

ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ CHỈ THỊ PHÂN TỬ TRONG XÁC ĐỊNH ĐA DẠNG NÒI NẤM ĐẠO ÔN HẠI LÚA Ở CÁC TỈNH MIỀN BẮC VÀ MIỀN TRUNG VIỆT NAM

Là Tuấn Nghĩa¹, Phạm Thị Thuý¹, Lê Anh¹, Lê Như Kiều².

TÓM TẮT

Nghiên cứu đa dạng di truyền, xác định nòi (haplotype) nấm đạo ôn góp phần quan trọng trong công tác khai thác nguồn gen kháng bệnh ở lúa. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật Pot2 rep-PCR để nghiên cứu đa dạng di truyền, xác định nòi quần thể nấm đạo ôn thu thập ở miền Bắc và miền Trung Việt Nam vào năm 2007. Sử dụng chỉ thị phân tử PCR môi: MG1 và MG2 đặc trưng cho nấm đạo ôn để phân tích genom quần thể nấm bệnh đã xác định được 23 nòi nấm trên 5 vùng sinh thái nông nghiệp gồm: Tây Bắc, Đông Bắc, đồng bằng sông Hồng, Bắc Trung bộ, Nam trung bộ. Phân tích liên kết đã cho thấy, 23 nòi nấm chia thành 5 nhóm ở mức độ giống nhau về di truyền 70%. Trong số các nhóm thì nhóm II có tần số cao nhất là 0,48; nhóm I có tần số là 0,32; các nhóm còn lại có tần số $\leq 0,10$. Tuy có sự đa dạng cao song quần thể nấm chỉ có một số nòi và nhóm chiếm ưu thế, mang tính chất đại diện và là các nòi và nhóm chung đó là: H1; H4; H6; H7; H9; H10; H11; H12; H14 và các nhóm: I và II. Các nòi và nhóm nấm này có thể được sử dụng làm vật liệu nguồn nấm để đánh giá tính kháng/ nhiễm bệnh của các giống lúa.

Từ khoá: Bệnh đạo ôn, công nghệ chỉ thị phân tử, haplotype, *Pyricularia grisea*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh đạo ôn do nấm *Pyricularia grisea* gây ra là một loại bệnh hại nghiêm trọng và thường xuyên xảy ra làm ảnh hưởng lớn đến nghề trồng lúa trên thế giới cũng như ở Việt Nam [2]. Đối với công tác phòng trừ bệnh hại, sử dụng nguồn gen để tạo ra giống lúa kháng bệnh được xem là biện pháp có hiệu quả nhất. Tuy nhiên, biện pháp này muốn phát huy được tính hiệu quả thực sự của nó thì cần phải có những nghiên cứu rất cơ bản về nấm ký sinh gây bệnh thông qua việc xác định các nòi (haplotype) nấm và sự phát triển của chúng ở các vùng sinh thái khác nhau [1, 2].

Để nghiên cứu xác định các nòi nấm gây bệnh, thông thường có hai phương pháp cơ bản đó là: Phương pháp dựa trên phản ứng của các giống chỉ thị với quần thể nấm gây bệnh và phương pháp sử dụng chỉ thị phân tử [3, 4]. Năm 1998, George và cs. đã xây dựng thành công kỹ thuật Pot2 rep-PCR, một kỹ thuật đặc thù cho phát hiện, phân loại, xác định nòi nấm đạo ôn. Đồng thời khắc phục được trở ngại của phương pháp dựa trên phản ứng bệnh là việc đánh giá mức độ gây bệnh gặp nhiều khó khăn, kết quả không ổn định và chịu sự tác động của môi trường cũng như ý muốn chủ quan của người đánh giá. Hơn

nữa mỗi một vùng, một quốc gia cần phải có một bộ giống chuẩn cho riêng mình.

Do quần thể nấm luôn biến động qua không gian, thời gian và dễ dàng hình thành nòi mới, vì vậy việc nghiên cứu, phân tích đa dạng di truyền, xác định các nòi nấm cần được tiến hành thường xuyên. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật Pot2 rep-PCR, phân tích sự đa dạng di truyền quần thể nấm thu thập ở các tỉnh phía Bắc (từ Phú Yên trở ra), nhằm xác định các nòi nấm phục vụ cho công tác khai thác hiệu quả nguồn gen kháng bệnh đạo ôn ở lúa.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

364 mẫu bệnh đạo ôn gây hại trên các giống lúa khác nhau thu thập ở các tỉnh miền Bắc và miền Trung được sử dụng để phân tích xác định nòi, sự khác biệt di truyền và phân bố của các nòi nấm trên các vùng sinh thái nông nghiệp. Các vật tư; hoá chất phục vụ cho việc thu thập, phân lập mẫu và tách chiết, nhận dạng ADN các mẫu nấm.

2. Phương pháp

a. Phân lập bào tử đơn nấm

Thời gian và địa điểm thu mẫu: Mẫu bệnh được thu vào thời điểm từ tháng 3 đến tháng 5 năm 2007. Địa điểm thu mẫu ở 18 tỉnh miền Bắc và miền Trung

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp

² Viện Thổ nhưỡng Nông hoá

và chủ yếu được thu ở các vùng đồng bằng sông Hồng và Nam Trung bộ. ở các vùng này thường xuyên xảy ra bệnh hại và có mức độ trầm trọng hơn các vùng sinh thái khác.

Cách thu mẫu: Mẫu bệnh được thu trên các giống lúa khác nhau. Mỗi giống lúa bị nhiễm có cấp bệnh từ 6 trở lên đã được thu khoảng 5 mẫu bệnh tùy theo các giống. Mẫu bệnh được thu trên bất kỳ các phần (lá, cổ bông, đốt thân) bị nhiễm bệnh của cây. Mỗi lá bị bệnh được thu một mẫu có kích thước khoảng 5cm.

Phân lập bào tử đơn nấm: Mẫu lá lúa có vết bệnh được rửa sạch dưới vòi nước máy. Sau đó khử trùng bề mặt bằng dung dịch natri hypochloride 10% trong 3 phút và rửa sạch lại bằng nước cất khử trùng. Làm khô mẫu bệnh bằng cách đặt nó lên giấy lọc đã khử trùng. Sau đó nuôi cấy vết bệnh lên môi trường PDA (200g khoai tây; 20g đường glucoza; 20g thạch trong 1 lít dung dịch, pH 6,8) trong điều kiện nhiệt độ 26 - 28°C, trong 24h. Dùng que cấy vô trùng tách nấm từ vết bệnh nuôi cấy (trái mỏng) trên môi trường PDA, sau đó dùng que cấy (kim) để bắt bào tử đơn nấm nuôi cấy trên môi trường PDA để tạo mẫu nấm tinh sạch.

b. Nhận dạng ADN của nấm

Tách chiết và tiến hành nhận dạng ADN nấm đạo ôn theo qui trình của George và cs (1998). Kỹ thuật Pot2 rep - PCR sử dụng mỗi MG1: 5'CGG AAG CCC TAA AGC TGT TT3' và MG2: 5'CCC TCA TTC GTC ACA CGT TC 5'.

c. Phân tích dữ liệu

Dữ liệu nhận dạng ADN được ghi nhận như sau: ở cùng một vị trí nếu có băng ADN được ghi là 1, không có băng ADN được ghi là 0. Qua cách ghi nhận như vậy, chúng ta có bảng dữ liệu nhị phân (0 và 1). Chương trình NTSYS-package [5] được sử dụng để phân tích mối quan hệ giữa các mẫu qua bảng dữ liệu nhị phân này.

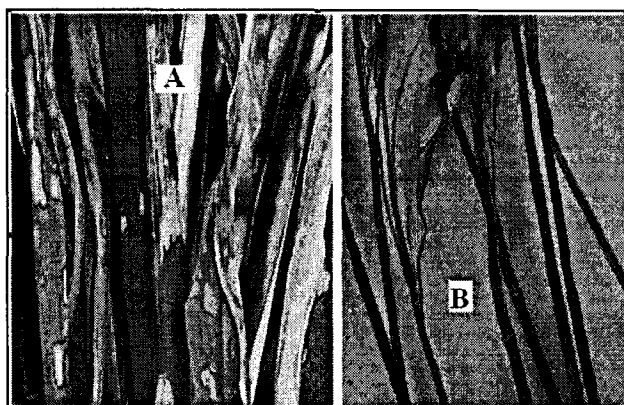
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thu thập mẫu nấm

364 mẫu bệnh đạo ôn đã được thu trong 5 vùng sinh thái nông nghiệp khác nhau: Vùng Tây bắc (TB), Đông bắc (ĐB), đồng bằng sông Hồng (ĐBSH), Bắc Trung bộ (BTB) và Nam Trung bộ (NTB). Cụ thể là các tỉnh: Sơn La, Vĩnh Phúc, Hà Tây, Bắc Ninh, Bắc Giang.

Hà Nội, Hà Nam, Thái Bình, Hưng Yên, Hải Dương, Hải Phòng, Thanh Hoá, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Phú Yên.

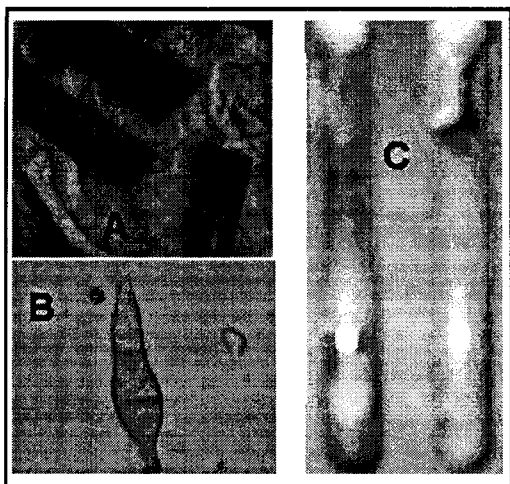
Đạo ôn là một loại bệnh hại nghiêm trọng đối với lúa ở nước ta và nó xảy ra hàng năm trên tất cả các vùng sinh thái khác nhau. Tuy vậy, mức độ trầm trọng của bệnh hại ở miền Bắc và miền Trung chủ yếu là ở các vùng ĐBSH, BTB và NTB; ở các vùng khác như: vùng TB và ĐB bệnh có xuất hiện nhưng ở mức độ nhẹ hơn. Do tập quán canh tác, sử dụng các giống lúa khác nhau.v.v. là nguyên nhân dẫn tới sự đa dạng, sự khác biệt của nấm bệnh cũng như mức độ trầm trọng của bệnh đối với mỗi vùng sinh thái. Điều này cũng giải thích tại sao ở các vùng ĐBSH, BTB và NTB bệnh lại trầm trọng hơn các vùng khác. Từ những lý do nêu trên; mặc dù chúng tôi đã cố gắng thu mẫu sao cho phản ánh được tính đại diện cho các vùng, song trong số 364 mẫu vật thu được chủ yếu là ở vùng ĐBSH, BTB và NTB.



Hình 1. Mẫu lá (A) và cổ bông (B) lúa nhiễm bệnh được thu để phân lập nấm đạo ôn

2. Phân lập mẫu nấm

Từ 364 mẫu bệnh thu được, chúng tôi đã tiến hành phân lập như đã mô tả trong phần phương pháp (hình 1). 335 isolate nấm bệnh đã được phân lập và nuôi cấy trên môi trường PDA (hình 2). Các isolate này đều được nhân lên từ bào tử đơn nên chúng đều có độ thuần là 100%. Chúng tôi đã kiểm tra độ thuần của chúng bằng cách nuôi cấy và kiểm tra bào tử nấm. Kết quả cho thấy, tất cả các isolate không bị tạp nhiễm vi khuẩn hoặc các loại nấm khác, thể hiện qua kết quả các bào tử đơn nấm và khuẩn lạc nấm phát triển đồng dạng.



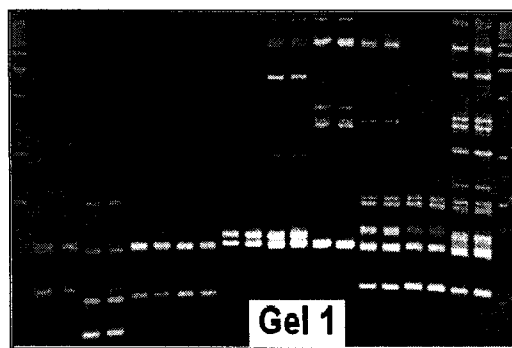
Hình 2. Isolate nấm được phân lập từ mẫu lá bệnh: A: mẫu lá lúa của giống CR203 bị bệnh; B bào tử đơn nấm được phân lập; C: Isolate được nuôi cấy trên môi trường PDA.

3. Xác định các nòi nấm bệnh

Kết quả nhận dạng ADN của các isolate nấm đạo ôn đã được tạo ra bởi sử dụng kỹ thuật Pot2 rep-PCR (hình 3). Số lượng băng ADN được tạo ra qua sử dụng kỹ thuật này đối với mỗi isolate nấm đạo ôn vào khoảng từ 10 đến 25 băng, kích thước các băng có phạm vi từ 500bp tới > 20kb. Nghiên cứu này đã tiến hành nhận dạng ADN của 81 isolate nấm đạo ôn và đã cho được hình ảnh nhận dạng ADN của 81 isolate này. Trên hình ảnh nhận dạng ADN của 81 isolate nấm cho thấy nhiều isolate có cùng kiểu gen. Qua phân tích đã xác định được 23 kiểu gen (haplotype) nấm khác nhau từ 81 isolate nấm. Mỗi một kiểu gen này được xem như một nòi nấm và như vậy đã xác định được 23 nòi. Các nòi nấm được đặt tên từ H1 đến H23, (bảng 1).

Kết quả phân tích cho thấy, tần số của các nòi có phạm vi từ 0,01 đến 0,14 (bảng 1), trong đó có 13 nòi có tần số < 0,5 và 10 nòi có tần số > 0,5. Có 4 nòi: H4, H6, H7 và H14 có tần số $\geq 0,10$ và tương ứng là: 0,14; 0,11; 0,10 và 0,10. Xem xét tần số của các nòi nấm cho thấy, mặc dù số lượng nòi là khá đa dạng (23 nòi) tuy vậy chỉ có một số nòi (4 nòi) có tần số cao hơn hẳn và trong số 4 nòi đó thì nòi H4 có tần số vượt trội. Kết quả nghiên cứu cho thấy quần thể nấm thu thập tuy đa dạng nhưng chỉ có 4 nòi đóng vai trò chính và có lẽ chúng là những nòi gây bệnh chủ yếu của quần thể nấm và là đại diện để sử dụng trong nghiên cứu xác định các gen kháng.

M H1H2H3H4H5H6H7H8H9H10H11H12H13H14H15H16H17H18H19H20M



Hình 3. Nhận dạng ADN của nấm đạo ôn sử dụng mỗi PCR MG1 và MG2

4. Sự đa dạng và phân bố của các nòi nấm trong các vùng sinh thái

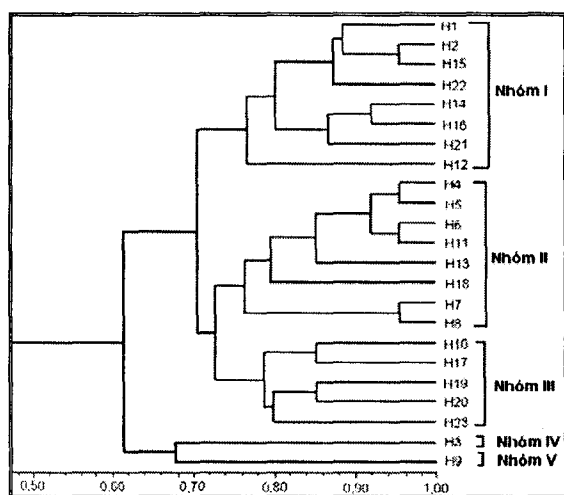
Kết quả phân tích sự đa dạng được thể hiện trong hình 4 và bảng 1 đã cho thấy các nòi nấm có quan hệ di truyền với mức độ tương đồng từ 48% đến 93%. Tuy nhiên, ở phạm vi tương đồng như vậy, các nòi nấm thể hiện sự khá đa dạng về nguồn gen (hình 4). Điều này cũng có thể cho thấy sự đa dạng về độc tính và khả năng gây bệnh của các nòi nấm.

Nghiên cứu sự phân bố của các nòi nấm trong các vùng sinh thái (bảng 2) cho thấy, các nòi: H6, H11, H14 phân bố ở 3 vùng, nòi H7 phân bố ở 4 vùng. Nòi H4 có tần số cao nhất nhưng chủ yếu phân bố và gây bệnh ở hai vùng ĐBSH và BTB. Sự phân bố của các nòi trong các vùng cho thấy khả năng phân bố và gây bệnh ở các vùng của mỗi nòi có tính đặc trưng riêng. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy ở mỗi vùng đều có những nòi chính và là nòi đại diện của quần thể nấm. Chẳng hạn ở vùng ĐBSH và BTB có nòi H4, ở vùng TB: ĐBSH, BTB và NTB có nòi số H7.

Trên cơ sở sự đa dạng kiểu gen của các nòi nấm, nghiên cứu đã phân tích xác định nhóm (chủng nấm) nhằm xác định được những chủng đại diện làm vật liệu cho lây nhiễm đánh giá tính kháng/nhiễm bệnh của lúa. Từ phân tích xác định mức độ tương đồng từ 75% đến 100% cho thấy sự đa dạng của 23 nòi nấm được phân thành 5 nhóm (hình 4), trong đó có 3 nhóm lớn và hai nhóm nhỏ. Nhóm 1 gồm các nòi: H1, H2, H15, H22, H14, H16, H21, H12; nhóm 2 gồm các nòi: H4, H5, H6, H11, H13, H18, H7, H8; nhóm 3 gồm các nòi: H10, H17, H19, H20, H23; nhóm 4 gồm nòi: H3; nhóm 5 gồm nòi: H9.

Bảng 1. Hệ số tương đồng dựa trên phân tích ADN của các nòi nấm đạo ôn

Nòi nấm	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23
H1	1.00																						
H2	0.86	1.00																					
H3	0.65	0.58	1.00																				
H4	0.82	0.68	0.75	1.00																			
H5	0.75	0.62	0.75	0.93	1.00																		
H6	0.82	0.68	0.68	0.93	0.86	1.00																	
H7	0.75	0.68	0.63	0.86	0.79	0.79	1.00																
H8	0.82	0.75	0.55	0.79	0.72	0.72	0.93	1.00															
H9	0.65	0.58	0.65	0.62	0.68	0.62	0.62	0.62	1.00														
H10	0.68	0.55	0.68	0.72	0.65	0.65	0.65	0.65	0.68	1.00													
H11	0.75	0.62	0.68	0.93	0.86	0.93	0.79	0.72	0.68	0.72	1.00												
H12	0.79	0.65	0.44	0.68	0.62	0.68	0.63	0.68	0.52	0.62	0.62	1.00											
H13	0.82	0.68	0.62	0.86	0.79	0.86	0.72	0.72	0.62	0.65	0.79	0.82	1.00										
H14	0.82	0.75	0.48	0.72	0.65	0.72	0.65	0.72	0.62	0.65	0.65	0.82	0.86	1.00									
H15	0.86	0.93	0.58	0.75	0.68	0.75	0.75	0.82	0.58	0.62	0.68	0.72	0.75	0.75	1.00								
H16	0.72	0.72	0.37	0.62	0.55	0.62	0.55	0.62	0.58	0.62	0.62	0.72	0.75	0.89	0.72	1.00							
H17	0.72	0.65	0.58	0.68	0.62	0.75	0.62	0.62	0.58	0.82	0.68	0.65	0.68	0.75	0.65	0.65	1.00						
H18	0.72	0.65	0.51	0.58	0.75	0.68	0.82	0.62	0.62	0.58	0.68	0.82	0.65	0.75	0.68	0.72	0.65	1.00					
H19	0.79	0.65	0.65	0.82	0.75	0.82	0.75	0.68	0.65	0.75	0.75	0.72	0.82	0.75	0.72	0.65	0.72	0.72	1.00				
H20	0.68	0.55	0.68	0.72	0.65	0.79	0.65	0.58	0.75	0.79	0.79	0.62	0.72	0.65	0.62	0.62	0.75	0.75	0.82	1.00			
H21	0.86	0.86	0.51	0.68	0.62	0.68	0.62	0.68	0.51	0.55	0.62	0.72	0.75	0.82	0.79	0.86	0.65	0.58	0.65	0.55	1.00		
H22	0.82	0.82	0.48	0.72	0.65	0.72	0.72	0.79	0.62	0.58	0.65	0.75	0.72	0.79	0.89	0.75	0.62	0.62	0.68	0.58	0.75	1.00	
H23	0.75	0.62	0.62	0.65	0.58	0.72	0.65	0.65	0.68	0.79	0.72	0.62	0.65	0.65	0.62	0.62	0.75	0.75	0.75	0.79	0.62	0.58	1.00



Hình 4. Cây quan hệ di truyền của các nòi và nhóm nấm

Xét tần số của các nhóm nấm cho thấy, nhóm II có tần số cao nhất là: 0,48, nhóm I có tần số cao thứ 2 là: 0,32, trong khi đó nhóm IV và V có tần số $\leq 0,10$ (bảng 2). Qua phân tích tần số nhóm cho thấy, có thể nhóm I và II là các nhóm chính đóng vai trò quyết định dịch bệnh. Hai nhóm này cũng phân bố ở 5 vùng sinh thái nông nghiệp gồm: TB, ĐB, ĐBSH, BTB và NTB.

Bảng 2. Các nhóm nấm, tần số và sự phân bố của chúng trong các vùng sinh thái nông nghiệp

Nhóm	Nòi		Tần số nhóm	Vùng phân bố
	Tên	Tần số		
I	H1	0,06	0,32	TB, ĐB, ĐBSH, BTB, NTB
	H2	0,01		
	H15	0,04		
	H22	0,03		
	H14	0,10		
	H16	0,01		
	H21	0,02		
	H12	0,06		
II	H4	0,13	0,48	TB, ĐB, ĐBSH, BTB, NTB
	H5	0,03		
	H6	0,10		
	H11	0,06		
	H13	0,01		
	H18	0,01		
	H7	0,09		
	H8	0,01		
III	H10	0,04	0,10	ĐB, ĐBSH, BTB, NTB
	H17	0,01		
	H19	0,01		
	H20	0,01		
	H23	0,02		
IV	H3	0,02	0,02	ĐBSH
V	H9	0,09	0,07	ĐB, ĐBSH

Từ kết quả phân tích sự khác biệt di truyền, tần số, phân bố của các nòi và nhóm nấm bệnh đã cho thấy 9 nòi nấm: H1; H4; H6; H7; H9; H10; H11; H12 và H14 là những nòi chính có thể sử dụng làm vật liệu để lấy nhiễm đánh giá sự kháng/nhiễm bệnh đạo ôn của các giống lúa, phục vụ công tác chọn tạo giống lúa kháng bệnh cho các vùng sinh thái nông nghiệp khác nhau.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

Kết quả nghiên cứu đã xác định được 23 nòi nấm bệnh trên 5 vùng sinh thái nông nghiệp gồm: TB; ĐB; ĐBSH; BTB; NTB trên cơ sở nhận dạng ADN nấm sử dụng chỉ thị phân tử PCR mỗi: MG1 và MG2 đặc trưng cho nấm đạo ôn.

23 nòi nấm đã chia thành 5 nhóm ở mức độ giống nhau về di truyền 70%. Trong số các nhóm thì nhóm II có tần số cao nhất là 0,48; nhóm I có tần số là 0,32; các nhóm còn lại có tần số $\leq 0,10$.

Tuy có sự đa dạng cao song quần thể nấm chỉ có một số nòi và nhóm chiếm ưu thế, mang tính chất đại diện đó là: H1; H4; H6; H7; H9; H10; H11; H12; H14 và các nhóm: I và II. Các nòi và nhóm nấm này có thể được sử dụng để lấy nhiễm trên các giống lúa.

2. Đề nghị

Sử dụng các nòi nấm đại diện đã được xác định trong nghiên cứu này làm vật liệu nguồn nấm để đánh giá tính kháng/nhiễm bệnh của các giống lúa nhằm xác định được nguồn gen kháng có hiệu quả ở nước ta phục vụ cho công tác chọn tạo giống lúa kháng bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- (1) Atkin, J.G., Robert, A.L., Adair, C.R., Goto, K., Kozaka, T., Yanagida, R., Yamada, M., Matsumotu, S. (1967), "A international set of rice varieties for differentiating races of *Pyricularia grisea*", *Phytopathology* 57, pp. 297-301.
- (2) George, M. L. C., Nelson, R. J., Zeigler, R. S., Leung, H. (1998), "Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences", *Phytopathology* 88, pp. 223-229.
- (3) Nguyễn Hữu Thụy, Hà Minh Trung, Nguyễn Văn Tuất và ctv (1989), Nòi nấm đạo ôn ở Việt Nam và tuyển chọn bộ giống chống đạo ôn, Kết quả nghiên cứu bảo vệ thực vật, NXB Nông nghiệp, Hà Nội,
- (4) Ngô Vinh Viễn, Hà Minh Trung, Mai Thị Liên và ctv (1997), "Một số kết quả nghiên cứu về bệnh đạo

ôn (1991-1995)", Tạp chí Khoa học - Công nghệ và quản lý kinh tế 3, tr. 99-102.

(5) Rohlf, F. J. (1989), NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Exeter Publishing Co. Ltd. Setauket, NY.

APPLICATION OF DNA TECHNOLOGY TO IDENTIFY THE HAPLOTYPES OF RICE BLAST FUNGUS COLLECTED IN THE NORTH AND CENTRAL VIETNAM

La Tuan Nghia, Pham Thi Thuy, Le Anh, Lê Như Kiều,

Summary

Genetic analysis of rice blast fungus population is to play a very important role in disease management. The advanced technique based on PCR has been used for discrimination of pathogen population which developed by George et al. in 1998, this technique named the Pot2 rep-PCR. In this research, the Pot2 rep-PCR was used to analyze the fungus population collected in the North and the Central of Vietnam. Twenty three haplotypes of fungus were identified among 364 isolates. The clustering analysis was to determine four group at 70% genotyping similarity level. Although, the collection of blast pathogen having the high genetic diversity, it was showing the some common haplotypes and groups such as: the haplotypes H1; H4; H6; H7; H9; H10; H11; H12; H14 and the groups I and II. The above mentioned haplotypes will be used as the representative haplotypes in inoculating on the rice varieties.

Keywords: *Blast fungus, DNA technology; Haplotype, Pyricularia grisea.*

Người phản biện: TS. Ngô Vĩnh Viễn