

CHỌN LỌC DÒNG THUẦN CÀ CHUA KHÁNG VIRUS XOĂN VÀNG LÁ THÔNG QUA CHỈ THỊ PHÂN TỬ

Đặng Thị Vân¹, Đặng Thị Thu Hà¹, Lê Thị Thủy¹, Đoàn Thị Thùy Vân¹

TÓM TẮT

Sử dụng giống kháng virus đã và đang là biện pháp hữu hiệu nhất để quản lý bệnh xoăn vàng lá ở cà chua. Việc tổ hợp nhiều gen kháng vào một giống có tác dụng nâng cao khả năng kháng virus cho cà chua. Tuy nhiên, tạo được dòng thuần mang đồng thời nhiều gen kháng virus xoăn vàng lá là khó khăn do chúng chỉ có ở loài cà chua dại lại nằm trên các nhiễm sắc thể khác nhau. Sử dụng chỉ thị phân tử giúp đánh giá và chọn lọc thành công 8 dòng thuần cà chua mang đồng thời 2 gen kháng virus xoăn lá Ty2 và Ty3 ở dạng đồng hợp tử. Các dòng này có khả năng kháng rất cao với virus xoăn vàng lá, tới khi kết thúc thu hoạch cây hoàn toàn không có triệu chứng bệnh. Đây là nguồn vật liệu quan trọng cho công tác tạo giống cà chua kháng bệnh virus xoăn vàng lá ở Việt Nam.

Từ khóa: Gen kháng, virus, xoăn vàng lá, cà chua, dòng thuần

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh xoăn vàng lá do Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) đã và đang là bệnh gây hại nghiêm trọng trên cà chua ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Quản lý dịch hại do TYLCV bằng biện pháp hóa học gặp rất nhiều khó khăn do quan hệ phức tạp giữa ký chủ-vector-virus đồng thời lại gây ảnh hưởng không tốt tới môi trường. Do vậy, việc trồng các giống kháng TYLCV được coi là biện pháp hữu hiệu nhất để quản lý bệnh xoăn vàng lá cà chua. Cho tới nay đã có 5 gen kháng virus gây bệnh xoăn vàng lá cà chua đã được phát hiện ở các loài cà chua hoang dại khác nhau bao gồm Ty1/Ty3; Ty-2, Ty-4, ty-5 và Ty-6 (Zamir *et al.*, 1994; Hanson *et al.*, 2000; Ji *et al.*, 2009; Verlaan *et al.*, 2013; Hutton *et al.*, 2012). Chúng đã được lai tạo với các dòng cà chua trồng để phục vụ cho việc tạo giống cà chua thương mại kháng bệnh virus xoăn vàng lá. Tạo dòng thuần cà chua kháng bệnh thông qua lai hữu tính thường phải trải qua 7-8 thế hệ tự thụ bởi bên cạnh tính trạng kháng bệnh còn cần phải đạt được độ thuần về các tính trạng nông sinh học quan trọng khác. Ngày nay, chọn lọc bằng hỗ trợ của chỉ thị (MAS) đã và đang trở thành công cụ hữu hiệu nhất cho công tác tạo giống cây trồng. Áp dụng MAS trong chọn tạo dòng thuần kháng bệnh từ quần thể phân ly của các tổ hợp lai hữu tính sẽ đảm bảo phát hiện được các gen kháng bệnh qua các thế hệ mà không cần tới đánh giá biểu hiện kiểu hình, đồng thời không cần một quần thể lớn ở các thế hệ giúp tiết kiệm thời gian, diện tích cũng như chi phí. Thông qua hợp tác trong khuôn khổ đề tài “Tạo giống cà chua kháng bệnh xoăn vàng lá virus (TYCLV) và héo xanh vi khuẩn (*Ralstonia solanacearum*) ở Việt Nam bằng chỉ thị phân tử, kết hợp với lai truyền thống”, Trung tâm

Rau Thế giới (World Vegetable Center - AVRDC) đã cung cấp cho Viện nghiên cứu Rau quả các dòng cà chua có chứa gen kháng virus khác nhau trong đó có một số dòng còn ở thế hệ tự thụ đời F4 còn cần phải tiếp tục chọn lọc làm thuần. Bài báo này trình bày kết quả chọn lọc dòng thuần với việc áp dụng các chỉ thị phân tử để đánh giá các gen kháng Ty2 (có nguồn gốc từ loài *S. habrochaites*) và Ty3 (có nguồn gốc từ loài *S. chilenses*).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

10 dòng cà chua tự thụ thế hệ F4 mang gen kháng virus xoăn vàng lá Ty2, Ty3 và 3 dòng cà chua miễn cảm với virus xoăn vàng lá do AVRDC cung cấp.

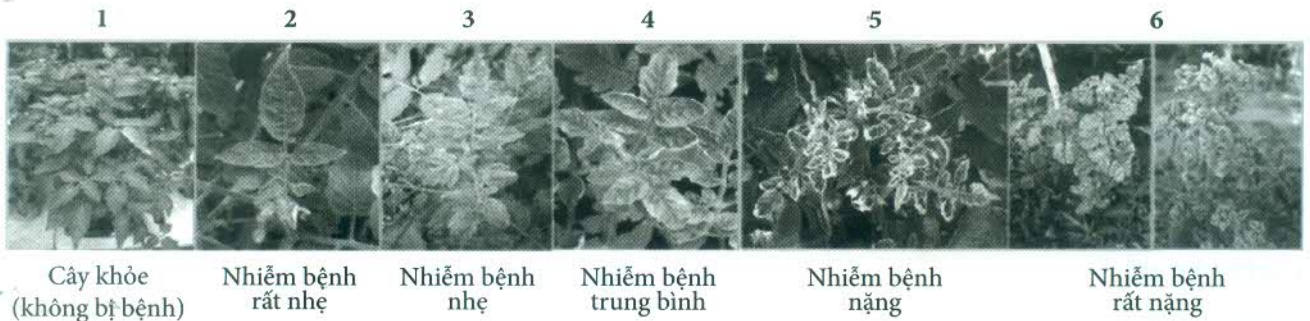
2.2. Phương pháp nghiên cứu

Đánh giá các dòng mang gen kháng virus Ty2, Ty3 được thực hiện thông qua phản ứng PCR với các cặp mỗi P6-25F (5-ggt agt gga aat gat gct gct c-3)/P6-25R (5-gct ctg cct att gtc cca tat ata acc-3) chỉ thị của gen Ty3 (Ji *et al.*, 2007) và cặp mỗi TG302F (5-tggctcatctgaagctgatagcgc-3)/TG302R6(5-tgattgatgttctcatctctcgcctg-3) chỉ thị của gen Ty2 (Garcia *et al.*, 2007). Chọn lọc được tiến hành như sau: Trước mỗi thời vụ trồng, ADN được tách chiết từ mô lá của 20 cây cà chua sau 2 tuần gieo hạt. Sau đó tiến hành phản ứng PCR với cặp mỗi P6-25 và cặp mỗi TG302F/TG302R6 để chọn ra 10 cây mang gen Ty2, Ty3. Các cá thể được đánh số tương ứng với kết quả PCR khi trồng ra đồng ruộng để chọn lọc theo các chỉ tiêu nông sinh học. Việc chọn lọc làm thuần các tính trạng nông sinh học được áp dụng theo phương pháp phả hệ (Pedigree).

¹ Viện Nghiên cứu Rau quả

Lây nhiễm virus bằng bộ phận trên cây 2 tuần sau gieo hạt trong nhà lưới cách ly: 1500 bộ phận được thả trên 50 cây cà chua bị bệnh xoắn vàng lá cấp 4-6 trong 1 tuần, sau đó các khay 20 cây 2 tuần tuổi của các dòng tự thụ F7 mang gen kháng và 3 dòng miễn cảm (L00015, L00285 và L04841) được đặt vào giữa

các cây bệnh, tiến hành lây nhẹ các cây bệnh ngày 3 lần. Sau 3 tuần các cây lây nhiễm được trồng ra đất. Triệu chứng bệnh xoắn vàng lá được đánh giá theo tài liệu hướng dẫn của Trung tâm Rau Thế giới (Hình 1) tại 3 thời điểm: 45 ngày sau trồng, khi bắt đầu thu hoạch và kết thúc thu hoạch.



Hình 1. Phân cấp chỉ số bệnh theo Trung tâm Rau Thế giới

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trước mỗi vụ trồng tiến hành sàng lọc bằng chỉ thị phân tử sao cho các cá thể được chọn lọc có chứa các gen kháng Ty2 và Ty3. Kết quả chọn lọc các dòng mang gen kháng qua các thế hệ được thể hiện tại bảng 1.

Để có thể làm nguồn vật liệu cho lai tạo giống F1 thì các dòng thuần kháng virus cần phải mang gen kháng ở trạng thái đồng hợp tử. Từ lý lịch nguồn vật liệu cho thấy hầu hết các dòng đều có chứa đồng thời cả 2 gen kháng Ty2 và Ty3, chỉ 1 dòng CLN3670F4H không mang gen Ty2. Kết quả kiểm tra bằng PCR ở thế hệ F4 cho gen Ty2, Ty3 thấy rằng ở hầu hết các dòng đều xuất hiện 3 dạng kiểu gen: Đồng hợp tử trội Ty2/Ty2, Ty3/Ty3, dị hợp tử Ty2/ty2, Ty3/ty3 và đồng hợp tử lặn ty2/ty2, ty3/ty3 (Hình 2). Thông thường các dạng đồng hợp tử trội (dạng kháng) sẽ được lựa chọn để duy trì tuy nhiên bên cạnh việc đánh giá chọn lọc kiểu gen kháng thì việc chọn lọc làm thuần các tính trạng nông sinh học khác là cần thiết. Sau khi kết hợp cả 2 yếu tố trên thì ở thế hệ F4 các cá thể được chọn lọc duy trì ở tất cả các dòng đều mang Ty2 ở trạng thái dị hợp tử, trong khi đó có 6/10 dòng cà chua đã mang gen Ty3 đã ở trạng thái đồng hợp tử. Kết quả PCR năm 2013 (Bảng 1) cho thấy dòng cà chua CLN3641F4 theo lý lịch có chứa gen kháng Ty2 ở trạng thái dị hợp tử và gen Ty3 ở trạng thái đồng hợp tử trội, tuy nhiên kết quả PCR thực tế thì tất cả các cá thể đều không chứa allele trội Ty2. Điều này là có thể bởi các hạt F4 ở trạng thái dị

hợp tử phân ly 3 kiểu gen Ty2/Ty2, Ty2/ty2 và ty2/ty2, các cá thể được kiểm tra đã rơi vào nhóm mang kiểu gen ty2/ty2. Dòng CLN3670F4H chỉ mang gen Ty3 phù hợp theo lý lịch. Ở các dòng còn lại đều có chứa các cá thể mang kiểu gen đồng hợp tử trội hoặc dị hợp của cả 2 gen Ty2 và Ty3.

Ở vụ Thu Đông 2013, tiến hành đánh giá các chỉ tiêu khối lượng trung bình quả (KLTBQ), tổng số quả/cây, tỉ lệ quả thương phẩm, bảng 2 cho thấy khối lượng trung bình của các dòng cà chua dao động từ 60 tới 95g. Trong đó các dòng CLN3641F4-0, CLN3643F4-0, CLN3682F4C-0, CLN3670F4E-0 và CLN3670F4G-0 đạt từ 80g tới 95g và các dòng này có tỉ lệ quả thương phẩm đạt từ 70-90%. Số quả trên cây dao động từ 11 tới 30 quả trong đó các dòng CLN3682F4C-0, CLN3670F4G-0 và CLN3670F4H-0 có số quả trên cây rất thấp chỉ đạt từ 11 tới 14 quả. Ở 3 dòng CLN3682F4A-0, CLN3669F4-0, CLN3670F4D-0 có hiện tượng phân ly thành 2 dạng: Dạng 1 có số quả/cây nhiều nhưng quả rất nhỏ, dạng 2 quả lớn hơn nhưng lại có số quả trên cây ít hơn. Ở các dòng này lựa chọn cá thể theo hướng quả có trọng lượng lớn hơn để duy trì tạo dòng thuần. Kết hợp giữa kết quả PCR và trên đồng ruộng 2013, các dòng F5 được chọn lọc để duy trì là CLN3641F4-0-1, CLN3643F4-0-3, CLN3682F4A-0-1, CLN3682F4B-0-2, CLN3682F4C-0-7, CLN3669F4-0-1, CLN3670F4D-0-2, CLN3670F4E-0-2, CLN3670F4G-0-10 và CLN3670F4H-0-3.

Bảng 1. Kết quả chọn lọc làm thuần các dòng mang gen kháng virus Ty2 và Ty3

Thế hệ	Dòng cà chua	Lý lịch		2013		2014		2015	
		Ty2	Ty3	Ty2	Ty3	Ty2	Ty3	Ty2	Ty3
F4	CLN3641F4	H	R						
F5	CLN3641F4-0-1			S	R				
F6	CLN3641F4-0-1-3					S	R		
F7	CLN3641F4-0-1-3*							S	R
F4	CLN3643F4	H	R						
F5	CLN3643F4-0-3			H	R				
F6	CLN3643F4-0-3-5					R	R		
F7	CLN3643F4-0-3-5*							R	R
F4	CLN3682F4A	H	R						
F5	CLN3682F4A-0-1			H	R				
F6	CLN3682F4A-0-1-3					R	R		
F7	CLN3682F4A-0-1-3*							R	R
F4	CLN3682F4B	H	R						
F5	CLN3682F4B-0-2			H	R				
F6	CLN3682F4B-0-2-4					H	R		
F7	CLN3682F4B-0-2-4*							R	R
F4	CLN3682F4C	H	R						
F5	CLN3682F4C-0-7			H	R				
F6	CLN3682F4C-0-7-1					R	R		
F7	CLN3682F4C-0-7-1*							R	R
F4	CLN3669F4	H	H						
F5	CLN3669F4-0-1			H	H				
F6	CLN3669F4-0-1-3					H	R		
F7	CLN3669F4-0-1-3*							R	R
F4	CLN3670F4D	H	H						
F5	CLN3670F4D-0-2			H	H				
F6	CLN3670F4D-0-2-5					R	H		
F7	CLN3670F4D-0-2-5*							R	R
F4	CLN3670F4E	H	H						
F5	CLN3670F4E-0-2			H	R				
F6	CLN3670F4E-0-2-3					H	R		
F7	CLN3670F4E-0-2-3*							R	R
F4	CLN3670F4G	H	R						
F5	CLN3670F4G-0-10			H	R				
F6	CLN3670F4G-0-10-7					R	R		
F7	CLN3670F4G-0-10-7*							R	R
F4	CLN3670F4H	S	H						
F5	CLN3670F4H-0-3			S	H				
F6	CLN3670F4H-0-3-5					S	R		
F7	CLN3670F4H-0-3-5*							S	R

Chú thích: R: Trạng thái đồng hợp tử trội của gen Ty2 hoặc Ty3 (Ty2/Ty2; Ty3/Ty3); H: Trạng thái dị hợp tử (Ty2/ty2; Ty3/ty3); S: gen ở trạng thái đồng hợp tử lặn (ty2/ty2; ty3/ty3).

