

Results of testing BT6 rice variety in Northern central region

Le Van Vinh, Tran Thi Tham, Vo Van Trung

Abstract

The short duration rice variety BT6 was created in 2006 by selecting from the combination of BT7 and TBR1 rice varieties. It was be tested in Nghe An and Thua Thien Hue provinces from 2010 and then was VCU and DUS tested by the National Seed Testing Center. Results of testing showed that BT6 rice varieties had short duration (120 - 130 days in Spring crop and 100 - 105 days in Summer - Autumn crop season), high yield (6.5 - 7.0 tons/ha in Spring), good quality, resistance to pests and diseases. It is suitable for development in Northern central region.

Keywords: BT6 rice variety, short duration, high yield, quality, testing

Ngày nhận bài: 15/10/2017

Người phản biện: TS. Phạm Xuân Liêm

Ngày phản biện: 20/10/2017

Ngày duyệt đăng: 10/11/2017

XÁC ĐỊNH NẤM *Colletotrichum* GÂY BỆNH THÁN THƯ ỚT Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG HỒNG

Nguyễn Duy Hưng¹, Hà Việt Cường²,
Hoàng Chúng Lâm¹, Nguyễn Đức Huy²

TÓM TẮT

Nghiên cứu này trình bày kết quả phân loại các mẫu nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt thu tại Đồng bằng sông Hồng dựa trên đánh giá đặc điểm hình thái, giải trình tự gen mã hóa RNA ribosome (Internal Transcribed Spacer, ITS), vùng liên gen ApMat. Kết quả nghiên cứu đã xác định được ít nhất 5 loài là *C. truncatum*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides* (*sensu stricto*), *C. aeschynomenes* và *C. siamense* hại ớt tại Đồng bằng Sông Hồng, trong đó 4 loài sau được ghi nhận lần đầu tiên tại Việt Nam.

Từ khóa: Bệnh thán thư, ớt, nấm *Colletotrichum*, ITS, Đồng bằng sông Hồng

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong số các bệnh hại ớt, bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* gây ra được xem là nguy hiểm nhất (Than *et al.*, 2008).

Cho tới năm 2008, thành phần loài của nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt công bố trên thế giới khá đa dạng, bao gồm ít nhất 7 loài *C. gloeosporioides*, *C. capsici*, *C. acutatum*, *C. coccodes*, *C. dematium*, *C. nigrum* và *C. atramentarium* (Than *et al.*, 2008). Tại Việt Nam, ít nhất 4 loài là *C. acutatum*, *C. capsici*, *C. gloeosporioides* và *C. nigrum* đã được công bố gây bệnh thán thư ớt (Don *et al.*, 2007; Ngô Bích Hào, 1991, 1992).

Việc xác định (định danh) nấm *Colletotrichum* hại ớt ở trên (cũng như các loài *Colletotrichum* khác) chủ yếu dựa vào nguồn gốc ký chủ và các đặc điểm hình thái bao gồm (i) màu sắc, tốc độ phát triển và cấu trúc tản nấm; (ii) hình dạng và kích thước bào tử phân sinh; (iii) hình dạng và kích thước đĩa áp, (iv) có hay không có lông gai của đĩa cành; (v) hình thành hay không hình thành hạch nấm; (vi) hình thành hay không hình thành giai đoạn sinh sản hữu

tính. Do các đặc điểm hình hình thái không đủ để phân loại tới mức loài nên đã có quá nhiều nhầm lẫn trong phân loại nấm *Colletotrichum* (Hyde *et al.*, 2009). Trong khoảng 6 năm trở lại đây, nhiều nghiên cứu phân loại lại nấm *Colletotrichum* đã được thực hiện, chủ yếu dựa trên phân tích phân tử. (Cannon *et al.*, 2012; Damm *et al.*, 2012a; Damm *et al.*, 2012b; Weir *et al.*, 2012). Các nghiên cứu này cho thấy, chẳng hạn, *C. gloeosporioides* và *C. acutatum* thực chất là các phức hợp loài (species complex), trong đó *C. gloeosporioides* gồm ít nhất 22 loài khác nhau (Weir *et al.*, 2012) và *C. acutatum* gồm ít nhất 31 loài khác nhau (Damm *et al.*, 2012a).

Đối với nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên ớt, các nghiên cứu phân loại mới gần đây cho thấy đã có thay đổi lớn về thành phần loài so với công bố trước đây. Chẳng hạn, tại Ấn Độ, định danh lại 52 mẫu nấm *C. gloeosporioides* (*sensu lato*, nghĩa rộng) cho thấy chúng thuộc 2 loài là *C. fructicola* và *C. siamense* (Sharma and Shenoy, 2013). Tương tự, 2 loài *C. acutatum* và *C. capsici*, vốn được coi là 2 loài chính gây hại trên ớt tại Thái Lan nay được định

¹ Viện nghiên cứu Rau quả; ² Học viện Nông nghiệp Việt Nam

danh lại lần lượt là *C. simmondsii* và *C. truncatum* (Ko *et al.*, 2011).

Xác định chính xác thành phần cũng như định danh đúng nấm *Colletotrichum* có vai trò quan trọng không những về mặt khoa học mà còn trong thực tiễn quản lý bệnh vì quan hệ giữa nấm với cây ký chủ cũng như tính miễn cảm với thuốc hóa học khác nhau theo loài (Mongkolporn *et al.*, 2010).

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định được chính xác thành phần loài của nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt tại Đồng bằng sông Hồng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu nấm: Nấm *Colletotrichum* được phân lập từ vết bệnh thán thư trên quả ớt thu thập trong năm 2015. Nấm được phân lập trên môi trường WA (Water Agar) và được làm thuần trên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đánh giá đặc điểm hình thái

Các đặc điểm hình thái quan trọng trong phân loại nấm *Colletotrichum* gồm hình dạng và kích thước bào tử phân sinh được đánh giá trên nấm nuôi cấy sau 7 ngày trên môi trường PDA ở điều kiện 25 - 28 °C, chiếu sáng liên tục. Đặc điểm của đĩa áp (appressorium) gồm hình dạng và kích thước được đánh giá theo mô tả đã công bố (Cai *et al.*, 2009; Johnston and Jones, 1997). Một mảnh môi trường PDA (1 cm²) được đặt trên đĩa Petri vô trùng. Bào tử nấm được cấy vào cạnh của miếng môi trường và một lamên vô trùng được đặt lên trên mảnh môi

trường. Đĩa được ủ 5 - 7 ngày ở 25°C cho tới khi đĩa áp hình thành ở mặt dưới của lam.

2.2.2. Chiết ADN nấm

ADN tổng số của các mẫu nấm được chiết bằng đệm CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) theo phương pháp của Doyle & Doyle (1987). Khoảng 50 mg tàn nấm thuần nuôi cấy trên môi trường PDA được nghiền bằng chày nhựa chuyên dụng (Kontes™ Pellet Pestle) với 0.5 mL đệm CTAB trong ống Eppendorf loại 1.5 mL. ADN được chiết một lần với Chloroform: isoamyl alcohol (24:1). Cặn ADN được rửa hai lần bằng ethanol 70% và hòa trong 30 uL nước cất 2 lần vô trùng. Mẫu ADN được bảo quản ở - 20 °C.

2.2.3. Phản ứng PCR

Các phản ứng PCR được thực hiện bằng kit GoTaq Green Master Mix (Promega) hoặc kit DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR PTC-100 (MJ Research Inc.) với điều kiện sau: khởi đầu biến tính ở 94°C trong 2 phút; tiếp theo là 35 chu trình phản ứng gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mỗi ở 52°C - 54°C trong 30 giây (Bảng 1), tổng hợp sợi ở 72°C trong 1 phút. Phản ứng được kết thúc với 5 phút ở 72°C. Các mẫu sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở Bảng 1.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1 % được chuẩn bị bằng đệm TAE (Tris Acetic acid EDTA) và chứa 0.5 mg/mL ethidium bromide. Gel được chạy trên thiết bị điện di Mupid-exU Mini System (Helixxtec) với đệm TAE ở điện thế 100 V trong 30 - 40 phút.

Bảng 1. Các môi được sử dụng trong định danh phân tử nấm *Colletotrichum*

Môi	Trình tự (5'-3')	Sản phẩm (bp)	Vùng gen	Tham khảo
AM-F	TCATTCTACGTATGTGCCCG	~ 910	ApMat	Silva <i>et al.</i> (2012)
AM-R	CCAGAAATACACCGAACTTGC			
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	~ 500	ITS	White <i>et al.</i> (1990)
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG			

2.2.4. Giải trình tự và phân tích trình tự

Sản phẩm PCR được tinh chiết từ gel agarose dùng kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific). Sản phẩm PCR tinh chiết được giải trình tự trực tiếp cả 2 chiều dùng môi PCR tại hãng Macrogen (Hàn Quốc).

Các chuỗi mẫu được xác định danh tính khi so sánh với các chuỗi đã công bố từ trước nhờ phần mềm tìm kiếm BLAST tại NCBI (The National Center for Biotechnology Information ([http://www.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

[ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).

Phân tích trình tự và xây dựng cây phả hệ được thực hiện bằng phần mềm ClustalX 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) và Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 1/2015 đến tháng 12/2017 tại Viện Nghiên cứu Rau quả và Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới, Học viện Nông nghiệp Việt Nam (Trâu Quỳ, Gia Lâm, Hà Nội).

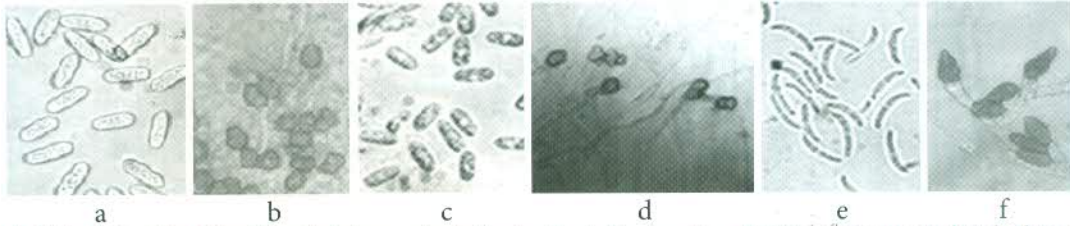
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm hình thái nấm *Colletotrichum*

Mười sáu mẫu nấm đã được phân lập từ vết bệnh thán thư trên quả ớt thu thập tại 8 tỉnh miền Bắc gồm Hà Nội, Hải Phòng, Bắc Ninh, Hưng Yên, Bắc Giang, Thái Bình, Sơn La và Thái Nguyên (Bảng 2).

Đánh giá đặc điểm bào tử phân sinh và đĩa áp của nấm thấy 16 mẫu nấm có thể được chia làm 3 nhóm (Bảng 2).

Nhóm I gồm 12 mẫu là C1, C14, C11, C24, C42, C44, C45, C4, C6, C33, C9 và C26. Nhóm này có bào tử phân sinh hình trụ, hai đầu tù tới tròn, kích thước dao động từ 10,9 - 13,6 × 3,4 - 4,9 μ. Đĩa áp có màu nâu đến nâu đậm, hình trứng, tày, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều (Bảng 2, Hình 1).



Hình 1. Đặc điểm bào tử phân sinh (a, c, e) và đĩa áp (b, d, f) của nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt tại Đồng Bằng Sông Hồng (đại diện 3 nhóm hình thái C1 (a, b); C29 (c, d) và C25 (e, f))

Nhóm II chỉ gồm 1 mẫu là C29. Đặc điểm bào tử của nhóm này nhìn chung giống với nhóm I. Tuy nhiên một số đĩa áp của nấm có mức độ chẻ thùy sâu hơn so với nhóm I (Bảng 2, Hình 1).

Đặc điểm bào tử và đĩa áp của nấm nhóm I và II nhìn chung giống với các loài nấm thuộc phức hợp loài *C. gloeosporioides*. Phức hợp này gồm ít nhất 22 loài, tất cả đều tạo bào tử phân sinh hình trụ thẳng, hai đầu tù, kích thước rất dao động. Đặc điểm hình thái tản cũng như đĩa áp cũng rất đa dạng và thay đổi (Weir *et al.*, 2012).

Nhóm III gồm 3 mẫu là C25, C30 và C48. Nhóm này có bào tử phân sinh hình lưỡi liềm, kích thước dao động từ 21,5 - 22,4 × 3,5 - 3,7 μ. Đĩa áp giống nhóm I, có màu nâu đến nâu đậm, hình trứng, tày, elip tới gần hình thoi, một số có hình dạng không đều (Bảng 2, Hình 1).

3.2. Định danh phân tử nấm

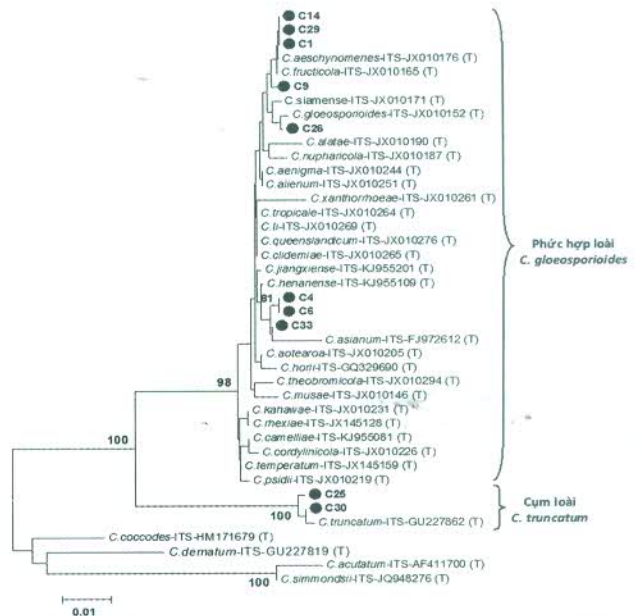
Do phân loại nấm *Colletotrichum* chỉ dựa vào các đặc điểm hình thái đã tạo ra quá nhiều sai lầm do sự phụ thuộc cao của các đặc điểm hình thái vào điều kiện môi trường nên vai trò của phân tích phân tử đã ngày càng trở nên quan trọng và được xem là chuẩn vàng trong phân loại nhóm nấm này (Cannon *et al.*, 2000; Hyde *et al.*, 2009).

3.2.1. Định danh phân tử dựa trên giải trình tự vùng ITS

Vùng liên gen ITS (internally transcribed spacers) của cụm gen rDNA là một trong các vùng gen phổ biến nhất để nghiên cứu đa dạng và phân loại nấm (Schoch *et al.*, 2012). Vùng gen này cũng đã từng được sử dụng để định danh nấm *Colletotrichum* (Martínez-Culebras *et al.*, 2000).

Dựa trên đặc điểm hình thái, 10 mẫu nấm (C1, C4, C6, C9, C14, C25, C26, C29, C30, C33) đã được chọn giải trình tự vùng ITS. Tất cả các mẫu giải trình tự đều có chất lượng tốt và có kích thước từ 529 đến 563 bp (Bảng 3).

Kết quả tìm kiếm trên Ngân hàng gen bằng phần mềm BLAST cho thấy 2 mẫu C25 và C30 thuộc loài *C. truncatum*. Trình tự của tám mẫu còn lại đều có mức đồng nhất trình tự cao (từ 98 - 99%) với các loài thuộc phức hợp loài *C. gloeosporioides* (Bảng 3).



Hình 2. Phân tích phả hệ dựa trên trình tự vùng ITS của các mẫu nấm *Colletotrichum* thuộc phức hợp loài *C. gloeosporioides* và các loài được công bố gây bệnh thán thư ớt

Cây được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining (NJ). Giá trị ở các nút là giá trị thống kê bootstrap dưới dạng % (1000 lần lặp) (chỉ trình bày các giá trị > ngưỡng tin cậy chung 75%). Ký tự T trong ngoặc đơn là mẫu đại diện loài (Type strain). Thanh tỷ lệ chỉ khoảng cách di truyền.

