

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÀ SỰ CÓ MẶT GEN KHÁNG VIRUS XOĂN VÀNG LÁ Ở CÀ CHUA

Đoàn Xuân Cảnh^{1*}, Tống Văn Hải, Nguyễn Hồng Minh², Đoàn Thị Thanh Thúy¹

¹*Viện Cây lương thực Cây thực phẩm*

²*Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

Email^{}: canh-rq@yahoo.com*

Ngày gửi bài: 15.08.2014

Ngày chấp nhận: 22.01.2015

TÓM TẮT

Cà chua là một loại rau quan trọng và phổ biến trên thế giới cũng như Việt Nam. Để chọn tạo giống lai (F1) cho năng suất cao, chất lượng tốt bên cạnh các đánh giá về kiểu hình cần nắm được thông tin về quan hệ di truyền giữa các giống cà chua. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng 10 chỉ thị phân tử ADN để đánh giá đa dạng di truyền của 26 mẫu giống cà chua, kết quả thu được 5 chỉ thị cho đa hình. Từ kết quả chạy điện di sản phẩm PCR của 5 chỉ thị cho đa hình, bằng phần mềm NTSYSpc 2.1, chúng tôi đã phân 26 mẫu giống cà chua thành 5 nhóm với hệ số tương đồng 0,7. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra các mẫu giống có độ sai khác di truyền khá cao, chúng có ý nghĩa quan trọng trong tạo giống cà chua lai mới. Bệnh xoắn vàng lá cà chua (XVL) do phức hợp nhiều virus thuộc chi *Begomovirus*, họ *Geminiviridae* gây ra, là một trong những bệnh hại nguy hiểm nhất đối với cây cà chua ở Việt Nam. Hiện tại chưa có loại thuốc bảo vệ thực vật nào phòng chống được bệnh này, hướng duy nhất là sử dụng gen kháng. Trong nghiên cứu này, chỉ thị phân tử ADN được sử dụng để phát hiện gen kháng Ty1, Ty2 và Ty3. Trong tổng số 26 mẫu giống đã phát hiện được 4 dòng cà chua chứa gen Ty1, không có dòng nào chứa gen Ty2 và Ty3.

Từ khóa: Cà chua, chỉ thị ADN, đa dạng di truyền, virus xoắn vàng lá cà chua.

Assessing Genetic Diversity Tomato and Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) Resistance Gene of Tomato Varieties by DNA Markers

ABSTRACT

Tomato is a popularly important vegetable in the world and Vietnam. Assessing genetic diversity and detection of genes for disease resistance of the existing germplasm of tomato are useful for development of new varieties with high yield, good quality and disease resistance. In this study, 10 SSR markers and four markers related to TYLCV resistance genes (*Ty1*, *Ty2* and *Ty3*) were used to analyse genetic diversity and identify the TYLCV genes, respectively, of 26 of tomatoes accessions available at food crops research institute. The results showed, that only 5 marker showed polymorphism. 26 accessions were grouped into 5 clusters with similarity coefficients threshold of 0.7 by using NTSYSpc 2.1 software. The information found in this study is very important for new tomato hybrid breeding programs. Only four of 26 accessions carried *Ty1* and the genes *Ty2* and *Ty3* were not detected

Keywords: DNA markers, genetic diversity, tomato yellow leaf curl virus, tomato.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cà chua là một loại rau quan trọng và phổ biến trên thế giới được dùng để xào nấu, ăn tươi và trong các bữa ăn hoặc chế biến thành nhiều

loại thực phẩm khác. Tuy nhiên, qua quá trình chọn giống lâu dài, phổ di truyền của các giống cà chua đang ngày càng bị thu hẹp, gây trở ngại cho công tác chọn tạo giống cà chua mới nói chung và chọn tạo giống cà chua lai kháng bệnh

virus XVL. Vì thế, việc xác định được các vật liệu mang gen kháng bệnh XVL và hiểu biết mối quan hệ di truyền giữa các giống cà chua, làm cơ sở cho tạo giống lai F1 năng suất cao, kháng bệnh là vô cùng cần thiết.

Trong chọn tạo giống ưu thế lai, sử dụng các bố mẹ có khoảng cách di truyền xa nhau sẽ cho ưu thế lai cao. Tuy nhiên, dựa vào các đặc điểm nông sinh học thì khó có thể kết luận được mối quan hệ di truyền của nguồn vật liệu vì các tính trạng nông sinh học phụ thuộc rất nhiều vào yếu tố môi trường. Trong những năm gần đây, các nhà khoa học đã sử dụng các loại chỉ thị phân tử khác nhau như: RFLP, ISSR, RAPD, SSR và AFLP để phân tích mối quan hệ di truyền giữa các giống cà chua ở mức độ ADN, đặc biệt là chỉ thị SSR (Simple Sequence Repeat), chỉ thị dùng để nhân những đoạn ADN lặp trong genome để tìm sự đa hình. Các nhà khoa học đã áp dụng chỉ thị này trong phân tích đa hình giữa các loại cây trồng với nhau, từ đó tìm ra sự khác biệt giữa chúng. So với chỉ thị RAPD và các chỉ thị khác, chỉ thị SSR có độ chính xác cao. Các tác giả Parmar và cộng sự (2010), Meng và cộng sự (2010) đã sử dụng các chỉ thị SSR để nghiên cứu đa dạng di truyền của các giống cà chua. Kết quả cho thấy tất cả các chỉ thị đều cho đa hình cao, từ đó phân biệt được mối quan hệ di truyền giữa các mẫu giống làm cơ sở cho công tác chọn tạo giống cũng như bảo tồn nguồn gen cà chua. Song song với việc nghiên cứu đa dạng di truyền các mẫu giống cà chua, chỉ thị phân tử ADN cũng được sử dụng để phát hiện gen kháng bệnh XVL là *Ty1*, *Ty2* và *Ty3*. Bệnh này do phức hợp nhiều virus thuộc chi *Begomovirus*, họ *Geminiviridae* gây ra, là một trong những bệnh hại nguy hiểm nhất đối với cây cà chua ở Việt Nam. Hiện tại, chưa có loại thuốc BVTV nào phòng chống được bệnh này, hướng duy nhất là sử dụng gen kháng. Các gen kháng *Ty1*, *Ty2* và *Ty3* là các gen kháng tốt đối với nhiều loài virus gây bệnh ở đồng Nam Á. Mặt khác, đây đều là các gen trội nên hoàn toàn có thể sử dụng trong chọn tạo giống cà chua lai.

Trong thời gian qua, Viện cây lương thực và cây thực phẩm đã chọn lọc và lưu giữ 26 mẫu giống cà chua mang nhiều tính trạng quý. Để phục vụ cho công tác chọn tạo giống cà chua lai

có năng suất cao, chất lượng tốt và kháng bệnh virus XVL, việc nghiên cứu mức độ sai khác di truyền giữa các mẫu giống và phát hiện gen kháng virus xoắn vàng lá là việc làm hết sức cần thiết.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- 26 dòng cà chua thuần của Viện cây lương thực và cây thực phẩm được ký hiệu từ dòng D1 đến dòng D26.
- 10 cặp mỗi SSR (Bảng 2) sử dụng trong nghiên cứu quan hệ di truyền giữa các giống.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Kiểm tra có mặt gen kháng *Ty1*, *Ty2* và *Ty3* ở 26 dòng cà chua

* Chiết tách ADN: ADN được chiết tách từ lá non của cây con 30 ngày tuổi bằng phương pháp CTAB được mô tả bởi Doyle (1990) có cải tiến: lấy 0,1g lá non ở cây khô, nghiền nhỏ bằng dụng cụ chuyên dụng, sau đó thêm 800µl đệm chiết tách bao gồm (NaCl 1,5M, EDTA 50mM, Tris-HCl 100mM, CTAB 2%, β mercaptoethanol 1%), tiếp tục nghiền và đảo đều cho đến khi dịch chuyển sang màu xanh đậm. Chuyển dung dịch trên vào ống Eppendorf 1,5ml vô trùng, ủ ở nhiệt độ 65°C trong 30 phút. Dung dịch sau khi ủ chuyển ra ngoài lưu giữ ở nhiệt độ bình thường trong 5 phút, sau đó bổ sung thêm 800µl hỗn hợp Chloroform: Isoamylalcol theo tỷ lệ (24:1), lắc nhẹ 10 phút, tiếp tục ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút. Sau ly tâm, dịch mẫu tạo thành 3 lớp, chuyển phần dịch ở lớp trên cùng sang ống Eppendorf mới. Thêm 800µl Isopropanol và tiếp tục lắc đều rồi đặt ở -20°C trong 30 phút, sau đó ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút, thu kết tủa ADN dưới đáy ống. Rửa kết tủa bằng Ethanol 70%, để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng. Hòa tan kết tủa ADN bằng 50µl dung dịch TE bao gồm (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) rồi bảo quản ở -20°C. Kiểm tra ADN bằng điện di trên gel agarose 1,0%.

* Mỗi phát hiện gen kháng *Ty1*, *Ty2*, *Ty3* (Bảng 2).

Bảng 1. Nguồn gốc 26 dòng cà chua được chọn lọc năm 2011 tại Viện cây lương thực và cây thực phẩm, huyện Gia Lộc, Hải Dương

TT	Ký hiệu tên dòng	Nguồn gốc	
		Tên mẫu dòng	Nguồn nhập
1	D1	VC/XH-232-14	Viện CLT-TP
2	D2	PT4719A	AVRDC
3	D3	CLN1351C	AVRDC
4	D4	VC/XH-252-17	Viện CLT-TP
5	D5	VC/XH-218-09	Viện CLT-TP
6	D6	VC/XH- 126-05	Viện CLT-TP
7	D7	CLN2396-94-16-11-23	AVRDC
8	D8	Mỹ chọn lọc 1	Viện CLT-TP
9	D9	Lan Đá Hải Phòng	Địa phương
10	D10	CLN3241F-31-8-16-20	AVRDC
11	D11	VC/06-2250-5	Viện CLT-TP
12	D12	CLN2443DC2B-7-23-2-7-10	AVRDC
13	D13	VC/06-2250-6	Viện CLT-TP
14	D14	CLN2131-1-16-17-5	AVRDC
15	D15	CLN3241F-31-25-13-2	AVRDC
16	D16	CLN2418F	AVRDC
17	D17	VC/06-2530-4	Viện CLT-TP
18	D18	CLN2413-L 12	AVRDC
19	D19	CLN2237B	AVRDC
20	D20	CLN2413A	AVRDC
21	D21	VC/XH.218-09	Viện CLT-TP
22	D22	CL 5915-93 D4-1-0-C-1	AVRDC
23	D23	VC/XH.122-15	Viện CLT-TP
24	D24	VC/VX.282-35	Viện CLT-TP
25	D25	VC/VX.157-33	Viện CLT-TP
26	D26	CLN 6046 BC 3F2 -20-5-15	AVRDC

Ghi chú: AVRDC: Asian Vegetable Research and Development Center
CLT - TP: Cây lương thực- thực phẩm

Bảng 3. Mỗi sử dụng để nhân ADN các chỉ thị liên kết với các gen kháng gen xoắn vàng lá

STT	Tên mẫu	Trình tự mẫu	Phát hiện gen	Tham khảo
1	JB1	F: 5'- aac cat tat ccg gtt cac tc - 3'	Ty1	Castro và cộng sự, 2007)
		R: 5'- tt tcca ttc ctt gtt tct ctg - 3'		
2	TG97	F: 5'- taa tcc gtc gtt acc tct cct t -3'	Ty1	Han và cộng sự, 2012
		R: 5'- cgg atg act tca ata gca atg a -3'		
3	T0302	F: 5'- tgg ctc atc ctg aag ctg ata gcg c - 3'	Ty2	Garcia và cộng sự, 2007
		R: 5'- tga t(t/g)t gat gtt ctc (t/a)tc tct (c/a)gc ctg - 3'		
4	P6-25	F: 5'- ggt agt gga aat gat gct gct c - 3'	Ty3	Ji và cộng sự, 2007
		R: 5'- gct ctg cct att gtc cca tat ata acc - 3'		

Bảng 2. Các mối SSR sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên mối	Trình tự mối	Ta (°C)	Tham khảo
1	SSR-304	F: 5'-tcc tcc ggt tgt tac tcc ac R: 5'-tta gca ctt cca cog att cc	49	Parmar và cộng sự, 2010
2	SSR-108	F: 5'-tgt gtt gga tgt ttg gca ct R: 5'-gcc att gaa act tgc aga ga	48,5	
3	Tom 49-50	F: 5'-aag aaa ctt ttt gaa tgt tgc R: 5'-att aca att tag aga gtc aag g	43	Meng và cộng sự, 2010
4	Tom 8-9 A	F: 5'-gca ttg att gaa ctt cat tct cgt cc R: 5'-att ttt gtc cac caa cta acc g	49	
5	Tom 322-323	F: 5'-ggt gaa aag agc aaa ata gt R: 5'-ttt gta atc cat gtc tat aa	38	
6	Tom 41-42	F: 5'-gaa atc tgt tga agc cct ctc R: 5'-gac tgt gat agt aag aat gag	48	
7	Tom 61-62	F: 5'-ggc aaa gaa gga ccc aga gc R: 5'-ggt gcc taa aaa agt taa at	48	
8	Tom 69-70	F: 5'-cgg act ccc aga ccc tca t R: 5'-acc aat gat act act acc aca ac	48	
9	Tom 202-203	F: 5'-tggtcaccttcaactttatatac R: 5'-aaa tga taa tga aat gga gtg a	45	
10	Tom 300-301	F: 5'-tgc tt att ttg gag gta R: 5'-atc aca aat tca aat cac	45	

* Phản ứng PCR:

Thành phần mỗi phản ứng 25µl gồm: 5µl PCR buffer 5X, 3µl MgCl₂ (25mM), 0,2µl dNTPs (10mM), 1,25µl mỗi xuiôi (10iM), 1,25µl mỗi ngược (10iM), 0,1µl KAPATaq HotStart ADN Polymerase (5 U/ìl), 1µl ADN mẫu, thêm nước cất đến 25µl.

Chu kỳ nhiệt: biến tính ban đầu ở 94°C/5 phút. Thời gian các bước sau tùy mỗi gen: Gen Ty1 với chỉ thị JB1 và TG97 chạy 20 chu kỳ đầu ở 94°C/10 giây, 55°C/30 giây, 72°C/70 giây; 10 chu kỳ sau ở 94°C/10 giây, 53°C/30 giây 72°C/70 giây. Các gen Ty2, Ty3 chạy 35 chu kỳ gồm 94°C/30 giây, 53°C/1 phút, 72°C/1 phút. Kết thúc phản ứng bằng bước kéo dài ở 72°C /5 phút và giữ ở 4°C. Riêng gen Ty1, 10µl sản phẩm PCR được ủ qua đêm ở 65°C với 5 đơn vị enzyme TaqI để phân biệt các alen kháng khác nhau (đồng hợp và dị hợp).

* Điện di: Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% trong đệm TAE 1 X, sau đó

nhuộm với Ethidium bromide và phát quang trong buồng UV.

2.2.2. Phân tích đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử

* Chiết tách ADN: Chiết tách ADN như phần 2.2.1.

* Phản ứng PCR: 10 cặp mỗi SSR có trình tự trình bày ở bảng 2. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR Eppendorf với thể tích phản ứng 25µl, trong đó ADN tổng số 1µl (100ng ADN), primer 2µl (10pM) mỗi loại, dNTP (10mM) 0,4µl, Taq polymerase (5 Unit) 0,1µl. Đệm PCR 2,0µl, nước cất vô trùng cho đến 25µl.

Chu kỳ nhiệt: 94°C trong 5 phút, tiếp tục 35 chu kỳ (94°C trong 30 giây, 38–49°C trong 1 phút (tùy theo cặp mối, xem bảng 3), 72°C trong 2 phút), cuối cùng 72°C trong 10 phút.

* Điện di và cho điểm: 15µl sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2,0%, hiệu điện thế 60V trong 1,5–2 giờ trong dung dịch đệm

TAE bao gồm (Tris-HCl, Axit acetic và EDTA). Sau đó gel được nhuộm trong Ethidium Bromide 1,0% trong 15 phút rồi soi dưới đèn UV và chụp ảnh. Các băng trên gel được xác định bằng cách cho điểm (0) không có băng, (1) có băng theo cùng một kích thước.

* Xử lý số liệu: Sự vắng mặt hay có mặt của các vạch băng trên các mẫu giống được ghi lại trong một ma trận nhị phân tương ứng là 1 hoặc 0. Sự tương đồng về di truyền (S) giữa các mẫu giống được tính toán bằng cách sử dụng hệ số tương đồng được mô tả bởi Nei và Li (1973). Các dữ liệu này được sử dụng để xây dựng một cây phả hệ bằng phương pháp phân nhóm UPGMA thông qua phần mềm NTSYS-pc 2.1 (Rohlf, 2000).

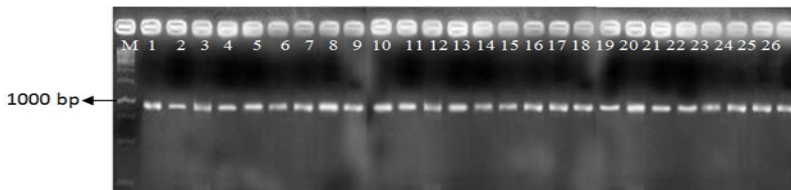
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phát hiện gen kháng bệnh virus (XVL) ở 26 dòng cà chua

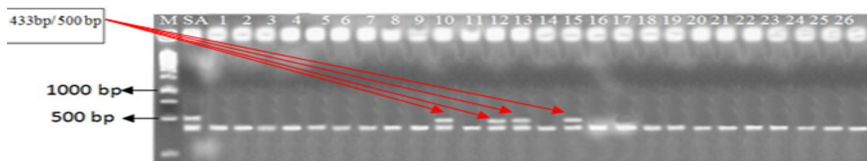
3.1.1. Phát hiện gen Ty1

Castro và cộng sự (2007) đã xác định được chỉ thị JB-1 liên kết chặt với gen Ty1. Cũng theo tác giả, các cây đồng hợp tử alen Ty1/Ty1 có khả năng kháng cao và không biểu hiện triệu

chứng bệnh đối với các loài virus gây bệnh xoắn vàng lá cà chua. Theo Garcia và Maxwell (2011), sản phẩm PCR thu được với marker JB-1 hình 3.1a có kích thước 930bp, với kích thước này không thể phân biệt cây chứa gen đồng hợp trội, đồng hợp lặn. Để phân biệt sản phẩm PCR được cắt bởi enzyme TaqI. Sau phản ứng các mẫu giống mang kiểu gen ty1/ty1 (đồng hợp lặn) cho một vạch băng kép khoảng 437bp và một băng quá nhỏ khoảng 35bp cho nên khi điện di bằng agar 2% chỉ thấy 1 vạch khoảng 437bp. Các mẫu giống có gen kháng Ty1/Ty1 (đồng hợp trội) hoặc Ty1/ty1 (dị hợp tử) cho hai vệt băng khoảng 433bp và 500bp. Nguyên nhân của sự sai khác này là do alen từ *S. lycopersicum* có 2 vị trí cắt của TaqI, trong khi alen kháng từ *S. chilense* chỉ có một (Hình 3.1b) (Garcia và Maxwell, 2011). Tiến hành phản ứng PCR với chỉ thị JB-1 trên 26 mẫu giống nghiên cứu, điện di sản phẩm PCR (Hình 1a) chúng tôi đã thu được vạch băng 930bp rõ nét ở tất cả các mẫu giống đúng như mô tả của Garcia và Maxwell (2011). Sau khi ủ sản phẩm PCR với TaqI thấy 4 mẫu giống có chứa gen là D10, D12, D13 và D15, vệt băng của 4 mẫu giống này cũng trùng với vệt băng của giống đối chứng SA (savior).

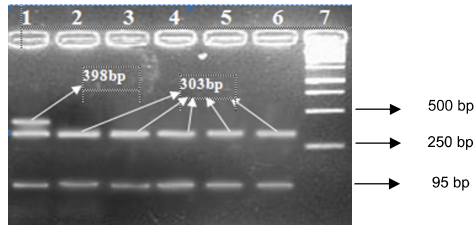


Hình 3.1a. Sản phẩm PCR phát hiện gen Ty1



Hình 3.1b. Cắt sản phẩm PCR gen Ty1 bằng enzym TaqI

Ghi chú: Các giống SA, 10, 12, 15 và 15 chứa gen Ty1, các giống còn lại không chứa gen



Hình 3.1c. Điện di phát hiện gen kháng Ty1 sử dụng chỉ thị TG97

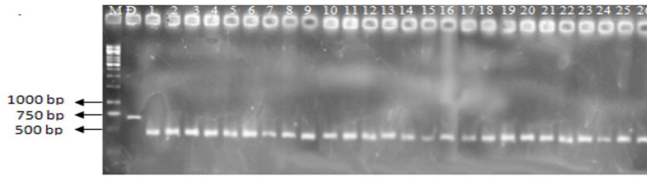
Ghi chú: Savior chứa gen Ty1/ty1 (dị hợp); 2. D10 chứa gen Ty1/Ty1 (đồng hợp trội), 3. D12 chứa gen Ty1/Ty1 (đồng hợp trội); 4. D13 chứa gen Ty1/Ty1 (đồng hợp trội); 5. D15 chứa gen Ty1/Ty1 (đồng hợp trội), 6. TR32 chứa gen Ty1/Ty1 (đồng hợp trội) đối chứng dương; 7. Leader

Như vậy để phát hiện gen Ty-1, Castro et al., (2007) đã phát triển chỉ thị CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) JB-1 liên kết chặt với gen này. Tuy nhiên, đây là một marker trội, không phân biệt được kiểu gen kháng đồng và dị hợp tử, chính vì vậy các vệt băng của các giống chứa gen đều trùng với giống Savior, mà Savior lại là giống lai F1 có kiểu gen kháng dạng dị hợp tử không sử dụng được trong chọn tạo giống cà chua lai. Mới đây, Han và 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. Sản phẩm PCR với cặp mồi TG97F/R là một đoạn ADN dài 398bp ở tất cả các mẫu giống. Sau khi cắt sản phẩm bằng enzyme TaqI, các mẫu giống mang gen Ty1 đồng hợp tử xuất hiện 2 vạch băng dài 303bp và 95bp, các mẫu giống mang gen Ty1 dị hợp tử xuất hiện 3 vạch băng dài 398, 303 và 95bp, các mẫu giống không có gen kháng không bị cắt nên chỉ có một vạch dài 398bp (Han et al., 2012). Để chứng minh các mẫu giống D10, D12, D13 và D15 chứa gen kháng Ty1 đồng hợp phục vụ cho công tác chọn tạo giống cà chua lai, chỉ thị TG97 tiếp tục để phát hiện gen Ty1. Kết quả cho thấy, cả 4 mẫu giống đều chứa 2 vệt băng 303 và 95bp tương ứng với chứa gen Ty1/Ty1 trùng với đối chứng chứa gen TR 32 (Hình 3.1c). Đối chứng Savior chứa gen dị hợp tử Ty1/ty1 xuất hiện 3 vệt băng có kích thước lần lượt là: 398, 303 và 95bp. Như vậy, 4 mẫu giống D10, D12, D13 và

D15 đều chứa gen Ty1 đồng hợp tử nên hoàn toàn có thể sử dụng trong chọn tạo giống cà chua lai.

3.1.2. Phát hiện gen Ty2

Gen Ty2 đã được lập bản đồ nằm trên NST số 11 liên kết với các chỉ thị RFLP TG393 và TG36 (Hanson et al., 2006). Hiện nay, có một số chỉ thị dựa trên PCR nhằm phát hiện vùng ADN chuyển vị từ loài *S. habrochaites* đã được phát triển. Chỉ thị CAPS TG105A có khả năng khuếch đại mạnh và cắt giới hạn sản phẩm PCR bằng enzyme TaqI đã tạo ra các vệt băng đa hình phân biệt *S. habrochaites* và *S. lycopersicum*. Một chỉ thị khác dựa trên PCR là T0302 cũng đã được xác định phát hiện locus Ty2 mà không cần phải dùng đến enzyme cắt giới hạn. Trong nghiên cứu này đã sử dụng chỉ thị T0302 để phát hiện gen Ty2/Ty2 (đồng hợp trội). Đối với gen Ty2, sản phẩm PCR với cặp mồi T0302F/R nhân chỉ thị T0302 nếu là Ty2/Ty2 (đồng hợp trội) thì nhân lên đoạn 600bp, nếu là ty2/ty2 (đồng hợp lặn) nhân lên đoạn 450, nếu là Ty2/ty2 (dị hợp) cho ba đoạn gồm 450, 600 và 700bp (Garcia et al., 2007). Kết quả PCR phát hiện gen Ty2 cho thấy tất cả các mẫu giống đều chỉ cho sản phẩm là một băng 450bp (Hình 3.2) tương ứng alen mất cảm ty2/ty2 (đồng hợp lặn). Như vậy, trong tổng số 26 mẫu giống nghiên cứu không phát hiện được dòng cà chua nào chứa gen Ty2.



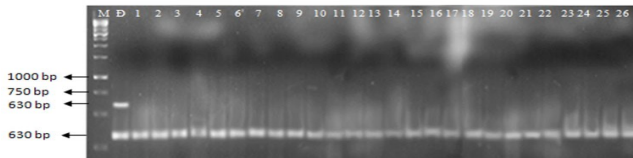
Hình 3.2. Sản phẩm PCR phát hiện gen Ty2

Ghi chú: Đ. Đối chứng chứa gen, 1-26 các giống cà chua nghiên cứu từ D1-D26 không chứa gen

3.1.3. Phát hiện gen Ty3

Gen Ty3 là gen trội nằm trên nhiễm sắc thể số 6 (Ji et al., 2007; Ji and Scott, 2007). Theo Ji et al. (2007), gen Ty3 định vị tại một vùng có chứa locus FER (25 cM, dòng vector BAC 56B23, AY678298). Cặp mồi P6-25 F/R được thiết kế để khuếch đại trình tự gần đầu 5' của dòng vector BAC 56B23, tạo ra sản phẩm là một băng 660bp đối với alen Ty3b và một băng 630bp với alen Ty3a, alen mất cảm ty3 cho một băng 320bp. Các giống lai dị hợp tử cho sản phẩm là 2 băng 320bp (ty3) và 660bp (Ty3) hoặc 630bp (Ty3a). Khi sử dụng cặp mồi P6-25F/R để sàng lọc một số giống lai thương mại, Ji et al. (2007) đã thu được một băng PCR 660bp ở ba giống khác nhau. Khi sử dụng cặp mồi P6-25F/R để khảo sát khả năng mang gen kháng Ty3 ở các mẫu giống nghiên cứu, nhận thấy đa số các mẫu giống đều chỉ cho một băng 320bp (ty3/ty3) (Hình 3.3). Riêng giống đối chứng chứa gen cho hai vệt băng 630 và 320bp. Như vậy, không có dòng cà chua nào có chứa gen Ty3.

3.2. Kết quả phân tích đa dạng di truyền của 26 dòng cà chua bằng chỉ thị phân tử SSR



Hình 3.3. Điện di sản phẩm PCR phát hiện gen Ty3

Ghi chú: Đối chứng (Đ). Chứa gen Ty3, các giống nghiên cứu từ 1-26 không chứa gen

SSR (Simple Sequence Repeat) là chỉ thị dùng để nhân những đoạn ADN lặp trong genome để tìm sự đa hình. Trong nghiên cứu này, 10 chỉ thị có trình tự như bảng 3 đã được sử dụng để nghiên cứu đánh giá mối quan hệ di truyền của các mẫu giống cà chua. Đây là những cặp mồi sử dụng chuyên đánh giá đa dạng di truyền ở cây cà chua và đã được các tác giả Parmar et al. (2010) và Meng et al. (2010) kết luận là có sự đa hình cao.

Tuy nhiên trong số 10 chỉ thị SSR được sử dụng, chỉ có 5 chỉ thị chiếm 50% cho sản phẩm khuếch đại đa hình. 5 chỉ thị còn lại số alen nhân lên nhiều nhưng không alen nào đa hình, mặc dù chúng tôi đã cố gắng tối ưu hóa các điều kiện phản ứng nhưng đều không thu được sản phẩm đa hình, kết quả tổng hợp ở bảng 3.

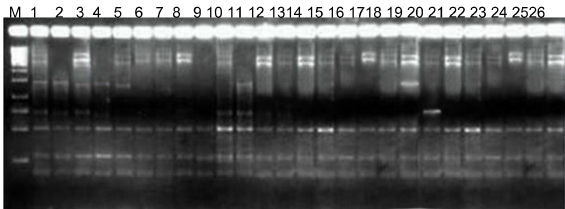
Bảng 4 cho thấy chỉ thị nhân lên nhiều alen nhất là chỉ thị Tom 300-301 với 14 alen, tuy nhiên không có alen nào đa hình, điều này không có ý nghĩa trong nghiên cứu đa dạng di truyền. 4 chỉ thị Tom 41-42, Tom 61-62, Tom 69-70 và Tom 203-203 cho kết quả tương tự.

Chỉ thị cho số alen đa hình nhiều nhất là SSR-304 với 5 alen đa hình. Tuy nhiên, tỷ lệ

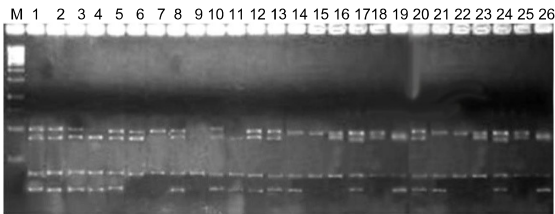
allen đa hình cao nhất lại là chỉ thị Tom 49-50, đạt 45,5% và SSR-108 đạt 33,3%. Tính tỷ lệ tỷ lệ số băng đa hình 80%, tiếp đó là chỉ thị Tom 8-9A đạt 75%, Tom 322-323 đạt 60%, SSR-304 là 77, số allen đa hình 17 chiếm 22%.

Bảng 4. Số allen nhân lên bằng PCR sử dụng các chỉ thị SSR

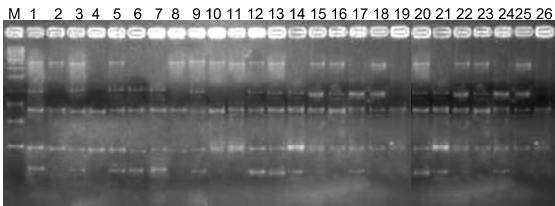
Chỉ thị	Tổng số allen	Số allen đa hình	Tỷ lệ số băng đa hình %
SSR-304	11	5	45,5
SSR-108	6	2	33,3
Tom 49-50	5	4	80,0
Tom 8-9 A	4	3	75,0
Tom 322-323	5	3	60,0
Tom 41-42	11	0	00,0
Tom 61-62	4	0	00,0
Tom 69-70	13	0	00,0
Tom 202-203	4	0	00,0
Tom 300-301	14	0	00,0
Tổng	77	17	22,0



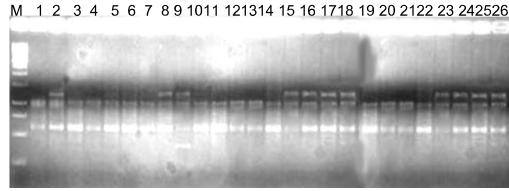
Hình 3.4. Sản phẩm PCR chỉ thị SSR 304



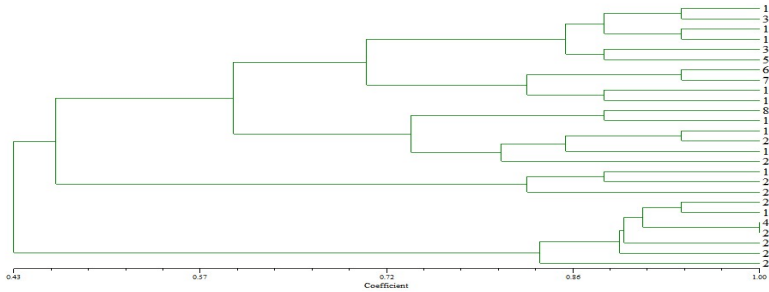
Hình 3.5. Sản phẩm PCR chỉ thị Tom 8-9A



Hình 3.6. Sản phẩm PCR chỉ thị Tom 49-50



Hình 3.7. Sản phẩm PCR chỉ thị Tom 322-323



Hình 3.8. Sơ đồ biểu diễn mối quan hệ di truyền của 26 dòng cà chua

Từ kết quả của 5 chỉ thị cho các allen đa hình là SSR304, Tom 8-9A, Tom 49-50, Tom 322-323 và SSR 108, trên trường diện di chúng tôi tiến hành ghi điểm (0) và (1). Điểm 0 tức không có allen, điểm 1 có allen ở một vị trí trên các giống. Bằng phần mềm chuyên dụng NTSYSpc 2.1 chúng tôi đã tính toán được hệ số tương đồng di truyền và sơ đồ hình cây quan hệ di truyền của 26 mẫu giống cà chua. Dựa vào hệ số tương đồng di truyền đã xây dựng sơ đồ hình cây diễn tả quan hệ di truyền của 26 mẫu cà chua nghiên cứu, qua đó đã phân theo các nhóm để có hướng sử dụng trong công tác chọn tạo giống (Hình 3.8, Bảng 5)

Theo các nhà di truyền, để con lai có ưu thế lai cao thì hệ số tương đồng di truyền của bố, mẹ nằm trong khoảng 0,4-0,7. Nếu nằm ngoài khoảng này thì không có ưu thế lai do bố mẹ rất gần nhau. Tại HSTD = 0,7 đã phân lập 26 dòng cà chua thành 5 nhóm có khoảng cách di truyền khác nhau.

Nhóm I: gồm 6 dòng là D1, D30, D13, D14, D5, D3.

Nhóm II: gồm 4 dòng là D6, D7, D15 và D18.

Nhóm III: gồm 6 dòng là D8, D11, D16, D17, D20 và D29

Nhóm IV: gồm 3 dòng là D10, D23 và D24;

Nhóm V: gồm 7 dòng là D2, D4, D12, D21, D25, D26 và D27

Tuy nhiên ở nhóm V, dòng D4 và D21 có hệ số tương đồng di truyền là 1, nghĩa là 2 dòng này giống nhau về bản chất di truyền.

Các dòng trong cùng một nhóm nếu cho lai với nhau sẽ không cho ưu thế lai cao vì có mức độ tương đồng di truyền cao. Các dòng khác nhóm có thể lai với nhau cho con lai ưu thế lai cao.

Kết quả nghiên cứu, phân nhóm trên cho thấy: 4 dòng có chứa gen kháng Ty1 là: dòng D13 (nhóm I), dòng D15 (nhóm II), dòng D10 (nhóm IV) và dòng D12 (nhóm V). Như vậy, khả năng lai giữa chúng với nhau cơ hội cho ưu thế lai về khả năng kháng bệnh virus XVL typ Ty1 là rất cao.

Đánh giá đa dạng di truyền và sự có mặt gen Kháng virus xoăn vàng lá ở cà chua

Bảng 5. Hệ số tương đồng di truyền của 26 dòng cà chua thuần

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26
D1	1.00																									
D2	0.82	1.00																								
D3	0.82	0.64	1.00																							
D4	0.82	0.88	0.76	1.00																						
D5	0.88	0.70	0.82	0.82	1.00																					
D6	0.47	0.64	0.52	0.34	0.67	1.00																				
D7	0.52	0.58	0.58	0.58	0.64	0.70	1.00																			
D8	0.52	0.70	0.47	0.58	0.41	0.70	0.41	1.00																		
D9	0.70	0.76	0.76	0.64	0.58	0.52	0.58	0.70	1.00																	
D10	0.58	0.76	0.52	0.64	0.47	0.76	0.47	0.94	0.76	1.00																
D11	0.88	0.82	0.70	0.82	0.76	0.58	0.64	0.52	0.70	0.58	1.00															
D12	0.94	0.76	0.88	0.88	0.94	0.52	0.58	0.47	0.64	0.52	0.82	1.00														
D13	0.94	0.76	0.88	0.88	0.94	0.52	0.58	0.47	0.64	0.52	0.82	1.00	1.00													
D14	0.64	0.70	0.70	0.70	0.64	0.82	0.88	0.52	0.70	0.58	0.76	0.70	0.70	1.00												
D15	0.58	0.64	0.52	0.52	0.47	0.64	0.47	0.82	0.76	0.88	0.58	0.52	0.52	0.58	1.00											
D16	0.47	0.64	0.41	0.52	0.35	0.76	0.47	0.82	0.64	0.88	0.47	0.41	0.41	0.58	0.88	1.00										
D17	0.52	0.58	0.47	0.47	0.41	0.82	0.76	0.64	0.58	0.70	0.64	0.47	0.47	0.76	0.70	0.70	1.00									
D18	0.47	0.64	0.41	0.52	0.35	0.76	0.58	0.82	0.64	0.88	0.47	0.41	0.41	0.58	0.76	0.88	0.82	1.00								
D19	0.70	0.88	0.64	0.96	0.70	0.76	0.70	0.58	0.64	0.64	0.82	0.76	0.76	0.82	0.52	0.52	0.58	0.52	1.00							
D20	0.58	0.64	0.64	0.52	0.58	0.52	0.70	0.58	0.88	0.64	0.58	0.52	0.52	0.70	0.64	0.64	0.58	0.64	0.52	1.00						
D21	0.76	0.82	0.82	0.70	0.64	0.58	0.64	0.64	0.94	0.70	0.76	0.70	0.70	0.70	0.76	0.70	0.58	0.64	0.58	0.82	1.00					
D22	0.76	0.82	0.82	0.82	0.76	0.58	0.64	0.52	0.82	0.58	0.76	0.82	0.82	0.76	0.58	0.47	0.52	0.47	0.82	0.70	0.88	1.00				
D23	0.82	0.76	0.76	0.88	0.82	0.64	0.70	0.47	0.64	0.52	0.94	0.88	0.88	0.82	0.52	0.41	0.58	0.41	0.88	0.52	0.70	0.82	1.00			
D24	0.88	0.94	0.70	0.82	0.76	0.58	0.64	0.64	0.82	0.70	0.88	0.82	0.76	0.70	0.58	0.64	0.58	0.82	0.70	0.88	0.88	0.88	0.82	1.00		
D25	0.64	0.82	0.58	0.70	0.52	0.82	0.52	0.88	0.70	0.94	0.64	0.58	0.58	0.64	0.82	0.82	0.76	0.82	0.70	0.58	0.76	0.64	0.58	0.76	1.00	
D26	0.82	0.64	0.76	0.76	0.82	0.52	0.47	0.47	0.52	0.52	0.70	0.88	0.88	0.88	0.58	0.64	0.52	0.47	0.41	0.64	0.41	0.58	0.70	0.76	0.58	1.00

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Sử dụng 10 chỉ thị phân tử SSR đánh giá đa dạng di truyền của 26 dòng cà chua nghiên cứu thu được 5 chỉ thị cho các allen đa hình, số allen đa hình chiếm 22% (17 trong tổng số 77 allen thu được).

Phân tích SSR đã chia 26 dòng cà chua nghiên cứu thành 5 nhóm, các nhóm được phân có khoảng cách di truyền khác nhau, trong đó có nhiều dòng thể hiện mức độ sai khác di truyền khá cao, chúng có ý nghĩa sử dụng trong tạo giống cà chua ưu thế lai.

Kết quả điều tra 26 dòng cà chua thuần bằng chỉ thị phân tử ADN đã phát hiện được 4 dòng có chứa gen đồng trội *Ty1* là: D10, D12, D13 và D15. Không có dòng nào mang gen *Ty2*, *Ty3*. Xác định được dòng D13 ở nhóm I, dòng D15 ở nhóm II, dòng D10 ở nhóm IV và dòng D12 ở nhóm V. Như vậy, khi lai giữa chúng với nhau cơ hội cho ưu thế lai về khả năng kháng bệnh virus XVL typ *Ty1* là rất cao.

4.2. Đề nghị

Tiếp tục duy trì và khai thác 4 dòng cà chua thuần: D10, D12, D13 và D15 vào chương trình nghiên cứu chọn tạo giống cà chua lai năng suất cao, kháng bệnh virus xoắn vàng lá (XVL) ở các tỉnh phía Bắc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Castro, Ana Pérez de, Blanca, José Miguel, Díez, María José, & Vinals, Fernando Nuez (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.
- F. James Rohlf (2000). NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1
- Han, c., Jianjun, s., Linshan, w., Peng, t. & Yan, q. 2012. Establishment of CAPS Molecular Marker for *Ty-1* Gene Resistant to Tomato Yellow Leaf Curl Disease. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 28: 195-200.
- 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.
- Doyle J. J., và J. L. Doyle (1990). A rapid total ADN preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Kaemmer D, Weising K, Beyermann B, Börner T, Epplen J T, Kahl G. 1995. Oligonucleotide fingerprinting of tomato ADN. *Plant Breeding*, 114: 12-17.
- Meng Fan-juan, XU Xiang-yang, Huang Feng-lan, LI Jing-fu (2010). Analysis of Genetic Diversity in Cultivated and Wild Tomato Varieties in Chinese Market by RAPD and SSR. *Agricultural Sciences in China* 9(10): 1430-1437.
- Nei M (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci.*, 70: 3321-3323.
- Ji, Yuanfu, Salus, Melinda S., Betteray, Bram van, Smeets, Josie, Jensen, Katie S., Martin, Christopher T., Mejia, Luis, Scott, Jay W., Havey, Michael J., & Maxwell, Douglas 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, Yuanfu, Schuster, David J., & Scott, Jay 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.
- Parmar Pritesh, Vishal P. Oza, Vaishnavi Chauhan, A.D. Patel, K.B. Kathiria, and R.B. Subramanian (2010). Genetic Diversity and ADN Fingerprint Study of Tomato Discerned by SSR Markers. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6(5): 657-666.
- Dương Kim Thoa (2012). “Nghiên cứu nguồn vật liệu khởi đầu cho tạo giống cà chua ưu thế lai phục vụ chế biến ở Đồng bằng sông Hồng”, Luận án tiến sĩ Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.