

# PHÁT HIỆN GEN KHÁNG BỆNH XOĂN VÀNG LÁ CÀ CHUA HỮU HIỆU BẰNG CHỈ THỊ PHẦN TỬ DNA VÀ LÂY NHIỄM NHÂN TẠO

Tổng Văn Hải<sup>1</sup>, Phan Thị Hiền<sup>1</sup>, Trịnh Thị Thu Thủy<sup>1</sup>, Phan Hữu Tôn<sup>2</sup>, Nguyễn Quốc Trung<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>2</sup> Trung tâm Bảo tồn và Phát triển Nguồn gen Cây trồng, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

## TÓM TẮT

Bệnh xoăn vàng lá là một trong những bệnh hại nguy hiểm nhất đối với cà chua ở Việt Nam có thể gây thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất. Cho đến nay, nhiều gen kháng bệnh đã được công bố và việc sử dụng các gen kháng tự nhiên được xác định là một trong những giải pháp hữu hiệu nhất trong chọn tạo giống cà chua kháng bệnh xoăn vàng lá. Nghiên cứu tiên hành khảo sát các gen kháng bệnh xoăn vàng lá *Ty1*, *Ty2*, *Ty3*, *Ty4* và *ty5* trong 230 mẫu giống cà chua đang lưu giữ tại Trung tâm Bảo tồn và Phát triển Nguồn gen Cây trồng - Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Sử dụng các chỉ thị phân tử DNA để phát hiện các gen kháng bệnh đã phát hiện 11 mẫu giống chứa gen *Ty1*, 5 mẫu giống chứa gen *Ty2*, 8 mẫu giống chứa gen *Ty3*, 4 mẫu giống chứa gen *Ty4* và 6 mẫu giống chứa gen *ty5*. Kết quả đánh giá khả năng kháng bệnh bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo trên các mẫu giống mang gen kháng đã xác định được *Ty1* và *Ty3* là các gen kháng hữu hiệu với các nguồn gây bệnh ở Việt Nam.

*Từ khóa:* Bệnh xoăn vàng lá cà chua, cà chua, chỉ thị phân tử DNA, gen kháng.

## MỞ ĐẦU

Bệnh xoăn vàng lá cà chua với 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 (Pico *et al.*, 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 *et al.*, 2003). TYLCV lây lan nhờ loài bọ phấn *Bemisia tabaci*, đây là loài côn trùng có sức sinh sản nhanh và mạnh, rất khó phòng trừ. Đại dịch do sự bùng phát số lượng của chúng gây ra đã được ghi nhận. Hiện tại chưa có loại thuốc bảo vệ thực vật nào phòng trừ hữu hiệu bệnh này, nếu cây bị nhiễm bệnh chỉ có thể nhổ bỏ. Vì vậy, sử dụng giống cà chua 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 *et al.*, 2013).

Muốn chọn tạo giống cà chua kháng bệnh xoăn vàng lá thành công thì việc đầu tiên phải xác định được số gen kháng và gen kháng hữu hiệu ở Việt Nam (Phan Hữu Tôn *et al.*, 2013). Đến nay, các nhà khoa học trên thế giới đã xác định được 5 gen kháng virus xoăn vàng lá khác nhau. Gen *Ty1* (Zamir *et al.*, 1994) và *Ty3* (Ji, Scott., 2006) nằm trên nhiễm sắc thể 6, gen *Ty2* nằm trên nhiễm sắc thể 11 (Hanson *et al.*, 2006), gen *Ty4* nằm trên nhiễm sắc thể 3 (Ji *et al.*, 2008) và gen *ty5* nằm trên nhiễm sắc thể 4 (Anbinder *et al.*, 2009). Các chỉ thị phân tử DNA liên kết với các gen kháng bệnh xoăn vàng lá *Ty1*, *Ty2*, *Ty3*, *Ty4* và *ty5* cũng đã được công bố (Pérez de Castro *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2009; Zhang., 2010 và Lapidot *et al.*, 2015), điều này giúp cho việc phát hiện gen kháng và chọn tạo giống kháng thuận tiện và nhanh chóng hơn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng chỉ thị phân tử DNA phát hiện gen kháng bệnh xoăn vàng lá *Ty1*, *Ty2*, *Ty3*, *Ty4* và *ty5* ở 230 mẫu giống cà chua đang lưu giữ tại Trung tâm Bảo tồn và Phát triển Nguồn gen Cây trồng - Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Tiếp đó, lây nhiễm nhân tạo các mẫu giống chứa gen khác nhau với các nguồn gây bệnh xoăn vàng lá để tìm ra gen kháng bệnh hữu hiệu. Đây là kết quả vô cùng ý nghĩa phục vụ chương trình chọn tạo giống cà chua kháng bệnh xoăn vàng lá tại Việt Nam.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu nghiên cứu

Tổng số 230 mẫu giống cà chua thu thập ở Việt Nam và các nước trên thế giới như Pháp, Iserel, Đài Loan, Nhật, Nga... Giống đối chứng trong lây nhiễm bệnh nhân tạo là C155.

Nguồn bệnh xoăn vàng lá được thu thập ở Bắc Giang, Hải Phòng, Hưng Yên và 01 cấu trúc xâm nhiễm ToLCHnV (mã GenBank HQ162269) gây bệnh xoăn vàng lá trên cà chua tại Việt Nam (Hà Viết Cường *et al.*, 2011).

### Phương pháp nghiên cứu

**Phương pháp chiết tách DNA:** DNA được chiết tách từ lá non của cây con 20 ngày tuổi bằng phương pháp CTAB được mô tả bởi Doyle và Doyle (1990) có cải tiến: Lấy 0,1g lá non ở cây khỏe, nghiền nhỏ 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 đều cho đến khi dịch chuyển sang màu xanh đậm. Chuyển dung dịch nghiền vào ống Eppendorf 1,5 ml vô trùng, ủ ở nhiệt độ 65°C trong 30 phút. Sau khi ủ chuyển ra ngoài, giữ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, sau đó bổ sung thêm 800 µl hỗn hợp Chloroform: Isoamylalcol theo tỷ lệ (24:1), lắc nhẹ rồi 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 lắc đều rồi đặt ở -20°C trong 30 phút, sau đó ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút, thu kết tủa DNA dưới đáy ống. Rửa kết tủa bằng Ethanol 70%, để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng. Hòa tan kết tủa DNA bằng 50 µl dung dịch TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) rồi bảo quản ở -20°C.

**Chỉ thị phân tử DNA bằng phương pháp PCR**

*Thành phần phản ứng PCR 20µl gồm:* 10 µl PCR 2X master mix của Fermentas; 1 µl (10 µM) mỗi mỗi loại; 7 µl nước free nuclease và 1ml DNA tổng số tương đương (10 ng).

*Chu kỳ nhiệt:* Với gen Ty1: 20 chu kỳ đầu ở 94°C/10 giây, 55°C/30 giây và 72°C/70 giây; 10 chu kỳ sau ở 94°C/10 giây, 53°C/30 giây và 72°C/70 giây; kết thúc bằng bước kéo dài ở 72°C/10 phút (Hanson et al., 2012). Với gen Ty2, Ty3, Ty4 và ty5: Biến tính ban đầu ở 94°C/5 phút, sau đó thiết lập 34 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 alen kháng và mẫn cảm.

*Điện di:* Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5% trong dung dịch đệm TAE 1X và bổ sung thêm chất nhuộm redsafe. Quan sát hình ảnh điện trong buồng UV.

*Trình tự mỗi nhân các đoạn chỉ thị:*

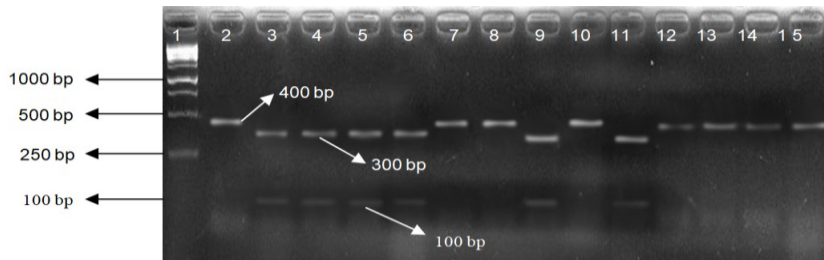
STT	Tên chỉ thị	Trình tự mỗi	Gen liên kết	Tham khảo
1	TG97	TG97F: 5'- taa tcc gtc gtt acc tct cct t - 3' TG97R: 5'- cgg atg act tca ata gca atg a - 3'	Ty1	Hanson et al., 2012
2	T0302	T0302F: 5'- tgg ctc atc ctg aag ctg ata gcg c - 3' T0302R: 5'- tga t(t/g)t gat gtt ctc (t/a)tc tct (c/a)gc ctg - 3'	Ty2	Garcia et al., 2007
3	P6-25	P6-25-F2: 5'- ggt agt gga aat gat gct gct c - 3' P6-25-R5: 5'- gct ctg cct att gtc cca tat ata acc - 3'	Ty3	Ji et al, 2007
4	C2_AT5g51110	F: 5'- tgg tgg aag gca cag ggc ac - 3' R: 5'- tct tta ctt gat cta ttt tag cag c -3'	Ty4	Ji et al., 2009
5	TM719	F: 5'- tcg att tgg aat gag ttt tc -3' R: 5'- tga aat aga ttt gtc agg tggtt-3'	ty5	Chen et al., 2015

**Lây 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 Kiến Thụy - Hải Phòng, Văn Giang - Hưng Yên và Việt Yên - Bắc Giang ghép lên giống mẫn cảm Hồng Lan 50 ngày tuổi để nhân và duy trì các nguồn bệnh. Cấu trúc xâm nhiễm ToLCHnV (mã GenBank HQ162269) cũng được lây nhiễm trên giống Hồng lan bằng phương pháp tiêm mật dưới lá (Kheyr et al., 1991) để nhân mẫu bệnh này phục vụ lây nhiễm nhân tạo bằng phương pháp ghép. Các dòng đánh giá được gieo trong nhà lưới để cách ly côn trùng, sau 30 ngày tuổi thì tiến hành ghép nêm với chồi bệnh, vị trí ghép ở phần thân phía trên 3 lá thật đầu tiên, mỗi dòng ghép 10 cây, sau 10 ngày thì trồng ra ruộng. Sau 40 ngày ghép tiến hành đánh giá mức độ nặng nhẹ theo thang điểm từ 0 - 4 (Lapidot, Friedmann., 2002): 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.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Phát hiện gen kháng Ty1**

Gen Ty1 là gen trội, được Zamir và đồng tác giả (1994) xác định nằm trên nhiễm sắc thể số 6. Sau này các nhà khoa học đã xác định được các chỉ thị phân tử liên kết với gen này. Pérez de Castro và đồng tác giả (2007) đã xác định được chỉ thị JB-1 liên kết với gen Ty1. Tuy nhiên, chỉ thị JB1 là chỉ thị trội nên không phân biệt được kiểu gen kháng đồng và dị hợp tử. Mới đây, Hanson và đồng tác giả (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. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng chỉ thị CAPS TG97 để chọn phát hiện gen kháng Ty1. Sản phẩm PCR với cặp mỗi TG97F/R là một đoạn DNA dài khoảng 400 bp ở tất cả các mẫu giống nghiên cứu. Sau khi cắt sản phẩm bằng enzyme TaqI, các mẫu giống mang gen Ty1 xuất hiện 2 vạch băng dài khoảng 300bp và 100 bp, các mẫu giống không mang gen thì không bị cắt nên chỉ có một vạch dài khoảng 400bp (Hanson et al., 2012). Phát hiện gen kháng Ty1 ở 230 mẫu giống nhận thấy có 11 mẫu giống chứa gen, là các mẫu giống AVRDC139, AVRDC154, AVRDC188, AVRDC189, AVRDC193, AVRDC198, Fr28, Fr34, Is23, Is34 và Ru07. Hình ảnh điện di được thể hiện ở hình 1.

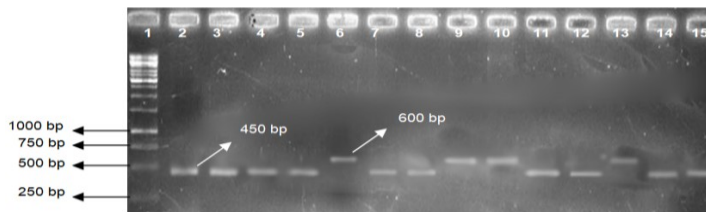


**Hình 1. Điện di sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi nhân đoạn chỉ thị TG97 cắt bởi enzyme *TaqI***

*Giếng 1: Ladder; Giếng 2, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15 kích thước vết băng khoảng 400 bp không mang gen Ty1; Giếng 3, 4, 5, 6, 9, 11 có hai vết băng kích thước khoảng 300 và 100 bp mang gen Ty1*

### Phát hiện gen Ty2

Gen Ty-2 được Hanson và đồng tác giả (2006) xác định nằm trên nhánh dài nhiễm sắc thể 11, nằm giữa chỉ thị TG36 và TG26. Sau đó Garcia và đồng tác giả (2007) đã phát triển chỉ thị SCAR T0302 liên kết với gen này. Sử dụng cặp mồi T0302F/TY2R1, cho phép phát hiện được gen Ty2 ở ba trạng thái khác nhau, đồng hợp tử trội, dị hợp tử và đồng hợp tử lặn. Sản phẩm PCR sau điện di xuất hiện vết băng kích thước 600bp là những mẫu giống có chứa gen kháng Ty-2, xuất hiện vết băng kích thước 450 bp là những mẫu giống không chứa gen Ty2 (Hanson *et al.*, 2006). Qua đó, phát hiện được 5 mẫu giống trên tổng 230 mẫu giống chứa gen kháng bệnh xoắn vàng lá Ty2. Các mẫu giống chứa gen Ty2 chủ yếu được thu thập từ viện nghiên cứu rau châu Á, là các mẫu giống AVRDC135, AVRDC138, AVRDC139, AVRDC142 và AVRDC144. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR phát hiện gen Ty2 được thể hiện ở hình 2.



**Hình 2. Điện di sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi T0302F/R1 nhân đoạn chỉ thị T0302 phát hiện gen Ty2**

*Giếng 1: Ladder; Giếng 2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 14, 15: Kích thước vết băng 450 bp không mang gen Ty2; Giếng 6, 9, 10, 13: Kích thước vết băng 600 bp mang gen kháng Ty2*

### Phát hiện gen kháng Ty3

Gen Ty3 là gen trội nằm trên nhiễm sắc thể số 6 (Ji *et al.*, 2007; Ji, Scott., 2006). Theo Ji và đồng tác giả (2007), gen Ty3 định vị tại một vùng có chứa locus FER (25 cM, dòng vector BAC56B23, 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.



**Hình 3. Điện di sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi P6-25 phát hiện gen Ty3**

*M: Ladder; Giếng 1, 2, 6, 7, 9, 11, 13 và 14: Kích thước vết băng 320 bp không mang gen Ty3; Giếng 3, 4, 5, 8, 10, 12: Kích thước vết băng 660 bp mang gen Ty3*

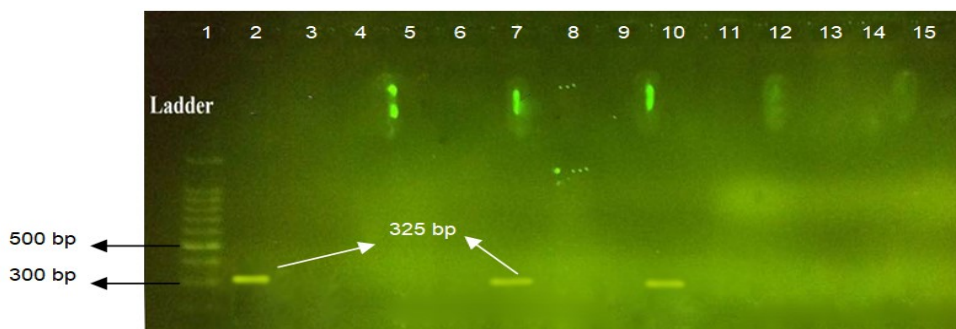
Sử dụng chỉ thị SCAR P6-25 với cặp mồi P6-25F/R để phát hiện kháng Ty3 ở 230 mẫu giống cà chua phát hiện được 8 mẫu giống chứa gen này, trong đó 5 mẫu giống thu từ Viện nghiên cứu rau châu Á là AVRDC154, AVRDC165, AVRDC166, AVRDC192, AVRDC195 và 3 mẫu giống thu từ Iserel là Is11, Is12 và Is22. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi P6-25F/R phát hiện gen Ty3 thể hiện ở hình 3.

### Phát hiện gen *Ty4*

Gen *Ty4* là gen trội được phát hiện bởi Ji và đồng tác giả. (2008). Tác giả đã phát hiện một vùng chuyển vị *S. Chilense* 14cM trên nhánh dài của NST số 3 trong một số dòng giống kháng có nguồn gốc từ LA1932. Một locus kháng *begomovirus* mới là *Ty4* được lập bản đồ với các marker vào khoảng 2,3 cM giữa *C2\_At4g17300* và *C2\_At5g60160* trong vùng chuyển vị (Ji *et al.*, 2009). Chỉ thị *C2\_AT5g51110* được xác định là liên kết với gen này (Ji *et al.*, 2009). Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng chỉ thị *C2\_AT5g51110* để phát hiện gen *Ty4*. Những mẫu giống mang gen *Ty4* thì vết băng có kích thước khoảng 325 bp được nhân lên, còn không chứa gen thì không có sản phẩm PCR được nhân lên (Ruman *et al.*, 2017). Qua đó đã phát hiện được 4 mẫu giống chứa gen *Ty4* là AVRDC102, AVRDC115, AVRDC122 và AVRDC123 đã được phát hiện trên tổng số 230 mẫu giống nghiên cứu. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR sử dụng chỉ thị *C2\_AT5g51110* phát hiện gen *Ty4* thể hiện ở hình 4.

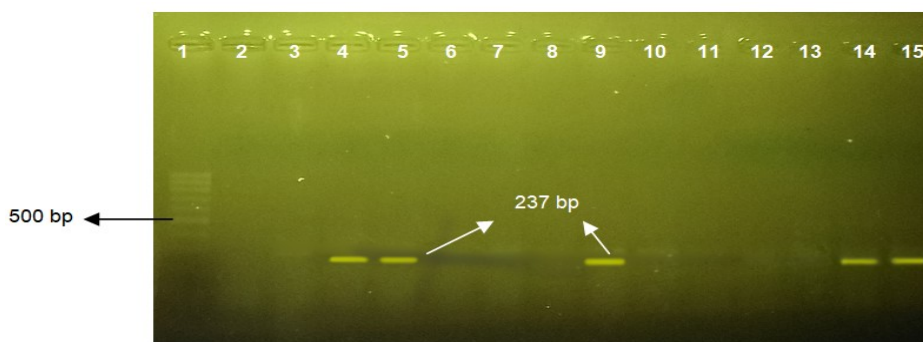
### Phát hiện gen *ty5*

Gen *ty5* là gen lặn được định vị trên nhiễm sắc thể số 4 (Anbinder *et al.*, 2009). Gen *ty5* là gen lặn nên không có ý nghĩa nhiều trong chọn tạo giống cà chua lai nhưng lại có ý nghĩa lớn trong chọn tạo giống cà chua thuần. Chỉ thị phân tử DNA liên kết với gen *ty5* cũng đã được hiện, đó là chỉ thị TM719 (Chen *et al.*, 2015). Sử dụng cặp mồi nhân chỉ thị TM719 bằng PCR phát hiện gen *ty5*, nếu giống chứa gen thì sản phẩm PCR nhân lên có kích thước 237bp còn mẫu giống không chứa gen thì không có sản phẩm PCR (Chen *et al.*, 2015; Ruman *et al.*, 2017). Sử dụng chỉ thị TM719 phát hiện gen kháng *ty5* ở 230 mẫu giống nghiên cứu phát hiện được 6 mẫu giống chứa gen kháng *ty5*, trong 02 mẫu giống thu thập từ Iserel là Is4 và Is5, 01 mẫu giống thu thập từ Pháp là Fr13 và 03 mẫu giống thu thập từ viện nghiên cứu rau châu á là AVRDC139, AVRDC140 và AVRDC151. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR sử dụng chỉ thị TM719 phát hiện gen *ty5* thể hiện ở hình 5.



**Hình 4. Điện di sản phẩm PCR sử dụng chỉ thị *C2\_AT5g51110* phát hiện gen *Ty4***

Giếng 1: Ladder; Giếng 2, 7 và 10: Kích thước vết băng 325 bp mang gen kháng *Ty4*;  
Các giếng còn lại không có vết băng nào, không mang gen *Ty4*



**Hình 5. Điện di sản phẩm PCR sử dụng chỉ thị TM719 phát hiện gen *ty5***

Giếng 1: ladder; Giếng 4, 5, 9, 14, 15: Kích thước vết băng 237 bp mang gen *ty5*;  
Các giếng còn lại không có vết băng nào, không mang gen *ty5*

Như vậy, bằng chỉ thị phân tử DNA đã phát hiện được 11 mẫu giống chứa gen *Ty1*, 5 mẫu giống chứa gen *Ty2*, 8 mẫu giống chứa gen *Ty3*, 4 mẫu giống chứa gen *Ty4* và 6 mẫu giống chứa gen *ty5*. Phần lớn các mẫu giống chứa gen kháng đều được thu thập tại Viện nghiên cứu rau châu Á. Đặc biệt có mẫu giống chứa 02 gen kháng và 03 gen kháng là AVRDC154 chứa gen *Ty1* và *Ty3* và AVRDC139 chứa gen *Ty1*, *Ty2* và *ty5*. Bảng 1 là danh sách các mẫu giống chứa gen kháng bệnh xoắn vàng lá.

**Bảng 1. Danh sách các mẫu giống chứa gen kháng Ty được phát hiện bằng chỉ thị phân tử**

STT	Ký hiệu	Chứa gen	Nguồn gốc
1	AVRDC102	Ty4	Viện nghiên cứu rau châu Á
2	AVRDC115	Ty4	Viện nghiên cứu rau châu Á
3	AVRDC122	Ty4	Viện nghiên cứu rau châu Á
4	AVRDC123	Ty4	Viện nghiên cứu rau châu Á
5	AVRDC135	Ty2	Viện nghiên cứu rau châu Á
6	AVRDC138	Ty2	Viện nghiên cứu rau châu Á
7	AVRDC139	Ty1, Ty2, ty5	Viện nghiên cứu rau châu Á
8	AVRDC140	ty5	Viện nghiên cứu rau châu Á
9	AVRDC142	Ty2	Viện nghiên cứu rau châu Á
10	AVRDC144	Ty2	Viện nghiên cứu rau châu Á
11	AVRDC151	ty5	Viện nghiên cứu rau châu Á
12	AVRDC154	Ty1, Ty3	Viện nghiên cứu rau châu Á
13	AVRDC165	Ty3	Viện nghiên cứu rau châu Á
14	AVRDC166	Ty3	Viện nghiên cứu rau châu Á
15	AVRDC188	Ty1	Viện nghiên cứu rau châu Á
16	AVRDC189	Ty1	Viện nghiên cứu rau châu Á
17	AVRDC192	Ty3	Viện nghiên cứu rau châu Á
18	AVRDC193	Ty1	Viện nghiên cứu rau châu Á
19	AVRDC198	ty5	Viện nghiên cứu rau châu Á
20	AVRDC198	Ty1	Viện nghiên cứu rau châu Á
22	Is4	ty5	Trường Đại Học Ben Gurion's, Iserel
23	Is5	ty5	Trường Đại Học Ben Gurion's, Iserel
24	Is11	Ty3	Trường Đại Học Ben Gurion's, Iserel
25	Is12	Ty3	Trường Đại Học Ben Gurion's, Iserel
26	Is22	Ty3	Trường Đại Học Ben Gurion's, Iserel
27	Is23	Ty1	Trường Đại Học Ben Gurion's, Iserel
28	Is34	Ty1	Trường Đại Học Ben Gurion's, Iserel
29	Fr13	ty5	Trường ĐH Picardie et Jules Verne Amiens (Pháp)
30	Fr28	Ty1	Trường ĐH Picardie et Jules Verne Amiens (Pháp)
31	Fr34	Ty1	Trường ĐH Picardie et Jules Verne Amiens (Pháp)
32	Ru07	Ty1	Nga

**Lây nhiễm nhân tạo phát hiện gen kháng hữu hiệu**

Để xác định khả năng kháng nhiễm của các mẫu giống đã được xác định mang gen, tiến hành lây nhiễm nhân tạo các giống mang gen kháng với 4 nguồn gây bệnh xoắn vàng lá thu thập tại Hải Phòng, Hưng Yên, Bắc Giang và cấu trúc xâm nhiễm ToLCHnV. Phản ứng của các mẫu giống mang gen đối với nguồn bệnh được tổng hợp ở bảng 2.

Từ bảng 2 nhận thấy mẫu đối đối chứng C155 bị nhiễm nặng ở tất cả các nguồn bệnh. Các mẫu giống chứa gen kháng Ty1 có phản ứng giống nhau giữa các nguồn bệnh. Không có triệu chứng với các nguồn bệnh thu từ Hải Phòng, Hưng Yên và ToLCHnV (điểm 0) và có triệu chứng nhẹ với nguồn bệnh thu thập từ Bắc Giang (điểm 1,0). Các mẫu giống chứa gen Ty2 không có triệu chứng đối với nguồn bệnh thu từ Bắc Giang và ToLCHnV (điểm 0). Tuy nhiên, bị nhiễm đối nguồn bệnh thu từ Hải Phòng (điểm 2,5) và nguồn bệnh thu từ Hưng Yên (điểm 1,5). Tương tự, các mẫu giống chứa gen kháng Ty3 cũng không có triệu chứng với nguồn bệnh thu thập từ Hưng Yên, Bắc Giang và ToLCHnV (điểm 0) và triệu chứng nhẹ đối với nguồn bệnh thu thập tại Hải Phòng (điểm 1). Kết quả này tương tự kết quả nghiên cứu của Phan Hữu Tôn và đồng tác giả. (2013) đối với phản ứng của gen Ty1 và Ty3 với các nguồn bệnh nêu trên. Các mẫu chứa gen Ty4 thì duy nhất kháng được nguồn bệnh thu từ Hưng Yên (điểm 0) và bị nhiễm nặng 3 nguồn bệnh còn lại. Các mẫu giống chứa gen kháng ty5 phản ứng kháng đối với 2 nguồn bệnh thu từ Hải Phòng và Hưng Yên (điểm 0), nhiễm nhẹ với nguồn bệnh thu từ Bắc Giang (điểm 1) và nhiễm nặng với nguồn ToLCHnV.

Như vậy, qua lây nhiễm nhận thấy rằng các mẫu giống chứa gen Ty1 và Ty3 có khả năng kháng tốt nhất đối với tất cả các nguồn bệnh. Đặc biệt, mẫu giống chứa đồng thời hai gen Ty1 và Ty2 hoặc 3 gen Ty1, Ty2 và ty5 thì kháng hoàn toàn với tất cả các nguồn bệnh lây nhiễm. Kết quả này đã xác định được 02 gen kháng hữu hiệu với các nguồn bệnh của Việt Nam là Ty1 và Ty3. Nên sử dụng gen kháng Ty1 và Ty3 vào các chương trình chọn tạo giống cà chua kháng bệnh xoắn vàng lá.

CÔNG NGHỆ SINH HỌC MÔI TRƯỜNG VÀ NÔNG NGHIỆP

Bảng 2. Kết quả đánh giá khả năng kháng bệnh xoắn vàng lá của các gen

STT	Ký hiệu	Chứa gen	Điểm kháng sau 50 ngày lây nhiễm			ToLCHnV
			Nguồn bệnh Hải Phòng	Nguồn bệnh Hưng Yên	Nguồn bệnh Bắc Giang	
1	AVRDC102	Ty4	3,0	0,0	3,5	2,5
2	AVRDC115	Ty4	3,0	0,0	3,5	2,5
3	AVRDC122	Ty4	3,0	0,0	3,5	2,5
4	AVRDC123	Ty4	3,0	0,0	3,5	2,5
5	AVRDC135	Ty2	2,5	1,5	0,0	0,0
6	AVRDC138	Ty2	2,5	1,5	0,0	0,0
7	AVRDC139	Ty1, Ty2, ty5	0,0	0,0	0,0	0,0
8	AVRDC140	ty5	0,0	0,0	1,0	2,5
9	AVRDC142	Ty2	2,5	1,5	0,0	0,0
10	AVRDC144	Ty2	2,5	1,5	0,0	0,0
11	AVRDC151	ty5	0,0	0,0	1,0	2,5
12	AVRDC154	Ty1, Ty3	0,0	0,0	0,0	0,0
13	AVRDC165	Ty3	1,0	0,0	0,0	0,0
14	AVRDC166	Ty3	1,0	0,0	0,0	0,0
15	AVRDC188	Ty1	0,0	0,0	1,0	0,0
16	AVRDC189	Ty1	0,0	0,0	1,0	0,0
17	AVRDC192	Ty3	1,0	0,0	0,0	0,0
18	AVRDC193	Ty1	0,0	0,0	1,0	0,0
19	AVRDC198	ty5	0,0	0,0	1,0	2,5
20	AVRDC198	Ty1	0,0	0,0	1,0	0,0
22	Is4	ty5	0,0	0,0	1,0	2,5
23	Is5	ty5	0,0	0,0	1,0	2,5
24	Is11	Ty3	1,0	0,0	0,0	0,0
25	Is12	Ty3	1,0	0,0	0,0	0,0
26	Is22	Ty3	1,0	0,0	0,0	0,0
27	Is23	Ty1	0,0	0,0	1,0	0,0
28	Is34	Ty1	0,0	0,0	1,0	0,0
29	Fr13	ty5	0,0	0,0	1,0	2,5
30	Fr28	Ty1	0,0	0,0	1,0	0,0
31	Fr34	Ty1	0,0	0,0	1,0	0,0
32	Ru07	Ty1	0,0	0,0	1,0	0,0
33	C155 (đ/c)	None	3,0	3,5	3,5	2,5

**KẾT LUẬN**

Bằng việc sử dụng các chỉ thị phân tử DNA đã phát hiện được 11 mẫu giống chứa gen *Ty1*, 5 mẫu giống chứa gen *Ty2*, 8 mẫu giống chứa gen *Ty3*, 4 mẫu giống chứa gen *Ty4* và 6 mẫu giống chứa gen *ty5*. Kết quả lây nhiễm nhân tạo 4 nguồn gây bệnh xoắn vàng lá xác định được gen 2 gen kháng bệnh hữu hiệu là *Ty1* và *Ty3*. Tổ hợp mẫu giống chứa hai gen kháng *Ty1*, *Ty3* hoặc ba gen kháng *Ty1*, *Ty2* và *ty5* thì có khả năng kháng hoàn toàn với tất cả các nguồn bệnh.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

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.

Chen HM, Lin CY, Yoshida M, Hanson P and Schafleitner R (2015). Multiplex PCR for Detection of Tomato Yellow Leaf Curl Disease and Root-Knot Nematode Resistance Genes in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Int J Plant Breed Genet* 9: 44-56.

Doyle JJ, và Doyle JL (1990). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12: 13-15.

Garcia BE, Graham E, Jensen KS, Hanson P, Mejía L, Maxwell DP (2007). Co-dominant SCAR marker for detection of the begomovirus-resistance Ty-2 locus derived from *Solanum habrochaites* in tomato germplasm. *Rep Tomato Genet Coop* 57: 21-24.

Ha Viet Cuong, Le Van Hai, Tran Ngoc Tiep, Ngo Bich Hao (2011). Molecular characterization of Tomato leaf curl Hainan virus and Tomato leaf curl Hanoi virus in Vietnam. *J ISSAAS* 17(2): 70 - 82.

Hanson PM, Green SK, Kuo G (2006). Ty-2 gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Rep Tomato Genet Coop* 56: 17-18.

- Ji Y, Scott JW (2006). Ty-3, a begomovirus resistance locus linked to Ty-1 on chromosome 6 of tomato. *Rep Tomato Genet Coop* 56: 22-23.
- Ji Y, Betteray B, Smeets J, Jensen KS, Mejía L, Scott JW, Havey MJ, Maxwell DP (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. *Rep Tomato Genet Coop* 57: 25-28.
- Ji Y, Schuster, David J, Scott JW (2007). Ty-3, a begomovirus resistance locus near the tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato. *Mol Breeding* 20(3): 271-284.
- Ji Y, Scott JW, Schuster DJ (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. *ANN APPL BIOL* 140: 109-127.
- Phan Hữu Tôn, Khúc Ngọc Tuyên, Tống 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.
- Pérez de Castro A, Blanca JM, Díez MJ, Viñals FN (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.
- Pico B, Díez MJ, 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 JM, 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.
- Ruman MDH, Tabassum S, Nessa KM, Islam MN (2017). Discovery of Tomato Leaf Curl Virus (ToLCV) Resistant Ty Genes from Local Tomato Varieties of Bangladesh. *GNOBB - Conference*, December 29 -30, 2017.
- Zamir D, Michelson I, Zakay Y, Navot N, Zeidan N, Sarfatti M, Eshed Y, Harel E, Pleban T, Van-Oss H, Kedar N, Rabinowitch HD, 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 thesis. Department of Molecular vegetable breeding* Huazhong Agricultural University, Wuhan, China.

## DETECTION OF EFFECTIVE RESISTANCE GENES FOR TOMATO LEAF CURL VIRUS BY DNA MOLECULAR MARKERS AND ARTIFICIAL INFECTION

**Tong Van Hai<sup>1</sup>, Phan Thi Hien<sup>1</sup>, Trinh Thi Thu Thuy<sup>1</sup>, Phan Huu Ton<sup>2</sup>, Nguyen Quoc Trung<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture,

<sup>2</sup> Center for Conservation and development of Crop Genetic Resources, Vietnam National University of Agriculture

### SUMMARY

Tomato yellow leaf curl virus disease (TYLCV) is one of the dangerous diseases in tomato in Vietnam and causes seriously yield loss. Several resistant genes have been reported and these natural genes have been used as one of the most effective solutions in breeding TYLCV disease resistant tomato. This study aimed to detect resistance genes *Ty1*, *Ty2*, *Ty3*, *Ty4* and *ty5* in 230 tomato accessions conserved at the Center for Conservation and Development of Plant Resources, Vietnam National University of Agriculture. Using DNA marker to detect resistant genes, there were 11 accessions containing *Ty1* gene, 5 accessions contain *Ty2* gene, 8 accessions contain *Ty3* gene, 4 accessions contain *Ty4* gene and 6 accessions contain *ty5* gene. In inoculation test, *Ty1* and *Ty3* gene showed high resistance to TYLCV in Vietnam.

**Keywords:** DNA marker, Tomato, Tomato yellow leaf curl virus, Resistance gene.

\* Author for correspondence: Tel: +84-982180979; Email: nqtrung@vnua.edu.vn