Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
website: sj.ctu.edu.vn

NHẬN DIỆN TÍNH KHÁNG BỆNH ĐỐM ĐEN Ở CÂY HOA HỒNG (*Rosa* L. HYBRID) BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ SSR

Nguyễn Lộc Hiền[1] và Huỳnh Kỳ[1]
[1] *Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ*

Thông tin chung:
Ngày nhận: 12/07/2014
Ngày chấp nhận: 27/04/2015

Title:
Identifying the resistance to black spot disease on rose (Rosa L. Hybrid) using SSR markers

Từ khóa:
Bệnh đốm đen, cây hoa hồng, tính kháng, SSR

Keywords:
Black spot disease, Rose, Resistance, SSR

ABSTRACT

The black spot disease is a major problem in the production of field-grown roses, as it causes significant losses of yields and quality. In the present study, 20 rose varieties were used to identify the black spot disease resistant varieties by using two SSR molecular markers 155SSR and 69Mic for the Rdr1 resistant gene. Results showed that 13 out of 20 varieties were resistant to black spot disease and 7 out of 20 varieties were susceptible in the field condition. There were 12 out of 13 resistant varieties linked to Rdr1 gene through 155SSR (157 bp) and 69Mic markers (249 bp). Mussay was the only field-resistant variety which was not identified by Rdr1 locus. Four susceptible varieties were also screened by these markers. These results indicated that 155SSR and 69Mic are valuable SSR markers to identify the resistant varieties to black spot disease in rose and very useful for breeding program of black spot disease resistance.

TÓM TẮT

Bệnh đốm đen là một bệnh nguy hiểm và đáng lo ngại trên cây hoa hồng. Bệnh ảnh hưởng nghiêm trọng đến quá trình sinh trưởng phát triển cây và gây thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng của hoa hồng. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích nhận diện những giống hoa hồng kháng bệnh đốm đen trong tập đoàn 20 giống hoa hồng được trồng tại Trường Đại học Cần Thơ bằng 2 chỉ thị phân tử SSR là 155SSR và 69Mic đối với gen Rdr1. Đánh giá sự xuất hiện bệnh ngoài vườn cho thấy có 13/20 giống không bị bệnh và 7/20 giống nhiễm bệnh đốm đen. Trong 13 giống không bị bệnh đốm đen, ngoại trừ giống Mussay, cả 12 giống còn lại đều xuất hiện các băng DNA liên kết với gen kháng bệnh đốm đen Rdr1 ở 2 chỉ thị phân tử 155SSR (157 bp) và 69Mic (249 bp). Có 4 giống nhiễm cũng được nhận diện bằng 2 chỉ thị phân tử này. Kết quả này cho thấy có thể sử dụng 2 chỉ thị SSR 155SSR và 69Mic để nhận diện nhanh tính kháng bệnh đốm đen ở cây hoa hồng, và có thể sử dụng làm cơ sở khoa học cho việc lai tạo và chọn lọc các giống hoa hồng kháng bệnh đốm đen.

1 GIỚI THIỆU

Hoa hồng là một trong những loại hoa có giá trị kinh tế cao và có ảnh hưởng sâu sắc đến đời sống tinh thần của con người. Tuy nhiên, những năm gần đây sản lượng và lợi nhuận thu được từ cây hoa hồng đang giảm xuống do nhiều loại dịch hại xuất hiện, trong đó nguy hiểm nhất là bệnh đốm đen do nấm *Diplocarpon rosae* gây nên.

Bệnh đốm đen trên hoa hồng xuất hiện nhiều trong mùa mưa. Bệnh có chiều hướng phát triển

mạnh trong vài năm gần đây có thể ảnh hưởng nghiêm trọng đến quá trình sinh trưởng và phát triển của cây, làm giảm giá trị kinh tế của cây hoa hồng (Vũ Quang Lãng, 2009). Hiện nay, đã có nhiều biện pháp được các nhà vườn áp dụng để phòng ngừa dịch bệnh đốm đen trên cây hoa hồng, trong đó, việc chọn trồng những giống hoa hồng có khả năng kháng bệnh được quan tâm hàng đầu. Tuy nhiên, phương pháp chọn giống kháng bằng cách truyền thống thì khó khăn và tốn thời gian.

Gần đây, trên thế giới đã có một số nghiên cứu sử dụng chỉ thị phân tử SSR để nhận diện tính kháng đối với bệnh đốm đen ở cây hoa hồng (Biber *et al*., 2009; Yan *et al*., 2005) dựa trên gen *Rdr1*, một gen đơn kháng bệnh đốm đen ở dạng trội (Biber *et al*., 2009). Kết quả nhận diện của chỉ thị SSR nhanh, đáng tin cậy, có khả năng lặp lại, chính xác và có hiệu quả cao. Ở Việt Nam, trong những năm gần đây việc nghiên cứu và ứng dụng chỉ thị phân tử trên cây trồng cũng được nhiều nhà khoa học quan tâm. Tuy nhiên vẫn chưa có những nghiên cứu cụ thể nào về bệnh đốm đen trên hoa hồng.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm nhận diện những giống hoa hồng kháng bệnh đốm đen bằng chỉ thị phân tử SSR để làm cơ sở cho việc lai tạo và chọn lọc các giống hoa hồng kháng bệnh đốm đen và cho các nghiên cứu về bệnh đốm đen gây hại cây hoa hồng.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu và phương pháp đánh giá tính kháng bệnh đốm đen ngoài đồng

Thí nghiệm sử dụng 20 giống hoa hồng được thu thập tại Công ty Sản xuất hoa Phượng Trung (Đồng Tháp) và Vườn hoa kiểng Tư Điều (An Giang) và được trồng tại trại thực nghiệm (Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ). Các giống được trồng ngẫu nhiên trong 10 liếp, kích thước mỗi liếp 1m x 3m, khoảng cách giữa 2 liếp là 0,5 m, mỗi liếp trồng 2 giống, mỗi giống 3 cây (1 cây/lặp lại).

Các giống hoa hồng được trồng, chăm sóc và quản lý tình trạng sinh trưởng của cây, chỉ phun xịt thuốc trừ dịch hại khi bị nhiễm sâu bệnh khác. Trong quá trình theo dõi, ghi nhận tình hình nhiễm bệnh đốm đen như các triệu chứng xuất hiện bệnh, bộ phận cây bị nhiễm bệnh, tỉ lệ bệnh và cấp bệnh (Bảng 1). Tỉ lệ bệnh được đánh giá trên toàn cây (như một lần lặp lại) bằng cách đếm tất cả lá và đánh giá biểu hiện bệnh tự nhiên. Cấp bệnh là giá trị trung bình cấp bệnh của các lá bị nhiễm bệnh.

Bảng 1: Các cấp bệnh đốm đen trên lá hoa hồng (Ngô Thành Trí, 2009)

Cấp bệnh	Tình trạng lá
0	Lá không bị bệnh
1	Dưới 25% diện tích lá bị bệnh
2	Từ 25% đến 50% diện tích lá bị bệnh
3	Trên 50% đến 75% diện tích lá bị bệnh
4	Trên 75% diện tích lá bị bệnh

2.2 Phản ứng khuếch đại DNA (PCR)

DNA được ly trích và tinh sạch theo phương pháp CTAB rút gọn (Doyle, 1991) để sử dụng thực hiện phản ứng khuếch đại PCR-SSR. Hỗn hợp phản ứng PCR được thực hiện với thể tích 10 µl bao gồm nước cất vô trùng, PCR buffer 10X, dNTPs 2mM, 2,5mM primer, Taq polymerase 5U/µl và DNA 40ng/µl. Phản ứng PCR-SSR với 2 chỉ thị SSR là 155SSR và 69Mic nhận diện tính kháng bệnh đốm đen do gen *Rdr1* (Bảng 2), được thực hiện qua 40 chu kỳ gia nhiệt trên máy PCR GeneAmp PCR system 2700 như sau: 3 phút ở 94^0C, 40 chu kỳ gồm 30 giây ở 94^0C, 30 giây ở 58^0C và 40 giây ở 72^0C, và cuối cùng là 10 phút ở 72^0C. Sản phẩm PCR được trữ ở 4^0C. Sản phẩm PCR sẽ được điện di trên gel polyarcylamide 6% trong dung dịch TBE 1X. Sau đó gel được nhuộm với dung dịch ethidium bromide và các đoạn DNA khuếch đại sẽ được ghi nhận và phân tích.

Bảng 2: Trình tự của 2 chỉ thị phân tử SSR được sử dụng (Biber *et al.*, 2009)

Chỉ thị SSR	Trình tự (5'-3')
155SSR	Forward: GAAAAGAACGAGGGGTTTCC Reverse: ACGGTCGGTAATCAAGATGC
69Mic	Forward: GGTTTGGGTTTTATTTGCTTTG Reverse: ACGCAAGAAAATGAGGGGTA

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Bệnh đốm đen trong vườn

Bệnh đốm đen hoa hồng có thể xuất hiện trên lá, thân cành, nụ hoa, hoa… nhưng chủ yếu là trên lá. Ban đầu vết bệnh chỉ là những vết tròn nhỏ có màu đen hoặc xám, sau lan rộng dần. Trên vết bệnh xuất hiện những chấm màu đen mịn như nhung. Nếu nặng, nhiều vết bệnh liên kết lại với nhau tạo thành những mảng lớn, làm cho lá vàng, bị rụng, thường những lá già phía dưới bị rụng trước, sau

đó là những lá phía trên làm cho cây hoa hồng sinh trưởng và phát triển kém, còi cọc, cho hoa nhỏ, xấu và ít hoa (Vũ Quang Lãng, 2009). Khi bệnh trở nên nặng hơn, thân cây dần trơ trọi và xơ xác dẫn đến chết cả cây. Bệnh này sẽ ảnh hưởng đến khả năng quang hợp và cây sẽ chết dần.

Qua đánh giá tình hình bệnh trạng trên lá, 20 giống hoa hồng khảo sát được chia làm 3 nhóm biểu hiện (Bảng 3).

– Nhóm cây nhiễm bệnh nặng (cấp 3-4): bao gồm 4 giống là Vàng Thái Lan, Hồng Nhung, Trắng Thủy Tinh và Tường Vi. Các giống này có tỉ lệ lá bị nhiễm bệnh từ 60%- 80%. Trong đó, giống Vàng Thái Lan có tỉ lệ lá nhiễm bệnh cao nhất là 80%. Hầu hết các lá non xuất hiện nhiều vết bệnh màu đen hay loang lổ, lá vàng đi, rụng nhiều, cây xơ xác.

– Nhóm nhiễm bệnh nhẹ (cấp 1-2): thuộc về 3 giống Hồng Cam, Cam Gai và Tím Nhạt. Các giống này có những cây bệnh đốm đen vừa xuất hiện nhưng tỉ lệ bệnh còn thấp, chưa ảnh hưởng nhiều đến sự sinh trưởng và phát triển của cây hồng. Tỉ lệ lá nhiễm bệnh trung bình là 20- 30%, trong đó giống Tím Nhạt nhiễm bệnh nhẹ nhất 20%.

– Nhóm chưa nhiễm bệnh: gồm có 13 giống. Ở những giống này, cây tạm thời chưa bị nhiễm bệnh đốm đen ở thời điểm đánh giá.

Kết quả khảo sát cho thấy hầu hết giống bị bệnh đốm đen xuất hiện trên lá phù hợp với những nghiên cứu trước (Vũ Quang Lãng, 2009) và vẫn chưa ghi nhận tình trạng bệnh xuất hiện trên bất kỳ bộ phận nào khác như thân, nụ hoa,...

Bảng 3: Tình hình bệnh đốm đen trên lá ở 20 giống hoa hồng trong vườn

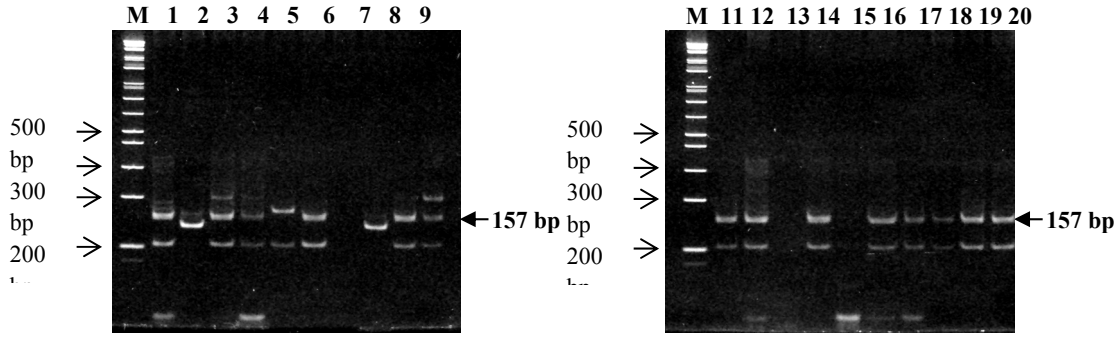
Giống	Tỉ lệ bệnh (%)	Cấp bệnh	Triệu chứng đánh giá được
Giống nhiễm nặng (4 giống)			
Vàng Thái Lan	80	3	Lá rụng chỉ còn lại vài lá, thân trơ trọi, khô cằn, lá loang lổ các vết bệnh, không có hoa.
Hồng Nhung	70	3	Lá vàng rụng nhiều, cây xơ xác.
Trắng thủy tinh	60	3	Lá bệnh, cây còi cọc và ít hoa
Tường Vi	70	4	Lá già vàng rụng nhiều, một số lá non loang lổ các vết hoại tử, cây chỉ còn lại vài lá trơ trọi, không có hoa.
Giống nhiễm nhẹ (3 giống)			
Hồng Cam	30	2	Các vết bệnh màu nâu đen xuất hiện ở các lá già và một ít các lá non.
Cam Gai	30	2	Các vết bệnh trên lá già chuyển sang màu đen, những chấm tròn này lan rộng ra tạo các vết hoại tử.
Tím Nhạt	20	1	Một số lá già bắt đầu xuất hiện những chấm màu nâu li ti.
Giống chưa nhiễm (13 giống)			

Mussay, Nữ hoàng, Vàng Hà Lan, Tỉ Muội Cam, Hồng Cà Rốt, Tỉ Muội Đỏ, Đỏ đậm, Tỉ muội trắng, Kiss Nhạt, Vàng Viền, Hồng Phấn, Hồng Lửa và Cam viền

3.2 Nhận diện tính kháng bệnh đốm đen bằng chỉ thị phân tử SSR

Nhận diện giống hoa hồng kháng bệnh đốm đen bằng chỉ thị phân tử 155SSR

Kết quả phân tích phổ điện di sử dụng chỉ thị phân tử 155SSR được thể hiện trong Hình 1. Theo nghiên cứu của Biber *et al*. (2009), đối với chỉ thị 155SSR, sản phẩm PCR ở vị trí 157 bp tương ứng với biểu hiện kiểu hình kháng đối với bệnh đốm đen trên hoa hồng. Như vậy, trong bộ giống này có 14 giống mang gen kháng bệnh này, bao gồm giống Cam Viền, Trắng Thủy Tinh, Tỉ Muội Trắng, Đỏ Đậm, Hồng Phấn, Kiss Nhạt, Nữ Hoàng, Vàng Viền, Vàng Hà Lan, Vàng Thái Lan, Hồng Cam, Hồng Cà Rốt, Tỉ Muội Cam và Hồng Lửa. Còn 6 giống còn lại (Mussay, Cam Gai, Hồng Nhạt, Tím Nhạt, Tường Vi và Tỉ Muội Đỏ) không mang gen kháng bệnh đốm đen *Rdr1*.



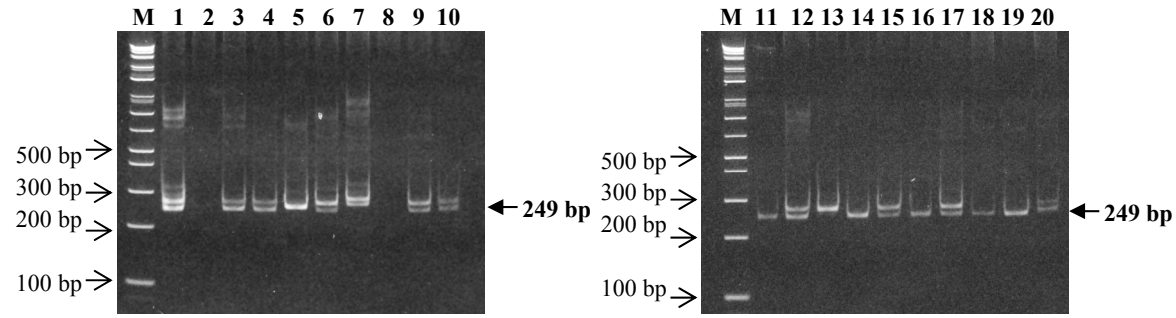
Hình 1: Phổ điện di của primer 155SSR

M: ladder 1Kb Plus Invitrogen, 1. Cam Viền, 2. Mussay, 3. Trắng Thủy Tinh, 4. Tí Muội Trắng, 5. Cam Gai, 6. Đỏ Đậm, 7. Hồng Nhung, 8. Tím Nhạt, 9. Hồng Phấn, 10. Kiss Nhạt, 11. Nữ Hoàng, 12. Vàng Viền, 13. Tường Vi, 14. Vàng Hà Lan, 15. Tí Muội Đỏ, 16. Vàng Thái Lan, 17. Hồng Cam, 18. Hồng Cà Rốt, 19. Tí Muội Cam, 20. Hồng Lửa

Nhận diện giống hoa hồng kháng bệnh đốm đen bằng chỉ thị phân tử 69Mic

Đối với chỉ thị phân tử 69Mic, băng DNA vị trí 249 bp cho phép nhận diện giống mang gen kháng bệnh đốm đen *Rdr1* (Biber *et al*., 2009). Quan sát phổ điện di ở Hình 2 cho thấy có 14 giống hoa hồng trong bộ sưu tập này chỉ ra băng 249 bp nghĩa là 13 giống này có chứa gen kháng bệnh đốm đen. Sáu giống còn lại không mang gen kháng bệnh đốm đen, đó là các giống Mussay (băng số 2), Cam Gai (băng số 5), Hồng Nhung (băng số 7), Tím Nhạt (băng số 8), Tường Vi (băng số 13) và Hồng Lửa (băng số 20).

Tuy nhiên, khi so sánh giữa 2 chỉ thị phân tử 155SSR và 69Mic cho thấy có sự khác biệt ở 2 giống Tí Muội Đỏ và Hồng Lửa. Giống Tí Muội Đỏ biểu hiện nhiễm với chỉ thị 155SSR nhưng có băng kháng ở 69Mic trong khi giống Hồng Lửa lại chỉ có băng kháng ở 155SSR nhưng không có băng kháng ở 669Mic. Như vậy, giữa 2 chỉ thị chỉ tương đồng về kiểu gen kháng ở 13 giống trong bộ sưu tập giống hoa hồng này.



Hình 2: Phổ điện di của primer 69Mic

M: ladder 1Kb Plus Invitrogen, 1. Cam Viền, 2. Mussay, 3. Trắng Thủy Tinh, 4. Tí Muội Trắng, 5. Cam Gai, 6. Đỏ Đậm, 7. Hồng Nhung, 8. Tím Nhạt, 9. Hồng Phấn, 10. Kiss Nhạt, 11. Nữ Hoàng, 12. Vàng Viền, 13. Tường Vi, 14. Vàng Hà Lan, 15. Tí Muội Đỏ, 16. Vàng Thái Lan, 17. Hồng Cam, 18. Hồng Cà Rốt, 19. Tí Muội Cam, 20. Hồng Lửa

Thảo luận chung về nhận diện giống hoa hồng kháng bệnh đốm đen

Để có thể xác định hiệu quả của việc nhận diện giống kháng bằng chỉ thị phân tử, kết quả đã được so sánh với những biểu hiện bệnh trong vườn đánh giá được (Bảng 4). Có 2 trường hợp xảy ra như sau:

Trường hợp 1: Kết quả phân tích SSR tương đồng với thí nghiệm ngoài vườn

– Có 10 giống dương tính (+) có mang gen kháng bệnh đốm đen *Rdr1* gây ra ở cả 2 chỉ thị phân tử và không bị nhiễm bệnh ngoài vườn. Đó là các giống Cam Viền, Tí Muội Trắng, Đỏ Đậm, Hồng Phấn, Kiss Nhạt, Nữ Hoàng, Vàng Viền, Vàng Hà Lan, Hồng Cà Rốt và Tí Muội Cam.

– Riêng 2 giống Tỉ Muội Đỏ và Hồng Lửa đều không bị nhiễm bệnh trong vườn nhưng chỉ nhận diện được bằng một trong hai chỉ thị phân tử (giống Tỉ Muội Đỏ biểu hiện kháng với chỉ thị 69Mic còn giống Hồng Lửa kháng với chỉ thị 155SSR).

– Có 4 giống âm tính (-) với cả 2 chỉ thị và nhiễm bệnh ngoài vườn là Cam Gai, Hồng Nhung, Tím Nhạt và Tường Vi.

Trường hợp 2: Kết quả phân tích SSR không tương đồng với thí nghiệm ngoài vườn.

Bảng 4: Sự biểu hiện tính kháng bệnh đốm đen qua khảo nghiệm trong vườn và phân tích chỉ thị phân tử SSR

Giống	Chỉ thị phân tử [a]		Tính kháng ngoài đồng [b]
	155SSR	69Mic	
Cam Viền	+	+	+
Mussay	-	-	+
Trắng Thủy Tinh	+	+	-
Tỉ Muội Trắng	+	+	+
Cam Gai	-	-	-
Đỏ Đậm	+	+	+
Hồng Nhung	-	-	-
Tím Nhạt	-	-	-
Hồng Phấn	+	+	+
Kiss Nhạt	+	+	+
Nữ Hoàng	+	+	+
Vàng Viền	+	+	+
Tường Vi	-	-	-
Vàng Hà Lan	+	+	+
Tỉ Muội Đỏ	-	+	+
Vàng Thái Lan	+	+	-
Hồng Cam	+	+	-
Hồng Cà Rốt	+	+	+
Tỉ Muội Cam	+	+	+
Hồng Lửa	+	-	+

(+): mang gen kháng;(-): không mang gen kháng; [b] (+): không bệnh;(-): nhiễm bệnh

– Ghi nhận cho thấy có 3 giống Trắng Thủy Tinh, Vàng Thái Lan và Hồng Cam có mang gen kháng *Rdr1* với 2 chỉ thị 155SSR và 69Mic nhưng lại nhiễm bệnh đốm đen khi trồng ngoài vườn. Điều này có thể do các gen kháng chưa gặp điều kiện thuận lợi để phát huy tính kháng bệnh đốm đen.

– Musay là giống duy nhất có kết quả âm tính đối với cả 2 chỉ thị phân tử, nghĩa là không mang gen kháng bệnh đốm đen *Rdr1*, nhưng lại không nhiễm bệnh đốm đen khi khảo sát ngoài vườn. Có khả năng do giống Musay có gen kháng khác với *Rdr1* nên 2 chỉ thị phân tử 155SSR và 69Mic không liên kết được, cũng có thể do giống này trong thời gian khảo sát thí nghiệm giống chưa nhiễm bệnh.

4 KẾT LUẬN

Bằng 2 chỉ thị phân tử 155SSR và 69Mic để nhận diện gen kháng *Rdr1* trong 20 giống hoa hồng cho thấy có 12 giống kháng và 4 giống nhiễm tương ứng với đánh giá sự biểu hiện bệnh ngoài vườn. Kết quả nghiên cứu này cho thấy có thể ứng dụng 2 chỉ thị phân tử SSR 155SSR và 69Mic để nhận diện các giống hoa hồng có mang gen kháng bệnh đốm đen và sử dụng trong các chương trình chọn giống hoa hồng kháng bệnh đốm đen.

TAI LIỆU THAM KHẢO

1. Biber A, Kaufmann H and Linde M, 2009. Molecular markers from a BAC contig spanning the *Rdr1* locus: a tool for marker-assisted selection in roses. Theor Appl Genet 120:765–773.
2. Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus 12:13-15.
3. Ngô Thành Trí. 2009. Bài giảng Bệnh cây trồng, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.
4. Vũ Quang Lãng. 2009. Bệnh đốm đen hại hoa hồng. NXB Nông nghiệp Hà Nội.
5. Yan Z, Denneboom C, Hattendorf A and Dolstra O. 2005. Theor Appl Genet 110: 766–777.