

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/271642937>

Identification of RAPD markers linked to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) resistance in tomato using bulked-segregant analysis

Article · January 2014

CITATIONS

0

READS

50

4 authors:



Hai Thi Hong Truong

Hue University

90 PUBLICATIONS 124 CITATIONS

SEE PROFILE



Trần Việt Thắng

Hue University

23 PUBLICATIONS 3 CITATIONS

SEE PROFILE



Nguyen Thi Thu Thuy

Hue University

53 PUBLICATIONS 32 CITATIONS

SEE PROFILE



Nhi Phan

RMIT International University Vietnam

1 PUBLICATION 0 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Nghiên cứu ứng dụng tiến bộ khoa học và công nghệ về nhân giống hữu tính nhằm nâng cao tỷ lệ và chất lượng cây giống sâm Ngọc Linh tại huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam [View project](#)



Development of markers linked to fruit aroma in *Luffa cylindrica* [View project](#)

ISSN 1859-4581

Tạp chí

NÔNG NGHIỆP & PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN

*Science and Technology Journal
of Agriculture & Rural Development*

MINISTRY OF AGRICULTURE AND RURAL DEVELOPMENT, VIETNAM

Chuyên đề

NÔNG LÂM NGHIỆP KHU VỰC MIỀN TRUNG - TÂY NGUYÊN

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN

Tháng 4

2014

TẠP CHÍ

NÔNG NGHIỆP & PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN

ISSN 1859 - 4581

NĂM THỨ MƯỜI BỐN

CHUYÊN ĐỀ NÔNG LÂM NGHIỆP KHU VỰC MIỀN TRUNG – TÂY NGUYÊN THÁNG 4/2014

TỔNG BIÊN TẬP
TS. BÙI HUY HIỂN
ĐT: 04.38345457

PHÒ TỔNG BIÊN TẬP
PHẠM HÀ THÁI
ĐT: 04.37711070

TOÀ SOẠN - TRỊ SỰ
Số 10 Nguyễn Công Hoan
Quận Ba Đình - Hà Nội
ĐT: 04.37711072
Fax: 04.37711073
E-mail: tapchinongnghiep@vnn.vn

BỘ PHẬN THƯƠNG TRỰC
135 Pasteur
Quận 3 - TP. Hồ Chí Minh
ĐT/Fax: 08.38274089

Giấy phép số:
400/GP - BVHTT
Bộ Văn hoá - Thông tin cấp ngày 28
tháng 12 năm 2000.

In tại Công ty Cổ phần KH&CN Hải Đăng
81/30/1 Lạc Long Quân, Cầu Giấy, Hà Nội

MỤC LỤC

- TRẦN VĂN MANH, NGUYỄN MINH HIẾU, NGUYỄN NHƯ HẢI, NGUYỄN THỊ MƠ. Đánh giá khả năng thích nghi và độ ổn định năng suất của một số giống lúa ngắn ngày tại các tỉnh duyên hải Nam Trung bộ 5 - 11
- TRẦN VĂN MINH, BLING MIẾN, TRẦN MINH QUANG. Đánh giá thực trạng sản xuất, đề xuất giải pháp bảo tồn và phát triển các giống lúa địa phương tại huyện Tây Giang, tỉnh Quảng Nam. 12 - 19
- PHAN THỊ PHƯƠNG NHI, TRƯƠNG THỊ HOÀNG HẠ. Nghiên cứu tình hình sinh trưởng, phát triển và năng suất của một số giống lúa trên đất, nhiễm mặn tại tỉnh Thừa Thiên - Huế 20 - 28
- TRẦN THỊ HOÀNG ĐÔNG, NGUYỄN CHÁNH THIÊN, TRẦN ĐĂNG HÒA. Đặc điểm sinh học của rầy lưng trắng *Sogatella furcifera* (Horvath) (Homoptera: Delphacidae) trên các giống lúa 29 - 33
- ĐỖ ĐÌNH THỰC, HOÀNG THỊ THÁI HÒA, DUƠNG CÔNG BẰNG, NGUYỄN THỊ KIM HỒNG. Nghiên cứu ảnh hưởng của các tổ hợp phân bón đến năng suất lúa trên đất phù sa không được bồi tại huyện Đông Hòa, tỉnh Phú Yên 34 - 40
- LÃ THỊ THU HẰNG, TRẦN MINH QUANG, TRẦN THỊ TRIỆU HÀ, NGUYỄN TIẾN LONG, TRẦN VĂN MINH, NGUYỄN MINH HIẾU, TRẦN THỊ THU HÀ, LÊ THỊ KHÁNH. Nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể và khối lượng cây giống In-vitro đến khả năng sinh trưởng của cây hoa chuông (*Sinningia speciosa*) ở giai đoạn vườn ươm 41 - 47
- NGUYỄN MINH HIẾU, NGUYỄN THỊ THU HÀ, LÊ THỊ KHÁNH. Kết quả nghiên cứu một số giống hoa Lily nhập nội trồng trên các loại giá thể trong vụ đông xuân tại Quảng Bình 48 - 54
- TRƯƠNG THỊ HỒNG HẢI, TRẦN VIẾT THẮNG, NGUYỄN THỊ THU THỦY, PHAN THỊ PHƯƠNG NHI, NGUYỄN DUY PHONG. Nghiên cứu xác định các chỉ thị phân tử RAPD liên kết với tính kháng bệnh héo xanh vi khuẩn (*Ralstonia solanacearum*) ở cây cà chua bằng phương pháp BSA 55 - 60
- MAI VĂN MINH, NGUYỄN MINH HIẾU, HOÀNG THỊ THÁI HÒA. Đánh giá dư lượng nitrat và một số hoạt chất thuốc bảo vệ thực vật trong rau cải xanh và mướp đắng tại tỉnh Quảng Bình 61 - 67
- LÊ ĐÌNH HUỠNG. Nghiên cứu mối quan hệ giữa các ngưỡng nhiễm *Aspergillus niger* trên hạt giống lạc với sự phát triển bệnh thối gốc mốc đen và hiệu quả phòng trừ của một số biện pháp xử lý hạt giống 68 - 73
- LÊ NHƯ CƯƠNG, NGUYỄN XUÂN VŨ. Sinh trưởng, phát triển và năng suất của lạc khi xử lý vi khuẩn có ích vùng rễ 74 - 81
- NGUYỄN VĨNH TRƯỜNG, TRẦN QUANG KHÁNH VÂN. Đánh giá sinh trưởng phát triển, năng suất và chất lượng các giống hồ tiêu trồng thử nghiệm ở Cam Nghĩa, Cam Lộ, Quảng Trị 82 - 91
- NGUYỄN QUỐC SINH, NGUYỄN THỊ MINH PHƯƠNG, NGÔ XUÂN CƯỜNG. Đánh giá một số đặc điểm hình thái và thành phần sinh hóa của giống chè PH8 và PH10 ở vụ xuân tại Phú Hộ 92 - 96
- ĐỖ THỊ BÍCH THỦY. Định danh và khảo sát một số tính chất cơ tếem năng probiotic của vi khuẩn lactic từ tôm chua Huế 97 - 104
- TRẦN THỊ THU HỒNG, LÊ VĂN AN, NGUYỄN THỊ LỘC, ĐÀO THỊ PHƯỢNG. Kỹ thuật nuôi giun quế (*Perionyx excavatus*) và ảnh hưởng của việc bổ sung giun quế trong khẩu phần ăn đến sinh trưởng của gà thịt (Gà đá x Lương Phượng) nuôi thả vườn 105 - 113
- PHẠM KHÁNH TÚ, TRẦN PHAN VŨ, HOÀNG ĐÌNH LỘC, HOÀNG NGHĨA DUYỆT. Khả năng sinh sản của lợn nái F₁(Landrace x Yorkshire) nuôi tại các trang trại vùng gò đồi tỉnh Nghệ An 114 - 120
- NGÔ MẬU DŨNG, LÊ ĐÌNH PHÙNG, PHÙNG THẮNG LONG. Nghiên cứu sinh trưởng, năng suất và phẩm chất thịt của lợn F₁ (Rừng x A Lic) và F₁ (Rừng x Móng Cái) 121 - 128
- HỒ TRUNG THÔNG, TANAKA UERU, NGUYỄN VĂN CHÁO, HỒ LÊ QUỲNH CHÂU. Mức độ kháng kháng sinh của vi khuẩn *Escherichia coli* phân lập từ phân lợn con bị tiêu chảy ở một số tỉnh miền Trung Việt Nam 129 - 136

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH CÁC CHỈ THỊ PHÂN TỬ RAPD LIÊN KẾT VỚI TÍNH KHÁNG BỆNH HÉO XANH VI KHUẨN (*Ralstonia solanacearum*) Ở CÂY CÀ CHUA BẰNG PHƯƠNG PHÁP BSA

Trương Thị Hồng Hải¹, Trần Việt Thắng¹,
Nguyễn Thị Thu Thủy¹, Phan Thị Phương Nhi¹, Nguyễn Duy Phong¹

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, đã xác định các chỉ thị RAPD liên kết với gen kháng bệnh héo xanh vi khuẩn ở cà chua sử dụng phương pháp BSA (Bulk Segregant Analysis). ADN của sáu dòng kháng thể hệ F₂ lần lượt là RIL # 26, 32, 41, 74, 162 và 200 và sáu dòng mẫn cảm thể hệ F₂ là RIL#30, 79, 158, 170, 182 và 183, được tạo từ một phép lai chéo giữa *S.lycopersicum* H7996 (mẹ, chuẩn kháng) và *S. pimpinellifolium* WVa700 (bố, chuẩn nhiễm), được gộp chung vào một R-pool và một S-pool tương ứng. Tổng cộng 800 mỗi RAPD được dùng để đánh giá kiểu gen của H7996 và Wva700 và chỉ có 23 mỗi RAPD biểu hiện đa hình về kiểu gen giữa 2 giống bố và mẹ và chỉ có sáu mỗi trong số này (UBC # 176, 205, 287, 317, 350 và 676) biểu hiện đa hình về kiểu gen giữa R- và S-pool. Trong số này, chỉ có hai chỉ thị UBC # 176 và 317 liên kết chặt (100%) với gen kháng bệnh héo xanh vi khuẩn. Vì vậy, các chỉ thị RAPD UBC # 176 và 317 có thể được dùng trong quá trình chọn lọc các giống cà chua kháng bệnh héo vi khuẩn.

Từ khóa: Bệnh héo xanh vi khuẩn, Bulk segregant analysis (BSA-phân tích sự chia tách số lượng), chọn giống bằng chỉ thị phân tử (MAS), RAPD, *Ralstonia solanacearum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum pimpinellifolium*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh héo xanh vi khuẩn do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây ra, là một loại bệnh lây lan qua đất, xâm nhập vào cây qua các vết thương ở rễ, làm tổn thương rễ và thân cây làm cho cây héo đột ngột. Bệnh này không những gây hại với cà chua mà còn gây hại cho các loại cây khác như: khoai tây, thuốc lá, ớt, cà tím, chuối, gừng, đậu đũa, và đậu phộng. Đã có rất nhiều biện pháp được nghiên cứu để phòng bệnh héo xanh vi khuẩn (Schonfeld et al., 2003; Hongng et al., 2011), tuy nhiên các biện pháp đều không có hiệu quả do phổ kí chủ của vi khuẩn dòng 1 là rất lớn đã gây khó khăn cho việc kiểm soát bệnh héo xanh vi khuẩn. Phương pháp có hiệu quả nhất hiện nay là trồng giống kháng hoặc sử dụng cây ghép. Một số giống cà chua có khả năng kháng bệnh héo xanh vi khuẩn nhưng do sự thay đổi độc tính của vi khuẩn *R. solanacearum* nên các giống này dần dần tỏ ra kém hiệu quả (Nakaho et al., 1996). Để giải quyết các vấn đề trên, tạo giống cà chua có khả năng kháng được nhiều chủng vi khuẩn gây bệnh ở các khu vực khác nhau là cần thiết.

Tạo giống kháng bệnh héo xanh vi khuẩn bằng phương pháp truyền thống rất tốn thời gian, hiệu quả thấp, các tác động của môi trường lên biểu hiện bệnh không kiểm soát được, khó thích ứng với sự biến đổi của các chủng vi khuẩn gây bệnh. Phương pháp chọn giống nhờ chỉ thị phân tử (Marker-assisted selection) (MAS), là phương pháp chọn lọc dựa trên kiểu gen nên hiệu quả cao hơn các phương pháp chọn tạo giống truyền thống. Việc sử dụng các chỉ thị phân tử để hỗ trợ tách tính kháng bệnh héo xanh vi khuẩn và những tính trạng không mong muốn và để lai chéo tính trạng kháng bệnh từ các nguồn khác nhau đã được thực hiện (Yang và Francis, 2005). Gần đây, Miao et al. (2009) đã phát triển 2 chỉ thị phân tử SCAR (Sequenced Characterized Amplified Region) liên kết với tính trạng kháng bệnh héo xanh vi khuẩn là TSCAR_{AAT/CGA} và TSCAR_{AAG/CAT}. Các chỉ thị này nằm cách gen kháng TRSR -1 ở vị trí lần lượt là 4.6 cM và 8.4 cM. Các chỉ thị này cũng đã được khuyến cáo sử dụng trong chọn tạo giống kháng bệnh héo xanh vi khuẩn bằng MAS. Tuy nhiên, Panthee và Foolad (2012) đã kiểm tra lại những chỉ thị này và kết quả cho thấy không có biểu hiện đa hình ở các kiểu gen kháng và mẫn cảm. Một số chỉ thị phân tử SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

¹ Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

và PCR-based khác liên quan đến các gen kháng bệnh héo xanh vi khuẩn nằm trên nhiễm sắc thể số 6 và số 12 đã được công bố (Mejía et al., 2009). Panthee và Foolad (2012) đã kiểm tra lại công dụng của 2 chi thị trên nhiễm sắc thể số 6 (C2_At1g44835 và C2_At4g10030) và một chi thị khác trên nhiễm sắc thể số 12 (SSR 20). Hai chi thị C2_At1g44835 và C2_At4g10030 đã không khuếch đại vì thể công dụng của nó không được công nhận. Chi thị SSR20 biểu hiện đa hình của các dòng kháng và mẫn cảm. Do đó, SSR20 có thể là một chi thị hữu ích. Tuy nhiên, SSR20 nằm trên nhiễm sắc thể 12, như vậy cần thêm những nghiên cứu sâu hơn để phát triển các chi thị PCR đáng tin cậy liên kết với các gen kháng bệnh héo xanh vi khuẩn của cà chua nằm trên nhiễm sắc thể số 6. Trong nghiên cứu này đã xác định các chi thị RAPD liên kết với gen kháng bệnh héo vi khuẩn bằng phương pháp BSA (bulked – segregant analysis) để phục vụ trong chọn tạo giống.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Các giống nghiên cứu và chiết xuất ADN

Giống chuẩn kháng Hawaii7996 (H7996) (*Solanum lycopersicum*) và giống chuẩn nhiễm West Virginia 700 (WVa700) (*S. pimpinellifolium*) được cung cấp bởi Trung tâm Rau Thế giới (AVRDC-The World vegetable Center), Đài Loan. Những hạt giống được gieo trong khay 36 lỗ. ADN của H7996, WVa700 được chiết xuất từ lá của cây con (3-4 lá thật) sử dụng DNeasy Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Đức). Nồng độ ADN được đo trên máy quang phổ Nanovue (GE Healthcare, Vương quốc Anh). Chất lượng của ADN được kiểm tra bằng cách sử dụng điện di agarosa gel và hấp thụ quang phổ (tỷ lệ A260/A280). ADN của 12 dòng lai tái tổ hợp (RILs) ở thế hệ F₉, có nguồn gốc từ một phép lai chéo giữa H7996 (*S. lycopersicum*, kháng) và WVa700 (*S. pimpinellifolium*, mẫn cảm) (Thoquet et al., 1996), được cung cấp bởi Trung tâm Rau Thế giới (AVRDC-The World vegetable Center), Đài Loan.

2.2. Phân tích BSA (Bulk Segregant Analysis)

ADN của sáu dòng kháng RIL ở thế hệ F₉ (RIL # 26, 32, 41, 74, 162, và 200) và sáu dòng mẫn cảm F₉ RILs (RIL # 30, 79, 158, 170, 182, và 183) được chọn bởi Mejía et al. (2009) đã

được gộp chung vào R-pool và S-pool, tương ứng (Michelmore et al., 1991). Các R- và S-pool được sử dụng để sàng lọc các mối RAPD biểu hiện đa hình về kiểu gen giữa giống chuẩn kháng và chuẩn nhiễm. Sau khi các đoạn ADN được tìm thấy tương ứng với giống kháng và R-pool, hoặc giống mẫn cảm và S-pool, sẽ được chọn là các chi thị liên kết với gen kháng bệnh héo xanh vi khuẩn.

2.3. Phân tích RAPD

Tổng cộng 800 mối RAPD, thiết kế bởi Đại học British Columbia (UBC) và tổng hợp bởi công ty Bioneer, Hàn Quốc, được sử dụng trong nghiên cứu này. Các mối được đánh giá biểu hiện đa hình về kiểu gen giữa H7996 và WVa700. Các phản ứng PCR được thực hiện bằng máy Eppendorf Mastercycler Gradient (Mỹ). Mỗi phản ứng là 15 µl, trong đó bao gồm 2,5 mM MgCl₂ (Roche, Hàn Quốc), 200 µM deoxyribonucleotit triphosphat hòa lẫn (Roche, Hàn Quốc), PCR buffer 10X, 25 mM MgCl₂, 1 U of *Taq* ADN polymeraza (Genet Bio, Hàn Quốc), và 0,25 µM mỗi ngẫu nhiên và 5-10 ng ADN tổng số. Các phản ứng PCR diễn ra trong chu trình sau: 94°C trong vòng 3 phút (1 chu kỳ); 94°C trong 1 phút, 37°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút (40 chu kỳ); 72°C trong 7 phút (1 chu kỳ). Sản phẩm sau khi khuếch đại xong được nhuộm bằng thuốc nhuộm SYBR Green I nồng độ 1/10000 (Invitrogen, USA) trong 20 phút, sau đó điện di trên agarosa gel 1%. Quá trình điện di được sử dụng 0,5X TBE trong 3 giờ rưỡi ở 120 V và chụp ảnh dưới ánh sáng tia cực tím. 100 bp ladder được sử dụng để đánh dấu khối lượng phân tử.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

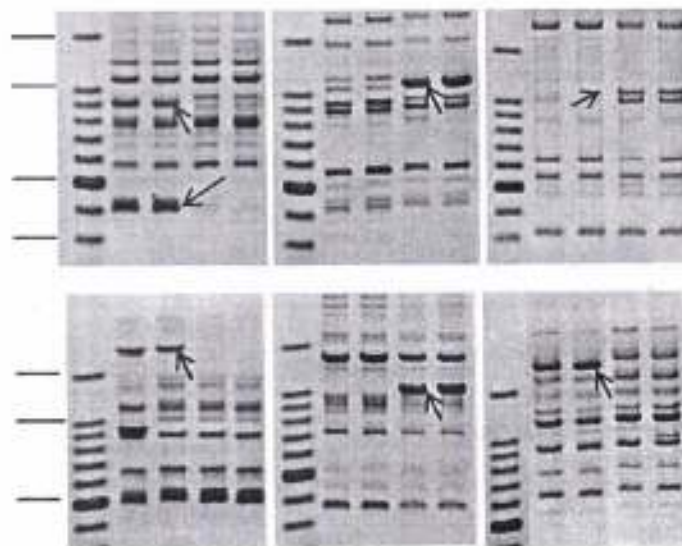
Sự di truyền tính kháng bệnh héo xanh vi khuẩn ở cà chua rất phức tạp bởi sự tương tác giữa kiểu gen, chủng bệnh cũng như các tác động của môi trường về biểu hiện tính kháng (Hayward, 1991). Khả năng kháng bệnh héo vi khuẩn của giống cà chua H7996 đã được nghiên cứu và báo cáo là một nguồn kháng bền vững (Wang et al., 1998). Theo các kết quả nghiên cứu trước đây, phương thức di truyền tính kháng của H7996 có thể thay đổi tùy theo chủng vi khuẩn gây bệnh và phương pháp lây nhiễm (Truong et al., 2008; Wang et al., 2000). Các quần thể được tạo từ tổ hợp lai H 7996 và WVa700 đã được sử dụng để nghiên cứu sự kiểm soát di truyền của

tính kháng của H7996, và kết quả cho thấy các tính trạng số lượng (QLT) có liên kết với các gen kháng đã được phát hiện trên nhiễm sắc thể số 6 (Wang et al., 2012; Wang et al., 2000). Ngoài ra còn có một QTL trên nhiễm sắc thể số 12 liên kết với tính kháng đặc hiệu với chủng vi khuẩn Pss4, Đài Loan (Wang et al., 2000). Gần đây, một QTL liên kết với gen kháng ổn định ở H7996 đã được phát hiện trên nhiễm sắc thể 12 (Wang et al., 2012). Theo Mejia et al. (2009), có sáu dòng F₀ RIL được tạo ra từ tổ hợp lai H7996 và Wva700 có mang gen kháng bệnh héo xanh vi khuẩn ở nhiễm sắc thể số 6 và 12. Trong nghiên cứu này đã sử dụng những dòng kháng đó tạo ra nhóm kháng (R-pool) để sàng lọc chi thị RAPD liên kết tính kháng bệnh héo vi khuẩn. Các kết quả nghiên cứu đã được công bố đều cho thấy sự thành công của việc xác định các chi thị liên quan đến gen kháng hoặc những tính trạng khác sử dụng phương pháp BSA và RAPD (Du et al., 2011; Singh et al., 2011).

Trong nghiên cứu này, đã sử dụng 800 môi RAPD để chọn ra các môi biểu hiện đa hình về kiểu gen giữa H7996 và Wva700. Trong số này, 23 môi biểu hiện đa hình về kiểu gen giữa H7996 và Wva700. Những môi này được kiểm tra lại trên R-pool và S-pool và kết quả cho thấy chỉ có sáu môi biểu hiện đa hình về kiểu gen giữa R-pool và S-pool (Hình 1). Trong số sáu chi thị này,

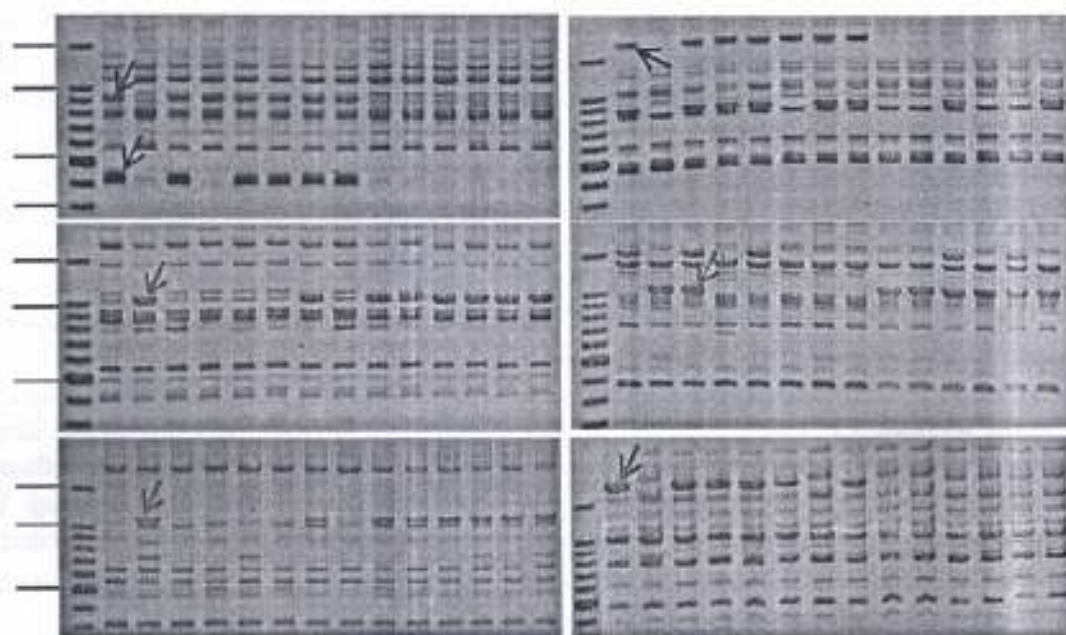
có 3 chi thị như: UBC#176, 317 và 676 khuếch đại các đoạn đa hình ở cây mẹ H7996, trong khi đó các chi thị như UBC# 205, 287 và 350 khuếch đại các đoạn đa hình ở cây bố Wva700 (Hình 1). Chi thị UBC#176 khuếch đại hai đoạn đa hình 400 và 900 bp. Sự liên kết giữa gen kháng bệnh héo xanh vi khuẩn và các đoạn đa hình được khuếch đại bởi sáu chi thị RAPD được kiểm chứng bằng cách phân tích 6 dòng kháng và 6 dòng nhiễm tạo nên các R- và S-pools tương ứng. Tuy nhiên, chỉ có chi thị UBC#176 và 317 liên kết 100% với gen kháng bệnh, các chi thị còn lại chỉ 91,7%. Dòng RIL-26 mang đoạn mẫn cảm UBC#350 và RIL#162 mang đoạn mẫn cảm UBC#205 và UBC# 287, nhưng không mang đoạn kháng UBC # 676 (Hình 2, bảng 1).

Một số các chi thị liên quan đến bệnh héo vi khuẩn đã được phát triển bởi Mejia và cộng sự (2009) và Miao và cộng sự (2009). Tuy nhiên, đã sử dụng các chi thị này để kiểm tra trên các dòng cà chua này nhưng không có kết quả như đã được công bố. Điều này phù hợp với kết quả kiểm chứng của Panthee và Foolad (2012). Các chi thị phân tử RAPD UBC#176 và 317 liên kết với gen kháng bệnh héo xanh vi khuẩn sẽ giúp các nhà chọn giống loại trừ được các cây không mang gen kháng, giúp cho quá trình chọn giống kháng bệnh sẽ nhanh hơn.



Hình 1. Sản phẩm điện di của các chi thị phân tử RAPD biểu hiện đa hình về kiểu gen giữa R- và S-pools. M, 100 bp molecular ladder, 1, giống kháng làm mẹ H7996; 2, - pool; 3, giống nhiễm làm bố Wva700; 4, - pool. Các đoạn biểu hiện đa hình về kiểu gen giữa R- và S-pool được chỉ bằng các mũi tên

3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



Hình 2. Sản phẩm điện di của các chỉ thị phân tử RAPD biểu hiện đa hình về kiểu gen giữa R- và S-pools được kiểm chứng trên 6 dòng kháng và 6 dòng nhiễm tạo nên các R- và S-pools tương ứng. M, 100 bp molecular ladder, 1, giống kháng làm mẹ H7996; 2, giống nhiễm làm bố WVa700; 3-8, các dòng kháng RIL#26, 32, 41, 74, 162, và 200 tương ứng; 9-14, các dòng nhiễm RIL#30, 79, 158, 170, 182, và 183 tương ứng. Các đoạn biểu hiện đa hình về kiểu gen giữa R- và S-pool được chỉ bằng các mũi tên

Bảng 1. Các dòng tái tổ hợp RIL tạo nên các R- và S-pools và các giống bố mẹ được đánh giá về kiểu gen sử dụng các chỉ thị phân tử RAPD biểu hiện đa hình về kiểu gen

Dòng/giống	Chỉ thị phân tử RAPD					
	UBC#176 (400 và 900bp)	UBC#205	UBC#287	UBC#317	UBC#350	UBC#676
Hawaii7996	H	H	H	H	H	H
WVa700	W	W	W	W	W	W
RIL-26	H	H	H	H	W	H
RIL-32	H	H	H	H	H	H
RIL-41	H	H	H	H	H	H
RIL-74	H	H	H	H	H	H
RIL-162	H	W	W	H	H	W
RIL-200	H	H	H	H	H	H
RIL-30	W	W	W	W	W	W
RIL-79	W	W	W	W	W	W
RIL-158	W	W	W	W	W	W
RIL-170	W	W	W	W	W	W
RIL-182	W	W	W	W	W	W
RIL-183	W	W	W	W	W	W

H: kiểu gen giống H7996; W: kiểu gen giống WVa700

4. KẾT LUẬN

Tổng cộng 800 mỗi RAPD được dùng để đánh giá kiểu gen của H7996 và Wva700 và chỉ có 23 mỗi RAPD biểu hiện đa hình về kiểu gen giữa 2 giống bố và mẹ và chỉ có sáu mỗi trong số này (UBC # 176, 205, 287, 317, 350 và 676) biểu hiện đa hình về kiểu gen giữa R-và S-pool. Trong số này, chỉ có hai chỉ thị UBC # 176 và 317 liên kết chặt (100%) với gen kháng bệnh héo xanh vi khuẩn. Chính vì vậy, các chỉ thị phân tử RAPD UBC#176 và 317 liên kết với gen kháng bệnh héo xanh vi khuẩn nên được ứng dụng trong chọn tạo giống sẽ giúp các nhà chọn tạo giống loại bỏ được cá thể không mang gen kháng. Như vậy sẽ tiết kiệm thời gian chi phí trong quá trình chọn tạo giống.

Lời cảm ơn

Chúng tôi cảm ơn Trung tâm Rau Thế giới (AVRDC) cung cấp mẫu ADN của 12 dòng lai tái tổ hợp (RILs) ở thế hệ F₉, được tạo từ tổ hợp lai H7996 (*S. lycopersicum*, kháng) và WVa700(*S. pimpinellifolium*, mẫn cảm) và tiến sĩ Jaw-Fen Wang đã trao đổi thông tin và gửi mẫu ADN cho chúng tôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Du, Z., Hou, R., Zhu, Y., Li, X., Zhu, H., Wang, Z. (2011). *A random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular marker linked to late-bolting gene in pak-choi (Brassica campestris ssp chinensis Makino L.)*. African Journal of Biotechnology 10, 7962-7968.
- [2]. Hayward, A. C. (1991). *Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by Pseudomonas-solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29, 65-87.
- [3]. Hong, J. C., Momol, M. T., Ji, P., Olson, S. M., Colee, J., Jones, J. B. (2011). *Management of bacterial wilt in tomatoes with thymol and acibenzolar-S-methyl*. Crop Protection 30, 1340-1345.
- [4]. Mejía, L., Garcia, B. E., Fulladolsa, A. C., Ewert, E. R., Wang, J.-F., Scott, J. W., Allen, C., Maxwell, D. P. (2009). *Evaluation of recombinant inbred lines for resistance to Ralstonia solanacearum in Guatemala and preliminary data on PCR-based tagging of introgressions associated with bacterial wilt-resistant line, Hawaii 7996*. Report Tomato genetic cooperation 59, 32-41.
- [5]. Miao, L., Shou, S., Cai, J., Jiang, F., Zhu, Z., Li, H. (2009). *Identification of two AFLP markers linked to bacterial wilt resistance in tomato and conversion to SCAR markers*. Molecular Biology Reports 36, 479-486.
- [6]. Michelmore, R., Paran, I., Kesseli, R. V. (1991). *Identification of marker linked to disease resistance gene by bulk segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations*. Proceedings of the National Academy of Sciences 88, 9828-9832.
- [7]. Nakaho, K., Takaya, S., Sumida, Y. (1996). *Conditions that increase latent infection of grafted or non-grafted tomatoes [Lycopersicon esculentum] with Pseudomonas solanacearum*. Annals of the Phytopathological Society of Japan 62, 234-239.
- [8]. Panthee, D. R., Foolad, M. R. (2012). *A reexamination of molecular markers for use in marker-assisted breeding in tomato*. Euphytica 184, 165-179.
- [9]. Schonfeld, J., Gelsomino, A., van Overbeek, L. S., Gorissen, A., Smalla, K., van Elsas, J. D. (2003). *Effects of compost addition and simulated solarisation on the fate of Ralstonia solanacearum biovar 2 and indigenous bacteria in soil*. Fems Microbiology Ecology 43, 63-74.
- [10]. Singh, M., Chaudhuri, I., Mandal, S. K., Chaudhuri, R. K. (2011). *Development of RAPD markers linked to Fusarium wilt resistance gene in Castor Bean (Ricinus communis L.)*. Genetic Engineering and Biotechnology Journal 2011, GEBJ-28.
- [11]. Truong, H. T. H., Esch, E., Wang, J.-F. (2008). *Resistance to Taiwanese race 1 strains of Ralstonia solanacearum in wild tomato germplasm*. European Journal of Plant Pathology 122, 471-479.
- [12]. Wang, J.-F., Ho, F.-I., Truong, H. T. H., Huang, S.-M., Balatero, C. H., Dittapongpitch, V., Hidayati, N. (2013). *Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar 'Hawaii*

- 7996' to *Ralstonia solanacearum*. Euphytica 190, 241-252.
- [13]. Wang, J. F., Hanson, P. M., Barnes, J. A. (1998). *Worldwide evaluation of an international set of resistance sources to bacterial wilt in tomato*, In: Prior, P., Allen, C., Elphinstone, J. (Eds.), *Bacterial wilt disease: Molecular and ecological aspects*. Springer-Verlog, Berlin, pp. 269-275.
- [14]. Wang, J. F., Olivier, J., Thoquet, P., Mangin, B., Sauviac, L., Grimsley, N. H. (2000). *Resistance of tomato line Hawaii7996 to Ralstonia solanacearum Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus*. Molecular Plant-Microbe Interactions 13, 6-13.
- [15]. Yang, W. C., Francis, D. M. (2005). *Marker-assisted selection for combining resistance to bacterial spot and bacterial speck in tomato*. Journal of the American Society for Horticultural Science 130, 716-721.

IDENTIFICATION OF RAPD MARKERS LINKED TO BACTERIAL WILT (*Ralstonia solanacearum*) RESISTANCE IN TOMATO USING BULKED-SEGREGANT ANALYSIS

Truong Thi Hong Hai¹, Tran Viet Thang¹, Nguyen Thi Thu Thuy¹, Phan Thi Phuong Nhi¹, Nguyen Duy Phong¹

¹Agronomy Faculty, Hue University of Agriculture and Forestry, Hue University

Summary

The identification of Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) markers were reported that linked to bacterial wilt resistance. Bulk segregant analysis was employed for rapid identification of RAPD markers linked to resistance genes. Genomic DNA from six resistant F₂ RILs (RIL#26, 32, 41, 74, 162, and 200) and six susceptible F₂ RILs (RIL#30, 79, 158, 170, 182, and 183), which derived from a cross between *S. lycopersicum* Hawaii7996 (resistant parent) and *S. pimpinellifolium* WVa700 (susceptible parent), were pooled in to an R-pool and an S-pool, respectively. A total of 800 RAPD primers screened, only six primers (UBC#176, 205, 287, 317, 350, and 676) showed polymorphism between R- and S- pools. Of these, only two markers UBC#176 and 317 revealed a 100% linkage in the individual plants comprising the contrasting bulks. Thus, use of RAPD markers UBC#176 and 317 could facilitate early selection of resistant lines for bacterial wilt resistance.

Keywords: Bulk-segregant analysis, marker-assisted selection, *Ralstonia solanacearum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum pimpinellifolium*.

Người phân biện: PGS.TS. Lê Tuấn Nghĩa

Ngày nhận bài: 1/11/2013

Ngày thông qua phân biện: 2/12/2013

Ngày duyệt đăng: 9/12/2013