

KHẢ NĂNG KHÁNG BỆNH MỐC SƯƠNG VÀ CÁC ĐẶC TÍNH NÔNG HỌC CỦA CÁC DÒNG LAI LẠI GIỮA CON LAI SOMA VÀ KHOAI TÂY TRỒNG

Hoàng Thị Giang^{1*}, Nguyễn Thị Thủy¹, Vũ Thị Hằng¹, Đỗ Thị Thu Hà¹,
Ramona Thieme², Thilo Hammann², Nguyễn Quang Thạch¹

¹*Viện Sinh học Nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

²*Viện nghiên cứu chọn tạo giống cây trồng nông nghiệp, Grossluesewitz, CHLB Đức*

Email*: cuonggiang18@gmail.com

Ngày gửi bài: 16.10.2014

Ngày chấp nhận: 24.12.2014

TÓM TẮT

Nghiên cứu này trình bày các kết quả đánh giá các con lai lại (backcross-BC) giữa các con lai soma với giống khoai tây trồng làm bố về khả năng kháng bệnh mốc sương và các đặc tính nông học. Các dòng con lai BC₁ được gieo trồng và đánh giá một cách hệ thống tính kháng bệnh mốc sương bao gồm phương pháp lây nhiễm trên cây con (seedling test), lây nhiễm nhân tạo trên lá đơn tách rời (Detached leaflet assay), trên lát cắt củ (Tuber slice test) và đánh giá sự có mặt của gen kháng bệnh mốc sương *Rpi-blb1* bằng chỉ thị phân tử ở thế hệ BC₁. Kết quả đánh giá đã chọn lọc được 4 con lai BC₁ của tổ hợp lai *blb2G* (+) Delikat có biểu hiện tính kháng bệnh mốc sương cao. Qua phân tích bằng chỉ thị phân tử có sử dụng 2 mồi đặc hiệu (*Blb1* và *1/1'*) của gen kháng bệnh mốc sương *Rpi-blb1* đã phát hiện dòng đại *S. bulbocastanum*; con lai soma 2283/5 của tổ hợp lai *blb2G* (+) Delikat và các dòng con lai BC₁ đều có mặt gen kháng *Rpi-blb1*. Ngoài ra, các con lai BC₁ cũng mang nhiều đặc tính nông sinh học quý của khoai tây trồng. Điều này đã khẳng định được rằng dung hợp tế bào trần đã chuyển được tính kháng bệnh mốc sương từ loài khoai tây dại vào các con lai soma và duy trì được tính kháng bệnh ở các con lai BC₁, đồng thời các con lai BC₁ mang nhiều đặc tính quý của khoai tây trồng Delikat.

Từ khóa: Lai backcross, lai soma, kháng mốc sương, *Rpi-blb1*.

Late Blight Resistance and Agronomic Traits of The Backcrossed Hybrids between Somatic Hybrids and Cultivated Potato

ABSTRACT

This study presented the results of late blight resistance and agronomical traits of backcross (BC) hybrids between the somatic hybrids and cultivated potato varieties as the pollen donor. The BC₁ hybrids were grown and systematically evaluated for late blight resistance using artificial inoculation on seedlings (seedling test), on single detached leaves (detached leaflet assay), and on the tuber slices (tuber slice test). The presence of resistant gene *Rpi-blb1* was also verified by molecular markers in the BC₁ progeny. The results revealed that four BC₁ hybrids of *blb2G* (+) with *Delikat* possess high resistance to late blight. Molecular analysis using two specific primers (*blb1* and *1/1'*) of resistant gene *Rpi-blb1* detected that the wild type *S. bulbocastanum*; the 2283/5 somatic hybrids of the *blb2G* (+) *Delikat* hybrid combination and the BC₁ progenies contained this resistance gene. In addition, the BC₁ hybrids also carried several desirable agronomical characteristics of cultivated potatoes. This study confirmed that protoplast fusion was successful in transferring late blight resistance gene from the wild type potato to the somatic hybrids and the resistance was maintained in the BC₁ progeny. The BC₁ hybrids carried several desirable traits of cultivated potato cv. *Delikat*.

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

1. MỞ ĐẦU

Trong các loại bệnh gây hại và làm giảm năng suất khoai tây, bệnh mốc sương được coi là bệnh nguy hiểm nhất. Nhiều biện pháp đã được đưa ra để hạn chế tác hại của bệnh mốc sương gây ra như sử dụng tập đoàn giống mới cho các vùng nhiễm bệnh, sử dụng các thuốc hoá học nhưng chưa đem lại kết quả như mong đợi. Các nghiên cứu gần đây cho thấy các loài khoai tây dại như *S. pinatisectum*, *S. tarnii*, *S. bulbocastanum* mang nguồn gen kháng bệnh mốc sương cao (Thieme et al., 2008; 2010). Tuy nhiên, rất khó để chuyển đặc tính kháng này qua lai tạo hữu tính giữa các loài dại ($2n = 2x = 24$) với khoai tây trồng ($2n = 4x = 48$) do sự không tương hợp về genom, sự bất thụ trong lai xa. Để khắc phục hiện tượng này, lai soma (dung hợp tế bào) được áp dụng để chuyển tính kháng mốc sương từ khoai tây dại vào khoai tây trồng. Các nghiên cứu đi trước của Thạch et al. (1993); Thieme et al. (1997, 2008, 2010); Nguyễn Thị Phương Thảo & cs. (2009) đã rất thành công khi dung hợp các dòng/giống khoai tây nhị bội để tổ hợp các đặc tính kháng bệnh virus PVX, PVY. Thieme et al., 2010; Hoàng Thị Giang & cs. (2013) cũng đã bước đầu ứng dụng thành công kỹ thuật dung hợp tế bào trần giữa các dòng khoai tây dại với các giống khoai tây trồng nhằm tổ hợp đặc tính kháng bệnh mốc sương ở các con lai soma. Tuy nhiên, các con lai soma còn mang nhiều đặc tính của khoai tây dại cần được cải tạo. Các vật liệu lai soma mang

tính kháng bệnh mốc sương sẽ được lai lại (backcross- BC) với các giống khoai tây trồng (lâm bố) để chọn ra các con lai vừa có khả năng kháng bệnh mốc sương, vừa có kiểu hình giống với khoai tây trồng và mang các tính trạng nông sinh học tốt. Quá trình lai lại và chọn lọc sẽ được tiếp tục cho tới khi tạo được giống khoai tây mang tính kháng bệnh mốc sương có năng suất cao và phẩm chất tốt. Theo hướng này chúng tôi đã tiến hành “Nghiên cứu đánh giá tính kháng bệnh mốc sương và một số tính trạng nông sinh học của các dòng lai BC1 (backcross) giữa con lai soma và khoai tây trồng”.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

- Các dòng khoai tây dại nhị bội có nguồn gốc từ Mexico bao gồm: *S. bulbocastanum* (*blb2G*), *S. tarnii* (*trn 3G*); *S. pinatisectum* (*pnt2G*) do ngân hàng gen IPK cung cấp (IPK Genebank External Branch ‘North’, Gross Luesewitz, Germany). Các giống khoai tây trồng (*Solanum tuberosum* L.): Agave, Delikat, Rasant và Atlantic do công ty NORIKA cung cấp.

- Các con lai soma của tổ hợp lai *blb2G* (+) Delikat; *trn3G* (+) Delikat; *pnt2G* (+) Delikat; *pnt2G* (+) Atlantic.

- Các dòng con lai tạo ra từ phép lai backcross giữa các con lai soma với các giống khoai tây trồng.

STT	Nguồn gốc	Tổ hợp lai soma (dòng mẹ)	Ký hiệu dòng mẹ	Cây bố	Số hạt	Ký hiệu
1	2013-Hanoi	<i>trn3G</i> (+) Delikat	2195/2	Delikat	70	13.1302
2	2013-Hanoi	<i>blb2G</i> (+) Delikat	2283/5	Delikat	17	13.1303
3	2013-Hanoi	<i>pnt2G</i> (+) Delikat	2235/1	Delikat	32	13.1304
4	2013-Sapa	<i>blb2G</i> (+) Delikat	2281/5	Delikat	17	13.1306
5	2013-Sapa	<i>pnt2G</i> (+) Delikat	2195/2	Delikat	320	13.1310
6	2013-Sapa	<i>blb2G</i> (+) Delikat	2292/4	Delikat	110	13.1311
7	2013-Sapa	<i>trn3G</i> (+) Delikat	851/2	Delikat	220	13.1314
8	2013-Sapa	<i>trn3G</i> (+) Delikat	838/11	Delikat	500	13.1315
9	2013-Sapa	<i>pnt2G</i> (+) Atlantic	248/1	Atlantic	158	13.1317
10	2013-Sapa	<i>blb2G</i> (+) Delikat	2295/1	Delikat	6	13.1320
11	2013-Sapa	<i>blb2G</i> (+) Delikat	2283/5	Delikat	34	13.1322

2.2. Phương pháp

(1) *Phân lập nấm gây bệnh và tạo dịch lây nhiễm nhân tạo bệnh mốc sương*: Thu thập mô lá bị nhiễm bệnh 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 16-18°C ; 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 (Leontine Colon et al., 2004)

(2) *Đánh giá tính kháng bệnh trên cây con trồng từ hạt lai (seedling test)*: Sử dụng dung dịch Gibberelic Acid Solution (GA3 1ppm) để phá ngủ nghỉ hạt khoai tây. Tiến hành gieo hạt trên khay nhựa với mật độ khoảng 200 hạt/khay, để dưới ánh sáng ban ngày với nhiệt độ 18-20°C. Sau khi hạt nảy mầm đến giai đoạn 2 lá thật, tỉa thưa và đem trồng ra các khay mới. Sau khi gieo khoảng 10 ngày, phun dịch lây nhiễm, phun ướt và đều trên bề mặt lá, phủ nilon hoặc đậy tấm kính để giữ ẩm trong vòng 8-12h. Triệu chứng sẽ xuất hiện sau 3 ngày, giữ lại cây kháng (không có vết bệnh) và loại bỏ những cây nhiễm bệnh. Các cây kháng sẽ được trồng ra các chậu mới để tiếp tục cho các thí nghiệm đánh giá khác.

(3) *Đánh giá tính kháng bệnh mốc sương bằng lây nhiễm nhân tạo trên lá đơn tách rời (Detached leaflet assay)*: Trồng các con lai 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 14×10^3 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: diện tích chết hoại, sự phát triển của sợi nấm chiếm 90-100% diện tích lá (Leontine Colon et al., 2004; Hammann et al., 2009).

(4) *Đánh giá tính kháng bệnh mốc sương bằng lây nhiễm nhân tạo trên lát cắt củ (Tuber slice test)*: Sử dụng 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 tỷ lệ củ bị nhiễm bệnh (Leontine Colon et al., 2004, Hammann et al., 2009).

(5) *Kiểm tra sự có mặt của gen kháng mốc sương bằng chỉ thị phân tử*: Xác định các gen kháng *Rpi-blb1* ở các con lai hữu tính có sử dụng các môi đặc hiệu Blb1 (Wang et al., 2008) và 1/1' (Colton et al., 2006)

(6) *Đánh giá các tính trạng nông sinh học trong điều kiện nhà lưới*:

Thí nghiệm được bố trí 2 lần lặp cho mỗi dòng, mỗi lần lặp lại 5 cây. Các dòng con lai soma và các dòng bố mẹ sau nuôi cấy *in vitro* 4 tuần được trồng trong chậu vại và đặt trong điều kiện nhà màn để đánh giá các tính trạng về hình thái, sinh trưởng, phát triển. Các chỉ tiêu đánh giá theo tiêu chuẩn ngành (số 32-1998/QĐ-BNN-KHCN ngày 24/2/1998).

(7) *Xử lý số liệu*: bằng chương trình EXCEL và IRRISTAT 4.1.

2.3. Địa điểm

Nghiên cứu được tiến hành tại Viện Sinh học Nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

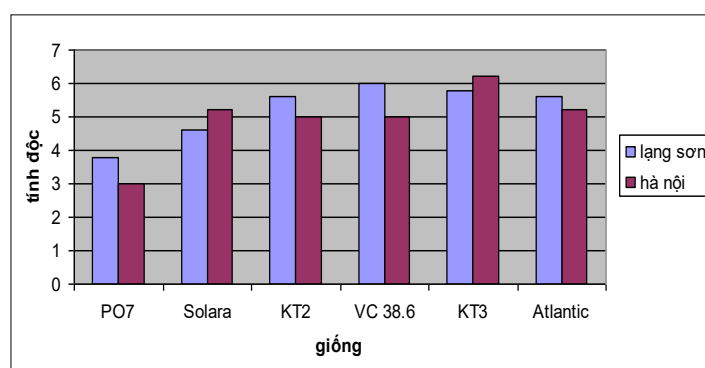
3.1. Tính kháng bệnh trên cây con trồng từ hạt lai BC1

Mẫu nấm mốc sương được phân lập từ mẫu lá bệnh thu thập ở các vùng trồng khoai tây tại Hà Nội và Lạng Sơn. Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy sợi nấm có cấu tạo đơn bào, không màu, cành bọc động bào tử không màu, phân nhiều nhánh cấp 1 so le với nhau. Bọc động bào tử quan sát được có dạng hình quả chanh yên hoặc hình trứng, có núm nhỏ ở đỉnh. Bọc bào tử động hình thành ở đỉnh nhánh theo kiểu vô hạn khiến cho nhánh có các chồi phình ra, thót vào.

Đây là đặc điểm riêng biệt của cảnh bọc động bào tử nấm *P. infestans* so với các loài *Phytophthora* khác. Nguồn nấm bệnh phân lập được từ hai vùng sinh thái khác nhau đều thể hiện tính độc trên các giống khoai tây trồng tại Việt Nam, thể hiện mức độ gây bệnh khá cao trên các đối tượng khảo sát. Kết quả xử lý số

liệu thống kê cho thấy không có sự sai khác về tính độc giữa hai chủng nấm được phân lập (Hình 1). Nguồn nấm bệnh này hoàn toàn có thể sử dụng cho các thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo.

Theo dõi khả năng nảy mầm của các hạt lai ở các tổ hợp lai khác nhau cho kết quả như bảng 1 và hình 2.



Hình 1. So sánh tính độc của hai nguồn nấm bệnh phân lập từ Hà Nội và Sapa

Bảng 1. Tỷ lệ nảy mầm trên cây con trồng từ hạt lai

Tổ hợp lai soma (dòng mẹ)	Ký hiệu dòng mẹ	Cây bố	Ký hiệu dòng lai năm 2013	Số hạt gieo	Số hạt nảy mầm	Tỷ lệ nảy mầm (%)
<i>trn3G</i> + Delikat	2195/2	Delikat	13.1302	70	50	71,4
<i>blb2G</i> + Delikat	2283/5	Delikat	13.1303	17	13	76,5
<i>pnt2G</i> + Delikat	2235/1	Delikat	13.1304	32	25	78,1
<i>blb2G</i> + Delikat	2281/5	Delikat	13.1306	17	7	41,2
<i>pnt2G</i> + Delikat	2195/2	Delikat	13.1310	320	256	80
<i>blb2G</i> + Delikat	2292/4	Delikat	13.1311	110	102	92,7
<i>trn3G</i> + Delikat	851/2	Delikat	13.1314	220	93	42,3
<i>trn3G</i> + Delikat	838/11	Delikat	13.1315	500	173	34,6
<i>pnt2G</i> + Atlantic	248/1	Atlantic	13.1317	158	48	30,4
<i>blb2G</i> + Delikat	2295/1	Delikat	13.1320	6	0	0
<i>blb2G</i> + Delikat	2283/5	Delikat	13.1322	34	5	14,7



Hình 2. Cây con sau gieo hạt 10 ngày

Ghi chú: 1-Cây khoai tây dòng 13.1310; 2- Cây khoai tây dòng 13.1314; 3- Cây khoai tây dòng 13.1320.

Số liệu bảng 1 cho thấy 11 dòng con lai BC1 được gieo hạt có khả năng nảy mầm không đồng đều và rất khác nhau. 5 dòng lai BC1 có tỷ lệ nảy mầm cao đó là 13.1302 (71,4%), 13.1303 (76,5%), 13.1304 (78,1%), 13.1310 (80%), 13.1311 (92,7%); 2 dòng đạt tỷ lệ thấp là 13.1322 (14,7%), đặc biệt dòng 13.1320 không có hạt nào nảy mầm. Sau nảy mầm khoảng 10 ngày sẽ lây nhiễm nhân tạo (dung dịch nấm 6.000 bào tử/ml). Sau 3-4 ngày lây nhiễm, đo đếm triệu chứng trên cây con seedling. Tiến hành đánh giá và sàng lọc những cây khỏe mạnh (không có triệu chứng bệnh) giữ lại và loại bỏ những cây bị bệnh. Việc sàng lọc tính kháng ở giai đoạn cây con sẽ giảm được công lao động, tiết kiệm được thời gian và giúp cho việc theo dõi và đánh giá các thí nghiệm tiếp theo một cách thuận lợi hơn.

Kết quả đánh giá sàng lọc được thể hiện trên bảng 2 và hình 3.

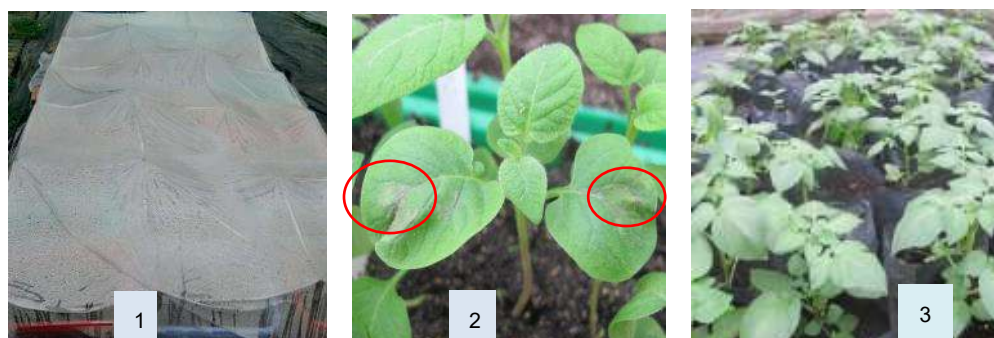
Kết quả cho thấy các con lai của tổ hợp lai *blb2G* (+) Delikat nhìn chung có khả năng kháng cao hơn những dòng khác. Con lai 13.1322 đạt tỷ lệ 60%; Con lai 13.1303 đạt 53,8%; Con lai 13.1311 đạt 55,8%. Các con lai của dòng đại *trn3G* và *pnt2G* chỉ đạt tỷ lệ kháng trung bình và thấp như con lai 13.1302 chỉ đạt 18% hay 13.1304 chỉ đạt 20%.

3.2. Tính kháng bệnh mốc sương của các con lai BC1 bằng lây nhiễm nhân tạo trên lá đơn tách rời

Các dòng con lai BC1 sau khi được thanh lọc tính kháng bệnh ở giai đoạn cây con và các giống bố mẹ được trồng trong điều kiện chậu vại. Các thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo được thực hiện trên mẫu lá của các vật liệu nghiên cứu theo phương pháp lây nhiễm nhân tạo trên lá tách rời. Kết quả được thể hiện trên bảng 3.

Bảng 2. Khả năng kháng bệnh mốc sương của các con lai BC1 ở giai đoạn cây con

Tổ hợp lai soma (dòng mẹ)	Ký hiệu dòng mẹ	Cây bố	Ký hiệu dòng lai năm 2013	Số hạt nảy mầm	Số cây khỏe mạnh	Tỷ lệ số cây khỏe mạnh (%)
<i>trn3G</i> + Delikat	2195/2	Delikat	13.1302	50	9	18
<i>blb2G</i> + Delikat	2283/5	Delikat	13.1303	13	7	53,8
<i>pnt2G</i> + Delikat	2235/1	Delikat	13.1304	25	5	20
<i>blb2G</i> + Delikat	2281/5	Delikat	13.1306	7	3	42,9
<i>pnt2G</i> + Delikat	2195/2	Delikat	13.1310	256	120	46,9
<i>blb2G</i> + Delikat	2292/4	Delikat	13.1311	102	57	55,8
<i>trn3G</i> + Delikat	851/2	Delikat	13.1314	93	29	31,2
<i>trn3G</i> + Delikat	838/11	Delikat	13.1315	173	68	39,3
<i>pnt2G</i> + Atlantic	248/1	Atlantic	13.1317	48	23	47,9
<i>blb2G</i> + Delikat	2295/1	Delikat	13.1320	0	0	0
<i>blb2G</i> + Delikat	2283/5	Delikat	13.1322	5	3	60



Hình 3. 1- Phủ nilone giữ ẩm sau khi lây nhiễm, 2- Cây bị nhiễm bệnh sau 3-4 ngày lây nhiễm, 3- Cây khỏe mạnh được đưa ra khu vực riêng

Bảng 3. Tính kháng bệnh mốc sương của các con lai BC1 so với dòng bố mẹ bằng lây nhiễm nhân tạo trên lá đơn tách rời

Tên dòng	Ký hiệu dòng	Điểm kích thước vết hoại tử mặt trên của lá (Mean $\pm$ SD)	Sự hình thành bào tử nấm ở mặt sau của lá (Mean $\pm$ SD)
Các dòng/giống bố mẹ			
Delikat		4,00 $\pm$ 0,10	2,75 $\pm$ 001
<i>blb2G</i>		1,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0
<i>pnt2G</i>		1,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0
<i>blb2G</i> + Delikat	2283/5	2,4 $\pm$ 0,0	1,25 $\pm$ 0,12
<i>pnt2G</i> + Delikat	2195/2	2,8 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,0
	2235/1	2,2 $\pm$ 0,02	1,6 $\pm$ 0,3
Các con lai BC1			
2195/2 x Delikat	13.1302.1	4 $\pm$ 0,15	4 $\pm$ 0,42
	13.1302.2	4,2 $\pm$ 0,07	4,2 $\pm$ 0,35
	13.1302.3	4,4 $\pm$ 0,03	4,8 $\pm$ 0,08
	13.1302.8	2,8 $\pm$ 0,12	2,6 $\pm$ 0,12
	13.1302.4	4,6 $\pm$ 0,08	3,6 $\pm$ 0,17
	13.1302.5	4 $\pm$ 0,15	3,8 $\pm$ 0,07
	13.1302.7	4 $\pm$ 0,25	3,6 $\pm$ 0,13
	13.1302.11	3,4 $\pm$ 0,43	3 $\pm$ 0,67
	13.1302.10	4,2 $\pm$ 0,07	5 $\pm$ 0,03
2283/5 x Delikat	13.1303.7	4,4 $\pm$ 0,13	3,8 $\pm$ 0,33
	13.1303.4	1,4 $\pm$ 0,03	1 $\pm$ 0,03
	13.1303.11	1,4 $\pm$ 0,03	1 $\pm$ 0,02
	13.1303.2	2,2 $\pm$ 0,07	1 $\pm$ 0,08
	13.1303.1	4,2 $\pm$ 0,07	4,6 $\pm$ 0,17
	13.1303.6	2,2 $\pm$ 0,17	1 $\pm$ 0,18
	13.1303.22	3,2 $\pm$ 0,12	1 $\pm$ 0,12
2235/1 x Delikat	13.1304.3	4,4 $\pm$ 0,08	3,8 $\pm$ 0,02
	13.1304.4	4,4 $\pm$ 0,03	4,6 $\pm$ 0,03
	13.1304.5	4,2 $\pm$ 0,17	4,4 $\pm$ 0,17
	13.1304.1	3,8 $\pm$ 0,07	4,6 $\pm$ 0,17
	13.1304.2	2,4 $\pm$ 0,23	1,6 $\pm$ 0,17

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

Kết quả cho thấy giống khoai tây trồng Delikat được chọn làm bố mẹ đều thể hiện tính nhiễm bệnh cao đối với chủng nấm mốc sương đã phân lập. Hai dòng khoai tây đại là *S. bulbocastanum* và *S. pinatisectum* đều có biểu hiện kháng tốt với nấm mốc sương (điểm đánh giá bằng 1). Con lai soma là 2283/5 của tổ hợp lai *blb2G* (+) Delikat; 2195/2 và 2235/1 của tổ hợp lai *pnt2G* (+) Delikat có biểu hiện kháng mốc sương ở mức trung bình. Kết quả này cũng hoàn toàn phù hợp với công bố trước của Hoàng Thị Giang & cs. (2013).

Trong các dòng con lai BC1, 4 dòng 13.1303.2, 13.1303.4, 13.1303.6, 13.1303.11 của tổ hợp lai 2283/5 x Delikat có biểu hiện kháng mốc sương cao so với khoai tây trồng Delikat và dòng mẹ là tổ hợp lai soma 2283/5 (điểm đánh giá $\leq$ 3. Như vậy, chúng tôi chứng tỏ rằng tính kháng mốc sương đã được chuyển từ dòng đại vào các tổ hợp lai. Kết quả cũng cho thấy giữa các con lai BC1 có biểu hiện kháng/nhiễm mốc sương khác nhau khi lai lại với khoai tây trồng, ngay cả trong cùng một tổ hợp lai cũng có các biểu hiện kháng/nhiễm bệnh khác nhau.

Bảng 4. Tính kháng bệnh mốc sương của các con lai BC1 so với dòng bố mẹ bằng lây nhiễm nhân tạo trên lát cắt củ

Tên dòng	Ký hiệu dòng	Điểm kích thước vết hoại tử mặt trên của lát cắt củ (Mean $\pm$ SD)	Sự hình thành bào tử nấm ở mặt sau của lát cắt củ (Mean $\pm$ SD)
Các dòng/giống bố mẹ			
Delikat		3,60 $\pm$ 0,00	2,03 $\pm$ 0,07
<i>blb2G</i>		1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00
<i>pnt2G</i>		1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00
<i>blb2G</i> + Delikat	2283/5	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00
<i>pnt2G</i> + Delikat	2195/2	1,8 $\pm$ 0,02	1,00 $\pm$ 0,00
	2235/1	1,8 $\pm$ 0,05	1,2 $\pm$ 0,02
Các dòng/giống con lai BC1			
2195/2 x Delikat	13.1302.1	2,2 $\pm$ 0,02	3,4 $\pm$ 0,03
	13.1302.2	3,8 $\pm$ 0,07	4,6 $\pm$ 0,03
	13.1302.3	4,2 $\pm$ 0,07	3,6 $\pm$ 0,03
	13.1302.8	3,4 $\pm$ 0,03	3,4 $\pm$ 0,03
	13.1302.4	3,8 $\pm$ 0,07	3,6 $\pm$ 0,03
	13.1302.5	3,8 $\pm$ 0,07	3,4 $\pm$ 0,03
	13.1302.7	3,8 $\pm$ 0,02	4,2 $\pm$ 0,07
	13.1302.11	3,8 $\pm$ 0,02	4 $\pm$ 0,01
	13.1302.10	3,6 $\pm$ 0,03	4,2 $\pm$ 0,07
2283/5 x Delikat	13.1303.7	4 $\pm$ 0,05	3,8 $\pm$ 0,02
	13.1303.4	1,0 $\pm$ 0,00	1,0 $\pm$ 0,00
	13.1303.11	1,0 $\pm$ 0,00	1,0 $\pm$ 0,00
	13.1303.2	1,0 $\pm$ 0,00	1,0 $\pm$ 0,00
	13.1303.1	5,4 $\pm$ 0,23	3,4 $\pm$ 0,03
	13.1303.6	1,0 $\pm$ 0,00	1,0 $\pm$ 0,00
	13.1303.22	3,6 $\pm$ 0,03	4,2 $\pm$ 0,07
2235/1 x Delikat	13.1304.3	3,4 $\pm$ 0,13	3,6 $\pm$ 0,03
	13.1304.4	4 $\pm$ 0,0	3,8 $\pm$ 0,02
	13.1304.5	3,6 $\pm$ 0,03	4,2 $\pm$ 0,02
	13.1304.1	3,4 $\pm$ 0,23	3,4 $\pm$ 0,03
	13.1304.2	4 $\pm$ 0,05	3,4 $\pm$ 0,13

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

3.3. Tính kháng bệnh mốc sương của các con lai BC1 bằng lây nhiễm nhân tạo trên lát cắt củ

Bệnh mốc sương do nấm *Phytophthora infestans* 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, nghiên cứu cũng đánh giá tính kháng bệnh mốc sương của các con lai BC1 thông qua lây nhiễm nhân tạo trên lát cắt củ.

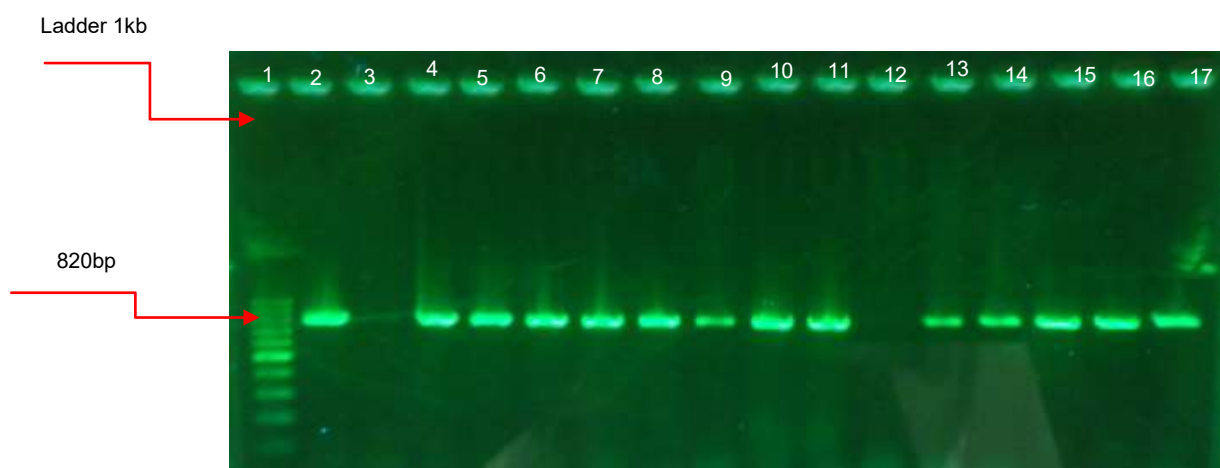
Kết quả trên bảng 4 cho thấy dòng 13.1303.2, 13.1303.4, 13.1303.6, 13.1303.11 của tổ hợp lai (2283/5 x Delikat) có điểm đánh giá là 1,0 $\pm$ 0,00 (hầu như không thấy xuất hiện triệu

chứng nhiễm bệnh sau khi lây nhiễm nhân tạo. Như vậy, đây là những dòng có đặc tính kháng mốc sương do dòng khoai tây đại *S. bulbocastanum* chuyển sang.

Như vậy, từ các thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo trên lá đơn tách rời và trên lát cắt củ của các dòng con lai BC1 và các dòng bố mẹ của chúng, bước đầu đã xác định được 4 dòng khoai tây có đặc tính kháng bệnh mốc sương cao là các con lai của tổ hợp lai (2283/5 x Delikat). Đây sẽ là những vật liệu để tiếp tục đánh giá sự có mặt của gen kháng mốc sương bằng chỉ thị phân tử.

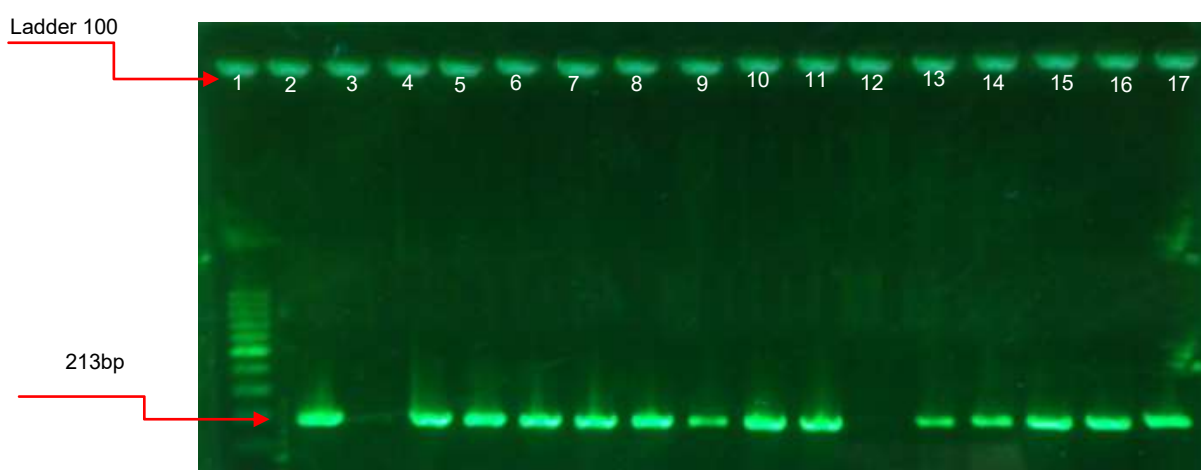
3.4. Đánh giá sự có mặt của gen kháng mốc sương ở các con lai BC1 bằng chỉ thị phân tử

Kết quả nghiên cứu của Hoàng Thị Giang & cs. (2013) đã chứng minh được các con lai soma có mang gen kháng bệnh mốc sương từ loài khoai tây đại. Nghiên cứu đã đánh giá sự có mặt của gen kháng $R_{pi-blb1}$ ở thể hệ con lai BC1 với 2 cặp môi 1/1' và Blb1. Trong đó, cặp môi 1/1' nhân đoạn DNA có kích thước 213bp (Colton et al., 2006) và cặp môi Blb1 nhân đoạn DNA có kích thước 820bp liên kết chặt với gen $R_{pi-blb1}$ (Wang et al., 2008). Kết quả điện di sản phẩm PCR được thể hiện trên hình 4-A và B.



Hình 4-A. Kết quả điện di sản phẩm PCR sử dụng cặp môi đặc hiệu Blb1

Chú thích: 1- Ladder, 2- blb, 3- Delikat, 4- 2283/5, 5- 1303.1, 6- 1303.2, 7- 1303.3, 8- 1303.4, 9- 1303.6, 10- 1303.9, 11- 1303.11, 12- 1303.12; 13- 1303.15; 14- 1303.20; 15- 1303.20; 16- 1303.22; 17-1303.23



Hình 4-B. Kết quả điện di sản phẩm PCR sử dụng cặp môi đặc hiệu Blb1

Chú thích: 1- Ladder, 2- blb, 3- Delikat, 4- 2283/5, 5- 1303.1, 6- 1303.2, 7- 1303.3, 8- 1303.4, 9- 1303.6, 10- 1303.9, 11- 1303.11, 12- 1303.12; 13- 1303.15; 14- 1303.20; 15- 1303.20; 16- 1303.22; 17-1303.23

Kết quả hình 5-A và B cho thấy sản phẩm phản ứng PCR khi chạy với cặp mồi 1/1' xuất hiện ở tất cả các giếng trừ giếng số 3 (Delikat) và giếng số 12 (1303.12). Tất cả các vạch băng của *blb* và con lai soma đều rõ ràng, có cùng kích thước. Đối chiếu kết quả PCR với ladder có kích thước 1kb chúng tôi nhận thấy các vạch băng đều có cùng kích thước xấp xỉ 820bp, tương đương với kích thước đoạn DNA liên kết với gen *R_{pi-blb1}* được nhân lên nhờ cặp mồi Blb1. Đối chiếu với ladder kích thước 100bp chúng tôi nhận thấy kích thước của sản phẩm PCR xấp xỉ 213bp bằng với kích thước của đoạn DNA liên kết chặt với gen *R_{pi-blb1}* được nhân lên nhờ cặp mồi 1/1'. Như vậy, có thể kết luận rằng gen kháng bệnh mốc sương *R_{pi-blb1}* đã được chuyển sang con lai nhờ dung hợp và các con lai chỉ thừa hưởng gen *R_{pi-blb1}* từ dòng bố *blb*, giống Delikat không mang gen kháng này. Các gen

kháng này tiếp tục được duy trì ở thế hệ BC1 (Trừ con lai 1303.12).

Đối chiếu kết quả lây nhiễm nhân tạo và thí nghiệm đánh giá sự có mặt của gen kháng mốc sương đã được thực hiện trên các đối tượng nghiên cứu chúng tôi thấy rằng sự có mặt của gen kháng trên các vật liệu có nguồn gốc từ loài khoai tây dại *S. bulbocactanum* gồm *Solanum bulbocactanum*, con lai của tổ hợp lai *blb+* Delikat/2283/5 và các con lai BC1 của tổ hợp lai *blb+* Delikat/2283/5 x Delikat là phù hợp với kết quả thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo.

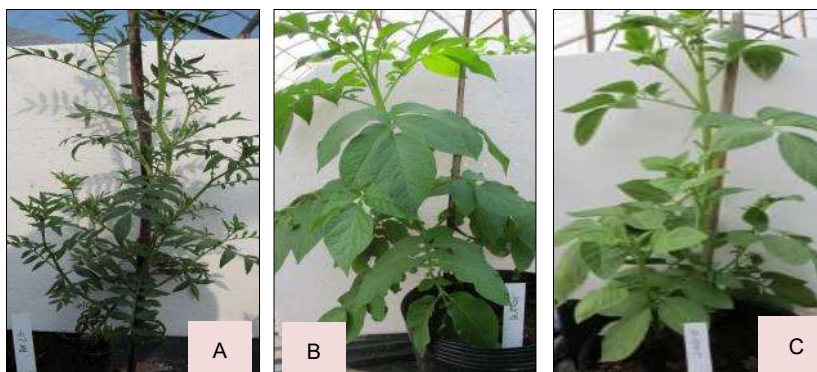
3.5. Đánh giá các đặc tính trồng trọt của các con lai BC1

Kết quả đánh giá cho thấy có sự khác nhau về sự sinh trưởng cũng như phát triển của các dòng/giống bố mẹ cũng như các dòng con lai BC1. Kết quả được thể hiện trên bảng 5 và hình 5.

Bảng 5. Khả năng sinh trưởng và phát triển của các con lai BC1 và các dòng/giống bố mẹ

Tên dòng	Ký hiệu dòng	Hình thái cây/sức sinh trưởng của cây	Cấu trúc tán (1-dạng thân, 2-TG, 3-dạng lá)	Chiều cao cây TB/khóm (cm)	Khả năng ra hoa (1-9; 9-rất nhiều)
Các giống bố mẹ					
Atlantic		Tu, +++	2	45,7	7
Delikat		Tu, +++	2	43,0	4
<i>S.bulbocactanum</i>	<i>blb2G</i>	Wild type, +	3	62,0	-
<i>S.tarinil</i>	<i>trn3G</i>	Wild type, ++	3	48,0	-
<i>S.pinatisectum</i>	<i>pnt2G</i>	Wild type, +	3	49,0	-
<i>blb2G</i> + Delikat	2283/5	Tu, +++	2	54,7	7
	2281/10	Tu, +++	2	40,7	5
	2292/4	Tu, +++	2	39,3	7
<i>pnt2G</i> + Delikat	2235/1	Tu, +++	2	40,0	-
	2195/2	Tu, +++	2	56,3	7
<i>pnt2G</i> + Atlantic	248/1	Tu, ++	1	43,3	8
<i>trn3G</i> + Delikat	838/11	Tu, ++	2	43,0	7
Các dòng con lai BC1					
2195/2 x Delikat	13.1302 (1 - 11)	Tu, ++	2	35,3	5
2283/5 x Delikat	13.1303 (1 - 22)	Tu, +++	2	40,1	7
2235/1 x Delikat	13.1304 (1 - 5)	Tu, +++	2	37,6	5
2281/10 x Delikat	13.1306	Tu, ++	1	14,0	-
2195/2 x Delikat	13.1310 (1 - 4)	Tu, ++	2	25,2	-
2292/4 x Delikat	13.1311 (1 - 3)	Tu, ++	1	23,3	-
838/11 x Delikat	13.1315 (1 - 6)	Tu, +++	2	48,6	-
248/1 x Atlantic	13.1317	Tu, +++	1	42,0	-

Chú thích: (-) = không xác định; (+) = yếu; (++) = trung bình; (+++) = khỏe; Tuberosum = dạng khoai tây trồng; Wild type = dạng dại;



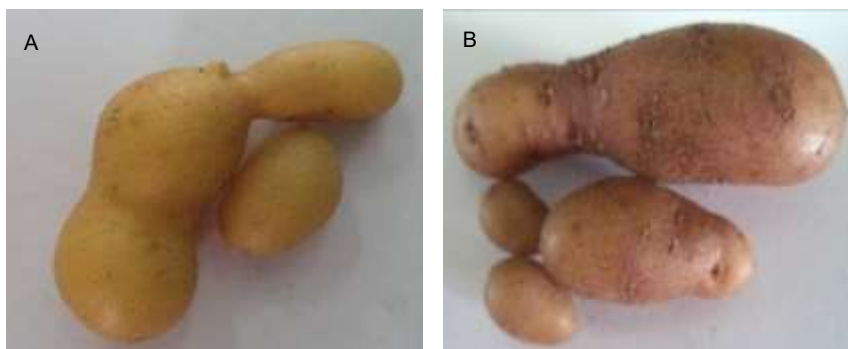
Hình 5. Hình thái cây một số dòng khoai tây

Chú thích: A- Dòng khoai tây đại pnt 2G; B- Dòng khoai tây trồng Delikat; C- Con lai BC1 dòng 13.1304 của tổ hợp lai pnt 2G (+) Delikat với giống khoai tây trồng Delikat



Hình 6-A. Đặc điểm hình thái củ

Chú thích: A- Atlantic; B- pnt2G; C- con lai soma pnt2G (+) Atlantic; D- BC1 của tổ hợp lai khoai tây của một số tổ hợp lai pnt2G (+) Atlantic với giống khoai tây trồng Atlantic.



Hình 6-B. Đặc điểm hình thái củ của một số tổ hợp lai bị biến dị

Chú thích: A- BC1 13.1310; B- BC1 13.1315

Cũng giống như các tổ hợp lai soma được chọn làm bố mẹ, hầu hết con lai BC1 đã bảo toàn được đặc tính hình thái ở dạng khoai tây trồng và có sức sinh trưởng tương đối giống với khoai tây trồng. Ngoài ra, khả năng ra hoa của các con lai và bố mẹ của chúng cũng được đánh giá bởi khả năng ra hoa sẽ quyết định có thể

tiếp tục lai trở lại với khoai tây trồng để chọn tạo ra những giống khoai tây mang đặc tính mong muốn được hay không. Các con lai và bố mẹ của chúng có sự khác nhau về màu sắc hoa cũng như mật độ hoa. Các con lai có khả năng ra hoa là 13.1302; 13.1303; 13.1304, trong đó dòng 13.1304 có khả năng ra hoa cao hơn.

Kết quả đánh giá các tính trạng về củ của các con lai BC1 (Hình thái củ; độ sâu mắt ngủ; hàm lượng tinh bột và đường khử) cho thấy đa số các con lai BC1 có hình thái củ giống với khoai tây trồng (Bảng 6). Độ sâu mắt ngủ của các dòng con lai BC1 đều nông hoặc rất nông, thích hợp cho chế biến công nghiệp (Hình 6-A). Ngoài ra, ở các con lai BC1 cũng xuất hiện một số dạng củ giống với dạng đại (Hình 6-B). Như vậy, rất cần thiết phải tiếp tục lai trở lại với khoai tây trồng qua nhiều thế hệ để tổ hợp được các đặc tính trồng trọt của khoai tây trồng vào các con lai.

Ngoài ra, khi phân tích một số chỉ tiêu chất lượng củ của các con lai BC1 và các dòng bố mẹ đã cho thấy hầu hết các con lai BC1 đều có hàm lượng đường khử thấp hơn dòng khoai tây trồng và các dòng đại. Thấp nhất là các dòng 13.1303.2 và 13.1303.6 với lượng đường khử đạt lần lượt là 0,017 và 0,019. Qua đánh giá thấy được một số dòng con lai đã có hàm lượng tinh bột cao hơn dòng bố mẹ của chúng. Đáng chú ý đó là các dòng 13.1303.2 và 13.1303.11 đạt tỷ lệ tinh bột lần lượt là 20,67% và 20,58%.

Tóm lại, các dòng con lai khoai tây BC1 đều có hình dáng cũng như phẩm chất củ (đặc tính trồng trọt) tương đối giống với khoai tây trồng.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tạo thành công 11 tổ hợp lai backcross giữa các con lai soma với các giống khoai tây trồng làm bố.

Đánh giá khả năng kháng bệnh mốc sương của các con lai BC1 ở giai đoạn cây con (seedling) đã xác định được 3 dòng 13.1303, 13.1311, 13.1322 có khả năng kháng bệnh mốc sương cao.

Qua chọn lọc sau lây nhiễm nhân tạo trên lá đơn tách rời và trên lát cắt củ đã lựa chọn được 4 dòng con lai của tổ hợp lai *blb2G* + Delikat/2283/5 x Delikat(13.1303.2, 13.1303.4, 13.1303.6, 13.1303.11) mang đặc tính kháng mốc sương do nấm *Phytophthora infestans*.

Chọn được 4 dòng con lai BC1: 13.1303.2, 13.1303.4, 13.1303.6, 13.1303.11 có sức sinh trưởng phát triển, phẩm chất cao hơn các dòng

khác, có đặc tính kháng bệnh mốc sương cao và mang các đặc điểm hình thái giống với khoai tây trồng Delikat.

Đánh giá khả năng kháng bệnh mốc sương bằng chỉ thị phân tử đã xác định gen $R_{pi-blb1}$ đều có mặt ở loài khoai tây soma và các con lai của BC1 với khoai tây trồng. Các dòng gen kháng đều có tính kháng bệnh cao qua test lây nhiễm nhân tạo trên lá đơn tách rời và lát cắt củ. Điều này khẳng định rằng dung hợp tế bào trần đã chuyển được tính kháng bệnh mốc sương từ loài khoai tây đại vào các con lai soma và duy trì được tính kháng bệnh ở các con lai BC1, đồng thời các con lai BC1 mang nhiều đặc tính quý của khoai tây tổng Delikat.

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 Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã hỗ trợ nguồn kinh phí; Dr. Ramona Thieme, Dr. Thilo Hamann (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

- Hoàng Thị Giang, Đỗ Thị Thu Hà, Vũ Thị Hằng, Nguyễn Thị Thủy, Nguyễn Quang Thạch, Ramona Thieme, Thilo Hamann (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 tarndli*, *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.
- Hoàng Thị Giang, Vũ Thị Hằng, Nguyễn Thị Thủy, Đỗ Thị Thu Hà, Ramona Thieme, Thilo Hamann, Nguyễn Quang Thạch (2014). Đánh giá khả năng chuyển đặc tính kháng bệnh mốc sương từ khoai tây đại sang khoai tây trồng thông qua dung hợp tế bào trần. Tạp chí KH&PT, 12(7): 1149-1156.
- Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Quang Thạch, Ninh Thị Thảo, Hoàng Thị Giang, Lương Văn Hưng, Nguyễn Xuân Trường (2009). Đánh giá một số đặc tính nông sinh học và khả năng kháng virus PVX, PVY của tám dòng khoai tây nhị bội. Tạp chí NN&PTNT, 2: 8-13.

- 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, p. 428-436.
- 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.
- Song JQ, Brandeen JM, Naess SK, Raasch JA, Wielgus SM, Haberalach 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 Acad Sci 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 Devel*, 1: 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. tarnii*) 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, Stevens 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, Vlesshouwers 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.