

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG CHUYỂN ĐẶC TÍNH KHÁNG BỆNH MỐC SƯƠNG TỪ KHOAI TÂY DẠI SANG KHOAI TÂY TRỒNG THÔNG QUA DUNG HỢP TẾ BÀO TRẦN

Hoàng Thị Giang¹, Vũ Thị Hằng¹, Nguyễn Thị Thủy¹, Đỗ Thị Thu Hà¹
Ramona Thieme², Thilo Hammann², Nguyễn Quang Thạch^{1*}

¹*Viện Sinh học Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

²*Viện Nghiên cứu Chọn tạo giống cây trồng JKI, Gross Luesewitz, Đức*

Email*: nqthachshnn@gmail.com

Ngày gửi bài: 30.07.2014

Ngày chấp nhận: 21.10.2014

TÓM TẮT

Bài báo trình bày các kết quả đánh giá tính kháng bệnh mốc sương của các con lai soma tạo được qua dung hợp tế bào trần giữa các giống khoai tây trồng loài *S. tuberosum* (Delikat, Rasant, Agave, Atlantic) với các dòng khoai tây dại mang đặc tính kháng bệnh mốc sương thuộc các loài *S. bulbocastanum*, *S. pinatisectum*, *S. tarnii*. Nghiên cứu đã sử dụng một hệ thống các phương pháp đánh giá tính kháng bệnh mốc sương bao gồm phương pháp lấy nhiễm trên lá đơn tách rời (Detached leaflet assay), trên lát cắt củ (Tuber slice test) và phương pháp lấy nhiễm trên đồng ruộng (Field test). Kết quả đánh giá đã phát hiện thấy chỉ các con lai soma của tổ hợp lai giữa *S. bulbocastanum* với giống khoai tây trồng Delikat có biểu hiện tính kháng bệnh mốc sương cao. Qua phân tích bằng chỉ thị phân tử có sử dụng các môi đặc hiệu cho các gen kháng bệnh mốc sương *Rpi-blb* đã phát hiện dòng dại *S. bulbocastanum* và các con lai soma của nó đều có mặt gen kháng *Rpi-blb1* và *Rpi-blb3*. Điều này chứng tỏ gen kháng bệnh mốc sương đã được chuyển từ khoai tây dại sang khoai tây trồng thông qua dung hợp tế bào trần.

Từ khóa: Con lai soma, mốc sương, kháng mốc sương, *Rpi-blb1*, *Rpi-blb3*

Evaluating Transferability of Late Blight Resistance from Wild Potato to Cultivated Potato via Protoplast Fusion

ABSTRACT

This paper presented the evaluation of late blight resistance of somatic hybrid potato plants generated via protoplast fusion between *Solanum tuberosum* varieties (Delikat, Rasant, Agave, Atlantic) with wild potato species (*S. bulbocastanum*, *S. pinatisectum*, *S. Tarnii*). Late blight resistance was evaluated using detached-leaf method, tuber slice test and field test. The results revealed that only somatic hybrid plants between *S. bulbocastanum* with cultivated potato variety Delikat showed resistance against late blight disease. Molecular marker analysis for *Rpi-blb*, resistant-related genes, found the presence of *Rpi-blb1* and *Rpi-blb3* genes in *S. bulbocastanum* and its somatic hybrids. This confirmed that late blight resistant genes were successfully transferred from wild potato to cultivated potato via protoplast fusion.

Keywords: Late blight, late blight resistance, *Rpi-blb1*, *Rpi-blb3*, somatic hybrid.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh mốc sương gây hại khoai tây do nấm *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary gây ra. Bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng cho sản xuất khoai tây ở tất cả các nước có trồng khoai tây. Việc sử dụng biện pháp phòng chống bệnh

hại bằng thuốc hóa học vừa làm tăng chi phí sản xuất, vừa gây ô nhiễm môi trường (riêng ở Đức chi phí cho việc dùng thuốc hóa học lên tới 470 EURO/ha (Darsow et al., 2008).

Gần đây đã phát hiện ra các loài khoai tây dại có nguồn gốc từ Nam và Trung Mỹ (Trung

tâm phát sinh khoai tây quốc tế) có khả năng kháng bệnh mốc sương rất cao (extremely resistance) (Thieme et al., 1997; 2010; Szczerbakowa et al., 2005). Tuy nhiên do khác loài và có độ bội khác nhau nên việc chuyển tính kháng bệnh mốc sương từ các loài khoai tây dại nói trên sang khoai tây trồng thông qua lai hữu tính là không thể thực hiện được. Để khắc phục hiện tượng này, việc dung hợp tế bào trần (lai soma) giữa khoai tây trồng và khoai tây là giải pháp hữu hiệu, đầy hứa hẹn trong việc tạo nên vật liệu khởi đầu cho chương trình chọn tạo giống khoai tây kháng bệnh mốc sương. Đây là hướng đi đúng đắn và đã được nhiều nghiên cứu chứng minh về khả năng chuyển các đặc tính quý của các loài khoai tây khác nhau thông qua dung hợp tế bào (Mattheij et al., 1992; Thach et al., 1993; Thieme et al., 2000; 2008; 2010).

Các nghiên cứu về sự đa dạng, phạm vi phân bố cũng như quá trình tiến hóa của các gen kháng mốc sương có ở loài dại *S. bulbocastanum* đã đưa ra các cặp mồi đặc hiệu để nhân các gen kháng này. Gen $R_{pi-blb1}/RB$ được phát hiện bởi 2 cặp mồi là Blb1 (Wang et al., 2008) và 1/1', các cặp mồi đặc hiệu này khuếch đại gen $R_{pi-blb1}/RB$ và cho đoạn ADN được khuếch đại có kích thước lần lượt là 820 và 213bp (Wang et al., 2008); gen $R_{pi-blb2}$ được phát hiện nhờ cặp mồi Blb2F/R, cặp mồi khuếch đại gen $R_{pi-blb2}$ và cho đoạn DNA được khuếch đại có kích thước khoảng 715bp (Lokossou cs., 2010), trong khi Wang et al., (2008) cho rằng cặp mồi Blb2F/R sẽ khuếch đại đoạn ADN có kích thước khoảng 773bp. Cặp mồi Blb3F/R đặc hiệu khuếch đại gen kháng mốc sương $R_{pi-blb3}$ và cho đoạn ADN có kích thước khoảng 618bp (Wang et al., 2008).

Tính kháng bệnh mốc sương có tương quan chặt chẽ với tính chín muộn ở cây khoai tây và do nhiều gen quy định (polygenes). Cho tới nay các nhà chọn tạo giống khoai tây đã phải quan tâm tới xấp xỉ 70 tính trạng khi giới thiệu tính kháng bệnh về số lượng do nhiều gen quy định từ nguồn gen kháng không đặc hiệu (Hammann et al., 2009). Chính vì thế việc đánh giá khả năng kháng bệnh dưới áp lực của điều kiện tự nhiên là hết sức cần thiết.

Theo hướng này, hàng loạt con lai soma giữa các loài khoai tây dại và khoai tây trồng đã

được tạo ra (Hoàng Thị Giang et al., 2013). Nghiên cứu đã tạo thành công hàng loạt các con lai soma (dung hợp tế bào trần) giữa các dòng khoai tây dại và khoai tây trồng. Việc đánh giá đặc tính kháng bệnh mốc sương của các con lai soma này qua test lây nhiễm nhân tạo và chỉ thị phân tử là rất cần thiết để khẳng định tính kháng bệnh đã được chuyển từ khoai tây dại sang khoai tây trồng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Nghiên cứu đã sử dụng các dòng khoai tây dại *S. bulbocastanum* (blb2G), *S. tarnii* (trn3G), *S. pinatisectum* (pnt2G) do Ngân hàng IPK cung cấp (IPK Genebank External Branch 'North', Gross Luesewitz, Germany); các giống khoai tây trồng (Agave, Delikat, Rasant, Quarta, Atlantic) và các con lai soma của tổ hợp lai giữa các dòng khoai tây dại với các giống khoai tây trồng. Các dòng khoai tây trên được sử dụng duy trì ở dạng cây *in vitro*, lá được sử dụng sau 3-4 tuần tuổi để tách tế bào trần

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập mẫu bệnh và tạo dịch lây nhiễm nhân tạo bệnh mốc sương (Leontine Colon et al., 2004)

Thu thập mô lá bị nhiễm bệnh (sử dụng lá bánh tẻ) để trong tối sau 1 đêm với độ ẩm 100%. Đặt mô lá bệnh vào giữa 2 lát cắt củ với độ ẩm 95-100%, nhiệt độ 16-18⁰; 1-2 ngày sau bỏ lá bệnh; sau 5-6 ngày thu được các túi bào tử. Sử dụng buồng đếm hồng cầu để xác định nồng độ bào tử, bổ sung thêm dịch chiết củ khoai tây, duy trì ở 4 -10 °C nhằm giảm sự phân tách bào tử động. Nhân nuôi bào tử nấm trên các lát cắt củ để lưu trữ nguồn nấm.

2.2.2. Đánh giá tính kháng bệnh mốc sương bằng lây nhiễm nhân tạo trên lá đơn tách rời (Detached leaflet assay)

Trồng các con lai soma trong nhà kính (bao gồm cả giống đối chứng và các dòng bố mẹ). Tiến hành thu các lá đơn khi cây bắt đầu có hoa, lây nhiễm trên bề mặt sau của lá đơn (một giọt dịch lây nhiễm 15-20μl). Nồng độ của dịch lây nhiễm là 14 x 10³ bào tử/ml. Triệu chứng bệnh sẽ xuất

hiện sau 6 ngày lây nhiễm. Đo kích thước vết hoại tử và sự hình thành bào tử nấm theo thang điểm từ 1-9 trong đó điểm 1 tương đương không xuất hiện triệu chứng bệnh, điểm 9 là diện tích chết hoại, sự phát triển của sợi nấm chiếm 90 - 100% diện tích lá (Leontine et al., 2004; Hammann et al., 2009).

2.2.3. Đánh giá tính kháng bệnh mốc sương bằng lây nhiễm nhân tạo trên lát cắt củ (Tuber slice test)

Củ mới được thu hoạch (trong vòng 24h) hoặc các củ đã được bảo quản từ 1-2 tháng ở 8 - 9°C (bao gồm cả các giống đối chứng). Nồng độ của dịch lây nhiễm là 14×10^3 bào tử/ml. Thí nghiệm được lặp lại gồm 6 củ/kiểu gen x 2 lát/củ. Nhỏ một giọt dịch vào chính giữa bề mặt lát củ và ủ trong tối ở nhiệt độ 16 -18°C với độ ẩm 90-100%. Triệu chứng sẽ xuất hiện sau 7-10 ngày, đo bệnh (mặt trên và mặt dưới) với % củ bị nhiễm bệnh (Leontine et al., 2004, Hammann et al., 2009).

2.2.4. Đánh giá tính kháng bệnh mốc sương bằng lây nhiễm nhân tạo trên đồng ruộng (Field test)

Thí nghiệm trên đồng ruộng được bố trí ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại có 15 cây trên 3 luống (bao gồm cả các giống đối chứng và các dòng mang gen kháng R). Nồng độ dung dịch lây nhiễm là 20×10^3 bào tử/ml tại thời điểm khi cây bắt đầu hoặc kết thúc có hoa vào lúc tối muộn khi trời ẩm ướt (lây nhiễm theo kiểu dạng phun mù). Triệu chứng sẽ bắt đầu xuất hiện sau 1 tuần lây nhiễm.

Tiến hành đo vết bệnh ít nhất 5 lần khi sự nhiễm bệnh bắt đầu từ 0,1 - 100%. Đánh giá phản ứng của bệnh trong toàn bộ quá trình phát triển theo diện tích dưới đường diễn biến bệnh (Area Under Disease Progress Curve - AUDPC) và đánh giá tương quan (r) AUDPC; Phân tích sự sai khác (variance) được sử dụng để đánh giá

tất cả các giống. Kết quả có thể được so sánh với giống đối chứng) (Bernd et al., 2008). Giá trị diện tích dưới đường diễn biến bệnh được tính theo công thức dưới đây:

Sự thành thực của cây có tương quan chặt chẽ với tính kháng bệnh. Đánh giá sự thành thực của cây theo thang điểm từ 1-9 trong đó: 1-chín sớm ; 9-chín muộn (Bernd et al., 2008; Hammann et al., 2009).

$$n=1$$

$$AUDPC = \sum_{i=1} (y_i + y_{i+1}) (t_{i+1} - t_i)/2$$

Trong đó: n= số lần đo bệnh; y_i = cường độ bệnh (chỉ số bệnh hoặc tỷ lệ bệnh); t_i = thời gian tồn tại lần đo thứ i

$$(\Delta)rAUDPC = AUDPC/\max AUDPC$$

$$n-1$$

$$= AUDPC/ \sum_{i=1}^{n-1} 100 (t_{i+1} - t_i)$$

Trong đó: $t_{i+1} - t_i$ = tổng thời gian dịch bệnh

2.2.5. Kiểm tra sự có mặt của gen kháng mốc sương bằng chỉ thị phân tử

Xác định các gen kháng *Rpi-blb* ở các con lai soma có sử dụng các môi đặc hiệu của các gen: *Rpi-blb1* (Wang et al., 2008) và *Rpi-blb3* (Lokossou et al., 2010) (Bảng 1).

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê theo chương trình EXCEL và IRRISTAT 4.1

2.4. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành tại Viện Sinh học Nông nghiệp- Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội và Viện Nghiên cứu chọn tạo Giống cây trồng JKI- CHLB Đức.

Bảng 1. Trình tự mỗi của các gen kháng *Rpi-blb1* và *Rpi-blb3*

Tên môi	Trình tự	Gene	Nhiệt độ gắn môi	Độ lớn đoạn Nu được nhân
Bib 1	F: AACCTGTATGGCAGTGGCATG R: GTCAGAAAAGGGCACTCGTG	<i>Rpi-blb1</i>	66°C	820bp
Bib3	F: TGTCGCTGAAAGAGTAGGCC R: TATGGAGTGGCTTCTTGAAC	<i>Rpi-blb3</i>	62°C	618bp

Đánh giá khả năng chuyển đặc tính kháng bệnh mốc sương từ khoai tây dại sang khoai tây trồng thông qua dung hợp tế bào trần

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng kháng bệnh mốc sương của con lai soma qua lây nhiễm nhân tạo trên lá đơn tách rời

Các thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo được thực hiện trên mẫu lá của các vật liệu nghiên cứu trồng trong chậu vại ở thời kỳ ra hoa. Kết quả được thể hiện trên bảng 2.

Bảng 2. Kết quả đánh giá tính kháng bệnh mốc sương của các con lai soma và dòng bố mẹ bằng lây nhiễm nhân tạo trên lá đơn tách rời

Kiểu gen	Kí hiệu	Kích thước vết hoại tử (Mean±SD)*	Sự hình thành bào tử nấm (Mean±SD)**
<i>S. bulbocastanum</i>	<i>blb2G</i>	1,0 ± 0,0	1,00±0,0
<i>S. tarnii</i>	<i>trn3G</i>	1,0 ± 0,0	1,00±0,0
<i>S. pinnatisectum</i>	<i>pnt2G</i>	1,8±0,25	1,00±0,0
cv.Delikat	cv.Delikat	4,00±0,10	2,75±0,01
cv.Atlantic	cv.Atlantic	3,60±0,12	2,00±0,02
cv.Rasant	cv.Rasant	4,60±0,0	2,00±0,0
cv.Agave	cv.Agave	4,60±0,02	2,20±0,02
<u><i>trn 3G+cv.Delikat</i></u>			
SHtrn3G+Delikat	857/5	5,20±0,0	2,75±0,03
SHtrn3G+Delikat	851/2	4,00±0,06	2,00±0,0
SHtrn3G+Delikat	849/5	4,20±0,21	2,25±0,03
SHtrn3G+Delikat	849/4	5,20±0,17	3,00±0,0
SHtrn3G+Delikat	838/11	4,00±0,03	2,25±0,01
<u><i>trn 3G+cv.Rasant</i></u>			
SHtrn3G+Rasant	1/6	4,40±0,12	1,00±0,0
SHtrn3G+Rasant	3/9	4,40±0,0	1,75±0,01
SHtrn3G+Rasant	3/7	4,40±0,0	2,25±0,02
SHtrn3G+Rasant	3/5	6,00±0,0	3,00±0,0
<u><i>trn 3G+cv.Agave</i></u>			
SHtrn3G+Agave	4/12	4,60±0,11	2,25±0,06
SHtrn3G+Agave	4/13	3,40±0,02	1,25±0,05
SHtrn3G+Agave	4/20	5,00±0,05	2,50±0,12
SHtrn3G+Agave	4/22	3,80±0,0	1,50±0,03
SHtrn3G+Agave	7/3	Nt	Nt
SHtrn3G+Agave	7/4	4,20±0,3	2,00±0,0
SHtrn3G+Agave	7/7	4,20±0,25	1,50±0,01
<u><i>blb 2G+cv.Delikat</i></u>			
SHblb2G+Delikat	2281/10	1,80±0,20	1,00±0,0
SHblb2G+Delikat	2283/5	2,40±0,0	1,25±0,12
SHblb2G+Delikat	2292/4	1,60±0,0	1,00±0,0
SHblb2G+Delikat	2295/1	1,40±0,12	1,00±0,0
<u><i>pnt 2G+cv.Delikat</i></u>			
SHpnt2G+Delikat	2196/4	4,00±0,14	3,00±0,0
SHpnt2G+Delikat	2199/6	4,60±0,10	2,50±0,10
SHpnt2G+Delikat	2197/6	Nt	Nt
SHpnt2G+Delikat	2204/3	4,0±0,05	2,25±0,03
SHpnt2G+Delikat	2235/1	5,4±0,02	2,75±0,02
<u><i>pnt 2G+cv.Atlantic</i></u>			
SHpnt2G+Atlantic	257/2	Nt	Nt
SHpnt2G+Atlantic	245/6	4,80±0,0	2,50±0,07
SHpnt2G+Atlantic	248/1	4,00±0,12	2,25±0,06
SHpnt2G+Atlantic	254/1	Nt	Nt
SHpnt2G+Atlantic	257/1	Nt	Nt

Chú thích: SH: con lai soma; *: giá trị trung bình của kích thước vết hoại tử trên lá với 5 lần lặp lại, trong đó 1 có nghĩa là kháng; 9 là nhiễm; SD là sự sai khác giữa 5 lần lặp lại; **: giá trị trung bình của sự phát triển bào tử nấm, trong đó 1 là không có hoặc rất ít bào tử nấm; 2 là bào tử nấm phát triển trung bình (10-30%); 3 là bào tử nấm phát triển mạnh. Nt là không đánh giá.

Kết quả đánh giá bằng lây nhiễm nhân tạo cho thấy các dòng khoai tây đại sử dụng để dung hợp *S.bulbocastanum*; *S. tarnii* và *S. pinnatisectum* đều có đặc tính kháng tốt với bệnh mốc sương (điểm đánh giá vết hoại tử nằm trong khoảng từ 1,0-1,8), trong khi các giống khoai tây trồng Delikat, Agave, Atlantic, Quarta, Rasant có tính kháng bệnh mốc sương khá thấp (điểm đánh giá vết hoại tử nằm trong khoảng từ 3,6-4,6). Các tổ hợp lai soma giữa *S. tarnii*; *S. pinnatisectum* với các giống khoai tây trồng Delikat, Atlantic, Rasant và Agave hầu như không làm thay đổi khả năng kháng bệnh mốc sương. Chỉ có tổ hợp lai giữa loài đại *S. bulbocastanum* với giống khoai tây trồng Delikat có tính kháng rất cao với bệnh mốc sương. Điều này chứng tỏ dòng đại *S.bulbocastanum* có khả năng chuyển đặc tính kháng bệnh mốc sương của nó cho các giống khoai tây trồng thông qua dung hợp.

3.2. Khả năng kháng bệnh mốc sương của con lai soma qua lây nhiễm nhân tạo trên lát cắt củ

Bệnh mốc sương do nấm *Phytophthora infestans* gây hại trên cả lá, thân và củ của cây khoai tây. Bệnh mốc sương trên lá và trên củ có biểu hiện và mức độ gây hại khác nhau mặc dù được gây ra cùng một loại chủng bệnh (Hammann et al., 2009). Chính vì vậy, để đánh giá một cách toàn diện về tính kháng/nhiễm của các con lai soma chúng tôi cũng đánh giá thông qua lây bệnh nhân tạo trên các lát cắt củ.

Kết quả cho thấy 4 con lai soma 2281/10, 2283/5, 2292/4, 2295/1 của tổ hợp lai *S. bulbocastanum* và Delikat có khả năng kháng bệnh rất cao (extremely resistance), điểm đánh

giá là $1,00 \pm 0,00$, hầu như không xuất hiện triệu chứng bệnh. Các con lai soma 2195/2; 2196/4; 2235/1 của tổ hợp lai *S. pinnatisectum* và Delikat cũng có khả năng kháng bệnh cao, điểm đánh giá là $1,6 \pm 0,3$; $1,8 \pm 0,2$; $1,8 \pm 0,5$. Như vậy có thể phối hợp các kết quả thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo trên lá đơn tách rời và trên lát cắt củ để chọn lọc các con lai soma có khả năng kháng bệnh mốc sương cao (Bảng 3).

3.3. Khả năng kháng bệnh mốc sương của con lai soma qua lây nhiễm nhân tạo trên đồng ruộng

Các vật liệu sẽ tiếp tục được đánh giá khả năng kháng bệnh mốc sương trên đồng ruộng, sử dụng dung dịch lây nhiễm với nồng độ 20.000 túi bào tử/ml. Thí nghiệm lây nhiễm được tiến hành vào chiều tối mát, duy trì nhiệt độ khoảng $18-25^{\circ}\text{C}$, ẩm độ khoảng 70-80%. Triệu chứng bệnh sẽ bắt đầu xuất hiện khoảng 1 tuần sau lây nhiễm. Tiến hành đo đếm mỗi tuần 1 lần trong suốt quá trình diễn biến của bệnh (7 lần). Kết quả được tính theo diện tích dưới đường diễn biến bệnh (bảng 3). Giá trị $(\Delta)rAUDPC > 0$ cho thấy giống rất mẫn cảm với bệnh, $(\Delta)rAUDPC < 0$ nghĩa là giống có khả năng kháng cao với bệnh trong đó giá trị tuyệt đối của $(\Delta)rAUDPC$ càng nhỏ thì khả năng kháng bệnh càng cao. Kết quả được thể hiện trên bảng 4.

Kết quả bảng 4 cho thấy giống khoai tây trồng Delikat rất mẫn cảm với bệnh trong khi các con lai soma của dòng giống này với dòng đại *S. bulbocastanum* có khả năng kháng bệnh cao. Thông qua đánh giá về sự thành thực trên đồng ruộng cũng cho thấy có sự tương quan giữa tính kháng bệnh mốc sương với sự thành thực của các kiểu gen khác nhau. Các kiểu gen có

Bảng 3. Các con lai soma có khả năng kháng bệnh mốc sương cao sau khi lây nhiễm nhân tạo trên cả lá đơn và lát cắt củ

Kiểu gen	Đánh giá biểu hiện bệnh	
	Lá (Mean $\pm$ SD)	Củ (Mean $\pm$ SD)
Blb2G+Delikat (2295/1)	2,00 $\pm$ 0,0	1,00 $\pm$ 0,0
Blb2G+Delikat (2281/10)	1,80 $\pm$ 0,2	1,00 $\pm$ 0,0
Blb2G+Delikat (2283/5)	2,00 $\pm$ 0,0	1,00 $\pm$ 0,0
Blb2G+Delikat (2292/4)	2,20 $\pm$ 0,2	1,00 $\pm$ 0,0

Bảng 4. Kết quả đánh giá các con lai soma và các dòng bố mẹ về khả năng kháng bệnh mốc sương trên đồng ruộng và đánh giá sự thành thực của cây

Tình trạng cây/tổ hợp lai	Tình trạng cây/ ký hiệu	Kết quả đánh giá tính kháng bệnh mốc sương trên lá đơn (leaflet assay)	Kết quả đánh giá tính kháng mốc sương trên đồng ruộng (Field test) (Δ RAUDPC)	Sự thành thực của cây (1- Chín sớm; 9- Chín muộn)
Cultivar	Delikat	5,0 ⁽¹⁾ S	0,311 ⁽²⁾	4,8
Wild species	<i>S. bulbocastanum</i>	1,0 R	-	-
Blb + Delikat	SH 2282/4	1,0 R	-0,352	6,0
	SH 2283/5	1,4 R	-0,248	6,5
	SH 2283/9	1,8 R	-0,324	6,0
	SH 2292/4	1,0 R	-0,030	7,4

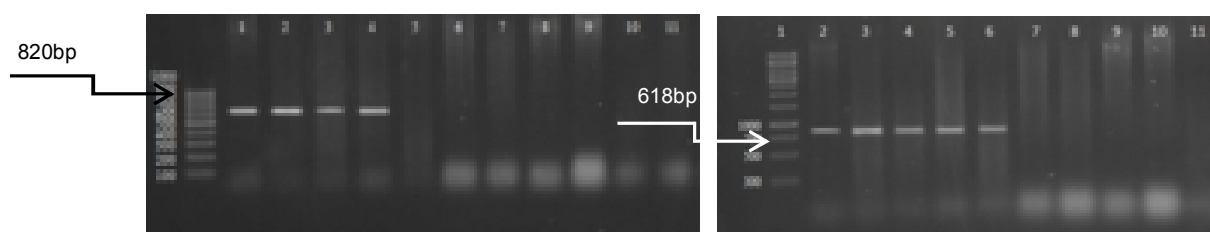
tính kháng bệnh cao thì thường chín muộn và ngược lại. Có nhiều khả năng liên quan đến sự liên kết hay tương tác giữa các gen dẫn đến kết quả trên. Bảng 4 cho thấy con lai SH 2292/4 có độ chín muộn trong khi các con lai khác có độ chín trung bình. Như vậy có sự tương quan chặt chẽ giữa tính kháng bệnh mốc sương và độ chín của cây. Điều này nói lên rằng diễn biến của bệnh trên đồng ruộng khá phức tạp, chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố tự nhiên, do nhiều gen kiểm soát và được cho là tính kháng có ý nghĩa quan trọng nhất (tính kháng về số lượng-Quantitative resistance)

3.4. Đánh giá sự có mặt của gen kháng mốc sương ở các con lai soma bằng chỉ thị phân tử

Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành đánh giá các con lai soma 2281/10, 2283/5, 2292/4, 2295/1 của tổ hợp lai *S. bulbocastanum* và Delikat để kiểm tra sự có mặt của gen kháng

R_{pi-blb1} với cặp mỗi Blb1 nhân đoạn DNA có kích thước 820bp liên kết chặt với gen *R_{pi-blb1}* và gen kháng *R_{pi-blb3}* với cặp mỗi đặc hiệu Blb3 nhân đoạn DNA có kích thước 618bp (Wang et al. 2008). Kết quả phân tích cho thấy gen kháng *R_{pi-blb1}* và *R_{pi-blb3}* chỉ có mặt ở loài khoai tây dại *S. bulbocastanum* và các con lai soma của tổ hợp lai *S. bulbocastanum* và Delikat, được phát hiện lần lượt bởi các cặp mỗi tương ứng là Blb1 và Blb3 (Hình 1).

Kết quả trên hoàn toàn phù hợp với kết quả thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo. Các con lai soma của tổ hợp lai *S. bulbocastanum* và Delikat cho kết quả kháng cao sau lây nhiễm nhân tạo và đều mang gen kháng *R_{pi-blb1}* và *R_{pi-blb3}*. Như vậy phương pháp dung hợp tế bào trần hoàn toàn có thể sử dụng để chuyển tính kháng bệnh mốc sương từ dòng khoai tây dại *S. bulbocastanum* vào các con lai soma.



Hình 1. Kết quả xác định sự có mặt của gen kháng mốc sương bằng chỉ thị phân tử

Ghi chú: 1-A: Gen kháng *R_{pi-blb1}* với cặp mỗi Blb1 nhân đoạn DNA có kích thước 820bp. 1-B: gen *R_{pi-blb3}* với cặp mỗi Blb3 nhân đoạn DNA có kích thước khoảng 618bp. 1- Ladder, 2- *S. bulbocastanum*, 3- SH 2281/10, 4-SH 2283/5, 5- SH 2292/4, 6- SH 2295/1, 7- Delikat, 8-Pnt 2G, 9- Trn 3G, 10- Cph, 11- 1031,12- 1032.

Hiện tượng, một số dòng khoai tây đại mang tính kháng mốc sương sử dụng trong dung hợp tế bào trần như *S. tarnii*, *S. pinatisectum* không chuyển được tính kháng bệnh cho con lai soma là vấn đề cần được tiếp tục nghiên cứu tìm hiểu.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã khẳng định có thể sử dụng phương pháp dung hợp tế bào trần để chuyển đặc tính kháng bệnh mốc sương từ khoai tây đại vào khoai tây trồng. Khả năng chuyển phụ thuộc rất nhiều vào dòng khoai tây đại tham gia vào dung hợp tế bào trần. Trong 3 dòng khoai tây đại mang tính kháng bệnh nghiên cứu (*S. bulbocastanum*, *S. pinatisectum*, *S. tarnii*) chỉ có dòng *S. bulbocastanum* thể hiện khả năng chuyển tính kháng bệnh cho con lai soma.

Có thể đánh giá tính kháng bệnh mốc sương thông qua phương pháp lây nhiễm nhân tạo trên lá đơn tách rời và trên lát cắt củ. Kết quả đánh giá này cũng tương ứng với kết quả đánh giá bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo trên đồng ruộng. Kết quả đánh giá trên đồng ruộng cho thấy có sự tương quan chặt chẽ giữa tính kháng bệnh mốc sương khoai tây với độ chín của cây (kháng cao-chín muộn) hay nói cách khác các giống dài ngày hơn có tính kháng mốc sương cao hơn.

Đã nhận thấy loài khoai tây đại *S. bulbocastanum* và các con lai soma của tổ hợp lai *S. bulbocastanum* và Delikat có mang gen kháng $R_{pi-blb1}$ và $R_{pi-blb3}$ được phát hiện lần lượt qua kỹ thuật PCR bởi các cặp môi đặc hiệu tương ứng là Blb1 và Blb3. Kết quả này đã chứng minh khả năng chuyển các gen kháng từ dòng đại vào khoai tây trồng. Các kết quả phân tích bằng chỉ thị phân tử (đánh giá kiểu gen) cũng hoàn toàn phù hợp với kết quả đánh giá bằng lây nhiễm nhân tạo và lây nhiễm trên đồng ruộng.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn tới Ban Chủ nhiệm Chương trình Công nghệ sinh học

Nông nghiệp và Thủy sản - Bộ NN và PTNT đã hỗ trợ nguồn kinh phí; Dr. Ramona Thieme, Dr. Thilo Hammann (Viện Nghiên cứu chọn tạo giống cây trồng - CHLB Đức) đã phối hợp và giúp đỡ chúng tôi trong quá trình thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bernd Truberg, Thilo Hammann, Ulrich Darsow, Hans-Peter Piepho (2008). Empirical comparison of different methods for correcting late blight (*Phytophthora infestans* [Mont.] de Bary) data for maturity in selection experiments of potato (*Solanum tuberosum* subsp. *Tuberosum*). Journal for Plant Culture, 61(3): 77-81.
- Darsow U (2008): Pre-breeding for Quantitative resistance of potato to late blight. Institute of Agriculture Crops in Gross Luesewitz in the department research in BMELV.
- Hammann T, Truberg B, Thieme R (2009). Improving Resistance to Late Blight (*Phytophthora infestans* [Mont.] de Bary) by using Interspecific Crosses in Potato (*Solanum tuberosum* ssp.). Proc 3rd Symp on Plant Protection and Plant Health in Europe, Berlin, pp. 428-436.
- Hoàng Thị Giang, Đỗ Thị Thu Hà, Vũ Thị Hằng, Nguyễn Thị Thủy, Nguyễn Quang Thạch, Ramona Thieme, Thilo Hammann (2013). Nghiên cứu tạo, đánh giá con lai soma khác loài giữa các giống khoai tây trồng *Solanum bulbocastanum* ($2n=4x=48$) và các dòng khoai tây đại *Solanum bulbocastanum*, *Solanum tarnii*, *Solanum pinatisectum* ($2n=2x=24$) mang khả năng kháng bệnh mốc sương bằng dung hợp tế bào trần. Tạp chí NN&PTNT, 22: 3-10
- Leontine Colon, Bent Nielsen and Ulrich Darsow (2004). Eucablight protocol Detached leaflet assay for foliage blight resistance.
- Lokossou AA, Park TH, van Arkel G, Arens GM, Ruyter-Spire C, Morales J, Whisson SG, Birch PRJ, Visser RGF, Jacobsen E, van der Vossen EAG (2009). Exploiting knowledge of *R/aAvr* genes to rapidly clone a new LZ-NBS-LRR family of late blight resistance genes from potato linkage group IV. Mol Plant Microbe Interact, 22: 630-641
- Lokossou AA, Rietman H, Wang M, Krensek P, van der Schoot H, Henken B, Hoekstra R, Vlesshouwers VGAA, van der Vossen EAG, Visser RGF, Jacobsen E and Vosman B (2010). Diversity, distribution, and evolution of *Solanum bulbocastanum* late blight resistance genes. Mol Plant-Microbe Interaction, 23: 1206-1216.

- Mattheij WM, Puite KJ (1992). Tetraploid potato hybrids through protoplast fusion and analysis of their performance in the field. *Theor Appl. Genet*, 83: 807-812.
- Szczerbakowa A, Boltowicz D, Lebecka R, Radomski P, Wielgat B (2005). Characteristics of the interspecific somatic hybrids *Solanum pinnatisectum* (+) *S. tuberosum* H-8105. *Acta Physiol Plant*, 3a(27): 265-273.
- Song JQ, Brandeen JM, Naess SK, Raasch JA, Wielgus Sm, Haberland GT, Liu J, Kuang HH, Austin-Phillips S, Buell CR, Helgeson JP, Jiang JM (2003). Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc Natl AcadSci USA* 100: 9128-9133
- Thach N Q, Frei U, Wenzel G (1993). Somatic fusion for combining virus resistance in *Solanum tuberosum* L. *Theor Appl. Genet*, 85: 863-867
- Thieme R, Darsow U, Gavrilenko T, Dorokhov D, Tiemann H (1997) Production of somatic hybrids between *S.tuberosum* L. and late blight resistant Mexican wild potato species. *Euphytica*, 97: 189-200.
- Thieme R, Thomas T, Heimbach U and Gavrilenko T (2000) Incorporation and testing of new genetic sources for virus resistance in potato. *Global Res Dev*, 271-278.
- Thieme T, Rakosy-Tican E, Gavrilenko T, Antonova O, Schubert J, Nachtigall M, Heimbach U (2008). Novel somatic hybrids (*Solanum tuberosum* L. + *S. tataricum*) and their fertile BC₁ progenies express extremely resistance to potato virus Y and late blight. *Theor Appl Genet*, 116: 691-700.
- Thieme R, Rakosy E, Nachtigall M, Schubert J, Hammann T, Antonova O, Gavrilenko T, Heimbach U, Thieme T (2010). Characterization of the multiple resistance traits of somatic hybrids between *Solanum cardiophyllum* Lindl. and two commercial potato cultivars. *Plant Cell Rep*, 29: 1187-1201.
- Oosumi T, Rockhold DR, Maccree MM (2009). Gene *Rpi-bt1* from *Solanum bulbocastanum* confers resistance to late blight in transgenic potatoes. *Am.J.Pot Res*, 86: 456-465.
- van der Vossen EA, Sikkema A, Hekkert BL, Gros J, Stevents P, Musken M, Wouters D, Pereira A, Stiekema W, and Allefs S (2003). An ancient *R* gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant Journal*, 36: 867-882
- van der Vossen EA, Gros J, Sikkema A, Musken M, Wouters D, Pereira A, and Allefs S (2005). The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an Mi-1 gene Homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. *Plant Journal*, 44: 208-222.
- Wang M, Allefs S, van den Berg RG, Vleeshouwers VG, van der Vossen EA, Vosman B (2008). Allele mining in *Solanum*: conserved homologues of *Rpi-blb1* are identified in *Solanum stoloniferum*. *Theor Appl Genet*, 116(7): 933-943.