

PHÂN LẬP VÀ NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN NẤM *Curvularia lunata* GÂY BỆNH LEM LÉP HẠT LÚA

Isolation and Genetic Diversity Evaluation of *Curvularia lunata* Causing Black Kernel Disease in Rice

Nguyễn Quốc Trung, Bùi Thị Xuân, Nguyễn Ngọc Hòa

Khoa Công Nghệ Sinh học - Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài: 20.3.2019

Ngày chấp nhận: 15.5.2019

Abstract

Discolouration or black kernel disease is one of the most common diseases affecting seed quality and yield in rice production. Black kernel is caused by several pathogens, among them *Curvularia lunata* (*C. lunata*) is the most usual and most dangerous one. This study aimed to isolate *C. lunata* from samples collected from 3 provinces: Lao Cai, Thai Nguyen and Soc Trang. Seventeen isolates of *C. lunata* were isolated based on morphology of colony and structure of spore under microscope. Genetic diversity was analyzed using 19 RAPD markers in which 6 markers showed high polymorphic with PIC value ranged from 0.71 (OPA11) to 0.89 (OPA3). Phylogenetic tree was constructed by NTSYS pc2.1 software. Five groups were divided with genetic homologous value 0.74. Group 1, 2 and 5 were geographical origin from Lao Cai, Thai Nguyen-Lao Cai and Soc Trang, respectively. Group 3 and 4 were from both Thai Nguyen and Lao Cai.

Keywords: *Curvularia lunata*, black kernel, genetic diversity, RAPD marker

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong ngành sản xuất lúa gạo, bệnh lem lép hạt là một loại bệnh rất phổ biến gây ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng hạt giống và năng suất. Bệnh này do một số loại vi khuẩn và nấm gây ra như: *Pseudomonas glumae*, *Alternaria padwickii*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium sp*, *Curvularia lunata*, ... Trong đó, *Curvularia lunata* (*C. lunata*) là tác nhân quan trọng nhất, gây tổn thất đáng kể đến chất lượng và năng suất lúa (Sumanagala và cs. 2008).

Bệnh thường gây hại vào giai đoạn lúa trổ bông đến chín sừa. Nếu gặp điều kiện thuận lợi với mưa kéo dài và độ ẩm cao, bệnh sẽ gây tỷ lệ lép, lửng cao. Ở cây lúa bị bệnh lem lép hạt trên vỏ trấu có những đốm nhỏ màu sậm biến đổi từ màu nâu đến màu đen, khi bị bệnh nặng tạo thành những mảng nâu đen trùm lên cả vỏ trấu. Hậu quả là chất lượng hạt gạo kém do bị biến màu hoặc bị lép. Theo Kamaluddeen và cs. 2013, triệu chứng bệnh do *C. lunata* gây ra xuất hiện trước tiên trên lá. Các đốm màu nâu hình elip xuất hiện và to dần ra trên lá. Sau đó, các đốm xuất hiện trên

bẹ lá. Dần dần, bệnh lan ra đến hạt. Vỏ trấu chuyển màu và bị nhiễm nặng, hạt thóc sẽ chuyển màu đen.

Một số công bố bước đầu đã phân lập thành công và nghiên cứu đa dạng di truyền như: Goh và cs. 1998 đã sử dụng trình tự bảo thủ giữa gen tổng hợp 28S rRNA, 5.8S rRNA và vùng ITS (Internal Transcribed Spacers) để đánh giá đa dạng di truyền của *Bipolaris*, *Cercospora*, *Corynespora*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* và *Helminthosporium*. Ahmad và cs. 2006 đã sử dụng RAPD (random amplified polymorphic DNA) để đánh giá đa dạng di truyền các quần thể *C. lunata* phân lập từ lúa mì và lúa...

Hiện nay, ở Việt Nam các đề tài nghiên cứu về phân lập, đánh giá đa dạng di truyền các tác nhân gây bệnh lem lép hạt còn chưa được quan tâm. Đề tài nghiên cứu này nhằm cung cấp thêm các thông tin về đặc điểm hình thái, sự đa dạng di truyền của nấm *C. lunata* phục vụ cho công tác bảo vệ thực vật cũng như chọn tạo giống kháng bệnh.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Các isolate nấm *C. lunata* được phân lập từ các mẫu lá nhiễm bệnh. Mẫu bệnh được thu thập bắt đầu từ giai đoạn cây lúa đẻ nhánh. Dựa trên triệu chứng bệnh mô tả theo Kamaluddeen và cs. 2013: lá nhiễm bệnh được thu thập và ghi đầy đủ thông tin (thời gian, địa điểm thu thập, mẫu giống lúa) trên túi thu thập. Địa điểm thu thập gồm 2 tỉnh Bắc Bộ là Lào Cai và Thái Nguyên; 1 tỉnh miền Đông Nam Bộ là Sóc Trăng.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phương pháp phân lập

Các isolate nấm được phân lập theo phương pháp IRRI, 1997 (Không thấy tài liệu tham khảo). Mẫu bệnh được cắt ra từng mảnh nhỏ khoảng 2-3 mm. Sau khi khử trùng bề mặt bằng 0.5% dung dịch Natri hypoclorit trong 1 phút và rửa lại 3 lần bằng nước cất khử trùng. Nấm bệnh được nuôi

cấy trong môi trường PDA (1 lít môi trường: 4g potato extract, 20g D-glucose, 15g agar, pH 6,5-7) ở 28°C trong 3 ngày. Sau đó dùng que cấy vô trùng quệt nhẹ lên bề mặt mô bệnh chuyển sang bề mặt môi trường PDA mới. Để nấm phát triển sau khoảng 4-5 ngày tiến hành lấy bào tử của nấm đưa lên kính hiển vi quan sát xác định bào tử. Cấy chuyển nhiều lần để làm thuần. Các isolate nấm được lưu giữ trong môi trường thạch nghiêng cho việc sử dụng ngắn hạn và giữ giống lâu dài trong glycerol 30% ở -30°C.

2.2.2 Phương pháp nghiên cứu đa dạng di truyền

Tách chiết DNA: theo qui trình của Dellaporta và cs. 1983. DNA tách chiết được kiểm tra chất lượng bằng điện di trên gel agarose 0,8%.

Đánh giá đa hình bằng chỉ thị RAPD: 19 môi RAPD được sử dụng để nghiên cứu đa dạng di truyền trên *C. lunata* (bảng 1).

Bảng 1. 19 môi RAPD sử dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền

STT	Tên môi	Trình tự 5'- 3'	Tài liệu tham khảo
1	OPA-01	CAGGCCCTTC	Weikert-oliveira và Resende, 2002
2	OPA-03	AGTCAGCCAC	
3	OPA-07	GGTGACGCAG	
4	OPA-11	CAATCGCCGT	Caligiorne và cs. 1999
5	OPA-13	CAGCACCCAC	
6	OPG-06	GTGCCTAACC	
7	OPG-14	GGATGAGACC	
8	OPE-14	TGCGGCTGAG	
9	PAP2	TACAACGAGG	Séré và cs. 2007
10	PAP3	TGGATTGGTC	
11	OPE-14	TGCGGCTGAG	
12	OPG-05	CTGAGACGGA	
13	OPQ-04	GACGGCTATC	
14	OPD-08	GGCAGGCAAG	
15	OPA-17	GACCGCTTGC	
16	OPB-10	CTGCTGGGAC	
17	OPB17	AGGGAACGAG	
18	OPB-04	GGACTGGAGT	
19	OPB-06	TGCTCTGCCC	

Điều kiện PCR: biến tính ở 94°C trong 3 phút, 40 chu kì tiếp theo 94°C trong 1 phút, 31°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút và 72°C trong 15 phút

ở chu kì cuối, bảo quản ở 15°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 4% và quan sát trên máy đọc gel.

Dựa trên kết quả điện di sản phẩm PCR, các băng trên gel được xác định và quy ước (0) không có băng và (1) có băng. Hệ số tương đồng di truyền Jaccard trong NTSYSpC phiên bản 2.1 được sử dụng để phân tích đánh giá mối liên hệ về mặt di truyền giữa các isolate *C. lunata* (Rohlf, 2000). Các băng sản phẩm PCR được dùng để phân tích độ tương đồng và vẽ sơ đồ hình cây về mức độ tương đồng di truyền.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Bảng 2. Danh sách 17 isolate phân lập từ 3 địa điểm thu thập (2013)

STT	Kí hiệu	Địa điểm thu thập	STT	Kí hiệu	Địa điểm thu thập
1	KU 1-1	Sóc Trăng	10	ADBL 10-16-1	Thái Nguyên
2	KU 1-2	Sóc Trăng	11	ADBL 10-18-1	Thái Nguyên
3	KU 4-2	Sóc Trăng	12	ADBL 10-28-1	Thái Nguyên
4	KU 9-1	Sóc Trăng	13	ADBL 10-28-2	Thái Nguyên
5	KU 9-4	Sóc Trăng	14	573	Thái Nguyên
6	KU 10-2	Sóc Trăng	15	574	Thái Nguyên
7	KU 10-3	Sóc Trăng	16	LC 25	Lào Cai
8	KU 12-1	Sóc Trăng	17	Pi-1 (sóng cù)	Lào Cai
9	KU 12-2	Sóc Trăng			

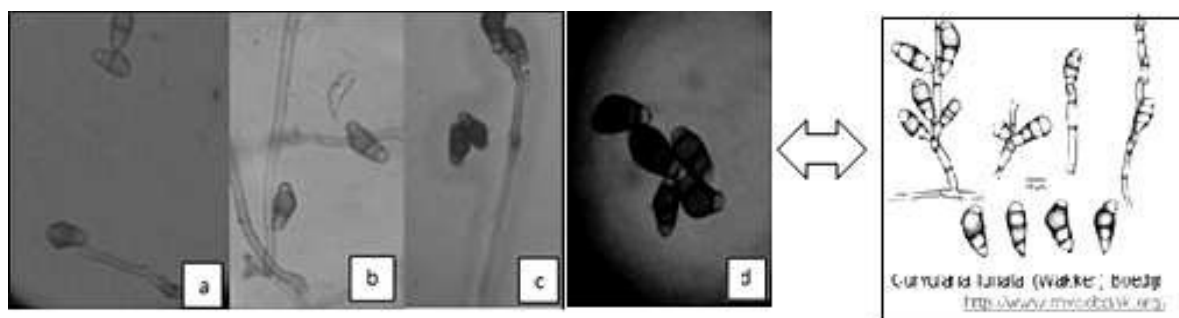
Bào tử mang đặc điểm đặc trưng của chi *Curvularia*, bào tử hơi cong ở tế bào thứ ba tính từ cuống bào tử, thường ba vách ngăn, bào tử màu nâu đậm, vách ngăn được quan sát rõ ràng dưới kính hiển vi. Qua so sánh hình thái bào tử

3.1 Kết quả phân lập các isolate nấm

Từ các mẫu lá bệnh thu thập tại Lào Cai, Thái Nguyên, Sóc Trăng, 17 isolate nấm đã được phân lập và tuyển chọn dựa trên đặc điểm hình thái khuẩn lạc và hình dạng bào tử theo mô tả của Kamaluddeen và cs. 2013 (bảng 2) để tiến hành thí nghiệm.

Khuẩn lạc của tất cả các isolate đều có màu xám đen đặc trưng, khác nhau ở màu sắc và sự xuất hiện của các sợi nấm bông trên bề mặt.

của các isolate với các mô tả đã công bố của Kamaluddeen và cs. 2013 và trên website <http://www.mycobank.org/>, có thể kết luận sơ bộ 17 isolate phân lập được thuộc chi *Curvularia* loài *Curvularia lunata*.



Hình 1. Hình ảnh bào tử của isolate nấm phân lập *Curvularia* spp.

Hình a: 10-18-1, b: KU 9-4, c: ADBL 10-18-1, d: ADBL 10-28-2 và mô tả bào tử theo www.mycobank.org

3.2 Đánh giá đa dạng di truyền

Với 19 môi RAPD được sử dụng cho nghiên cứu, kết quả cho thấy có 6 trong 19 môi cho đa hình giữa các isolate nghiên cứu. Các băng điện

di có kích thước từ 150 – 1600bp. Trong phân tích đa dạng di truyền, chúng tôi coi mỗi băng DNA sản phẩm trên bản điện di với một kích thước nhất định là một alen.

Bảng 3. Số lượng băng đa hình và hệ số PIC của các môi

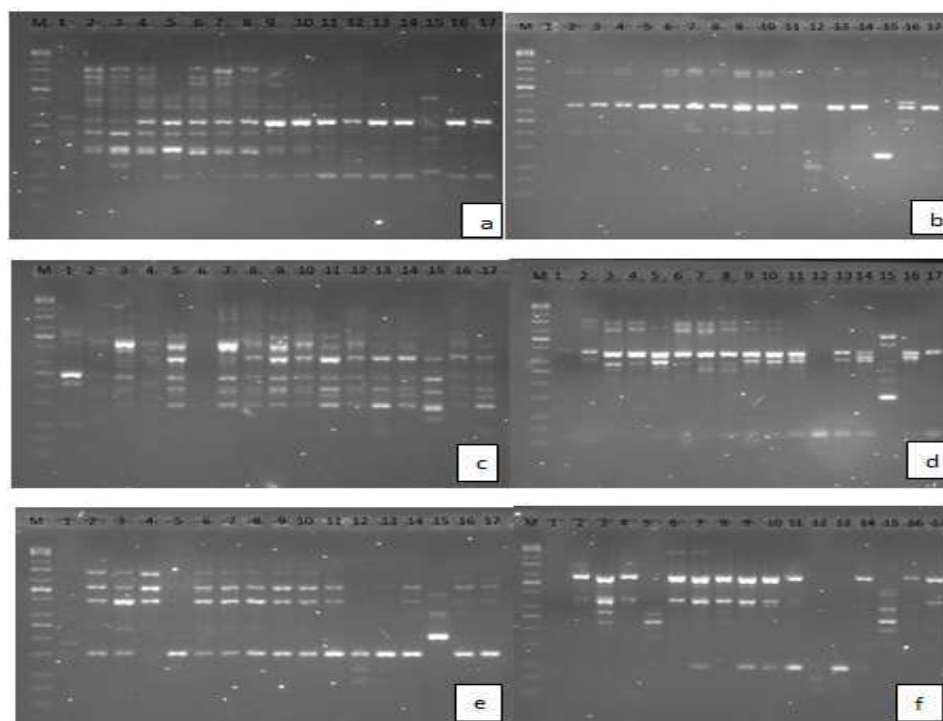
STT	Tên môi	Tổng số alen	Số alen đa hình	Hệ số PIC
1	OPA03	12	11	0.89
2	OPB 06	10	8	0.75
3	OPA 07	8	5	0.80
4	OPA 11	7	6	0.71
5	OPA 13	9	7	0.85
6	OPB 10	7	6	0.75
Tổng		53	43	
Trung bình		8.8	7.2	0.79

Chú thích: chỉ số PIC (Polymorphism Information Content) là hệ số đa dạng từng locus gene được tính theo công thức $PIC = 1 - \sum P_i^2$, trong đó P là tần xuất xuất hiện của alen thứ (i).

Qua kết quả tính toán cho thấy môi OPA 03 có hệ số PIC cao nhất với 11/12 alen đa hình, hệ số PIC thấp nhất 0,71 thuộc về môi OPA 11 với 6/7 alen đa hình. Hệ số PIC trung bình của 6 môi RAPD đạt 0,79.

Nhằm đánh giá mối quan hệ di truyền của 17

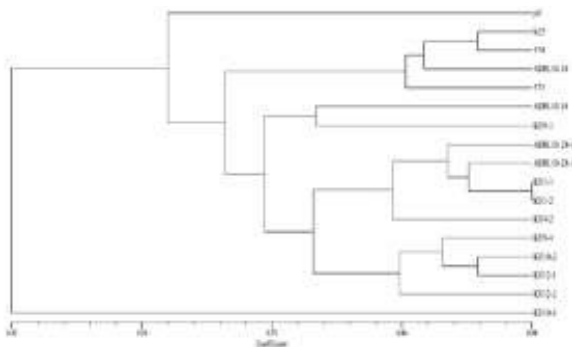
isolate, sơ đồ hình cây về mức độ tương đồng di truyền trên 6 môi RAPD được xây dựng dựa theo hệ số tương đồng di truyền Jaccard. Thông qua hình ảnh điện di số liệu được phân tích và tổng hợp cho việc lập cây đa dạng bằng phần mềm NTSYSpc2.1.



Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm PCR với 6 môi RAPD.

+ Hình a, b, c, d, e, f tương ứng với môi OPA03, OPA11, OPA13, OPA07, OPB06, OPB10. + Các mẫu từ M đến 17 lần lượt là DNA ladder 100bp, pi1, LC25, 573, 574, ADBL10-16, ADBL10-18, ADBL 10-28-1, ADBL 10-28-2, KU 1-1, KU 1-2, KU 4-2, KU 9-1, KU 9-4, KU 10-2, KU 10-3, KU 12-1, KU 12-2.

Dựa trên kết quả phân tích cây đa dạng di truyền, chúng tôi phân chia 17 isolate được chia thành năm nhóm ở mức độ tương đồng 0,74. Trong đó nhóm 1 (gồm pi1), nhóm 2 (gồm Ic25, 574, ADBL 10-18, 573) và nhóm 5 (KU 10-3) đặc trưng cho vùng địa lý thu thập mẫu lần lượt từ Lào Cai, Thái Nguyên-Lào Cai và Sóc Trăng. Hai nhóm 3 (ADBL10-16, KU9-1) và 4 (ADBL10-28-1, ADBL10-28-2, KU1-1, KU1-2, KU4-2, KU9-4, KU10-2, KU12-1 và KU12-2) có nguồn gốc ở cả Thái Nguyên và Sóc Trăng, sự tương đồng di truyền của các isolate thu thập từ 2 địa điểm cách xa nhau ở nhóm 3 và 4 cần được phân tích thêm ở mức phân tử để có thể giải thích về nguồn gốc các isolate này.



Hình 3. Cây đa dạng di truyền dựa trên kết quả phân tích chỉ thị RAPD

4. KẾT LUẬN

Tiến hành thu thập mẫu trong vụ Mùa 2013, chúng tôi đã phân lập thành công 17 isolate nấm *Curvularia lunata* gây bệnh lem lép hạt từ Lào Cai, Thái Nguyên và Sóc Trăng, đồng thời đã phân các isolate thành 5 nhóm dựa theo đa dạng di truyền phân tích bằng chỉ thị RAPD. Bệnh lem lép hạt là phổ biến, phân bố cả ở miền Bắc và miền Nam. Nguồn bệnh này là cơ sở rất hữu ích cho công tác bảo vệ thực vật, đánh giá độc tính nấm gây hại ở từng vùng sản xuất và là công cụ trong công tác chọn tạo giống lúa kháng bệnh lem lép hạt. Để có đầy đủ thông tin về tình hình bệnh lem lép hạt trên cả nước cũng như đa dạng di truyền, phân nhóm isolate nấm *Curvularia lunata* cần có những nghiên cứu trên quy mô toàn quốc và trong nhiều năm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad, I., Iram, S., Cullum, J., Ahmad, I., & Al, E. T., 2006. Genetic variability and aggressiveness in *Curvularia lunata* associated with rice-wheat cropping areas of Pakistan, 38(2), 475–485.
- Caligiore, R.B., Resende, M.A., Paiva, E. & Azevedo, V., 1999. Use of RAPD (random amplified polymorphic DNA) to analyse genetic diversity of dematiaceous fungal pathogens. *Canadian Journal of Microbiology* 45:408-412.
- Dellaporta SL, Wood J, and Hicks JB., 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1: 19-21
- Goh, T.K., Hyde, K.D. and Lee, D.K.L., 1998. Generic distinction in the *Helminthosporium* - complex based on restriction analysis of the nuclear ribosomal RNA gene. *Fungal Diversity*. 1: 85-107
- IRRI. (1997). Laboratory manual. In: A workshop on gene cloning, transformation and molecular analysis of transgenic rice. Plant Breeding, Genetics, and Biochemistry division, IRRI.
- Kamaluddeen; Sobita Simon; Lal, A. A., 2013. A new blight disease of rice caused by *Curvularia lunata* from Uttar Pradesh. *International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR)* 3 (5) 13-15.
- Reza, M., Motlagh, S., & Anvari, M., 2010. Genetic variation in a population of *Bipolaris oryzae* based on RAPD-PCR in north of Iran, 9(36), 5800–5804.
- Rohlf FJ, 2000. NTSYS-pc number taxonomy and multivariate analysis system version 2.1. Setauket, NY, USA, Exeter Publishing.
- Séré, Y., Onasanya, A., Afolabi, A., Mignouna, H. D., & Akator, K., 2007. Genetic diversity of the blast fungus, *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr, in Burkina Faso, 6(22), 2568–2577.
- Sumangala K., Patil M.B., Nargund V.B. and Ramegowda G., 2008. Evaluation of fungicides, botanicals and bio-agents against *Curvularia lunata*, a causal agent of grain discoloration in rice, *Journal of Plant Dis. Sci.*, 3(2), 159-164.
- Weikert-oliveira, R. C. B., Resende, M. A. D. E., 2002. Genetic variation among pathogens causing “*Helminthosporium*” diseases of rice, maize and wheat, 27(6), 639–643.

Phản biện: TS. Nguyễn Huy Chung