

SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY TRÊN LÁ TRONG CHỌN GIỐNG ĐẬU TƯƠNG KHÁNG *CERCOSPORA KIKUCHII*

Takeshi Kashiwa¹, Miguel Angel Lavilla², Antonio Diaz Paleo^{2,3},
Antonio Juan Gerardo Ivancovich² and Naoki Yamanaka¹

⁽¹⁾ Bộ phận Tài nguyên Sinh vật và Sau thu hoạch, Trung tâm Nghiên cứu Quốc tế về Khoa học Nông nghiệp Nhật Bản (JIRCAS), Tsukuba, Ibaraki, 305-8686, Nhật Bản

⁽²⁾ Đại học Quốc gia Tây Bắc Buenos Aires (UNNOBA), Pergamino, Tỉnh Buenos Aires, C.P.2700, Argentina

⁽³⁾ Viện Công nghệ Nông nghiệp Quốc gia (INTA), Pergamino, Tỉnh Buenos Aires, C.P.2700, Argentina

TÓM TẮT

Bệnh cháy lá *Cercospora* (CLB) gây thiệt hại trên diện rộng trong sản xuất đậu tương trên toàn thế giới, bao gồm cả các nước sản xuất đậu tương lớn như Argentina. *Cercospora kikuchii*, *C. cf. sigesbeckiae*, *C. cf. flagellaris* và *C. cf. nicotianae* được xác định là mầm bệnh của CLB. Khả năng kháng CLB của đậu tương vẫn chưa được biết rõ. Ngoài ra, việc kiểm soát hóa chất đối với CLB đang mất hiệu quả vì khả năng kháng thuốc diệt nấm của các mầm bệnh như *C. kikuchii*. Chúng tôi cấp thiết chọn tạo giống kháng CLB. Đáng tiếc, các phương pháp hiệu quả để sàng lọc kiểu gen đậu tương kháng thuốc vẫn chưa được thiết lập. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết kế một phương pháp cây mới, thông lượng cao để xác định khả năng kháng một trong những mầm bệnh CLB, *C. kikuchii*. Chúng tôi sử dụng sợi nấm được nuôi cấy lỏng của mầm bệnh *C. kikuchii* trên lá đậu tương được tách ra. Tổn thương trên lá đậu tương xuất hiện sau 9 ngày cấy bằng phương pháp này. Chúng tôi sử dụng phương pháp này để chọn bốn kiểu gen kháng *C. kikuchii* từ 80 kiểu gen trong Bộ sưu tập đậu tương thế giới. Phương pháp sàng lọc thông lượng cao được phát triển trong nghiên cứu này có thể đóng góp vào nghiên cứu về tính kháng của *C. kikuchii* bằng cách tạo điều kiện xác định các giống kháng.

Từ khóa: *Cercospora kikuchii*, Bệnh cháy lá (CLB), nấm bệnh, phương pháp cấy ghép, đậu tương

GIỚI THIỆU

Bệnh cháy lá *Cercospora* (CLB), do nấm bệnh được phân loại trong chi *Cercospora* gây ra, là mối đe dọa toàn cầu trong sản xuất đậu tương (*Glycine max* (L.) Merr.). Bệnh đã được báo cáo ở ba nước sản xuất đậu tương lớn ở Nam Mỹ; cụ thể là Argentina, Brazil và Paraguay (Wrather và cs, 2010). *Cercospora kikuchii* (Tak. Matsumoto & Tomoy.) M. W. Gardner được xác định là mầm bệnh của CLB (Matsumoto và Tomoyasu 1925). Gần đây, *Cercospora spp.* chẳng hạn như *C. cf. sigesbeckiae*, *C. cf. flagellaris* và *C. cf. nicotianae* còn được gọi là tác nhân gây bệnh CLB (Albu và cs, 2016; Sautua và cs, 2020; Soares và cs, 2015). Trong số bốn tác nhân gây bệnh CLB, hồ sơ của *C. kikuchii* đã được nghiên cứu kỹ lưỡng. Tác nhân gây bệnh gây ra các vết bệnh có màu tím sẫm trên lá và cuống lá và làm rụng lá sớm (Matsumoto và Tomoyasu 1925; Walters 1980). Bệnh làm giảm sản lượng đậu tương do rụng lá ở giai đoạn phát triển cuối cùng của cây trồng (Walters 1980). *C. kikuchii* cũng gây ra một vấn đề trên hạt được gọi là vết tím hạt (PSS) (Roy và Abney 1976; Suzuki 1921). Một yếu tố gây bệnh chính của mầm bệnh là sắc tố màu tím cercosporin (Daub và Hangarter 1983; Kuyama và Tamura 1957; Yamazaki và cộng sự 1975). Ứng dụng thuốc diệt nấm là một trong những chiến lược chính để quản lý

căn bệnh này. Tuy nhiên, việc sử dụng lâu dài các hóa chất này có thể dẫn đến việc kháng thuốc trừ nấm đối với nấm bệnh trên đồng ruộng (Price và cs, 2015). Để quản lý bệnh này, nên sử dụng các giống đậu tương kháng *C. kikuchii*.

Tính kháng di truyền chống lại PSS đã được báo cáo ở một số giống (Alloatti và cs, 2015; Jackson và cs, 2006, 2008; Wilcox và cs, 1975). Tuy nhiên, có ý kiến cho rằng không có mối tương quan giữa kháng PSS và kháng CLB (Li và cs, 2019; Ward-Gauthier và cs, 2015). Các giống đậu tương kháng lại mầm bệnh CLB như *C. kikuchii* vẫn chưa được biết. Mục tiêu của nghiên cứu này là thiết lập một phương pháp thực tế để sàng lọc các giống đậu tương dựa trên khả năng kháng *C. kikuchii*.

Một số rào cản tồn tại trong việc thiết lập một phương pháp sàng lọc hiệu quả đối với tính kháng *C. kikuchii*. Sự phát triển của bệnh *C. kikuchii* trên lá đậu tương chậm so với các bệnh nấm lá khác như bệnh gỉ sắt đậu tương châu Á (mầm bệnh *Phakopsora pachyrhizi*). Nói chung, mức độ nghiêm trọng của CLB có thể được đánh giá từ 2 đến 3 tuần sau khi điều trị nấm (Cai và cs, 2009). Để đảm bảo các vết bệnh lan rộng trên lá chết, cây nên được giữ trong các điều kiện thích hợp cho nấm phát triển. Điều kiện tối ưu bao gồm độ ẩm cao trong vài tuần trước khi quan sát rõ ràng các vết bệnh đầu tiên. Giữ cây đậu tương được cấy trong thời gian dài sẽ tạo ra nhiều sinh khối. Vì vậy, việc xem xét hiệu quả về thời gian và không gian khi nghiên cứu một phương pháp tầm soát mới cho căn bệnh này là điều cần thiết. Những khó khăn trong việc duy trì sản xuất bào tử của các phân lập *Cercospora* trong nuôi cấy nhân tạo đã được biết rõ (Goode và Brown 1970). Hơn nữa, việc sản xuất bào tử trên môi trường nuôi cấy nhân tạo như thạch dextrose khoai tây (PDA) của một số chủng *C. kikuchii* là không đủ để sàng lọc các kiểu gen đậu tương. Ngoài ra, có thể thu được đủ lượng sợi nấm *C. kikuchii* từ môi trường lỏng như nước dextrose khoai tây (PDB) trong vòng chưa đầy một tuần. Do đó, chúng tôi đã sử dụng sợi nấm để cấy *C. kikuchii*.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát triển một phương pháp sàng lọc thông lượng cao để kháng *C. kikuchii*, được gọi là phương pháp cấy trên lá. Sàng lọc bộ sưu tập đậu tương trên toàn thế giới, chúng tôi đã xác định được các giống có tỷ lệ vết bệnh do *C. kikuchii* trên lá thấp. Quá trình này có thể góp phần kiểm soát căn bệnh tàn phá này bằng cách xác định các kiểu gen kháng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Phân lập nấm và chuẩn bị chất cấy

Có ý kiến cho rằng quần thể *C. kikuchii* ở Nam Mỹ khác với quần thể ở Nhật Bản (Imazaki và cs, 2006). Do đó, chúng tôi đã thu được ba chủng *C. kikuchii* phân lập từ các tỉnh khác nhau của Argentina: # 9 (Pergamino, tỉnh Buenos Aires), # 40 (San Borgita, tỉnh Corrientes) và # 121 (San Miguel de Tucumán, tỉnh Tucumán). Nấm được phân lập từ đậu tương bị bệnh và được xác định là *C. kikuchii* bằng hình thái học. Các quan sát về khuẩn lạc sợi nấm và bào tử của các dòng phân lập phù hợp với tài liệu (Chupp 1953; Ward-Gauthier và cs, 2015). Ba chủng phân lập # 9, # 40 và # 121 được phân nhóm với CPC kiểu cũ 5068 và các phân lập khác của *C. kikuchii* trong cây phát sinh loài có chứa *C. cf. flagellaris*, *C. cf. sigesbeckiae* và *C. cf. nicotianae* (dữ liệu chưa được công bố). Các dòng phân lập được duy trì trên PDA (BD Biosciences, San Jose, CA, U.S.A.) ở 25°C và giữ trong bóng tối để thu được các khuẩn lạc sợi nấm. Thạch có sợi nấm thu hồi từ các đĩa PDA được ngâm trong glycerol 20% và giữ ở nhiệt độ dưới -80°C để bảo quản lâu dài.

Để có được sợi nấm tươi, chúng tôi đã cấy *C. kikuchii* vào 50 đến 100ml PDB (BD Biosciences) trong các bình Erlenmeyer 300ml có vách ngăn (ví dụ: 016310-300A; Công nghệ Khoa học Shibata, Saitama, Nhật Bản). Một mẫu thạch khoảng 5mm² với sợi nấm cắt ra từ đĩa PDA được chuyển vào mỗi bình. Các bình được lắc trên máy lắc quay ở tốc độ 140 vòng/phút trong 4 đến 5 ngày ở 25⁰C. Sau đó, các môi trường nuôi cấy PDB của *C. kikuchii* gần như bị gián đoạn bằng máy xay cầm tay (THM311; Tescom Denki, Tokyo, Nhật Bản) trong 10 giây. Bước này được lặp lại ba lần. Môi trường nuôi cấy được lọc bằng cách sử dụng gạc một lớp để loại bỏ các mảnh sợi nấm kết tụ. Phần nuôi cấy đã lọc được ly tâm ở 2.330 × g trong 10 phút, và phần nổi phía trên thu được được loại bỏ. Nước cất được hấp tiệt trùng với Tween 20 0,02% (thể tích) được sử dụng để chuẩn bị huyền phù sợi nấm. Nồng độ của các mảnh sợi (kích thước khoảng 0,05mm hoặc lớn hơn) được đếm bằng máy đo huyết cầu và được điều chỉnh thành 1,0 × 10⁵ sợi/ml.

Sàng lọc tính kháng *C. kikuchii* trên các giống đậu tương

Danh sách các giống đậu tương được sử dụng để cấy giống được cung cấp trong Bảng 1. Hạt giống đậu tương của Bộ sưu tập đậu tương thế giới (WC) được lấy từ Ngân hàng gen của Tổ chức Nghiên cứu Lương thực và Nông nghiệp Quốc gia (NARO). WC chứa 96 giống đại diện cho các đặc tính khác nhau trên toàn thế giới của đậu tương (Kaga và cs, 2012). Các giống đã được chọn lọc từ khoảng 4.000 giống đậu tương dựa trên dữ liệu giấy thông hành, dữ liệu đánh giá, đặc điểm hình thái học và đa hình đơn nucleotide (Kaga và cs, 2012). 80 trong số 96 giống đậu tương đã được sử dụng trong nghiên cứu này. Hạt đậu tương được gieo trên đất bùn ngâm nước. Sự nảy mầm của hạt giống, thúc đẩy sự phát triển của cây và cấy vào lá được thực hiện trong các buồng tăng trưởng LH-350, LH-410S, hoặc LH411-SPC (Nippon Medical & Chemical Instruments, Osaka, Nhật Bản). Quá trình nảy mầm được thúc đẩy ở 28⁰C, trong chu kỳ ánh sáng 14 giờ/ngày bằng cách sử dụng đèn huỳnh quang trắng (100% cường độ ánh sáng). Một tuần sau khi gieo hạt, ba hoặc bốn cây con khỏe nhất được cấy vào chậu có đường kính 113mm và sâu 140mm với đất được lấy từ cánh đồng thí nghiệm của Trung tâm Nghiên cứu Khoa học Nông nghiệp Quốc tế Nhật Bản (JIRCAS, Tsukuba, Ibaraki, Nhật Bản). Cây được duy trì ở 24⁰C với 14 giờ quang chu kỳ hàng ngày (100% cường độ ánh sáng).

Bảng 1. Danh sách các giống đậu tương được sử dụng trong nghiên cứu này

Code ^a	ID ^b	Name of variety	Status	Origin
WC1	GmWMC001	FISKEBY V	Developed variety	Sweden
WC2	GmWMC006	KS 1034	Landrace	Malaysia
WC3	GmWMC011	SEITA	Landrace	Republic of Korea
WC4	GmWMC012	MANSHUU	Landrace	China
WC5	GmWMC014	KLS 203	Landrace	Republic of Korea
WC6	GmWMC015	CHUUHOKU 2	Landrace	Republic of Korea
WC7	GmWMC018	RIGAI SEITOU	Landrace	China
WC8	GmWMC019	CHOUSENSHU (CHA)	Landrace	Korean Peninsula
WC9	GmWMC020	POCHAL	Landrace	Taiwan
WC10	GmWMC022	NEZUMI META	Landrace	Korean Peninsula
WC11	GmWMC024	CHIENEUM KONG	Landrace	Republic of Korea
WC12	GmWMC027	KONGNAMUL KONG	Landrace	Republic of Korea
WC13	GmWMC029	SHIRO SOTA	Landrace	Korean Peninsula
WC14	GmWMC035	PEKIN DAI OUTOU	Landrace	China
WC15	GmWMC036	MASSHOKUTOU (KOU 502)	Landrace	China
WC16	GmWMC038	ICHIGUHUHOU	Landrace	China
WC17	GmWMC042	MASSHOKUTOU (KOU 503)	Landrace	China
WC18	GmWMC045	OKJO	Landrace	Republic of Korea

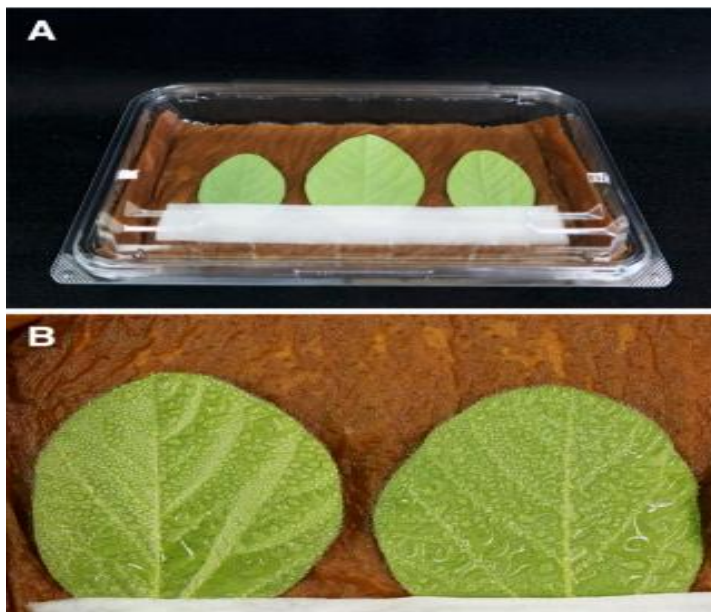
WC19	GmWMC046	KE 32	Landrace	Philippines
WC20	GmWMC048	HEAMNAM	Landrace	Republic of Korea
WC21	GmWMC066	HEUKDAELIP	Landrace	Republic of Korea
WC22	GmWMC070	CHOYOUTOU	Landrace	China
WC23	GmWMC071	PK 73-54	Landrace	India
WC24	GmWMC072	M 581	Landrace	India
WC25	GmWMC073	URONKON	Landrace	Korean Peninsula
WC26	GmWMC075	CHEONGYE MYONGTAE	Landrace	Republic of Korea
WC27	GmWMC083	KEUMDU	Landrace	Republic of Korea
WC28	GmWMC084	PEKING	Landrace	China
WC29	GmWMC086	ANTO SHOUKOKUTOU	Landrace	China
WC30	GmWMC089	BONGCHUNBAEKJAM	Landrace	China
WC31	GmWMC094	JEOKGAK	Landrace	Republic of Korea
WC32	GmWMC103	SENYOUTOU	Landrace	China
WC33	GmWMC107	HAKKA ZASHI	Landrace	China
WC34	GmWMC108	KARASUMAME	Landrace	China
WC35	GmWMC113	BARITOU 3 A	Landrace	Indonesia
WC36	GmWMC115	WILLIAMS 82	Developed variety	U.S.A.
WC37	GmWMC118	ODU	Landrace	Republic of Korea
WC38	GmWMC119	HAKUBI	Landrace	China
WC39	GmWMC120	U 1416	Landrace	Nepal
WC40	GmWMC122	GAPSANJAEALAE (I)	Landrace	Republic of Korea
WC41	GmWMC123	N 2295	Landrace	Nepal
WC42	GmWMC125	BHATMAS	Landrace	Nepal
WC43	GmWMC129	AOKI MAME	Landrace	China
WC44	GmWMC132	L 2A	Landrace	Philippines
WC45	GmWMC136	LOCAL VAR (SEPUTIH RAMAN)	Landrace	Indonesia
WC46	GmWMC138	COL/PAK/1989/IBPGR/2326 (1)	Landrace	Pakistan
WC47	GmWMC141	PETEK	Landrace	Indonesia
WC48	GmWMC142	JAVA 5	Landrace	Indonesia
WC49	GmWMC143	M 44	Landrace	India
WC50	GmWMC144	M 918	Landrace	India
WC51	GmWMC146	HM 39	Landrace	India
WC52	GmWMC147	COL/THAI/1986/THAI-78	Landrace	Thailand
WC53	GmWMC148	M 42	Landrace	India
WC54	GmWMC150	U 1042-1	Landrace	Nepal
WC55	GmWMC151	JAVA 7	Landrace	Indonesia
WC56	GmWMC152	U 1290-1	Landrace	Nepal
WC57	GmWMC154	MANSHU MASSHOKUTOU	Landrace	China
WC58	GmWMC156	U 8006-3	Landrace	Nepal
WC59	GmWMC159	COL/PAK/1989/IBPGR/2323 (2)	Landrace	Pakistan
WC60	GmWMC160	N 2392	Landrace	Nepal
WC61	GmWMC162	COL/THAI/1986/THAI-80	Landrace	Thailand
WC62	GmWMC163	N 2491	Landrace	Nepal
WC63	GmWMC165	KARASUMAME (SHINCHIKU)	Landrace	Taiwan
WC64	GmWMC166	MERAPI	Developed variety	Indonesia
WC65	GmWMC168	L 317	Landrace	India
WC66	GmWMC169	HAKUCHIKOU	Landrace	China
WC67	GmWMC170	M 652	Landrace	India
WC68	GmWMC171	U-1741-2-2 NO.3	Landrace	Nepal
WC69	GmWMC173	KARASUMAME (NAIHOU)	Landrace	Taiwan
WC70	GmWMC175	BISHU DAIZU	Landrace	China
WC71	GmWMC176	SANDEK SIENG	Landrace	Cambodia
WC72	GmWMC181	CHIENGMAI PALMETTO	Landrace	Thailand
WC73	GmWMC182	LOCAL VAR. (TEGINENENG)	Landrace	Indonesia
WC74	GmWMC183	KARASUMAME (HEITOU)	Landrace	Taiwan
WC75	GmWMC186	RINGGIT	Developed variety	Indonesia
WC76	GmWMC187	KADI BHATTO	Landrace	Nepal
WC77	GmWMC188	E C 112828	Landrace	India
WC78	GmWMC190	SAN SAI	Landrace	Thailand
WC79	GmWMC191	MISS 33 DIXI	Landrace	Philippines
WC80	GmWMC192	U 1155-4	Landrace	Nepal

a Mã cho các giống dựa trên nghiên cứu trước đây (Aoyagi et al. 2020).

b Mã định danh cho Bộ sưu tập lõi đậu nành thế giới, Dự án ngân hàng gen NARO (https://www.gene.affrc.go.jp/databases-core_collections_wg_en.php).

Các mẫu lá được ủ trong hộp nhựa dùng một lần (chiều rộng = 170mm, chiều cao = 115mm và chiều sâu = 45mm) có chứa khăn giấy ngậm nước (Kimtowel; Nippon Paper Crexia, Tokyo, Nhật Bản) để duy trì độ bão hòa của hơi nước bên trong trong quá trình cây (Hình. 1A). Các mẫu lá được thu từ các lá chết đầu tiên của cây 3 tuần tuổi (giai đoạn sinh trưởng V2 đến V3). Sau đó, tối đa ba lá chết được đặt trong hộp trước khi cây vào sợi nấm. Các mẫu lá được thu hoạch từ các cây khác nhau được đặt úp mặt lên trên một chiếc khăn giấy ngậm nước. Một khăn lau phòng thí nghiệm ngậm nước (Kimwipes; Nippon Paper Crexia) được đặt ở mép của mỗi mẫu lá để tránh bị khô. Khoảng 2ml huyền phù sợi nấm được phun vào mỗi hộp nhựa (Hình 1B) bằng chổi kim 0,5mm

(SX0.5D; TAMIYA, Shizuoka, Nhật Bản) và máy nén khí (PS251; GSI Creos, Tokyo, Nhật Bản). Các mẫu lá đã cấy được giữ ở 25°C trong bóng tối trong 48 giờ để thúc đẩy sự lây nhiễm của *C. kikuchii*. Các hộp sau đó được giữ ở 25°C dưới 12 giờ của chu kỳ quang hàng ngày (25% cường độ ánh sáng). Phần trăm diện tích tổn thương (% LA) trên mỗi mẫu lá được đánh giá sau 9 ngày sau cấy (dpi). Mẫu lá được quét bằng máy quét hình ảnh (CanoScan 9000F Mark II; Canon, Tokyo, Nhật Bản) và % LA đã được đánh giá. % LA được tính toán từ các phần được quét thành công của mẫu lá. Không thể phân biệt được các tổn thương do *C. kikuchii* trên các lá chết bị tổn thương quá mức. Trong trường hợp đó, % LA không được xác định.



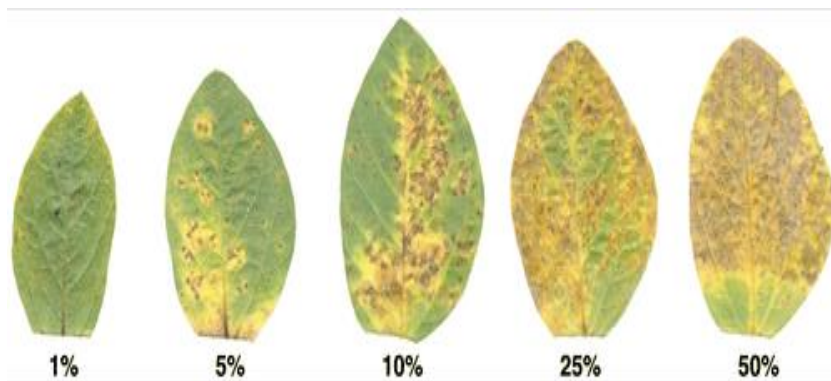
Hình 1. Phương pháp cấy vi khuẩn *Cercospora kikuchii*. Lá nhỏ được đặt trong hộp nhựa dùng một lần và giữ ở độ ẩm cao trong 9 ngày để tránh lây nhiễm. A. Hình ảnh cái hộp nhựa đựng lá đậu tương. B. Các mảnh lá sau khi phun cấy.

Lần sàng lọc thứ nhất và thứ hai được thực hiện bằng cách sử dụng tất cả 80 giống trong một thí nghiệm cấy duy nhất. Kết quả được phân tích như hai lần cấy độc lập để chọn ra các giống kháng hoặc mẫn cảm với *C. kikuchii*. Ít nhất ba mẫu cho mỗi loại đã được chuẩn bị trong mỗi lần sàng lọc. Sai số chuẩn % LA \pm trung bình của giá trị trung bình được tính bằng GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.A.). Các ứng cử viên cho các giống kháng và giống mẫn cảm được chọn dựa trên % LA trung bình. Đối với các ứng cử viên kháng, % LA dưới 5% trong mỗi ba chủng *C. kikuchii* phân lập cho cả hai lần lặp lại. Chúng tôi cũng chọn các ứng viên cho các giống mẫn cảm với *C. kikuchii* để so sánh với các giống kháng *C. kikuchii*. Các ứng cử viên mẫn cảm luôn được sản xuất trên 10% cho % LA. Để xác nhận sự lựa chọn, một cuộc sàng lọc thứ ba đã được thực hiện bằng cách sử dụng 12 mẫu lá trên mỗi giống đã chọn cho mỗi lần cấy. Phân tích một chiều về phương sai và kiểm tra nhiều phép so sánh của Tukey như phân tích posthoc được thực hiện bởi GraphPad Prism 8 để so sánh kết quả giữa các giống trong lần sàng lọc thứ ba. Ngoài ra, phân tích tương quan Pearson giữa % LA trung bình cho mỗi lần cấy đã được thực hiện bởi GraphPad Prism 8.

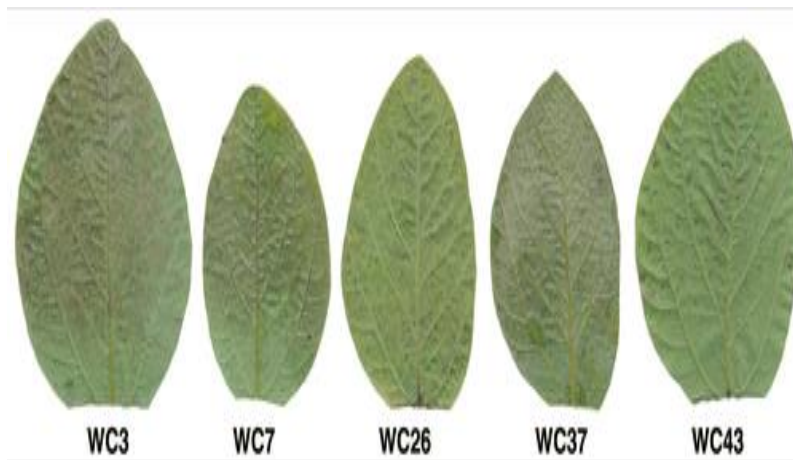
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Lần sàng lọc đầu tiên và thứ hai được thực hiện bằng cách sử dụng 80 giống. Ít nhất ba lá chết cho mỗi loại giống đã được chuẩn bị cho mỗi lần cấy. Tuy nhiên, việc cấy WC5, WC8, WC16, WC17, WC18, WC19, WC29, WC30, WC50, WC51, WC60, WC71 và WC79 đã được thực hiện với ít hơn ba mẫu lá cho mỗi lần cấy do tỷ lệ nảy mầm của hạt thấp hoặc làm hỏng mẫu trước khi cấy. Hình ảnh về các ví dụ đại diện của mẫu lá cho

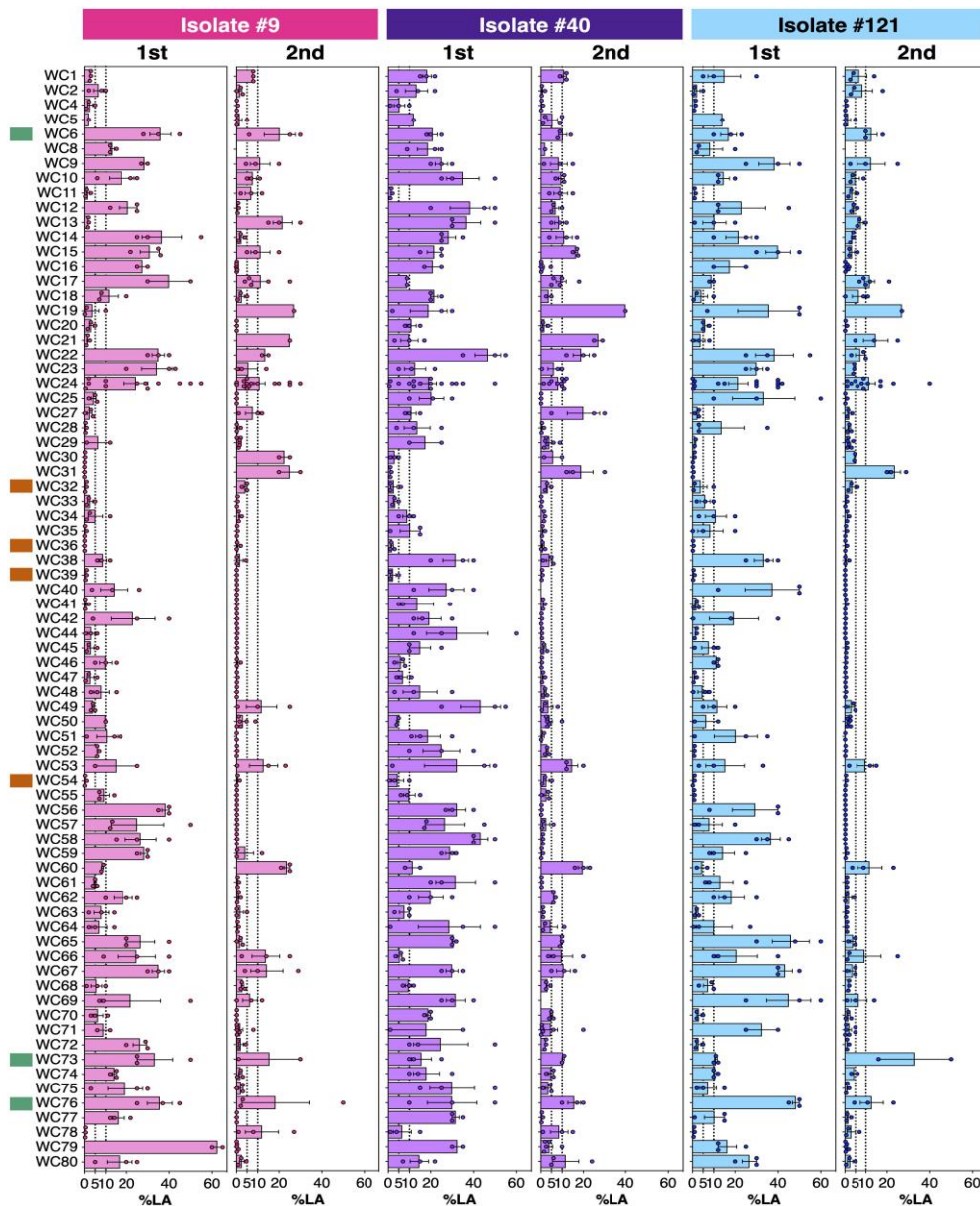
mức % LA được thể hiện trong Hình 2. Trong cuộc sàng lọc này, năm giống, bao gồm WC3, WC7, WC26, WC37 và WC43 có các vết bệnh không rõ ràng trên lá. Chúng đã bị loại khỏi nghiên cứu sâu hơn. Các giống này vẫn giữ đặc điểm xanh lá mầm hoặc vẫn xanh nên rất khó xác định chính xác mức độ tổn thương trên lá (Hình 3). Kết quả được trình bày trong Hình 4. Tỷ lệ % LA trung bình cho tất cả các lá chết được đánh giá của mỗi giống được sử dụng trong các tiêu chí lựa chọn ứng viên cho các giống kháng *C. kikuchii*. WC32, WC36, WC39 và WC54 được chọn làm ứng cử viên kháng đa dạng. % LA trung bình cho những ứng viên kháng này là dưới 5% trong mỗi chủng *C. kikuchii* phân lập cho cả hai lần lặp lại. Chúng tôi cũng chọn WC6, WC73 và WC76 là các giống miễn cảm với *C. kikuchii* để so sánh với các giống kháng *C. kikuchii*. Ba ứng cử viên miễn cảm liên tục tạo ra trên 10% cho % LA. Thử nghiệm tiếp tục cho bảy giống đã đề cập với thử nghiệm cây lần thứ ba.



Hình 2. Các ví dụ đại diện của mẫu lá cho phần trăm diện tích vùng tổn thương (% LA). Mẫu lá của WC11 (1%), WC1 (5%), WC49 (10%), WC38 (25%) và WC40 (50%) trong thử nghiệm cây đầu tiên của chủng phân lập # 121 được cung cấp.

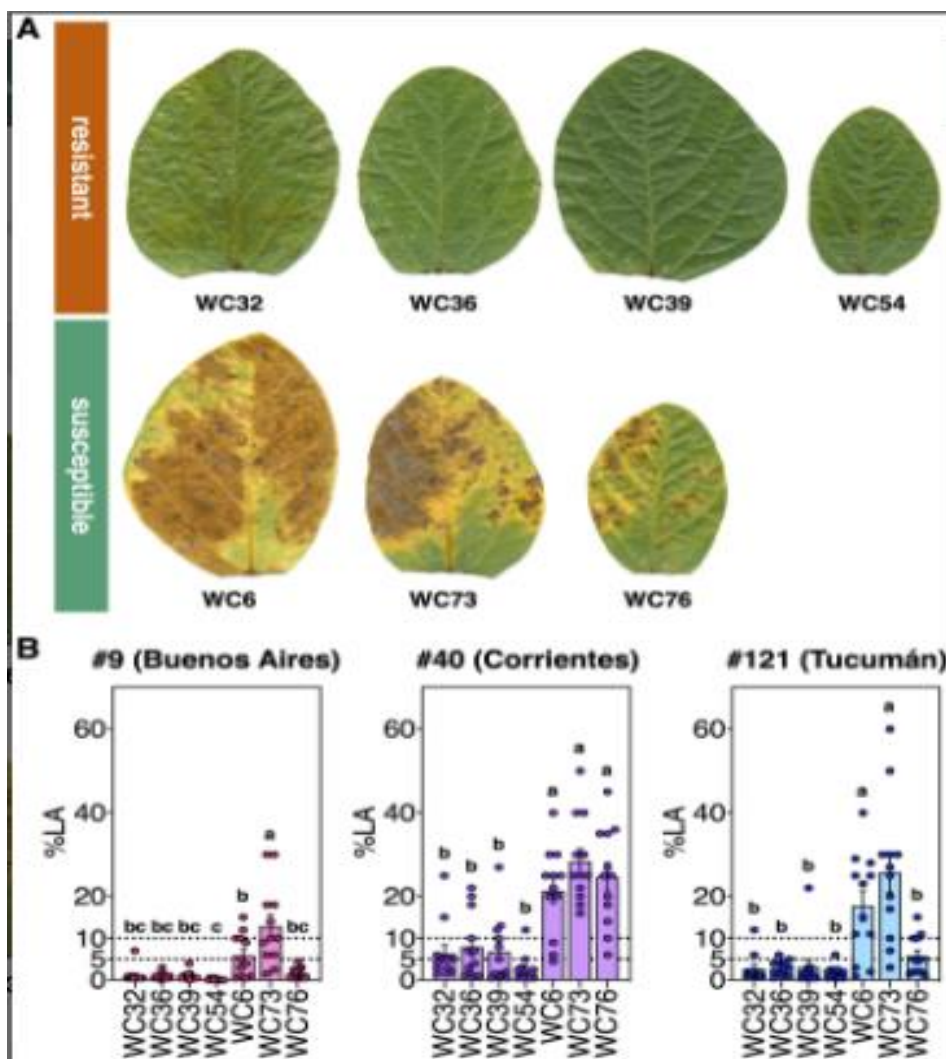


Hình 3. Các giống đậu tương WC3, WC7, WC26, WC37 và WC43. *Cercospora kikuchii* phân lập # 121 đã được cấy; hình ảnh đại diện cho mẫu lá sau khi cấy 9 ngày (thử nghiệm cây lần đầu tiên). Vết bệnh do *C. kikuchii* trên lá chết của các giống này không rõ ràng. Chúng tôi không thể ước tính tỷ lệ phần trăm diện tích vết bệnh (% LA) do đặc điểm chủng loại của kiểu hình lá mầm hoặc xanh lá cây.



Hình 4. Mức độ nghiêm trọng của bệnh *Cercospora kikuchii* trên các giống đậu tương từ bộ sưu tập thể giới. Tỷ lệ phần trăm diện tích tổn thương (% LA) trên mẫu lá được đánh giá sau khi cây mấu 9 ngày. Cây đã được lặp lại (lần đầu tiên và lần thứ hai). Các ô trên biểu đồ thể hiện % LA trên các mẫu lá được đánh giá. Các thanh chỉ ra sai số chuẩn của giá trị trung bình. Các ứng cử viên cho các giống kháng *C. kikuchii* và mẫn cảm lần lượt được đánh dấu bằng màu đỏ son và màu xanh lá cây.

Thử nghiệm cây trên bảy giống đã chọn được thực hiện bằng cách sử dụng các chủng *C. kikuchii* # 9, # 40 và # 121. Mười hai lá chết cho mỗi loại được chuẩn bị cho mỗi chất cây. Kết quả trùng với kết quả của hai lần chiếu trước: WC32, WC36, WC39 và WC54 cho thấy % LA thấp hơn (0,17 đến 1,08% cho # 9; 2,58 đến 7,96% cho # 40 và 1,71 đến 3,08% cho # 121) so với với các ứng cử viên giống mẫn cảm (Hình 5A). % LA của bốn giống (WC32, WC36, WC39 và WC54) thấp hơn đáng kể so với % LA của ứng cử viên giống mẫn cảm WC73 trong tất cả các chất cây (Hình 5B). Thật bất ngờ, hai ứng cử viên mẫn cảm khác, WC6 và WC76, thể hiện tính mẫn cảm vừa phải đối với việc cây chủng # 9 và # 121. Kết quả của chúng tôi chứng minh rằng WC32, WC36, WC39 và WC54 là các giống kháng *C. kikuchii*. Ngoài ra, WC73 được chứng minh là giống mẫn cảm *C. kikuchii* dựa trên kết quả của chúng tôi. Những kết quả này đã được xác nhận bằng một thử nghiệm cây toàn bộ cây trồng (Hình bổ sung. S1). % LA trung bình đối với các giống kháng (0,02 đến 0,20 đối với WC32, WC36, WC39 và WC54) thấp hơn đáng kể so với giống mẫn cảm (2,33 đối với WC73).

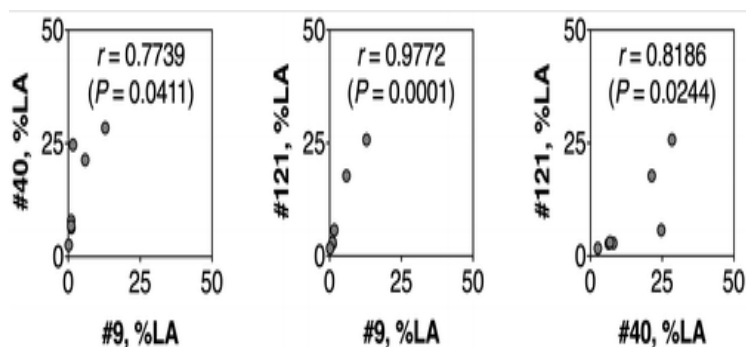


Hình 5. Làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh ở các ứng cử viên đa dạng kháng và miễn cảm *Cercospora kikuchii*.

A. Ảnh đại diện của mặt trụ của các mẫu lá ở thời điểm 9 ngày sau khi cây được cấy chủng *C. kikuchii* phân lập # 121.

B. Tỷ lệ trung bình của diện tích vết bệnh (% LA) tính từ 12 lá chết cho mỗi mẫu cây. Các ô trên biểu đồ thể hiện % LA trên các mẫu lá được đánh giá. Các thanh chỉ ra sai số chuẩn của giá trị trung bình. Mức độ quan trọng được xác định cho từng giống thông qua phân tích phương sai; các chữ cái tương ứng với trắc nghiệm Tukey post hoc ($P < 0,05$).

Như đã mô tả, WC6 và WC76 thể hiện các phản ứng miễn cảm hơi khác nhau đối với các chủng phân lập khác nhau. % LA trung bình của ba giống kháng được cấy # 40 cao hơn 5% (WC32 = 6,38%, WC36 = 7,96% và WC39 = 6,83%). Phân tích của chúng tôi so sánh các phân lập cho thấy kết quả của # 9 và # 121 có tương quan cao ($r = 0,9772$) nhưng tương quan giữa # 9 và # 40 ($r = 0,7739$), # 40 và # 121 ($r = 0,8186$) là thấp hơn (Hình 6). Các chủng phân lập này có nguồn gốc từ các tỉnh khác nhau ở Argentina. Kết quả này ngụ ý rằng quần thể *C. kikuchii* ở Argentina có sự đa dạng về địa lý trong khả năng gây bệnh đối với các giống đậu tương.



Hình 6. Mối tương quan giữa các kết quả của thử nghiệm cây ba chủng *Cercospora kikuchii* (# 9, # 40 và # 121). Các ô trên biểu đồ cho thấy tỷ lệ phần trăm trung bình của diện tích vết bệnh (% LA) của bảy giống đã chọn được cấy với ba dòng phân lập. Giá trị chỉ ra hệ số tương quan Pearson (r) và giá trị P hai phía (P)

Có một số khác biệt về khả năng gây bệnh đối với các giống đậu tương của ba chủng *C. kikuchii*. Tuy nhiên, WC54 thể hiện mức độ kháng cao với tất cả các chủng cách ly được

thử nghiệm. Điều này cho thấy rằng nó là một ứng cử viên tốt để làm nguồn gen kháng *C. kikuchii* ở Argentina (Hình 5B).

Sự phát triển bệnh của *C. kikuchii* là chậm. Thường mất 3 tuần sau khi cấy để xác định mức độ nghiêm trọng của bệnh (Cai và cs, 2009). Để sàng lọc tính kháng *C. kikuchii* trên một số lượng lớn các giống đậu tương, rất khó để giữ các điều kiện đồng nhất cho từng lá cây trên toàn cây vì ánh sáng và độ ẩm xung quanh các lá riêng lẻ có thể khác nhau. Ánh sáng rất quan trọng đối với độc tính của cercosporin (Daub và Hangarter 1983; Yamazaki và cs, 1975). Độ ẩm cao cũng cần thiết để thúc đẩy nhiễm trùng. Để khảo sát khả năng chống lại mầm bệnh này, cần phải có các phương pháp sàng lọc thống nhất và thông lượng cao. Phương pháp của chúng tôi đã có thể chọn lọc thành công cả hai giống kháng và mẫn cảm *C. kikuchii* (Hình 5). Độ ẩm cao liên tục trong điều kiện ổn định cho chất cấy trên lá chết đã rút ngắn thời gian cần thiết cho sự phát triển của bệnh *C. kikuchii*. Các tổn thương xuất hiện trong vòng 9 ngày sau cấy theo phương pháp của chúng tôi. Phương pháp của chúng tôi cũng đạt được tỷ lệ hình thành tổn thương trên mẫu lá nhiều hơn trong thời gian ngắn hơn một nửa so với báo cáo trước (Cai và cs, 2009). Ngoài ra, thiết kế nhỏ gọn cho phép vị trí sàng lọc nằm trong buồng tăng trưởng được kiểm soát nhiệt độ và ánh sáng trong phòng thí nghiệm thông thường. Phương pháp cấy lá cho *C. kikuchii* mà chúng tôi đã phát triển là thích hợp để sàng lọc tính kháng *C. kikuchii* trên các giống đậu tương được trồng trên toàn thế giới. Kết quả sàng lọc được hỗ trợ bởi một thử nghiệm cây bằng toàn bộ cây đậu tương (Hình bổ sung S1). Hơn nữa, khả năng chống lại *C. kikuchii* của các giống trên đồng ruộng vẫn chưa được chứng thực. Cai và cs, (2009) so sánh kết quả thu được từ việc cấy *C. kikuchii* được thực hiện trong môi trường được kiểm soát và đồng ruộng. Một số giống đại diện cho kết quả tương quan giữa hai điều kiện, nhưng mối tương quan không được xác nhận cho tất cả các giống được thử nghiệm trong nghiên cứu đó. Để điều tra mối tương quan giữa mức độ nghiêm trọng của bệnh *C. kikuchii* trên đồng ruộng và môi trường được kiểm soát, cần có những nghiên cứu sâu hơn bằng cách sử dụng một số lượng lớn các giống đậu tương trên đồng ruộng. Kết quả của việc cấy vào lá, ở một số giống, kết quả cấy khác nhau giữa các lá chết và các lần lặp lại. Để sử dụng phương pháp sàng lọc này, số lần lặp lại kỹ thuật và sinh học của mỗi lần cấy là rất quan trọng để tránh xác định sai tính kháng của *C. kikuchii*. Ngoài ra, việc tiêu hủy các mẫu lá trong quá trình cấy cần được xem xét để cải tiến hơn nữa phương pháp này.

Phương pháp sàng lọc thông lượng cao cho tính kháng *C. kikuchii* là một công cụ được tìm kiếm từ lâu để nghiên cứu (Cai và cs, 2009). Phương pháp của chúng tôi có thể góp phần tăng hiệu suất sàng lọc thông lượng cao cho tính kháng bệnh.