

CHỌN TẠO GIỐNG CÀ CHUA THUẦN KHÁNG BỆNH XOĂN VÀNG LÁ BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ ADN

Tổng Văn Hải^{1*}, Phan Hữu Tôn^{1,2}, Phan Thị Hiền¹, Nguyễn Quốc Trung¹

¹Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Trung tâm Bảo tồn và Phát triển nguồn gen cây trồng, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: tvhai@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 10.06.2020

Ngày chấp nhận đăng: 21.01.2021

TÓM TẮT

Bệnh xoăn vàng lá là một trong những bệnh hại nghiêm trọng nhất đối với cà chua ở Việt Nam. Để phòng trừ bệnh này, việc sử dụng giống kháng bệnh là biện pháp hữu hiệu nhất. Cho đến nay 5 gen kháng bệnh xoăn vàng lá đã được phát hiện là *Ty1*, *Ty2*, *Ty3*, *Ty4* và *ty5*. Các chỉ thị phân tử liên kết với các gen trên cũng đã được phát hiện, giúp cho việc chọn lọc gen kháng trở nên thuận lợi và chính xác. Trong nghiên cứu này, chỉ thị TG97 và P6-25 được sử dụng để xác định và chọn lọc gen kháng đồng hợp tử *Ty1* của quần thể F_2 ($H12 \times AVRDC188$) và *Ty3* của quần thể F_2 ($H12 \times AVRDC195$). Kết quả, 7 cá thể chứa gen *Ty1* và 4 cá thể chứa gen kháng *Ty3* đã được chọn. Các cá thể chứa gen *Ty1* và *Ty3* được hỗn hạt, trồng và cho tự thụ nhiều thế hệ, đến thế hệ F_7 tiến hành chọn dòng. Qua đó, chúng tôi chọn được hai dòng ưu tú đặt tên là TP130 chứa gen *Ty1* và TP135 chứa gen *Ty3*. Hai dòng TP130 và TP135 được khảo nghiệm và đánh giá khả năng kháng bệnh xoăn vàng lá bằng lây nhiễm nhân tạo. Kết quả thấy rằng các dòng đều cho năng suất cao, ổn định và kháng tốt với bệnh xoăn vàng lá.

Từ khóa: Cà chua, chỉ thị phân tử ADN, xoăn vàng lá cà chua, gen kháng bệnh.

Breeding Inbred Tomato for Resistance to Yellow Leaf Curl Virus by Marker-Assisted Selection

ABSTRACT

Tomato yellow leaf curl disease (TYLC) is one of the most dangerous tomato diseases in Vietnam. So far, using resistant genes for breeding tomato is one of the most effective solutions to control this disease. Currently, 5 resistance genes to yellow leaf curl have been identified as *Ty1*, *Ty2*, *Ty3*, *Ty4* and *ty5* genes. DNA markers linked to those genes were also discovered that have assisted to select the resistance genes more easily and accurately. In this study, we used TG97 marker to select *Ty1* resistance gene in F_2 population ($H12 \times AVRDC188$) and P6-25 marker to select *Ty3* resistance gene in F_2 population ($H12 \times AVRDC195$). As a result shown, 7 individuals possess *Ty1* homozygous resistance gene and 4 individuals possess *Ty3* homozygous resistance gene were selected. The individuals that carrying resistant genes were mixed together, planted for self-fertilization until the F_7 generation. The two promising lines were selected including: TP130 line containing *Ty1* gene and TP135 lines containing *Ty3* gene. TP130 and TP135 lines were basically tested in three cropping seasons and evaluated their resistance to yellow leaf curl by artificial infection. The results showed that TP130 and TP135 lines had high yield and high resistance to TYLC diseases.

Keywords: DNA markers, tomato, tomato yellow leaf curl virus, resistant gene.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh xoăn vàng lá cà chua có tên tiếng Anh là Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) do một số loài virus thuộc chi *Begomovirus*, họ *Geminiviridae* gây ra, được phát hiện lần đầu tiên ở Israel vào năm 1939 (Píco & cs., 1996).

Bệnh này làm thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất, chất lượng cà chua. Năng suất thiệt hại trung bình từ 55-90%, thậm chí là 100% khi cây bị nhiễm nặng bệnh này (Reynaud & cs., 2003). TYLCV được lan truyền nhờ loài bọ phấn *Bemisia tabaci*, đây là loài côn trùng có sức sinh sản nhanh và mạnh, rất khó phòng trừ. Hiện tại

chưa có loại thuốc nào phòng trừ hữu hiệu bệnh này, nếu cây bị nhiễm bệnh chỉ có thể nhổ bỏ. Vì vậy, sử dụng giống kháng bệnh là biện pháp hiệu quả nhất. Giống kháng bệnh không những có ý nghĩa đối với việc cải thiện năng suất, chất lượng mà còn an toàn với sức khỏe con người, vật nuôi và môi trường (Phan Hữu Tôn & cs., 2013). Muốn chọn tạo giống cà chua kháng bệnh thành công việc đầu tiên phải xác định được số gen kháng và gen kháng hữu hiệu ở Việt Nam. Đến nay, các nhà khoa học trên thế giới đã xác định được 5 gen kháng virus xoắn vàng lá khác nhau. Các gen kháng bệnh xoắn vàng lá gồm gen *Ty1* (Zamir & cs., 1994) và *Ty3* (Ji & Scott, 2006) nằm trên nhiễm sắc thể 6, gen *Ty2* nằm trên nhiễm sắc thể 11 (Hanson & cs., 2006), gen *Ty4* nằm trên nhiễm sắc thể 3 (Ji & cs., 2009) và gen *ty5* nằm trên nhiễm sắc thể 4 (Anbinder & cs., 2009). Các chỉ thị phân tử liên kết chặt với các gen kháng bệnh xoắn vàng lá *Ty1*, *Ty2*, *Ty3* (Castro & cs., 2007; Garcia & cs., 2007; Ji & cs., 2007; Zhang, 2010) cũng đã được phát triển và sử dụng trong chọn tạo giống, giúp cho việc chọn lọc gen kháng trở nên thuận lợi và chính xác. Trong chương trình hợp tác và trao đổi nguồn gen, Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã thu thập được các mẫu giống cà chua chứa 5 gen kháng nói trên. Qua đánh giá nhận thấy gen kháng *Ty1* và *Ty3* là hai gen kháng tốt đối với các nguồn bệnh xoắn vàng lá miền Bắc Việt Nam (Phan Hữu Tôn & cs., 2013), đây là tiền đề cho việc chọn tạo giống cà chua kháng bệnh xoắn vàng lá. Với mục tiêu chọn được giống cà chua thuần năng suất và kháng bệnh xoắn vàng lá, nên dòng H12 có năng suất cao, chất lượng tốt được sử dụng làm mẹ để lai với dòng bố AVRDC188 chứa gen kháng *Ty1* và AVRDC195 chứa gen kháng *Ty3*. Nghiên cứu này trình bày kết quả ứng dụng chỉ thị phân tử ADN trong chọn tạo giống cà chua kháng bệnh xoắn vàng lá, cũng như kết quả khảo nghiệm cơ bản của hai dòng cà chua TP130 và TP135 lần lượt chứa gen kháng bệnh *Ty1* và *Ty3*.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hai dòng cà chua thuần AVRDC188 (chứa gen *Ty1*) và AVRDC195 (chứa gen *Ty3*) được thu thập từ Viện Nghiên cứu Rau Châu Á.

Dòng cà chua thuần H12 của Trung tâm Bảo tồn và Phát triển nguồn gen cây trồng - Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

Giống cà chua thuần C15, cà chua lai Savior và giống Hồng Lan do Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm cung cấp.

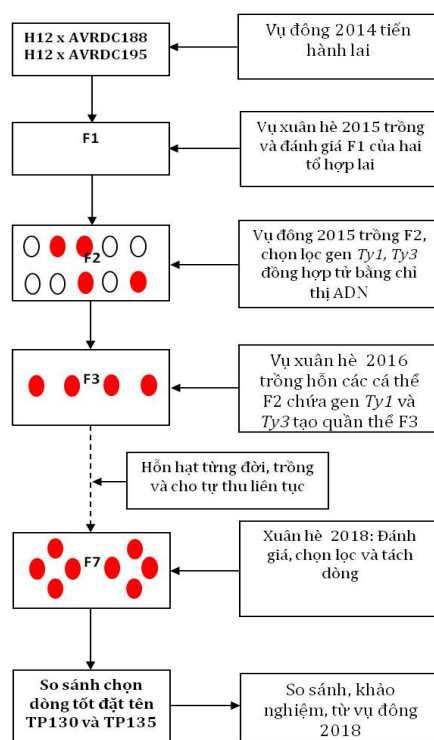
Nguồn bệnh xoắn vàng lá được thu thập ở Bắc Giang, Hải Phòng, Hưng Yên và 01 cấu trúc xâm nhiễm ToLCHnV (mã GenBank HQ162269) gây bệnh xoắn vàng lá trên cà chua (Hà Viết Cường & cs., 2011), được cung cấp bởi Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới - Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chọn tạo giống

Phương pháp lai và chọn tạo: Quần thể lai F₁ được tạo ra bằng phương pháp lai đơn, dòng mẹ H12 được lai với dòng bố AVRDC188 chứa gen *Ty1* và AVRDC195 chứa gen *Ty3*. Quần thể F₁ được sàng lọc bằng chỉ thị phân tử ADN. Từ thế hệ F₂ phương pháp chọn lọc phả hệ và chỉ thị phân tử ADN được sử dụng để chọn cá thể mang gen. Các cá thể mang gen cho tự thụ qua nhiều thế hệ, đến thế hệ F₇ tiến hành tách dòng dựa trên kiểu hình. Phương pháp lai và chọn tạo giống được mô tả ở hình 1.

Phương pháp chọn lọc áp dụng chỉ thị phân tử: ADN được chiết tách từ lá non của cây con 20 ngày tuổi bằng phương pháp CTAB được mô tả bởi Doyle & Doyle (1990) có cải tiến: 0,1g lá non được nghiền cùng với 800μL đệm chiết tách (NaCl 1,5M, EDTA 50mM, Tris-HCl 100mM, CTAB 2%, β mercaptoethanol 1%). Dịch nghiền được chuyển vào ống eppendorf 1,5mL và ủ ở nhiệt độ 65°C trong 30 phút. Sau khi ủ, mẫu được bổ sung thêm 800μl hỗn hợp Phenol : Choloroform : Isoamylalcol theo tỷ lệ (25:24:1), lắc nhẹ, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút. Sau ly tâm, phần dịch nổi được chuyển sang ống eppendorf mới, sau đó thêm 800μl Isopropanol, lắc đều và đặt ở -20° trong 30 phút. Mẫu tiếp tục được ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 15 phút, rồi thu kết tủa ADN dưới đáy ống. Kết tủa được rửa bằng Ethanol 70%, sau đó hòa bằng 50μl dung dịch TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) và bảo quản ở -20°C.



Hình 1. Sơ đồ minh họa chọn tạo giống cà chua kháng bệnh xoăn vàng lá

Nhân bản ADN bằng PCR: Gen *Ty1* được chọn lọc bằng chỉ thị TG97 (TG97F: 5'-taa-tcc-gtc-gtt-acc-tct-cct-t-3'; TG97R: 5'-cgg-atg-act-tca-ata-gca-atg-a-3') (Castro & cs., 2007). Gen *Ty3* được chọn lọc bằng chỉ thị P6-25 (P6-25-F2: 5'-ggg-agt-gga-aat-gat-gct-gct-c-3'; P6-25-R5: 5'-gct-ctg-cct-att-gtc-cca-tat-ata-acc-3') (Ji & cs., 2007). Thành phần phản ứng PCR gồm: 10 μ l PCR master mix 2X (Thermo Scientific); 1 μ l (10 μ M) mỗi mỗi loại; 7 μ l nước PCR và 1 μ l ADN tổng số (tương đương 10ng).

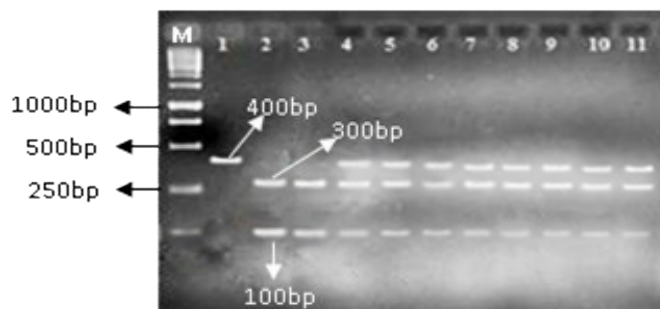
Chu kỳ nhiệt cho gen *Ty1* bao gồm: 94°C trong 5 phút, (94°C/10 giây, 55°C/30 giây và 72°C/70 giây) \times 20 chu kỳ, tiếp theo (94°C/10 giây, 53°C/30 giây và 72°C/70 giây) \times 10 chu kỳ; 72°C/10 phút và giữ ở 4°C. Chu kỳ nhiệt cho gen *Ty3* bao gồm: 94°C/5 phút, (94°C/30 giây, 53°C/1 phút, 72°C/1 phút) \times 34 chu kỳ; 72°C/5 phút và giữ ở 4°C. Đối với gen *Ty1*, 10 μ l sản phẩm PCR được ủ qua đêm ở 65°C với 5 đơn vị enzyme *TaqI* để phân biệt alen kháng và mẫn cảm.

Sản phẩm PCR và sản phẩm cắt enzyme giới hạn được điện di trên gel agarose 1,5% có bổ sung chất nhuộm redsafe.

2.2.2. Lấy nhiễm nhân tạo bệnh virus xoăn vàng lá

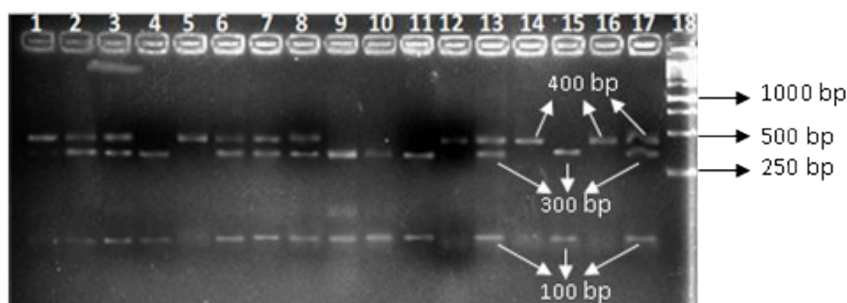
Chồi bệnh dài 4-5cm được tách ra từ những cây cà chua có triệu chứng bệnh điển hình thu từ Hải Phòng, Hưng Yên và Bắc Giang ghép lên giống mẫn cảm Hồng lan 50 ngày tuổi để nhân và duy trì các nguồn bệnh phục vụ lấy nhiễm. Cấu trúc xâm nhiễm ToLCHnV cũng được lấy nhiễm trên giống Hồng lan bằng phương pháp tiêm mặt dưới lá (Ahmed & cs., 1991) để nhân mẫu bệnh. Các dòng đánh giá được gieo trong nhà lưới, sau 30 ngày tiến hành ghép nêm với chồi bệnh, ghép ở vị trí phần thân phía trên 3 lá thật đầu tiên; mỗi dòng ghép 10 cây, sau 10 ngày được trồng ra ruộng. Sau 40 ngày ghép, các cây lấy nhiễm được đánh giá mức độ kháng/nhiễm theo thang điểm từ 0-4 (Lapidot & Friedmann., 2002) như sau: 0 - không có triệu chứng bệnh; 1 - cạnh lá hơi vàng; 2 - một số lá chết cuối bị biến vàng và số ít bị xoăn; 3 - nhiều lá biến vàng, xoăn, và cong lên, cây tiếp tục phát triển; 4 - cây còi cọc và biến vàng rất nghiêm trọng, lá xoăn và cong, cây ngừng phát triển.

Chọn tạo giống cà chua thuần kháng bệnh xoắn vàng lá bằng chỉ thị phân tử ADN



Ghi chú: Giếng 1: Dòng mẹ H12; giếng 2: Dòng bố AVRDC188; giếng 4-11: Cây lai F₁; M: Thang chuẩn ADN 1bp (Intron).

Hình 2. Chọn lọc cây F₁ của tổ hợp lai (H12 × AVRDC188) bằng chỉ thị TG97 và cắt enzyme giới hạn TaqI



Ghi chú: Giếng 4, 9, 10, 11, 15: dòng mang kiểu gen Ty1/Ty1 (2 băng ADN kích thước 300 bp và 100bp; giếng 1, 2, 12, 14 và 16: dòng mang kiểu gen ty1/ty1 (băng ADN kích thước 400bp); Giếng 2, 3, 6, 7, 8, 13 và 17: dòng mang kiểu gen Ty1/ ty1 (3 băng ADN kích thước 100, 300 và 400bp); giếng 18: thang chuẩn ADN 1kp của Intron.

Hình 3. Chọn lọc cá thể mang gen Ty1 trong quần thể lai F₂ bằng chỉ thị TG97 và cắt enzyme giới hạn TaqI

2.3. Phương pháp khảo nghiệm cơ bản, so sánh giống

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên đầy đủ (RCBD), 3 lần nhắc lại, diện tích ô thí nghiệm 10m², theo quy chuẩn QCVN01-63:2011/BNNPTNT. Giống C155 và giống Savior được sử dụng làm đối chứng trong quá trình khảo nghiệm.

Các dòng khảo nghiệm được theo dõi các chỉ tiêu về sinh trưởng, phát triển, khả năng kháng một số loài sâu, bệnh hại chính, các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất theo quy chuẩn QCVN01-63:2011/BNNPTNT.

Số liệu các chỉ tiêu theo dõi được thu thập bằng phương pháp quan trắc, đo đếm và được xử

lý thống kê phương sai (ANOVA) bằng phần mềm máy tính Excel và phần mềm thống kê sinh học SAS 9.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chọn dòng cà chua mang gen kháng Ty1 và Ty3 từ quần thể lai F₁ và quần thể tự thụ F₂

3.1.1. Chọn dòng cà chua mang gen kháng Ty1

Gen Ty1 là gen trội, được Zamir & cs. (1994) xác định nằm trên nhiễm sắc thể số 6. Để chọn lọc gen này, Han & cs. (2012) đã phát triển thành công chỉ thị đồng trội CAPS TG97 cho

phép phân biệt được kiểu gen kháng đồng và dị hợp tử. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chỉ thị TG97 đã được sử dụng để xác định và chọn lọc gen kháng *Ty1*. Sản phẩm PCR với cặp mỗi TG97 cắt bởi enzyme *TaqI* khi điện di sẽ cho 3 dạng. Dạng đồng hợp tử trội (mang gen kháng *Ty1*) cho 2 vạch băng kích thước 300 và 400bp, dạng đồng hợp tử lặn (không mang gen kháng *Ty1*) cho một vạch băng kích thước 400bp và dạng dị hợp tử (dạng F_1) cho ba vạch băng kích thước 100, 300 và 400bp (Han & cs., 2012). Kết quả sử dụng chỉ thị TG97 để đánh giá con lai F_1 của tổ hợp lai ($H12 \times AVRDC188$) nhận thấy 100% con lai F_1 đều cho ba vạch băng kích thước 100, 300 và 400bp (Hình 2). Điều này có nghĩa là tất cả cá thể F_1 được tạo ra đều là con lai thật. Bố, mẹ là những dòng cà chua thuần, nên F_1 tạo ra từ tổ hợp lai trên có kiểu gen giống hệt nhau. Vì vậy chúng tôi chọn 1 cá thể F_1 bất kỳ trông và cho tự thụ tạo quần thể F_2 phục vụ cho chọn lọc gen kháng *Ty1* đồng hợp trội.

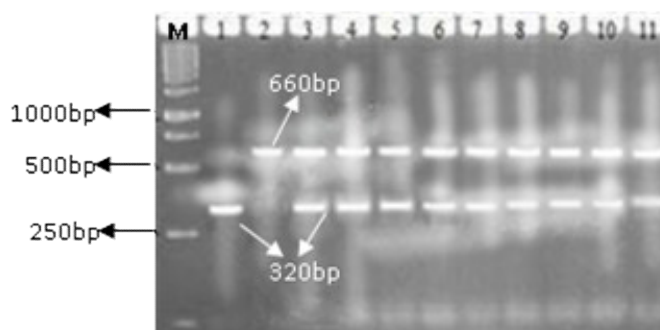
3.1.2. Chọn lọc dòng cà chua mang gen kháng *Ty3*

Gen *Ty3* là gen trội nằm trên nhiễm sắc thể số 6 (Ji & cs., 2007; Ji & Scott, 2007). Theo Ji & cs. (2007), gen *Ty3* định vị tại một vùng có chứa locus FER (25 cM, dòng vector BAC56B23, AY678298). Cặp mỗi P6-25 F/R được thiết kế để khuếch đại đoạn trình tự 660bp của alen *Ty3b* và 630bp với alen *Ty3a*, 320bp của alen mất cảm *ty3*, kiểu gen dị hợp tử sẽ cho 2 vạch băng 630bp hoặc 660bp và 320bp. Khi sử dụng cặp

mỗi P6-25F/R để sàng lọc một số giống lai (F_1) thương mại, Ji & cs. (2007) đã thu được hai băng có kích thước 660bp và 320bp ở các giống khác nhau. Kết quả sử dụng chỉ thị P6-25 với cặp mỗi P6-25F/R để xác định con lai F_1 của tổ hợp lai ($H12 \times AVRDC195$) đã thu được 100% con lai cho 2 vạch băng kích thước 660bp và 320bp (Hình 4). Điều này chứng tỏ tất cả cá thể F_1 đều là con lai được tạo ra từ tổ hợp ($H12 \times AVRDC195$). F_1 được tạo ra từ bố mẹ thuần chủng nên các cá thể lai F_1 có kiểu gen giống hệt nhau. Để tạo quần thể F_2 phục vụ cho chọn lọc gen kháng *Ty3* đồng hợp trội, chúng tôi lấy một cá thể F_1 bất kỳ trông và cho tự thụ.

Trong quần thể F_2 , chúng tôi tiếp tục sử dụng chỉ thị P6-25 để chọn lọc gen kháng *Ty3* đồng hợp tử trội. Kết quả, đã chọn được 4 cá thể mang gen kháng *Ty3* đồng hợp tử trội từ 50 cá thể F_2 (Hình 5). Tương tự như chọn lọc dòng mang gen *Ty1*, hạt của các cá thể chứa gen *Ty3* đồng hợp tử được hỗn, và cho tự thụ liên tục nhiều thế hệ, đến thế hệ F_7 đánh giá, chọn lọc và tách dòng dựa trên kiểu hình. Qua đó, một dòng có nhiều đặc tính tốt đã được chọn và đặt tên là TP135.

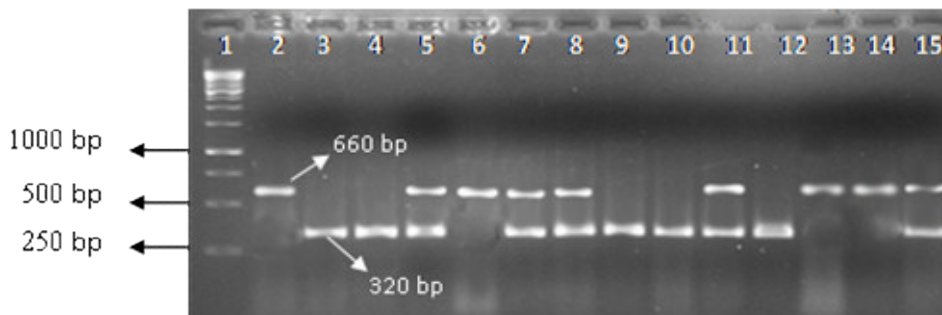
Như vậy, bằng phương pháp lai đơn kết hợp với ứng dụng chỉ thị phân tử ADN chọn lọc cây lai F_1 và chọn lọc cá thể mang gen kháng đồng hợp tử trong quần thể F_2 , chúng tôi đã chọn được 2 dòng cà chua ưu việt chứa gen kháng bệnh xoắn vàng lá *Ty1* và *Ty3* lần lượt là hai dòng TP130 và TP135.



Ghi chú: Giếng 1: Dòng mẹ H12; giếng 2: Dòng bố AVRDC195; giếng 4-11: Cây lai F_1 ; M: Thang chuẩn ADN 1bp (Intron).

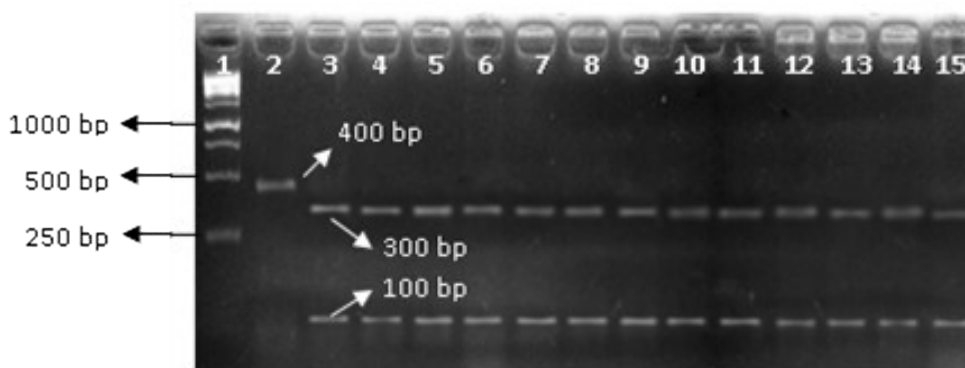
Hình 4. Xác định cây F_1 của tổ hợp lai ($H12 \times AVRDC195$) bằng chỉ thị P6-25

Chọn tạo giống cà chua thuần kháng bệnh xoăn vàng lá bằng chỉ thị phân tử ADN



Ghi chú: Giếng 1: Thang chuẩn ADN 1kp (Intron); giếng 2, 6, 13 và 14 dòng mang gen *Ty3* đồng hợp trội (bằng ADN kích thước 660bp); giếng 3, 4, 9, 10, 12 dòng mang gen *Ty3* đồng hợp tử lặn (bằng ADN kích thước 320bp); giếng 5, 7, 8 11, 15 dòng mang gen *Ty3* dị hợp tử (2 băng ADN kích thước 320 và 630bp).

Hình 5. Chọn lọc cá thể mang gen *Ty3* từ quần thể lai F2 bằng chỉ thị P6-25



Ghi chú: Giếng 1: Thang chuẩn ADN 1kp (Intron); giếng 2: Dòng mẹ H12 (bằng ADN kích thước 400bp); giếng 3: Dòng bố AVRDC 188 (2 băng ADN kích thước 300 và 100bp); giếng 4-15 các cá thể tạo ra từ dòng TP130.

Hình 6. Xác định gen kháng *Ty1* của dòng cà chua TP130 bằng chỉ thị TG97 và enzyme giới hạn *TaqI*

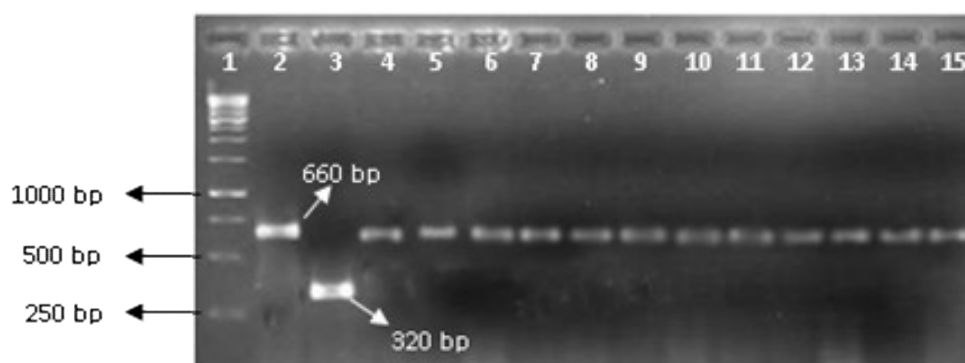
3.2. Xác định kiểu gen và kiểu hình kháng virus xoăn vàng lá của dòng chọn lọc

Để xác định sự có mặt của gen kháng *Ty1* trong dòng TP130 và *Ty3* trong dòng TP135, 50 cá thể mỗi dòng được chọn kiểm tra ngẫu nhiên bằng hai chỉ thị TG97 và P6-25. Kết quả cho thấy 100% số cá thể kiểm đều chứa gen kháng *Ty1* (dòng TP130) và *Ty3* (dòng TP135) (Hình 6 và 7). Điều này chứng tỏ gen *Ty1* và *Ty3* đã được di truyền ổn định qua các thế hệ.

Song song với quá trình kiểm tra sự hiện diện của gen *Ty1* và *Ty3*, hai dòng TP130 và TP135 cũng được đánh giá khả năng kháng bệnh xoăn vàng lá bằng lây nhiễm nhân tạo với 4 nguồn gây bệnh xoăn vàng lá. Kết quả lây nhiễm cho thấy dòng TP130 và dòng AVRDC188

(dòng bố) chứa gen kháng *Ty1* kháng tốt với bốn nguồn bệnh (Bảng 1). Dòng H12 (dòng mẹ) và giống đối chứng C155 bị nhiễm nặng với tất cả các nguồn bệnh. Tương tự, dòng TP135 và dòng AVRDC195 (dòng bố) mang gen kháng *Ty3* cũng kháng tốt với các nguồn bệnh (Bảng 1). Kết quả này tương tự kết quả nghiên cứu của Phan Hữu Tôn & cs. (2013) đối với phản ứng của gen *Ty1* và *Ty3* với các nguồn bệnh nêu trên. Giống lai Savior chứa gen *Ty1* dị hợp cũng kháng tốt và tương tự dòng mang gen *Ty1* đồng hợp trội. Vì vậy gen này có thể sử dụng trong việc sản xuất giống cà chua lai kháng bệnh xoăn vàng lá.

Như vậy, gen *Ty1* và *Ty3* đã hoàn toàn di truyền ổn định qua các thế hệ và cả hai gen này có khả năng kháng tốt với các nguồn bệnh thông qua lây nhiễm nhân tạo.



Ghi chú: Giếng 1: Thang chuẩn ADN 1kp của (Intron); giếng 2: Dòng mẹ H12 (bằng ADN kích thước 320bp); giếng 3: Dòng bố AVRDC 195 (bằng ADN kích thước 660bp); giếng 4-15 các cá thể tạo ra từ TP135.

Hình 7. Xác định gen *Ty3* của dòng cà chua TP135 bằng chỉ thị P6-25

Bảng 1. Kết quả đánh giá khả năng kháng bệnh xoăn vàng lá

Tên dòng/giống	Gen kháng	Điểm kháng sau 50 ngày lây nhiễm			
		Nguồn bệnh Hải Phòng	Nguồn bệnh Hưng Yên	Nguồn bệnh Bắc Giang	ToLCHnV
TP130	<i>Ty1</i>	0,0	0,0	1,0	0,0
TP135	<i>Ty3</i>	1,0	0,0	0,0	0,0
H12	<i>Không</i>	3,0	3,0	2,5	2,5
AVRDC 188 (bố)	<i>Ty1</i>	0,0	0,0	1,0	0,0
AVRDC 195 (bố)	<i>Ty3</i>	1,0	0,0	0,0	0,0
Savior (đ/c)	<i>Ty1ty1</i>	0,0	0,0	1,0	0,0
C155 (đ/c)	<i>Không</i>	3,0	3,5	3,5	2,5

3.3. Khảo nghiệm cơ bản hai dòng cà chua TP130 và TP135

3.3.1. Một số đặc điểm nông sinh học chính

Đặc điểm nông sinh học của hai dòng TP130 và TP135 được mô tả ở bảng 2. Qua đó, chúng tôi nhận thấy dòng TP130 có kiểu hình sinh trưởng bán hữu hạn (BHH). Thời gian sinh trưởng ngắn, trong điều kiện vụ xuân hè và vụ đông đều tương đương với dòng mẹ H12 và ngắn hơn dòng bố AVRDC188. Thời gian thu hoạch quả dài, khoảng từ 35 - 40 ngày trong điều kiện vụ xuân hè và 50-55 ngày trong điều kiện vụ thu đông. Về chiều cao cây, dòng TP130 có chiều cao cây trung bình, phù hợp với điều kiện sản xuất vụ xuân hè và vụ đông ở miền Bắc Việt Nam.

Dòng TP135 cũng có đặc điểm tương tự TP130, có kiểu hình sinh trưởng BHH, thời gian sinh trưởng từ ngắn hơn so với dòng bố AVRDC195 và đối chứng Savior, vụ đông có thời

gian sinh trưởng dài hơn vụ xuân hè. Thời gian thu hoạch quả trong vụ xuân hè từ 40-45 ngày và vụ đông từ 50-55 ngày, chiều cao cây của dòng TP135 cũng ở mức trung.

Như vậy, cả hai dòng cà chua mới chọn tạo đều có kiểu cây đẹp, cao cây vừa phải, sinh trưởng BHH, phát triển tốt trong cả vụ xuân hè và vụ đông, phù hợp với các cơ cấu giống ở miền Bắc Việt Nam.

3.3.2. Mức độ nhiễm một số loại sâu, bệnh hại chính

Nghiên cứu, đánh giá khả năng chống chịu sâu, bệnh hại trên đồng ruộng của hai dòng cà chua được tiến hành trong 3 vụ (Bảng 3). Kết quả cho thấy, đối với bệnh mốc sương trong điều kiện vụ xuân hè tất cả các dòng, giống đều bị nhiễm ở mức điểm 1-3, hai dòng bố và giống đối chứng Savior bị nặng hơn (điểm 3-5). Trong điều kiện vụ đông, triệu chứng bệnh nhẹ xuất

hiện trên dòng TP130, TP135 và hai dòng bố, trong khi đó giống đối chứng Savior và dòng mẹ bị nhiễm nặng hơn, ở mức điểm 1-3.

Bệnh héo xanh vi khuẩn chỉ thấy xuất hiện trong điều kiện vụ đông, nhưng ở mức độ nhiễm nhẹ ở tất cả các dòng, giống, với mức độ lây nhiễm từ 3,0 - 7,0% tổng số cây. Trong điều kiện vụ xuân hè, tất cả các dòng, giống hoàn toàn không thấy xuất hiện triệu chứng bệnh.

Bệnh xoắn vàng lá là bệnh nguy hiểm nhất đối cà chua. Qua theo dõi nhận thấy hai dòng khảo nghiệm TP130 và TP135 hoàn toàn không bị nhiễm bệnh này. Hai dòng bố AVRDC188 và AVRDC195 cũng có phản ứng tương tự. Có lẽ dòng TP130 và bố AVRDC188 chứa gen *Ty1* cũng như dòng TP135 và bố AVRDC195 chứa gen *Ty3* nên chúng kháng được bệnh này. Dòng mẹ H12 không chứa gen và giống đối chứng C155 bị nhiễm với tỷ lệ rất cao trong cả vụ đông và vụ xuân hè. Giống lai Savior mang gen kháng *Ty1* dị hợp tử (Phan Hữu Tôn & cs., 2013), đây là lý do giống Savio cũng không biểu hiện triệu chứng bệnh.

Về khả năng kháng sâu đục quả, nhìn chung tất cả các dòng, giống đều bị nhiễm, tuy nhiên hai dòng TP130 và TP135 bị hại ở mức độ thấp hơn so với hai giống đối chứng và dòng bố mẹ.

3.3.3. Các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất

Các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất được theo dõi, đánh giá trong 3 vụ. Kết quả, theo dõi và đánh giá được tổng hợp ở bảng 4.

Về số quả/cây, hai dòng TP130 và TP135 có số quả/cây cao hơn giống đối chứng C155 và dòng bố của chúng, tương đương giống Savior và dòng mẹ H12 trong cả 3 vụ.

Về khối lượng quả trung bình, dòng TP130 có khối lượng quả tương đương giống đối chứng C155 và dòng mẹ, nhưng thấp hơn giống đối chứng Savior và dòng bố AVRDC188. Với dòng TP135, khối lượng quả trung bình tương đương giống đối chứng Savior và dòng bố AVRDC195 cao hơn đối chứng C155 và dòng mẹ H12.

Bảng 2. Một số đặc điểm sinh trưởng, phát triển, hình thái của dòng TP130 và TP135

Tên dòng	Từ trồng - đến			Thời gian sinh trưởng (ngày)	Kiểu hình sinh trưởng	Chiều cao cây (cm)
	Ra hoa (ngày)	Bắt đầu thu hoạch đợt 1 (ngày)	Kết thúc thu hoạch (ngày)			
Điều kiện vụ xuân hè 2019						
TP130	23-25	60-65	100 ± 5	120 ± 5	BHH	122,5 ± 5,4
TP135	23-25	60-65	105 ± 5	125 ± 5	BHH	125,0 ± 4,7
H12	23-25	60-65	100 ± 5	120 ± 5	BHH	120,3 ± 4,5
AVRDC188	25-30	65-70	115 ± 5	135 ± 5	BHH	134,5 ± 4,7
AVRDC195	25-30	65-70	115 ± 5	135 ± 5	BHH	135,3 ± 4,3
Savior (đ/c)	27-30	65-70	110 ± 5	130 ± 5	BHH	130,5 ± 5,2
C155 (đ/c)	25-27	65-70	105 ± 5	125 ± 5	BHH	112,3 ± 3,6
Điều kiện vụ đông 2019						
TP130	25-30	65-70	120 ± 5	140 ± 3	BHH	133,6 ± 3,5
TP135	25-30	68-70	123 ± 5	143 ± 3	BHH	135,3 ± 4,2
H12	25-30	65-70	125 ± 5	145 ± 5	BHH	130,3 ± 4,5
AVRDC188	30-35	70-75	135 ± 5	155 ± 5	BHH	155,6 ± 4,5
AVRDC195	30-35	70-75	135 ± 5	155 ± 5	BHH	152,3 ± 4,5
Savior (đ/c)	28-30	75-80	125 ± 5	145 ± 3	BHH	142,5 ± 3,8
C155 (đ/c)	25-30	70-75	120 ± 5	140 ± 5	BHH	122,3 ± 4,5

Ghi chú: Các chỉ tiêu theo dõi theo quy chuẩn QCVN01-63:2011/BNNPTNT

Bảng 3. Khả năng sâu, bệnh hại chính của các giống cà chua khảo nghiệm

Thời vụ trồng	Tên dòng/giống	Bệnh mốc sương (điểm)	Héo xanh vi khuẩn (% cây bị bệnh)	Virus XVL (% cây bị bệnh)	Sâu đục quả
Vụ đông 2018	TP130	0-1	5,0	0	8,0
	TP135	0-1	7,0	0	6,0
	H12	1-3	5,0	20,6	8,5
	AVRDC188	0-1	5,0	0	6,0
	AVRDC195	0-1	5,0	0	6,0
	Savior	1-3	7,0	0	11,5
	C155	0-1	3,0	17,3	7,5
Vụ xuân hè 2019	TP130	1-3	0,0	0,0	6,5
	TP135	1-3	0,0	0,0	4,6
	H12	1-3	0,0	23,3	8,6
	AVRDC188	3-5	0,0	0,0	5,6
	AVRDC195	3-5	0,0	0,0	5,6
	Savior	3-5	0,0	0,0	8,3
	C155	1-3	0,0	22,0	11,3
Vụ đông 2019	TP130	0-1	3,0	0	4,5
	TP135	0-1	8,0	0	3,5
	H12	1-3	11,0	14,3	5,0
	AVRDC188	0-1	8,0	0	5,5
	AVRDC195	0-1	8,0	0	5,0
	Savior	1-3	6,0	0	5,0
	C155	0-1	11,0	12,6	4,5

Ghi chú: Các chỉ tiêu theo dõi theo quy chuẩn QCVN01-63:2011/BNNPTNT.

Về khối lượng quả/cây, trong cả 3 vụ dòng TP130 và TP135 đều cho khối lượng quả cao hơn giống đối chứng C155 và dòng bố của chúng và tương đương giống Savior và dòng mẹ.

Về năng suất thực thu, qua 3 vụ dòng TP130 và TP135 đều cho năng suất ổn định, cao hơn giống đối chứng C155 và dòng bố của chúng (sai khác có ý nghĩa thống kê, $P < 0,05$), tương đương giống đối chứng Savior và dòng mẹ (sai khác không có ý nghĩa thống kê, $P > 0,05$).

Nhìn chung 2 dòng mới chọn tạo TP130 và TP135 hội tụ được nhiều đặc tính quý, năng suất cao, ổn định qua các vụ, có khả năng chịu nóng tốt nên cho năng suất khá ngay cả trong vụ xuân hè và đặc biệt là khả năng kháng bệnh xoắn vàng lá rất tốt. Hai dòng này hoàn toàn có tiềm năng để phát triển rộng trong sản xuất.

4. KẾT LUẬN

Bằng chỉ thị phân tử kết hợp với chọn tạo giống truyền thống, chúng tôi đã chọn tạo thành công hai dòng cà chua TP130 và TP135 lần lượt chứa gen kháng vênh xoắn vàng lá *Ty1* và *Ty3*.

Gen *Ty1* và *Ty3* hoàn toàn di truyền ổn định qua các thế hệ và có mặt trong dòng TP130 và TP135. Chúng thể hiện khả năng kháng tốt với các nguồn bệnh thu thập tại Hải Phòng, Bắc Giang, Hưng Yên và ToLCHnV.

Dòng TP130 và TP135 có nhiều đặc điểm tốt, có kiểu hình sinh trưởng bán hữu hạn, thời gian sinh trưởng ngắn, khả năng kháng sâu bệnh tốt, đặc biệt là bệnh xoắn vàng lá, năng suất cao hơn đối chứng C155 và tương đương Savior.

Bảng 4. Năng suất và một số yếu tố cấu thành năng suất của dòng TP130 và TP135

Tên dòng/giống	Số quả/cây (quả)	Khối lượng quả (gam)	Khối lượng quả/cây (kg)	NS thực thu (tấn/ha)
Vụ đông 2018				
TP130	31,5 ^a	82,0 ^b	2,58 ^a	63,3 ^a
TP135	28,0 ^a	91,5 ^a	2,56 ^a	64,6 ^a
H12	29,5 ^a	87,0 ^b	2,57 ^a	65,3 ^a
AVRDC188	19,5 ^c	99,5 ^a	1,94 ^b	53,6 ^b
AVRDC195	18,0 ^c	102,5 ^a	1,85 ^b	52,3 ^b
Savior (đ/c)	27,0 ^a	99,0 ^a	2,68 ^a	66,6 ^a
C155 (đ/c)	23,5 ^b	84,0 ^b	1,97 ^b	56,6 ^b
CV%	9,8	8,9	8,6	8,6
LSD _{0,05}	4,9	9,3	0,59	4,4
Vụ xuân hè 2019				
TP130	24,5 ^a	83,5 ^b	2,04 ^a	54,7 ^a
TP135	22,5 ^a	93,0 ^a	2,09 ^a	55,6 ^a
H12	24,0 ^a	82,5 ^b	1,98 ^a	53,9 ^a
AVRDC188	13,6 ^c	104,3 ^a	1,42 ^b	46,6 ^b
AVRDC195	12,5 ^c	106,0 ^a	1,32 ^b	47,6 ^b
Savior(đ/c)	20,0 ^a	96,7 ^a	1,93 ^a	51,6 ^a
C155 (đ/c)	18,3 ^b	85,2 ^b	1,55 ^b	47,3 ^b
CV (%)	7,6	6,6	6,3	6,6
LSD _{0,05}	4,6	6,5	0,26	5,9
Vụ đông 2019				
TP130	33,5 ^a	84,0 ^b	2,81 ^a	67,5 ^a
TP135	31,0 ^a	94,5 ^a	2,83 ^a	69,3 ^a
H12	33,0 ^a	86,0 ^b	2,84 ^a	68,3 ^a
AVRDC188	18,0 ^c	101,5 ^a	1,73 ^b	55,6 ^b
AVRDC195	16,5 ^c	102,3 ^a	1,71 ^b	54,0 ^b
Savior (đ/c)	29,0 ^a	96,0 ^a	2,85 ^a	71,5 ^a
C155 (đ/c)	24,5 ^b	86,0 ^b	2,07 ^b	59,6 ^b
CV (%)	7,9	6,8	7,6	7,8
LSD _{0,05}	4,3	7,4	0,44	6,7

Ghi chú: Các số trong cùng một cột được theo sau bởi các chữ cái khác nhau thì khác nhau theo LSD_{0,05}

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahmed K.P., Mohamme B., Volker M., Gian P.A., Stefania C. & Bruno G. (1991). Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. *Nucleic Acids Res.* 19(24): 6763-6769.

Anbinder I., Reuveni M., Azari R., Paran I., Nahon S., Shlomo H., Chen L., Lapidot M. & Levin I. (2009). Molecular dissection of Tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from

Solanum peruvianum. *Theor. Appl. Genet.* 119(3): 519-30.

Bộ NN&PTNT (2011). QCVN 01-63:2011/BNNPTNT - Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về khảo nghiệm giá trị canh tác và giá trị sử dụng giống cà chua.

Castro A.P., Blanca J.M., María J.D. & Vinals F.N. (2007). Identification of a CAPS marker tightly linked to the Tomato yellow leaf curl disease resistance gene Ty-1 in tomato. *Eur. J. Plant Pathol.* 117: 347-356.

- Doyle J.J. & Doyle J.L. (1990). A rapid total ADN preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*. 12: 13-15.
- Garcia B.E., Graham E., Jensen K.S., Hanson P., Mejía L. & Maxwell D.P. (2007). Co-dominant SCAR marker for detection of the begomovirus-resistance Ty-2 locus derived from *Solanum habrochaites* in tomato germplasm. *Report of the Tomato Genetics Cooperative*. 57: 21-24.
- Hanson P.M., Green S.K. & Kuo G. (2006). Ty-2 gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Report of the Tomato Genetics Cooperative*. 56: 17-18.
- Ha V.C., Le V.H., Tran N.T. & Ngo B.H. (2011). Molecular characterization of Tomato leaf curl Hainan virus and Tomato leaf curl Hanoi virus in Vietnam. *J. ISSAAS*. 17(2): 70 - 82.
- Ji Y. & Scott J.W. (2006). Ty-3, a begomovirus resistance locus linked to Ty-1 on chromosome 6 of tomato. *Report of the Tomato Genetics Cooperative*. 56: 22-23.
- Ji Y., Salus M.S., Betteray B., Smeets J., Jensen K.S., Martin C.T., Mejía L., Scott J.W., Havey M.J. & Maxwell D.P. (2007). Co-dominant SCAR Markers for Detection of the Ty-3 and Ty-3a Loci from *Solanum chilense* at 25 cM of Chromosome 6 of Tomato. *Report of the Tomato Genetics Cooperative*. 57: 25-28.
- Ji Y., Schuster D.J. & Scott J.W. (2007). Ty-3, a begomovirus resistance locus near the tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding*. 20(3): 271-284.
- Ji Y., Scott J.W. & Schuster D.J. (2009). Molecular Mapping of Ty-4, a New Tomato YellowLeaf Curl Virus Resistance Locus on Chromosome 3 of Tomato. *J Amer Soc Hort Sci*. 134(2): 281-288.
- Lapidot M. & Friedmann M. (2002). Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. *Annals of Applied Biology*. 140: 109-127.
- Phan Hữu Tôn, Khúc Ngọc Tuyên, Tổng Văn Hải & Nguyễn Đức Bách (2013). Khảo sát nguồn gen cà chua chín chậm và kháng virus xoắn vàng lá bằng chỉ thị phân tử. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*. 11(6): 790-796.
- Pico B., Diez M. J. & Nuez F. (1996). Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The tomato yellow leaf curl virus. *Sci. Hortic*. 67:151-196.
- Reynaud B., Wuster G., Delatee H., Soustrade I., Lett J.M., Gambin O. & Peterschmitt M. (2003). Les maladies a begomovirus chez latomate dans les department francais d' Oute- Mer. *Phytoma-La Defense des Vegetaux*. 562: 13-17.
- Zamir D., Michelson I., Zakay Y., Navot N., Zeidan N., Sarfatti M., Eshed Y., Harel E., Pleban T., Van-Oss H., Kedar N., Rabinowitch H.D. & Czosnek H. (1994). Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene Ty-1. *Theor. Appl. Genet*: 88: 141-146.
- Zhang X. (2010). The development of longer shelf-life gene marker and assisted selection of tomato inbredlines. Master Molecular vegetable breeding, Huazhong Agricultural University, Wuhan, China.