngẫu nhiên đã được sử dụng để xác định các đặc tính kháng Al^{3+} . Như thể hiện trong Hình 1., xu hướng thay đổi RRE rất đồng nhất giữa các dòng này. Với nồng độ Al^{3+} tăng dần, RRE của mỗi dòng giảm, cho thấy sự ức chế mạnh mẽ đối với sự kéo dài của rễ ở nồng độ cao. Tương tự như vậy, việc kéo dài thời gian xử lý dẫn đến giảm sự kéo dài của rễ, vì vậy nhóm điều trị 72 giờ có RRE thấp nhất. Ngoài ra, hệ số biến thiên (CV) được tính toán để phát hiện các biến thể trong mỗi lần thử nghiệm. Phân tích so sánh cho thấy rằng điều kiện với nồng độ $25\mu\text{M Al}^{3+}$ và xử lý 24 giờ thể hiện CV cao nhất (20,20%), mức độ phân tán lớn nhất trong số năm dòng (Hình 1). Hơn nữa, hai giống bố mẹ ZH 24 và HX 3 cũng cho thấy sự khác biệt đáng kể trong điều kiện này ($25\mu\text{M Al}^{3+}$, 24 giờ). Do đó, $25\mu\text{M AlCl}_3$ và 24 giờ xử lý được chọn để có được sự phân tách rộng nhất trong quần thể RIL.



Hình 1. Các phản ứng của sự kéo dài rễ tương đối với các nghiệm thức Al^{3+} của các giống ZH 24, HX 3 và 5 dòng RIL.

Kết quả ANOVA đã chứng minh sự khác biệt đáng kể về kiểu hình giữa các dòng RIL trong RRE cũng như AAC ($P < 0,01$), nhưng không có sự khác biệt đáng kể giữa ba lần lặp lại. Kết quả RRE của toàn bộ dòng cho thấy sự phân bố liên tục trong khoảng từ 34,78 đến 103,60% trong số tất cả 160 dòng RIL F_{12} với giá trị trung bình là $71,26 \pm 16,92\%$ và $\text{CV} = 23,74\%$ (Bảng 1). RREs trung bình của HX 3 và ZH 24 lần lượt là 79,34% và 46,90%. Tương ứng, kết quả AAC cho thấy một phạm vi rộng từ 49,11 đến 175,46 $\mu\text{g/g}$ trong quần thể RIL, với $\text{CV} = 33,64\%$. Giá trị AAC của ZH 24 là 114,55 $\mu\text{g/g}$ của HX 3 là 92,10 $\mu\text{g/g}$ (Bảng 1). Ngoài ra, có mối tương quan nghịch đáng kể giữa RRE và AAC ($r^f = -0,70$) (Bảng 1).

Phân tích hồi quy tuyến tính đã chứng minh rằng AAC có tương quan nghịch đáng kể với RRE ($R^2 = 0,49$, $P < 0,001$) (Hình 2).

Bảng 1. Biểu hiện kiểu hình của các tính trạng kháng Al^{3+} ở hai quần thể bố mẹ và RIL

Traits ^a	Parents ^b		RILs ^c								
	ZH 24	HX 3	Mean	Min	Max	SD ^d	CV ^e	Heritability	Skewness	Kurtosis	r ^f
RRE (%)	46.90 ± 1.25	79.34 ± 0.23	71.37 ± 1.30	34.78	103.60	16.92	23.74	92.59%	-0.12	-0.78	-0.70**
AAC	114.55 ± 1.99	92.10 ± 4.33	90.83 ± 2.02	49.11	175.46	30.61	33.64	64.90%	0.98	0.77	

a) RRE: độ giãn dài của rễ tương đối; AAC, hàm lượng Al^{3+} đỉnh.

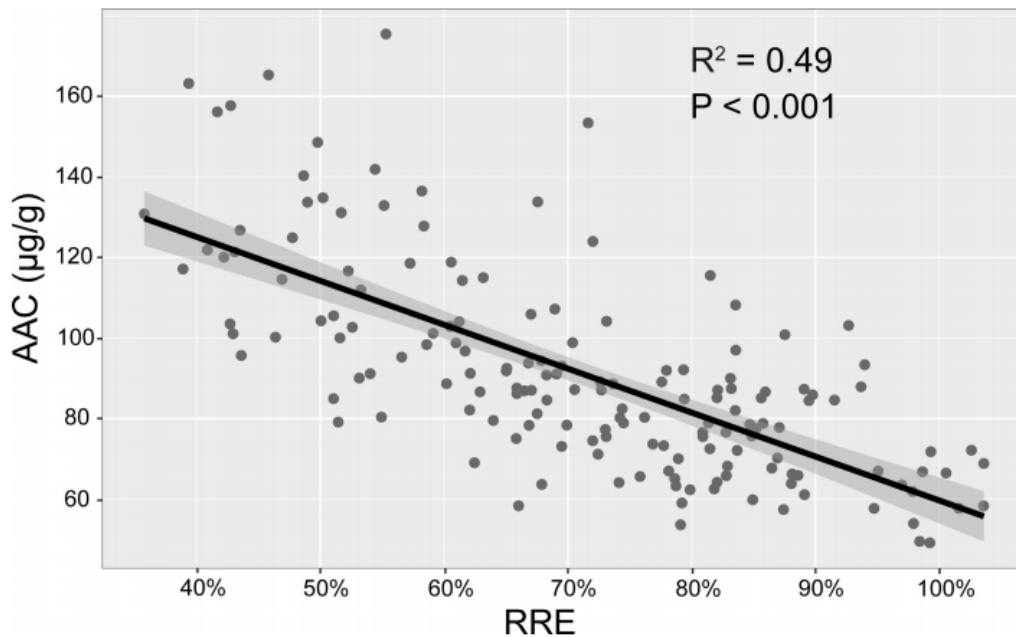
b) Bố mẹ được nuôi cấy và đo lường trong mỗi lần lặp lại thí nghiệm, và lấy giá trị trung bình.

c) Kích thước quần thể RIL F_{12} , $n = 160$, lặp lại $r = 3$ và lấy giá trị trung bình.

d) SD là độ lệch chuẩn.

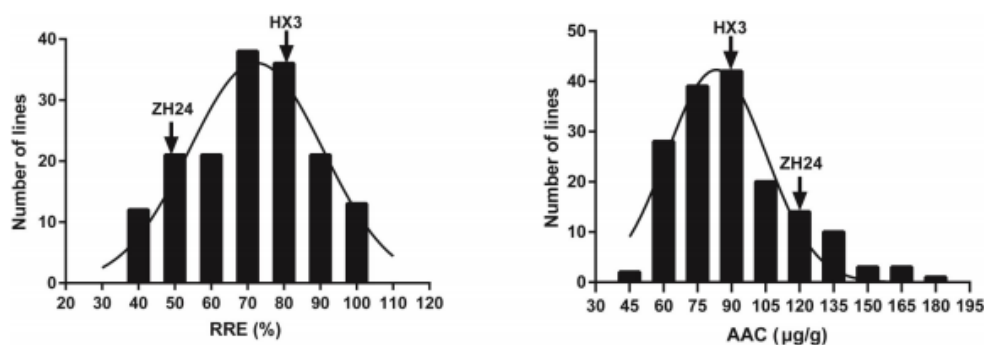
e) CV là hệ số biến thiên.

f) r là hệ số tương quan cho dữ liệu kiểu hình giữa RRE và AAC; $P < 0,01$



Hình 2. Mối quan hệ giữa RRE và AAC của RIL bằng phân tích hồi quy tuyến tính.

Sự phân bố tần số của RRE và AAC được thể hiện trong Hình 3. Dữ liệu kiểu hình của hai đặc điểm (RRE và AAC) trong các dòng F_{12} dưới tác động của Al^{3+} (Bảng 1 và Hình 3) cho thấy ở đó là một phân phối chuẩn cho RRE và một phân phối hơi lệch cho AAC với một mức độ tách biệt. Hơn nữa, sự phân chia phạm vi rộng rãi ở hai bên của bố mẹ trong RRE và AAC chỉ ra rằng các tính trạng được di truyền như các đặc điểm số lượng và bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố di truyền (Bảng 1 và Hình 3). Hệ số di truyền ước tính của RRE và AAC lần lượt là 92,59% và 64,90% (Bảng 1).



Hình 3. Phân bố tần số của RRE và AAC giữa các RIL.

Xây dựng bản đồ di truyền liên kết

Tổng số 47.472 SNP đa hình chất lượng cao đã được phát hiện bằng phân tích kiểu gen. Các điểm ngắt kết hợp tái tổ hợp cho từng cá thể đã được xác định, và tổng số là 2.639 marker thu được cho các dòng tái tổ hợp RIL. Chiều dài vật lý của ngân chứa dao động từ 20,01kb – 17,43Mb với độ dài trung bình là 360,01kb. Sử dụng 2.639 marker, bản đồ liên kết mật độ cao đã được xây dựng, bao gồm chiều dài bộ gen là 2638,24cM với khoảng cách trung bình là 1,00cM giữa các marker liền kề. Kiểm tra 2.639 marker cho thấy 2.356 marker (89,28%) được thể hiện giữa bố mẹ với tỷ lệ phân ly 1:1 ($P > 0,05$), phù hợp với các đặc điểm của markers đơn nguyên. Có 283 marker (10,72%) có biểu hiện biến dạng tách biệt ($P < 0,05$). Ngoài ra, hầu hết các marker có xu hướng đồng hợp tử, tỷ lệ dị hợp tử dưới 4,79%. Bản đồ liên kết được sử dụng để phân tích bản đồ.

Phân tích QTL

Kết quả của CIM cho thấy năm QTL được phát hiện trên 4 nhiễm sắc thể (Chr. Gm04, Gm16, Gm17, Gm19) (Bảng 2 và Hình 4 và 5).

Bảng 2. Các QTL cho hai tính trạng được xác định bằng phương pháp CIM trong quần thể RIL

Đặc điểm.	QTL tên.	Chr.	Khoảng thời gian đánh dấu	Vị trí thực tế (bp)	Khoảng cách vật lý (bp)	CI (cM).	LOD.	Thêm.	R ² (%)
RRE	qRRE_04	Gm04	Gm04_bin93-bin94	45290936-46017212	726277	90,50-92,30	2,76	-0,05	7,09%
	qRRE_16	Gm16	Gm16_bin8	4038850-4099407	60558	20,30	2,73	-0,05	7,80%
	qRRE_17	Gm17	Gm17_bin93	38592282-38624563	32282	89,70	3,32	0,05	8,52%
AAC	qAAC_04	Gm04	Gm04_bin93-bin94	45290936-46017212	726277	90,50-92,30	3,27	7,72	8,98%
	qAAC_19	Gm19	Gm19_bin19	10253846-10556775	302930	27,10	2,66	6,85	7,26%

CIM: khoảng thời gian tổng hợp ánh xạ.

a) RRE: độ giãn dài của rễ tương đối; AAC: hàm lượng Al^{3+} đỉnh.

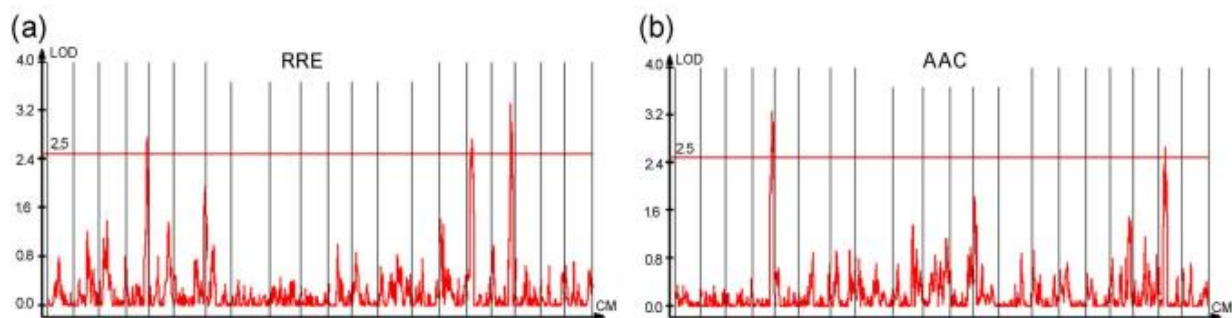
b) Tên QTL là tổng hợp các tính trạng theo sau là số lượng nhiễm sắc thể.

c) Vị trí vật lý tương ứng với khoảng tin cậy 95% cho QTL được phát hiện dựa trên mô hình gen *Glyma.Wm82. a1.v1.1*.

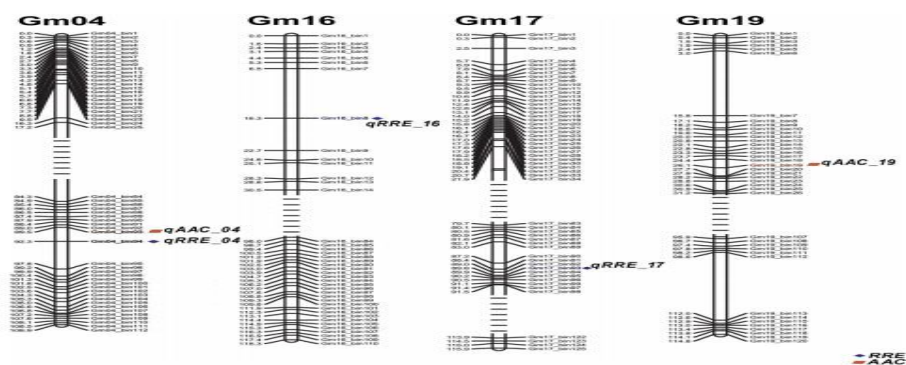
d) LOD chỉ ra logarit của điểm tỷ lệ cực

e) Tác động cộng gộp của các alen của bố mẹ.

f) R² cho biết phương sai kiểu hình được giải thích bởi các QTL riêng lẻ



Hình 4. Phân phối giá trị LOD của các QTL được ánh xạ của RRE (a) và AAC (b).



Hình 5. Vị trí QTL trên các nhóm liên kết của ZH 24 x HX 3. Các đường ảo đại diện cho các đoạn bị cắt ngắn của nhiễm sắc thể.

Ba QTL cho RRE, cụ thể là *qRRE_04*, *qRRE_16* và *qRRE_17*, được lập bản đồ trên nhiễm sắc thể Gm04, Gm16 và Gm17, với biến đổi kiểu hình (R^2) được giải thích bằng 7,09–8,52% và giá trị LOD nằm trong khoảng từ 2,73 đến 3,32 (Bảng 2). Hai QTL cho AAC, cụ thể là *qAAC_04* và *qAAC_19*, đã được xác định, với biến đổi kiểu hình được giải thích bằng 8,98% và 7,26% và giá trị LOD lần lượt là 3,27 và 2,66 (Bảng 2). Các hiệu ứng di truyền toàn diện được giải thích bởi tất cả các QTL đối với RRE và AAC là 39,65%. Hơn nữa, các QTL *qRRE_04* và *qAAC_04* đã được phát hiện bởi các marker bin93-bin94 trên Chr.04 trong vùng di truyền giữa 90,50 và 92,30cM (Bảng 2 và Hình 5), chỉ ra một QTL mới trên Chr.04 cho tính trạng kháng Al^{3+} của rễ đậu tương.

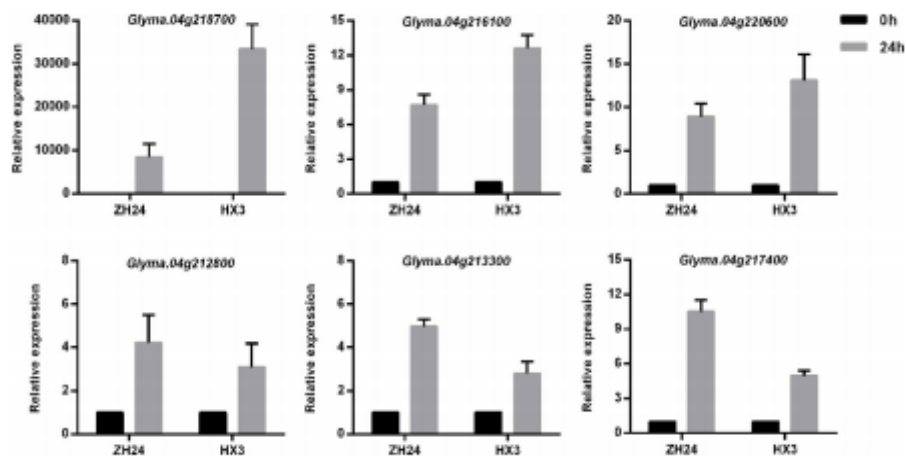
Phân tích làm giàu bản thể học gen (GO) của các gen trong QTLs

Cơ sở dữ liệu Soybase (<https://www.soybase.org/>) được sử dụng để khảo sát hiệu lực của các gen liên kết với khả năng kháng nhôm. Phân tích cho thấy 66 gen được chú thích là được ánh xạ trên các vùng của năm QTL. Tổng số 54 gen được phát hiện trong Gm04_bin93-bin94, từ 45290936bp đến 46017212bp. Có 6, 2 và 4 gen được chú thích trong ba khoảng thời gian ngắn tương ứng trên Chr. Gm16 (Gm16_bin8), Gm17 (Gm17_bin93) và Gm19 (Gm19_bin19). Để phân tích chú thích chức năng của mỗi gen, bộ công cụ AgriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/index.php>) được sử dụng để thực hiện phân tích bản thể học gen (GO). Tổng cộng 48 trong số 66 gen đã được xác minh là có ít nhất một GO ghi chú. Tất cả 48 gen được dự đoán có liên quan đến các quá trình sinh học, các thành phần tế bào hoặc chức năng phân tử. Những gen này có thể được nhóm thành bảy loại, bao gồm cả các quá trình tế bào, quy định sinh học, quá trình trao đổi chất, bộ phận tế bào, bào quan, hoạt động xúc tác và chức năng ràng buộc.

Phân tích biểu hiện của các gen ứng viên

Để điều tra phản ứng của các gen được chú thích đối với ảnh hưởng của nhôm, phân tích RT-PCR đã được thực hiện bằng cách sử dụng bố mẹ ZH 24 và HX 3 có hoặc không xử lý Al^{3+} . Mười lăm gen biểu hiện khác nhau đã được phát hiện trong vùng QTL của Chr. Gm04 và Gm16. Hơn nữa, qRT-PCR được sử dụng để phân tích các mẫu biểu hiện của 15 gen được chú thích này trong xử lý Al^{3+} . Hầu hết trong số 15 gen được chú thích có thể phản ứng với nhôm với kết quả RT-PCR tương tự với bố mẹ. Có 6 gen biểu hiện không khác biệt sau khi tiếp xúc với Al^{3+} giữa bố mẹ ZH 24 và HX 3. *Glyma.04g218700*, mã hóa yếu tố phiên mã WRKY, đã gây ra một cách đột ngột bằng tác động của Al nhưng biểu hiện giảm khi không xử lý Al^{3+} . *Glyma.04g212800*, *Glyma.04g213300* và *Glyma.04g217400* đã được kiểm soát rõ rệt

trong ZH 24, với sự biểu hiện gen tăng 5 – 10 lần. Tương tự, *Glyma.04g216100* và *Glyma.04g220600* cho thấy mức độ biểu hiện cao hơn trong HX 3 trong điều kiện xử lý Al^{3+} so với đối chứng (Hình 6).



Hình 6. Sự biểu hiện tương đối của các gen ứng viên bằng qRT-PCR ở rễ đỉnh của cả ZH 24 và HX 3 trước (0 giờ) và sau khi tiếp xúc với Al^{3+} (24 giờ). Giá trị sắp xếp thể hiện sự thay đổi nếp gấp trong biểu hiện gen.

Do đó, kết quả của chúng tôi gợi ý rằng những gen ứng cử viên này có thể đóng vai trò quan trọng trong phản ứng với ngộ độc nhôm ở đậu tương.

Thảo luận

RRE tương quan với hàm lượng AAC trong đậu tương

Đánh giá các đặc điểm kiểu hình về khả năng chống chịu nhôm của đậu tương là một thách thức do sự biến đổi phức tạp giữa các yếu tố tương tác và nhiều cơ chế kháng.

Các phương pháp sàng lọc khác nhau để xác định kiểu hình đã được đề xuất để làm sáng tỏ di truyền tính kháng Al^{3+} trong các kiểu gen đa dạng. Phương pháp trồng thủy canh được ưu tiên như một phương pháp khả thi để ước tính điện trở Al^{3+} đạt được sự biến đổi thống nhất của điều kiện, trong khi canh tác cát được cho là bắt chước môi trường tăng trưởng thực tế.

Ngoài ra, các nhà nghiên cứu thường sử dụng các chỉ số sinh lý và hình thái để xác định trực tiếp khả năng kháng Al^{3+} bất chấp các giai đoạn tăng trưởng khác nhau. RRE đã được coi là chỉ thị đáng tin cậy nhất về khả năng dung nạp Al^{3+} trong điều kiện nuôi cấy cây trồng trong dung dịch và đã được sử dụng thành công để phân tích di truyền của quần thể RIL ở lúa, ngô, lúa mì, và đậu tương. Kopittke và cs. đã chứng minh rằng gốc elongation có thể bị ức chế chỉ trong 30 phút tiếp xúc với $30\mu M Al^{3+}$ và trải qua 76% ức chế sau 48 giờ xử lý. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ ức chế trung bình đối với sự kéo dài của rễ trong các dòng là 29% khi được xử lý với $25\mu M Al^{3+}$ trong 24 giờ, cho thấy một giả thuyết hợp lý trùng với Kopittke.

Mặt khác, chiều dài tái tạo rễ (RRL), nhuộm hematoxylin và trọng lượng rễ khô đã được sử dụng rộng rãi như là chỉ số để đánh giá các giống cây trồng kháng Al^{3+} . Kỹ thuật nhuộm Hematoxylin được báo cáo là một phương pháp hiệu quả để xác định khả năng kháng Al^{3+} trong lúa mạch, chỉ ra mối liên hệ cụ thể giữa AAC và kháng Al^{3+} . Nhưng AAC vẫn chưa được sử dụng rộng rãi để đánh giá khả năng kháng Al^{3+} ở quần thể RIL đậu tương. Trong nghiên cứu của chúng tôi, AAC đã được áp dụng như một chỉ số để lập

bản đồ QTL về kháng Al^{3+} trong quần thể RILs đậu tương. Một mối tương quan âm đáng kể đã được quan sát thấy giữa RRE và AAC trong một quần thể lớn 160 dòng RIL (Hình 2). Thật vậy, mối quan hệ giữa AAC và khả năng choáng chịu Al^{3+} của thực vật có liên quan chặt chẽ với cơ chế loại trừ và giải độc bên trong. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng các kiểu gen nhạy cảm với Al^{3+} được tích lũy Al^{3+} tổng số trong các đỉnh rễ nhiều hơn các kiểu gen kháng Al^{3+} , và các kết quả tương tự thu được ở lúa và *Arabidopsis*. Không nghi ngờ gì nữa, cơ chế loại trừ hỗ trợ rằng cây có khả năng chống chịu cao hơn luôn luôn có ít AAC hơn. Tuy nhiên, mối quan hệ của giải độc tố nội bộ và AAC còn mơ hồ vì Al^{3+} có thể tích tụ trong không bào, tuy nhiên chỉ là một phần của cơ chế giải độc. Mối quan hệ quan trọng giữa RRE và AAC trong nghiên cứu này chỉ ra vai trò quan trọng của cơ chế loại trừ trong kháng Al^{3+} . Và mức độ tương quan giữa RRE và AAC giữa các dòng khác nhau là khác nhau (Hình 2), có thể phụ thuộc vào sự khác biệt về kiểu gen và sự kết hợp phức tạp của cơ chế kháng Al^{3+} ở đậu tương.

Hơn nữa, hệ số di truyền ước tính của RRE là 92,59% cho thấy tính trạng kháng Al sử dụng chỉ số RRE có hiệu quả lựa chọn cao. Hệ số di truyền của AAC thấp hơn 64,90% so với RRE, có thể liên quan đến ảnh hưởng của các tương tác giữa kiểu gen và môi trường.

QTL liên quan đến kháng Al^{3+}

Một cách thực tế để nghiên cứu sự di truyền của các tính trạng số lượng là xây dựng bản đồ liên kết di truyền và lập bản đồ các QTL với sự phân li của quần thể dựa trên các tính trạng đó. Một số nghiên cứu trước đây đã phát hiện các QTL về khả năng kháng Al^{3+} bằng cách sử dụng các bản đồ quần thể khác nhau. Hai quần thể từ tổ hợp lai Young \times PI 416937 và Kefeng số 1 \times Nannong 1138-2 được ưa chuộng bởi các nhà nghiên cứu. Các QTL khác nhau liên quan đến kháng Al^{3+} đã được xác định bằng cách cải thiện bản đồ di truyền liên kết được thiết lập bởi các marker RFLP và SSR bằng cách sử dụng cùng một quần thể RIL. Trong nghiên cứu của chúng tôi, quần thể RIL ổn định vượt quá thế hệ F_{12} với sự phân ly đa dạng và có sự khác biệt đáng kể giữa bố mẹ về hàm lượng tính trạng kháng Al^{3+} . Hơn nữa, các bản đồ di truyền mật độ cao đã được xây dựng bằng cách sử dụng công nghệ RAD-seq với các marker SNP và đã được áp dụng cho nhiều tính trạng. Những lợi thế này đã tạo điều kiện tiên quyết phù hợp cho nghiên cứu của chúng tôi.

Trong nghiên cứu này, một bản đồ gen đã được sử dụng để lập bản đồ các QTL cho khả năng kháng Al^{3+} ở đậu nành. Kết quả là, tổng cộng năm QTL kháng Al^{3+} giải thích 39,65% tổng số biến thể được lập bản đồ trên bốn nhiễm sắc thể với khoảng cách hẹp (Bảng 2). Một trong năm QTL (*qRRE_17*) gần với marker SSR Satt186 trong bộ gen của Williams 82 phiên bản 1.01, có liên quan đến khả năng chịu Al^{3+} trong các nghiên cứu trước đây (Bảng 3).

Bốn QTL còn lại (*qRRE_04*, *qRRE_16*, *qAAC_04*, *qAAC_19*) là các locus mới. Bianchihall và cs. và Abdel-Haleem và cs. cũng xác định các QTL cho khả năng kháng Al^{3+} trên Chr. Gm16 và Gm19, không được phát hiện ở đây. Những khác biệt này có thể được quy cho sự khác biệt về nguồn gốc di truyền và sự khác biệt trong các phương pháp sàng lọc.

Bảng 3. Các QTL được ohats hiện bởi các nghiên cứu trước đây và nghiên cứu hiện tại liên quan đến khả năng kháng Al³⁺ ở đậu tương.

Chr	Khoảng thời gian (a.l.v1)	CI (cM)	Vị trí vật lý	R ₂ (%)	Các chỉ số	Tham chiếu
Gm08	BARC-014837-01682-Satt333	117,30-119,50	35598937-39910959		Nhấn vào phần mở rộng gốc	Bianchihall và cộng sự. 2000
Gm11	Sat_270-Sat_272	19,00-21,00	4234139-2718892			Bianchihall và cộng sự. 2000
Gm11	Satt638-BARC-042837-08435	39,10-41,10	6971135-8150135			Bianchihall và cộng sự. 2000
Gm13	BARC-045205-08910-SOYHSP176	66,20-68,20	26196486-29041580			Bianchihall và cộng sự. 2000
Gm16	Sat_366-BARC-024047-04716	56,20-58,20	30404629-31474289			Bianchihall và cộng sự. 2000
Gm19	Satt723-BARC-039375-07304	3,10-5,10	264193-843081			Bianchihall và cộng sự. 2000
Gm02	Satt703-LE45	87,50-98,10		24,60	Cây cao	Qì và cộng sự. 2008
Gm02	A516-A953	101,70-109,30		1,90	Noleaves	Qì và cộng sự. 2008
Gm11	GMKF046-GMKF080	65,10-80,60		8,90	Bản khô	Qì và cộng sự. 2008
Gm17	GMKF058-Satt397	108,00-124,00		9,07	Trong lượng khô rễ	Qì và cộng sự. 2008
Gm17	Satt397-satt669	120,50-127,80		6,83		Qì và cộng sự. 2008
Gm19	satt278-sat_195	49,60-57,00		6,01		Qì và cộng sự. 2008
Gm19	satt278-sat_195	42,50-63,70		5,70		Qì và cộng sự. 2008
Gm20	B39-Sat_419	97,10-107,90		10,50		Qì và cộng sự. 2008
Gm06	Satt202-Satt371	126,23-145,47	48441504-49759893	34,00	Chỉ số chống chịu của rễ	Sharma và cộng sự. 2010
Gm13	Satt252-Satt160	16,08-33,18	16454986-17875691	31,00	Tăng trưởng trung bình tương đối rễ	Sharma và cộng sự. 2010
Gm02	Satt698-BARC-030679-06925	38,04-42,04	8827384-10906849	5,06	Trong lượng khô thực vật	Korir và cộng sự. 2011
Gm09	BARC-042823-08429-BARC-044609-08738	60,32-62,32	19422282-41745478	4,91	Bản khô	Korir và cộng sự. 2011
Gm10	BE801128- Sat_242	68,97-74,05	38957017-39392879		Trong lượng khô rễ	Korir và cộng sự. 2011
Gm11	Satt197-Sat_128	46,38-53,41	8898878-10011307	9,23		Korir và cộng sự. 2011
Gm17	satt514-Sat_001	86,42-95,55	18425834-36745724	6,64		Korir và cộng sự. 2011
Gm19	Satt313- Satt284	34,54-38,16	34753106-35672961	7,53		Korir và cộng sự. 2011
Gm02	Satt005	75,29	30874668		Độ dài rễ tương đối	Korir và cộng sự. 2013
Gm06	Satt286	101,75	16171860			Korir và cộng sự. 2013
Gm08	Satt209	128,44	42190891	8,36		Korir và cộng sự. 2013
Gm09	Sct_190	77,37	39455480	6,38		Korir và cộng sự. 2013
Gm10	GMES1703	60,60				Korir và cộng sự. 2013
Gm11	Sat_364	84,25	31594010	8,92		Korir và cộng sự. 2013
Gm13	Sat_240	25,58	1346775	5,73		Korir và cộng sự. 2013
Gm17	Satt186	92,23	39047273-39047329	16,54		Korir và cộng sự. 2013
Gm20	Sat_174	36,59	24547862			Korir và cộng sự. 2013
Gm03	Satt237-K494_1	101,31		10,30	Nhấn vào tiền ích mở rộng gốc tại HIAL	Abdel-Haleem và cộng sự. 2014
Gm08	BARCSOYSSR_08_1684-Satt409	152,07		44,80	Nhấn vào phần mở rộng gốc tại NOAL	Abdel-Haleem và cộng sự. 2014
Gm16	B122_1-Satt431	39,01		12,80	Phần mở rộng gốc tương đối	Abdel-Haleem và cộng sự. 2014
Gm16	Sat_093-Satt431	38,01		8,80		Abdel-Haleem và cộng sự. 2014
Gm18	Satt570-Satt501	50,03		9,40		Abdel-Haleem và cộng sự. 2014
Gm19	A169_1-A106_1	1,99		5,60		Abdel-Haleem và cộng sự. 2014
Gm04	bin93-bin94	90,50-92,30	45290936-46017212	7,09	Độ dài rễ tương đối	Trong nghiên cứu này
Gm04	bin93-bin94	90,50-92,30	45290936-46017212	8,98	Nội dung Apical Al ³⁺	Trong nghiên cứu này
Gm16	bin8	20,30	4038850-4099407	7,80		Trong nghiên cứu này
Gm17	bin93	89,70	38592282-38624563	8,52		Trong nghiên cứu này
Gm19	bin19	27,10	10253846-10556775	0,07		Trong nghiên cứu này

Đáng chú ý, *qRRE_04* hoặc *qAAC_04* nằm trong cùng một mã ngắn chứa marker trên Chr. Gm04, dấu hiệu cho rằng nó có thể là một locus quan trọng cho khả năng kháng Al³⁺ (Hình 5). Hơn nữa, *qRRE_04* là một QTL có màu trùng lặp với QTL đối với ngọc độc P thấp từ Zhang và cs.. Kết quả tương tự cũng thu được bằng cách lập bản đồ QTL về khả năng kháng Al³⁺ ở loại đậu thông thường. Nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng ứng dụng P có thể làm giảm độc tính của nhôm. Kết hợp với những kết quả này đã chứng minh rằng có một số QTL có thể liên quan đến khả năng chống chịu Al³⁺ và P ở đậu tương.

Phân tích các gen ứng viên

Tổng cộng có 66 gen được dự đoán trong các vùng của bốn QTL được lập bản đồ, trong khi 54 gen được dự đoán trong các locus được tô màu của *qRRE_04*. Sáu gen cho

thấy sự khác biệt có ý nghĩa trong thử nghiệm xử lý Al^{3+} ở cả ZH 24 và HX 3 so với các gen ứng cử viên khác (Hình 6).

Không có gen nào được nghiên cứu về khả năng kháng Al^{3+} , nhưng một số gen đã được đề cập trong báo cáo trước đây. *Glyma.04g218700*, một thành viên của các nhân tố phiên mã WRKY, tên là *WRKY21* của Zhou và cs., được báo cáo là có phản ứng với ngộ độc lạnh. Trong nghiên cứu này, *Glyma.04g218700* được tạo ra mạnh sau khi tiếp xúc với Al^{3+} , đặc biệt là trong HX 3 (Hình 6). *Glyma.04g217400*, mã hóa yếu tố phiên mã đáp ứng với ethylene ABR1, có thể liên quan chặt chẽ với ngộ độc phi sinh học bởi vì gen tương đồng *AtABR1* có thể được tạo ra do lạnh, do mặn và do hạn hán ở *Arabidopsis*, cho thấy phản ứng mạnh mẽ đối với ABA (Hình 6). *Glyma.04g213300* (NAC) và *Glyma.04g216100* (Trihelix), mã hóa hai yếu tố phiên mã, cũng được báo cáo là đáp ứng với nhiều dạng ngộ độc phi sinh học. Ngoài ra, một gen điều chỉnh, *Glyma.04g220600*, là được ghi lại để mã hóa một peroxidase (POD) được kích hoạt bởi các loại phản ứng oxy (ROS), có thể góp phần kháng Al^{3+} bằng cách tạo ra ROS trong rễ cây. Chúng tôi cũng quan sát thấy rằng gen *Glyma.04g212800* được điều chỉnh bởi ngộ độc nhôm mã hóa một GDP-mannose vận chuyển với mối quan hệ không rõ ràng giữa vận chuyển GDP-mannose và ngộ độc nhôm. Do đó, 6 gen này được xác định là gen ứng cử viên cho khả năng kháng nhôm dựa trên phản ứng tiềm tàng đối với các dạng ngộ độc phi sinh học khác (Hình 6). Trong số sáu gen, *Glyma.04g218700* có thể là gen ứng cử viên mạnh nhất cho khả năng chống chịu nhôm.

KẾT LUẬN

Tóm lại, một quần thể RIL có nguồn gốc từ tổ hợp lai ZH 24 × HX 3 được sử dụng để điều tra kế thừa định lượng của RRE và AAC đối với tính kháng Al^{3+} ở đậu tương. Bản đồ di truyền mật độ cao đậu tương được xây dựng bằng cách sử dụng 2.639 marker tái tổ hợp bởi cách tiếp cận RAD-seq để xác định các QTL. Tổng cộng năm QTL (*qAAC_04*, *qRRE_04*, *qRRE_16*, *qRRE_17* và *qAAC_19*) được lập bản đồ trên bốn nhiễm sắc thể (Chr. Gm04, Gm16, Gm17 và Gm19) với ảnh hưởng di truyền toàn diện 39,65%. Các QTL *qRRE_04* và *qAAC_04* có thể được phát hiện bởi các dấu hiệu giống nhau trong vùng di truyền giữa 90,50 và 92,30 cM, chỉ ra một QTL mới trên Chr.04 đối với tính trạng kháng Al^{3+} của đậu tương. Ngoài ra, 66 gen được dự đoán ở các vùng của năm QTL, với sáu gen có biểu hiện khác biệt có ý nghĩa sau khi tiếp xúc với Al^{3+} bằng qRT-PCR. *Glyma.04g218700* được điều chỉnh bằng cách xử lý Al^{3+} với mức độ biểu hiện cao nhất có thể là một gen ứng cử viên có vai trò tiềm năng trong phản ứng với ngộ độc nhôm. Do đó, những nỗ lực của chúng tôi sẽ cho phép phân tích chức năng trong tương lai của các gen ứng cử viên và sẽ đóng góp vào các chiến lược cải thiện khả năng chống chịu nhôm ở đậu tương.

Nguồn: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0223674>