

ĐẶC TRƯNG PHÂN TỬ NẤM *Mycosphaerella berkeleyi* GÂY BỆNH ĐÓM ĐEN LẠC TẠI NGHỆ AN

Ngô Thị Mai Vi^{1*}, Hà Giang², Trần Thị Như Hoa², Nguyễn Văn Viên³

¹*Khoa Nông lâm ngư, Trường đại học Vinh*

²*Trung tâm Nghiên cứu Bệnh cây Nhiệt đới, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

³*Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

Email*: maivitpv@yahoo.com

Ngày gửi bài: 05.09.2016

Ngày chấp nhận: 30.10.2016

TÓM TẮT

Nghiên cứu này đã lần đầu tiên xác định được trình tự vùng ITS (Internal Transcribed Spacer) của 11 mẫu nấm đốm đen thu thập trên lạc năm 2013, chủ yếu tại tỉnh Nghệ An. Trình tự gen ITS của tất cả các mẫu nấm đều đồng nhất 100% với nhau và đồng nhất từ 99,7 - 100% với loài *Mycosphaerella berkeleyi* trên GenBank. Kỹ thuật PCR dùng mồi thiết kế trên các chuỗi lặp (Rep-PCR, repetitive sequence primed PCR) với 3 bộ mồi được thiết kế trên các chuỗi lặp của vi khuẩn gồm chuỗi lặp đối song vùng không mã hóa (REP, repetitive extragenic palindromic), chuỗi lặp bảo thủ vùng liên gen (ERIC, enterobacterial repetitive intergenic consensus) và chuỗi BOX cũng đã được sử dụng để đánh giá mức độ đa dạng di truyền của 33 mẫu nấm đốm đen thu thập trên lạc, chủ yếu tại tỉnh Nghệ An. Phản ứng PCR dùng bộ mồi BOX đã tạo nhiều băng sản phẩm đa hình. Phân tích Rep-PCR đã chứng tỏ quần thể nấm đốm đen không đa dạng về di truyền. Không có mối quan hệ giữa các nhóm nấm được xác định dựa trên phân tích Rep-PCR và nguồn gốc thu thập mẫu cũng như đặc điểm hình thái.

Từ khóa: *Mycosphaerella berkeleyi*, đốm đen lạc, Nghệ An, Việt Nam, Rep-PCR, ITS.

Molecular Characterization of *Mycosphaerella Berkeleyi* Causing Late Leaf Spot of Groundnut in Nghe An

ABSTRACT

This study identified the ITS (Internal Transcribed Spacer) sequence of 11 groundnut late leaf spot fungal isolates collected from Vietnam, mainly from Nghe An province in 2013. The ITS sequences of the 11 isolates were identical among them and highly identical (99.7 and 100%) with two available isolates of *Mycosphaerella berkeleyi* on the GenBank. Rep-PCR technique (Repetitive sequence primed PCR) with 3 sets of primers designed on the repetitive sequences of bacterial genome including the repetitive extragenic palindromic (REP) sequence, enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) and BOX element, was used to investigate the genetic diversity of 33 *M. berkeleyi* isolates. PCR using BOX primers (BOX-PCR) produced polymorphic bands from tested fungal isolates. Rep-PCR analysis proved that fungal populations in Nghe An were of low genetic diversity. There was no correlation between Rep-PCR defined fungal groups with the origin of the isolates (location of sampling, groundnut cultivars) and morphological characteristics of the isolates (color and size of cultures)

Keywords: *Mycosphaerella berkeleyi*, late leaf spot, groundnut, Nghe An, Vietnam, Rep-PCR, ITS.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh đốm đen do nấm *Phaeoisariopsis personata* (giai đoạn vô tính) hay *Mycosphaerella berkeleyi* (giai đoạn hữu tính)

là một trong các bệnh hại lá nguy hiểm nhất đối với cây lạc trên toàn thế giới. Bệnh đốm đen hại lạc có thể làm giảm tới 80% năng suất lạc (Grichar *et al.*, 1998; McDonald *et al.*, 1985; Miller *et al.*, 1990).

Trên đồng ruộng, nấm tạo cả hai giai đoạn sinh sản vô tính và hữu tính nhưng bào tử phân sinh hình thành từ tàn dư tồn tại trong đất là nguồn bệnh quan trọng nhất. Nhìn chung, nấm đốm đen không truyền qua hạt nhưng được xem là tác nhân truyền qua đất. Khi bắt đầu vụ trồng, bào tử phân sinh nấm từ tàn dư trong đất sẽ nhiễm các lá phía dưới và nhanh chóng phát tán lên các lá phía trên và có thể gây tàn lụi bộ lá nếu điều kiện ngoại cảnh thuận lợi (McDonald *et al.*, 1985).

Sự đa dạng về các đặc điểm sinh học cũng như di truyền của nấm đốm đen nói riêng và tác nhân gây bệnh cây nói chung cần phải được nghiên cứu trước khi áp dụng các biện pháp phòng chống. Các chủng nấm khác nhau về nền di truyền có thể có phản ứng miễn cảm khác nhau đối với thuốc hóa học cũng như khác nhau về tính gây bệnh trên các giống cây (Adiver *et al.*, 2009).

Nghiên cứu về nấm đốm đen hại lạc tại Ấn Độ dựa trên phân tích RAPD và isozyme (Adiver, 2008) cho thấy nấm đốm đen có đa dạng về di truyền với hệ số tương đồng từ 77 - 94% và mức độ đa dạng di truyền có liên quan đến phân bố địa lý của mẫu nấm thu thập.

Tại Việt Nam, đa dạng di truyền nấm đốm đen hại lạc chưa được nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã áp dụng một kỹ thuật phân tích đa dạng tương đối đơn giản (chỉ dựa trên PCR) để tìm hiểu mức độ đa dạng di truyền của quần thể nấm đốm đen tại Nghệ An là kỹ thuật Rep-PCR.

Kỹ thuật Rep-PCR dùng môi thiết kế trên các chuỗi lặp (Rep-PCR, repetitive sequence primed PCR = repetitive element - based PCR) đã được ứng dụng nhiều do có ưu điểm là đơn giản (chỉ dựa trên PCR) và tin cậy. Kỹ thuật nguyên bản sử dụng các môi được thiết kế dựa trên các chuỗi lặp trên bộ gen vi khuẩn như các chuỗi lặp đối song vùng không mã hóa (REP, repetitive extragenic palindromic) có kích thước 35 - 40 bp, các chuỗi lặp bảo thủ vùng liên gen (ERIC, enterobacterial repetitive intergenic consensus) có kích thước 124 - 127 bp, chuỗi BOX có kích thước 54 bp. Phản ứng PCR sử dụng các môi này được gọi cụ thể là REP-PCR,

ERIC-PCR và BOX-PCR (Rademaker *et al.*, 2004). Mặc dù Gillings và Holley (1997) đã chứng minh rằng các chuỗi lặp bảo thủ vùng liên gen không có ở bộ gen vi sinh vật nhân chuẩn nhưng kỹ thuật Rep-PCR có thể được áp dụng để nghiên cứu đa dạng nhiều loài nấm gây bệnh cây như *Exerohilum turcicum* (Muiru *et al.*, 2010), *Rhizoctonia solani* (Matsumoto, 2014; Matsumoto và Cuong, 2014; Toda *et al.*, 1999), *Verticillium dahliae* (Komatsu *et al.*, 2001), *Fusarium* spp. (Ebadi *et al.*, 2014; Gurel *et al.*, 2010), *Cercospora canescens* (Ferrater, 2003), *Macrophomina phaseolina* (Purkayastha *et al.*, 2008), thậm chí có thể ứng dụng để phân loại nấm ở mức loài (Abdollahzadeh và Zolfaghari, 2014; Palencia *et al.*, 2009).

Ngoài ra, định danh phân tử nấm đốm đen hại lạc cũng chưa được nghiên cứu nhiều trên thế giới ngoại trừ trình tự vùng liên gen ITS (internally transcribed spacers) của cụm gen rDNA của 2 mẫu phân lập từ Mỹ với mã GenBank AY266147 (Stewart *et al.*, 1999) và từ Cộng hòa Trinidad và Tobago với mã GenBank AB435066 (Kurose *et al.*, 2009).

Hiện nay, vùng gen ITS là một trong các vùng gen phổ biến nhất để nghiên cứu đa dạng và xác định nhiều loài nấm. Các vùng ITS do có tốc độ đột biến nhìn chung tương ứng với tốc độ biệt hóa loài (tiến hóa trung tính) nên có thể phân biệt mối quan hệ tới mức loài. Hiện nay, vùng ITS được xem là “mã vạch - barcoding” đối với nấm (Schoch *et al.*, 2012).

Mục tiêu của nghiên cứu này là định danh phân tử nấm đốm đen hại lạc của Việt Nam dựa trên vùng ITS và đánh giá mức độ đa dạng di truyền của nấm dựa trên phân tích Rep-PCR.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Mẫu nấm

Nấm đốm đen hại lạc được phân lập bằng cách cấy đơn bào tử từ vết bệnh thu thập trên lạc. Mẫu lá lạc có vết bệnh điển hình được rửa sạch bằng nước vòi, sau đó bằng nước cất vô trùng. Chạm nhẹ vết bệnh trên bề mặt môi trường WA (water agar) úp ngược. Với hỗ trợ của kính hiển vi, các đơn bào tử được chuyển

bằng kim thủy tinh sang đĩa môi trường WA mới. Sau 2 ngày, bào tử nấm đang nảy mầm được chuyển sang môi trường PGA bổ sung dịch chiết lá lác để được mẫu nấm thuần.

2.2. Chiết DNA nấm

Khoảng 50 mg tản nấm thuần được nghiền bằng chày nhựa chuyên dụng (Kontes™ Pellet Pestle) với 0,5 mL đệm CTAB Doyle & Doyle (1987) trong ống Eppendorf loại 1,5 mL. DNA được chiết 2 lần với chloroform: isoamyl alcohol (24:1). Cặn DNA được rửa 2 lần bằng ethanol 70% và hòa trong 50 uL nước cất 2 lần vô trùng. Mẫu DNA được bảo quản ở -20°C.

2.3. PCR và giải trình tự

Hai môi ITS4 và ITS5 (White *et al.*, 1990) đã được sử dụng để nhân toàn bộ vùng liên gen ITS của cụm gen rDNA của mẫu nấm. Phản ứng PCR được thực hiện với DreamTaq Polymerase của hãng Fermentas với nhiệt độ gắn môi ở 52°C. Sản phẩm PCR được tinh chiết từ gel agarose dùng kit tinh chiết PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Hàm lượng DNA được ước lượng nồng độ bằng điện di agarose. Sản phẩm PCR được giải trình tự trực tiếp 1 chiều dùng môi PCR tại hãng Macrogen (Hàn Quốc). Trình tự nucleotide được biên tập và lắp ráp dùng phần mềm Seqman (DNASTAR, LaserGene).

2.4. Phân tích trình tự

Dựa trên các trình tự thu được, việc tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu Genbank bằng dùng phần mềm trực tuyến BLAST tại NCBI (the National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Phân tích trình tự được thực hiện dùng các phần mềm

ClustalX (Larkin *et al.*, 2007) và MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013)

2.5. Rep-PCR

Ba loại phản ứng Rep-PCR, REP-PCR, ERIC-PCR và BOX-PCR đã được thực hiện với các môi Rep-PCR được trình bày ở bảng 1. Mỗi phản ứng Rep-PCR có tổng thể tích 15 µL chứa 4,5 µL nước siêu sạch (Invitrogen), 7,5 µL GoTaq Green Master Mix (Promega), 2 µL DNA, 0,5 µL mỗi loại môi REP 1R và REP 2I (đối với REP-PCR), 0,5 µL mỗi loại môi ERIC 1R và ERIC 2 (đối với ERIC-PCR) và 1 µL mỗi BOX A1R (đối với BOX-PCR). Các môi đều được chuẩn bị ở nồng độ 20 µM.

Các phản ứng Rep-PCR được thực hiện trên máy PCR PTC-100 (MJ Research Inc.) với điều kiện sau: khởi đầu biến tính ở 94°C trong 4 phút; tiếp theo là 35 chu trình phản ứng gồm biến tính ở 94°C trong 1 phút, gắn môi ở 50°C (BOX-PCR và ERIC-PCR) và 40°C (REP-PCR) trong 1 phút, tổng hợp sợi ở 72°C trong 3 phút. Phản ứng được kết thúc với 5 phút ở 72°C.

Sản phẩm Rep-PCR được điện di trên gel agarose 1% được chuẩn bị bằng đệm TAE 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. Bản gel được kiểm tra dưới ánh sáng tử ngoại và được chụp bằng máy ảnh số.

Tất cả các băng xuất hiện trên bản điện di bất kể độ sáng đều được ghi và chuyển sang dạng số liệu nhị phân (0 và 1) để làm số liệu đầu vào cho phân tích đa dạng dùng phần mềm NTSYS pc 2.0. Do bộ gen nấm đốm đen lác là đơn bội và Rep-PCR thuộc nhóm marker trội

Bảng 1. Các môi được sử dụng trong Rep-PCR

Môi	Trình tự (5'-3')	Tham khảo
BOX A1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	Versalovic <i>et al.</i> , 1994
ERIC 1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
ERIC 2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
REP 1R	IIICGICGICATCIGGC	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
REP 2I	ICGICTTATCIGGCCTAC	Versalovic <i>et al.</i> , 1991

nên hệ số phù hợp đơn giản SMC (simple matching coefficient) được sử dụng để tính hệ số tương đồng theo công thức sau: S (hệ số tương đồng) = $(a+d)/(a+b+c+d)$; trong đó a là số bằng giống nhau của 2 mẫu, b là số bằng chỉ xuất hiện ở mẫu thứ i , c là số bằng chỉ xuất hiện ở mẫu thứ j , d là số bằng không xuất hiện ở cả 2 mẫu (nhưng xuất hiện ở các mẫu khác). Phân tích cụm được thực hiện theo phương pháp ghép cặp mẫu dùng khoảng cách trung bình số học ngang bằng (UPGMA, Unwaited Pair Group Method using Arithmetic Averages).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định các mẫu nấm mốc đen lá lạc thu tại Nghệ An bằng giải trình tự vùng ITS

Trong nghiên cứu này, 8 mẫu nấm mốc đen lá lạc phân lập từ bốn vùng sinh thái của tỉnh Nghệ An (đồng bằng ven biển, đồng bằng, trung du và miền núi) cũng như 3 mẫu nấm mốc đen lá lạc thu tại Lào Cai, Hà Tĩnh và Đồng Nai đã được giải trình tự trực tiếp vùng ITS từ sản phẩm PCR (Bảng 2). Sau khi lắp ráp và loại bỏ các đoạn nhiễu ở 2 đầu, các mẫu nấm đều có kích thước đoạn đọc được từ 441 - 496 bp (Bảng 2). Trình tự các đoạn đọc được bao phủ vùng ITS1, 5.8S và ITS2 của chuỗi ITS, cho phép xác định chính xác nấm mốc đen tới mức loài (Goodwin *et al.*, 2001).

Đầu tiên, trình tự đọc được của 11 mẫu được sử dụng để tìm kiếm các chuỗi gần gũi trên GenBank. Kết quả tìm kiếm (BLAST SEARCH) cho thấy tất cả 11 mẫu đều trùng khớp với 2 mẫu *M. berkeleyi* duy nhất trên GenBank (mã GenBank AB435066 và AY266147). Đáng chú ý, kết quả tìm kiếm cũng cho thấy hiện nay mới chỉ có 2 trình tự vùng ITS của nấm mốc đen lá lạc trên GenBank.

Tiếp theo, trình tự vùng ITS của 11 mẫu nấm được so sánh với nhau và với 30 trình tự vùng ITS của các mẫu nấm *Mycosphaerella* đại diện sẵn có trên GenBank, kể cả 2 mẫu *M. berkeleyi* (AY266147 và AB435066). Các mẫu nấm trên Genbank này là các mẫu chuẩn đã được công bố (Goodwin *et al.*, 2001) (Bảng 3).

Kết quả so sánh trình tự cho thấy trình tự vùng ITS của 11 mẫu nấm đều đồng nhất 100% với nhau chứng tỏ chúng đều là thành viên của cùng 1 loài.

Khi so sánh trình tự của 11 mẫu nấm trong nghiên cứu này với trình tự của 30 mẫu nấm GenBank thấy chúng có mức đồng nhất rất cao, 99,7 - 100%, tương ứng với 2 mẫu nấm *M. berkeleyi*, AY266147 và AB435066, sẵn có trên GenBank. Tất cả 11 mẫu nấm trong nghiên cứu này đều có mức đồng nhất trình tự thấp hơn nhiều, từ 69,2 - 94,2% đối với 28 mẫu nấm GenBank còn lại (Bảng 3).

Bảng 2. Nguồn gốc và kết quả giải trình tự vùng ITS của 11 mẫu nấm mốc đen lá lạc

Mã mẫu	Nguồn gốc mẫu nấm			Mã giải trình tự	Kích thước đoạn đọc được (bp)
	Địa điểm thu thập	Giống	Vùng sinh thái		
NA4.3	Nghi Thái, Nghi Lộc, Nghệ An	L14	Đồng bằng ven biển	17B4ZAB024	441
NA12.1	Nghi Xá, Nghi Lộc, Nghệ An	L14	Đồng bằng ven biển	17B4ZAB025	493
NA21.1	Diễn Thành, Diễn Châu, Nghệ An	Sen NA	Đồng bằng ven biển	17B4ZAB026	478
NA25.1	Nam Thượng, Nam Đàn, Nghệ An	L14	Đồng bằng	17B4ZAB027	464
NA30.1	Ngọc Sơn, Thanh Chương, Nghệ An	L14	Trung du	17B4ZAB028	466
NA32.1	Lưu Sơn, Đô Lương, Nghệ An	L14	Trung du	17B4ZAB029	482
NA33.1	Bình Sơn, Anh Sơn, Nghệ An	L14	Miền núi	17B4ZAB030	473
HT1.1	Cổ Đàm, Nghi Xuân, Hà Tĩnh	L14	Đồng bằng ven biển	17B4ZAB031	486
NA37.1	Tam Quang, Tương Dương, Nghệ An	Sen Lai	Miền núi	17B4ZAB032	493
LC2	Tả Phời, thành phố Lào Cai	L14	Miền núi	17B4ZAB034	496
ĐN1	Hưng Thịnh, Trảng Bom, Đồng Nai	L14	Trung du	17B4ZAB035	468

Đặc trưng phân tử nấm *Mycosphaerella berkeleyi* gây bệnh đốm đen lạt tại Nghệ An

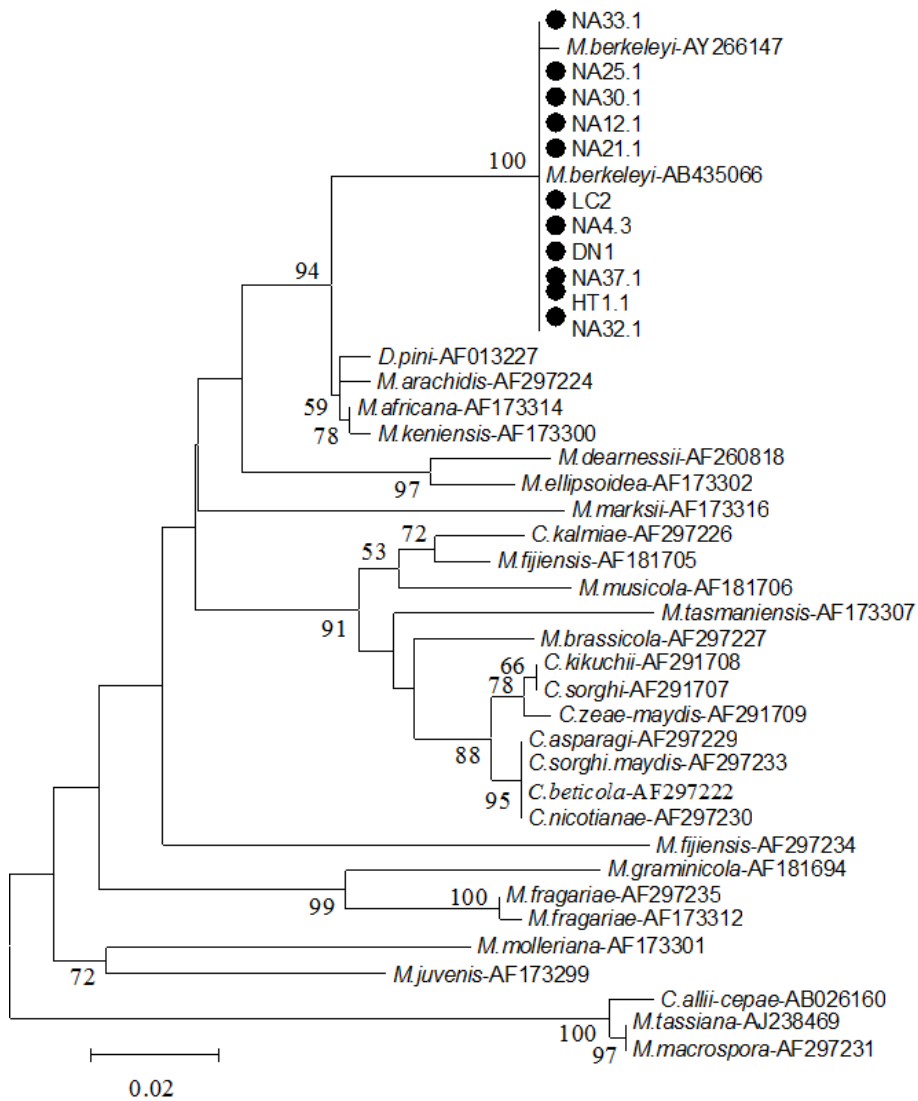
Phân tích phả hệ dựa trên trình tự vùng ITS cũng cho thấy 11 mẫu nấm trong nghiên cứu và 2 mẫu nấm *M. berkeleyi* sẵn có trên GenBank ở trên hình thành một cụm loài rõ rệt, với giá trị thống kê bootstrap 100% và tách biệt hẳn các nấm *Mycosphaerella* khác (Hình 1).

Kết quả so sánh trình tự và phân tích phả hệ vùng ITS đã chứng tỏ tất cả 11 mẫu nấm

đốm đen lạt thu thập tại Nghệ An, Hà Tĩnh, Lào Cai và Đồng Nai là thành viên của loài *M. berkeleyi*. Nghiên cứu này cũng chứng minh trình tự vùng ITS rất bảo thủ trong loài *M. berkeleyi* và do đó không thể sử dụng trong phân tích đa dạng nhưng lại là chỉ thị phân tử rất tốt để định danh nấm đốm đen lạt *M. berkeleyi*.

Bảng 3. So sánh trình tự vùng ITS của 11 mẫu nấm đốm đen lạt với các nấm *Mycosphaerella*

STT	Tên giai đoạn vô tính	Tên giai đoạn hữu tính	Mã GenBank	Mức đồng nhất trình tự (%)
1	<i>Phaeoisariopsis personata</i>	<i>Mycosphaerella berkeleyi</i>	AB435066	100,0
2	<i>Phaeoisariopsis personata</i>	<i>Mycosphaerella berkeleyi</i>	AY266147	99,7
3	<i>Dothistroma septospora</i>	<i>Mycosphaerella pini</i>	AF013227	94,2
4	<i>Cercospora arachidicola</i>	<i>Mycosphaerella arachidis</i>	AF297224	93,5
5	Chưa xác định	<i>Mycosphaerella africana</i>	AF173314	93,3
6	Chưa xác định	<i>Mycosphaerella keniensis</i>	AF173300	93,3
7	<i>Cercospora sorghi var. maydis</i>	Chưa xác định	AF297233	83,4
8	<i>Cercospora nicotianae</i>	Chưa xác định	AF297230	83,3
9	<i>Cercospora zaeae-maydis</i>	Chưa xác định	AF291709	83,1
10	<i>Cercospora asparagi</i>	Chưa xác định	AF297229	83,1
11	<i>Cercospora beticola</i>	Chưa xác định	AF297222	82,9
12	<i>Cercospora kikuchii</i>	Chưa xác định	AF291708	82,9
13	<i>Cercospora sorghif</i>	Chưa xác định	AF291707	82,9
14	<i>Paracercospora fijiensis</i>	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	AF181705	82,6
15	<i>Mycovellosiella tasmaniensis</i>	<i>Mycosphaerella tasmaniensis</i>	AF173307	82,6
16	<i>Asteromella brassicae</i>	<i>Mycosphaerella brassicicola</i>	AF297227	82,5
17	<i>Cercospora kalmiae</i>	Chưa xác định	AF297226	82,2
18	<i>Pseudocercospora musae</i>	<i>Mycosphaerella musicola</i>	AF181706	82,1
19	<i>Ramularia brunnea</i>	<i>Mycosphaerella fragariae</i>	AF173312	81,0
20	<i>Ramularia brunnea</i>	<i>Mycosphaerella fragariae</i>	AF297235	79,9
21	<i>Uwebraunia ellipsoidea</i>	<i>Mycosphaerella ellipsoidea</i>	AF173302	78,4
22	Chưa xác định	<i>Mycosphaerella marksii</i>	AF173316	77,7
23	<i>Paracercospora fijiensis</i>	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	AF297234	77,4
24	<i>Colletogloeopsis molleriana</i>	<i>Mycosphaerella molleriana</i>	AF173301	75,2
25	<i>Septoria tritici</i>	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	AF181694	74,8
26	<i>Lecanosticta acicola</i>	<i>Mycosphaerella dearnessii</i>	AF260818	74,5
27	<i>Uwebraunia juvenis</i>	<i>Mycosphaerella juvenis</i>	AF173299	74,4
28	<i>Cladosporium iridis</i>	<i>Mycosphaerella macrospora</i>	AF297231	70,0
29	<i>Cladosporium allii-cepae</i>	<i>Mycosphaerella allii-cepae</i>	AB026160	69,6
30	<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Mycosphaerella tassiana</i>	AJ238469	69,2



Hình 1. Phân tích phả hệ dựa trên trình tự toàn bộ vùng ITS của 11 mẫu nấm đốm đen lạc thu tại Việt Nam (đánh dấu bằng chấm đen) và các mẫu nấm sẵn có trên GenBank

Ghi chú: Cây được xây dựng bằng phương pháp NJ. Thanh bar trình bày khoảng cách di truyền. Giá trị ở các nốt là giá trị thống kê bootstrap dưới dạng phần trăm (1.000 lần lặp) và chỉ trình bày các giá trị > 50% (Ngưỡng tin cậy nhìn chung là 75% có nghĩa trong 1.000 lần lặp thì 750 lần các taxa phân nhóm với nhau).

3.2. Phân tích Rep-PCR

3.2.1. Nguồn gốc và đặc điểm hình thái các mẫu nấm đốm đen

Tổng số 33 mẫu nấm đốm đen đã được phân lập từ lá lạc bệnh của 4 giống, L14, L26, Sen Lai và Sen Nghệ An (Sen NA), trồng vụ xuân năm 2013 tại 4 tỉnh gồm Đồng Nai (2 mẫu), Nghệ An (29 mẫu), Thanh Hóa (1 mẫu), Lào Cai (1 mẫu). Các mẫu nấm (Bảng 4), sau khi được phân lập

thuần, đã được nuôi cấy trên môi trường PGA bổ sung dịch chiết lá lạc cho đánh giá đặc điểm hình thái.

Tất cả các mẫu nấm đốm đen đều sinh trưởng rất chậm với đường kính tản nấm trung bình từ 3,0 - 13,5 mm. Tản nấm của các mẫu nấm có màu tối, từ màu xám tới đen (Bảng 4). Kết quả này chứng tỏ các mẫu nấm đốm đen lạc khá đa dạng về đặc điểm hình thái cũng như tốc độ sinh trưởng trên môi trường nhân tạo.

Bảng 4. Nguồn gốc và đặc điểm hình thái của 33 mẫu nấm đốm đen hại lác thu thập năm 2013 trong phân tích Rep-PCR

TT	KH Mẫu	Địa điểm	Giống	Vùng sinh thái	Đường kính tản nấm (mm) ¹	Màu sắc tản nấm
1	ĐN1	Hưng Thịnh, Trảng Bom, Đồng Nai	L14	Trung du	3,8	Xám đậm
2	NA13.1	Nghi Thu, Nghi Lộc, Nghệ An	L14	Đồng bằng ven biển	5,5	Xám đậm
3	NA17.1.1	Diễn Hoa, Diễn Châu, Nghệ An	Sen Lai	Đồng bằng ven biển	4,5	Xám nhạt
4	NA17.2	Diễn Hoa, Diễn Châu, Nghệ An	Sen NA	Đồng bằng ven biển	6,5	Xám đậm
5	NA9.5	Nghi Phong, Nghi Lộc, Nghệ An	L14	Đồng bằng ven biển	3,5	Xám đậm
6	NA11.1	Nghi Hoa, Nghi Lộc, Nghệ An	L14	Đồng bằng ven biển	7,5	Đen
7	NA20.3	Diễn Phúc, Diễn Châu, Nghệ An	Sen NA	Đồng bằng ven biển	7,5	Đen
8	NA21.1	Diễn Thành, Diễn Châu, Nghệ An	Sen NA	Đồng bằng ven biển	5,3	Xám đậm
9	NA3.2	Nghi Khánh, Nghi Lộc, Nghệ An	L14	Đồng bằng ven biển	5,0	Xám đậm
10	NA4.3	Nghi Thái, Nghi Lộc, Nghệ An	L14	Đồng bằng ven biển	4,5	Xám đậm
11	NA12.1	Nghi Xá, Nghi Lộc, Nghệ An	L14	Đồng bằng ven biển	5,8	Đen
12	NA14.3	Nghi Thịnh, Nghi Lộc, Nghệ An	L14	Đồng bằng ven biển	5,5	Đen
13	NA5.3	Nghi Đức, Nghi Lộc, Nghệ An	L14	Đồng bằng ven biển	3,5	Xám đậm
14	NA6.4	Nghi Xuân, Nghi Lộc, Nghệ An	L14	Đồng bằng ven biển	3,0	Đen
15	NA3.4	Nghi Khánh, Nghi Lộc, Nghệ An	Sen Lai	Đồng bằng ven biển	4,3	Xám đậm
16	NA7.5.1	Nghi Trường, Nghi Lộc, Nghệ An	L14	Đồng bằng ven biển	6,5	Đen
17	NA14.1	Nghi Thịnh, Nghi Lộc, Nghệ An	Sen Lai	Đồng bằng ven biển	2,8	Xám đậm
18	NA19.1	Diễn Thịnh, Diễn Châu, Nghệ An	Sen NA	Đồng bằng ven biển	4,8	Xám đậm
19	NA20.3	Diễn Phúc, Diễn Châu, Nghệ An	Sen NA	Đồng bằng ven biển	7,5	Đen
20	NA21.2	Diễn Thành, Diễn Châu, Nghệ An	Sen NA	Đồng bằng ven biển	5,0	Xám đậm
21	NA25.1.1	Nam Thượng, Nam Đàn, Nghệ An	L14	Đồng bằng	3,0	Đen
22	NA23.1	Nam Hưng, Nam Đàn, Nghệ An	Sen Lai	Đồng bằng	4,8	Đen
23	NA26.1	Nam Hưng, Nam Đàn, Nghệ An	L14	Đồng bằng	4,0	Xám đậm
24	NA31.1	Thanh Lương, Thanh Chương, Nghệ An	L14	Miền núi	10,5	Xám hồng
25	ĐN2	Hưng Thịnh, Trảng Bom, Đồng Nai	L14	Trung du	3,8	Xám đậm
26	LC2	Tả Phời, Thành phố Lào Cai	L14	Miền núi	6,5	Xám đậm
27	NA24.1	Nam Tân, Nam Đàn, Nghệ An	Sen Lai	Đồng bằng	3,5	Đen
28	NA25.1.2	Nam Thượng, Nam Đàn, Nghệ An	L14	Đồng bằng	3,0	Đen
29	NA17.1.2	Diễn Hoa, Diễn Châu, Nghệ An	Sen Lai	Đồng bằng ven biển	4,5	Xám nhạt
30	NA32.1	Lưu Sơn, Đô Lương, Nghệ An	L14	Trung du	13,5	Xám hồng
31	NA7.5.2	Nghi Trường, Nghi Lộc, Nghệ An	L14	Đồng bằng ven biển	6,5	Đen
32	TH1	Nga Sơn, Thanh Hóa	L26	Đồng bằng ven biển	5,0	Đen
33	NA25.1.3	Nam Thượng, Nam Đàn, Nghệ An	L14	Đồng bằng	3,0	Đen

Ghi chú: ¹Đường kính tản nấm được đo sau cấy nấm 70 ngày và là trung bình của 3 lần lặp lại.

3.2.2. Phân tích Rep-PCR các mẫu nấm

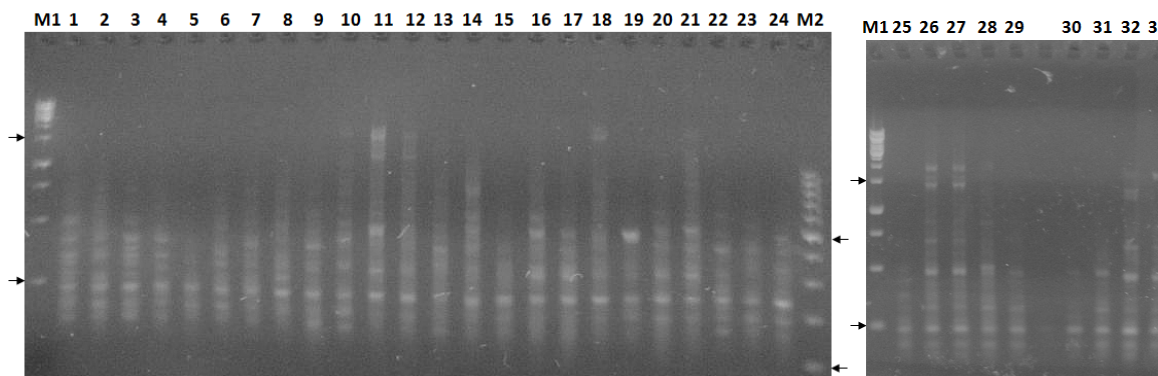
Kết quả phân tích Rep-PCR của 33 mẫu nấm đốm đen thu thập được cho thấy số băng sản phẩm của phản ứng PCR với bộ mồi BOX là 17 với kích thước từ ~ 0,15 kb tới ~ 2 kb (Bảng 5,

Hình 2). Bộ mồi ERIC và REP không tạo các băng sản phẩm.

Kiểm tra các băng sản phẩm trên gel agarose cho thấy bộ mồi BOX tạo tới 7 băng đa hình nằm giữa vị trí 0,3 kb và 2 kb (Hình 2).

Bảng 5. Sản phẩm của phân tích Rep-PCR đối với 33 mẫu nấm đốm đen hại lạc

Rep-PCR	Số băng hình thành	Số băng đa hình	Kích thước băng tối đa (kb)
ERIC-PCR	0	0	0
BOX-PCR	17	7	2,0
REP-PCR	0	0	0
	17	7	



Hình 2. Box-PCR trên 33 mẫu nấm đốm đen hại lạc *M. berkeleyi* thu thập ở 4 tỉnh năm 2013

Ghi chú: Số thứ tự mẫu tương ứng với số thứ tự trong bảng 5. M1 và M2 lần lượt là thang DNA 1 kb và 100 bp (GeneRuler 1 kb, GenRuler 100 bp, Thermo Scientific) với các băng tham khảo 250 bp và 1.500 bp (M1), 100 bp và 500 bp (M2) được chỉ rõ bằng mũi tên.

3.2.3. Phân tích cụm sản phẩm Rep-PCR

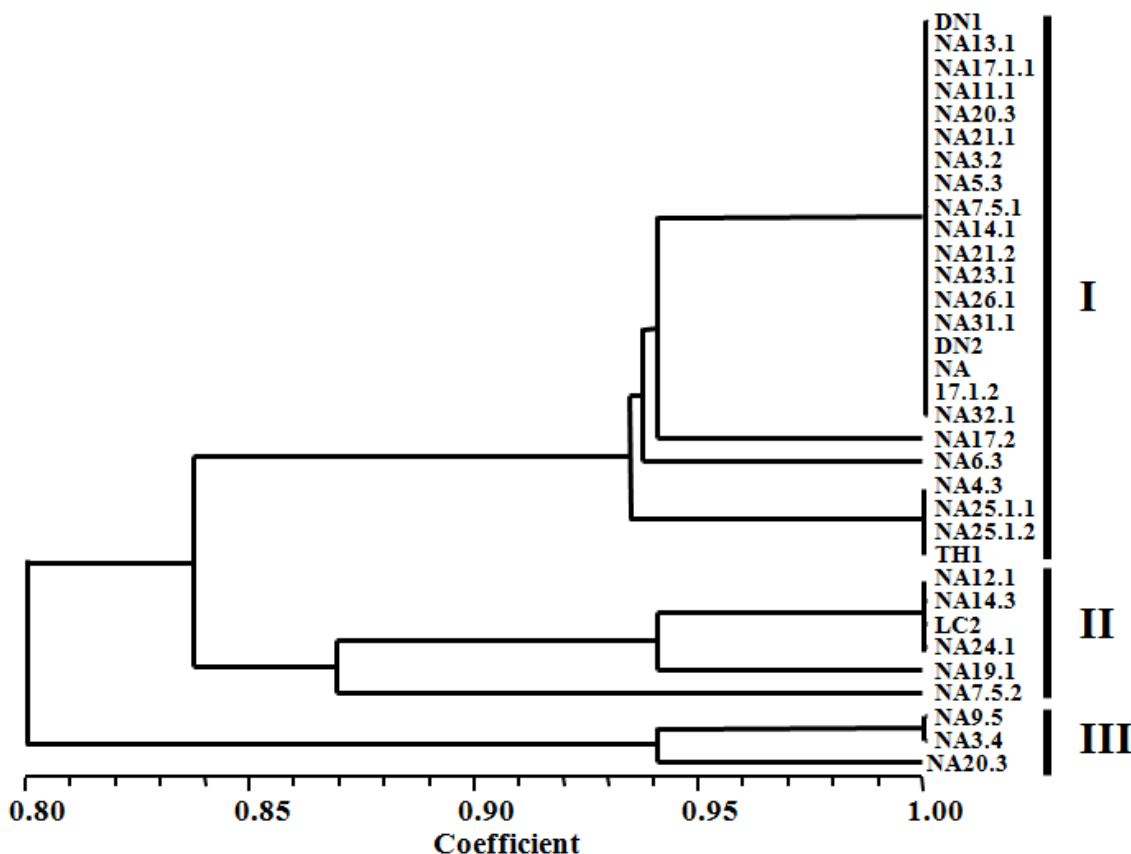
Các băng sản phẩm PCR của bộ mỗi BOX đã được chuyển sang số liệu nhị phân để tạo dữ liệu đầu vào cho phân tích cụm dùng phần mềm NTSYS nhằm tìm hiểu mức độ đa dạng và quan hệ của các mẫu nấm đốm đen. Kết quả phân tích cụm cho bộ mỗi BOX đã tạo ra 3 cụm mẫu nấm (ký hiệu là I, II, III) với ngưỡng phân chia dựa trên hệ số tương đồng là 83% (Hình 3). Cụm III gồm 03 mẫu là NA 3.4, NA9.5, NA20.3, cụm II gồm 5 mẫu TH1, LC2, NA12.1, NA14.1, NA24.1, cụm I gồm 25 mẫu còn lại (Hình 3).

Phân tích χ^2 đã được thực hiện nhằm tìm hiểu liệu có mối quan hệ giữa các cụm phả hệ với các nguồn gốc cũng như đặc điểm hình thái mẫu nấm. Phân tích χ^2 đã cho thấy không có mối quan hệ giữa các nhóm nấm được phân biệt dựa trên phân tích Box-PCR với nguồn gốc của chúng (4 vùng sinh thái, 4 giống lạc), đặc điểm hình thái trên môi

trường nuôi cấy nhân tạo (4 màu tản nấm, 4 nhóm kích thước tản nấm) (Bảng 6).

Mặc dù chia thành 3 cụm nhưng do (i) PCR không tạo ra các sản phẩm khi dùng mỗi Rep cũng như ERIC (chúng tỏ bộ gen của chúng giống nhau và không chứa các vị trí để gắn mỗi) và (ii) mức tương đồng di truyền khá cao (83 - 99%) trong phân tích dùng mỗi BOX nên phân tích Rep-PCR đã chứng tỏ quần thể nấm đốm đen tại Nghệ An khá đồng nhất. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của chúng tôi (phần) là nấm đốm đen tại Nghệ An chỉ sinh sản vô tính mà không sinh sản hữu tính như đã công bố trên thế giới.

Kết quả nghiên cứu trên gợi ý đối với nấm đốm đen ở Nghệ An, các biện pháp quản lý bệnh (giống kháng, thuốc hóa học, chế phẩm sinh học) có thể được áp dụng đồng loạt trên toàn tỉnh và tạo hiệu quả phòng chống giống nhau.



Hình 3. Phân tích cụm dựa trên số liệu BOX-PCR của các mẫu đốm đen thu tại Việt Nam

Ghi chú: Hệ số tương đồng được tính theo công thức tính hệ số phù hợp đơn giản (Simple Matching Coefficient). Các cây được vẽ theo phương pháp ghép cặp mẫu dùng khoảng cách trung bình số học ngang bằng (UPGMA).

Bảng 6. Quan hệ của các nhóm phả hệ với nguồn gốc địa lý, giống, đặc điểm hình thái

Quan hệ giữa nhóm phả hệ (I, II, III) với	Độ tự do df	χ^2	p	Kết luận*
Giống (L14, L26, Sen Lai, Sen NA)	6	1,63	0,951	Không quan hệ
Vùng sinh thái (Đồng bằng ven biển, Đồng bằng, Trung du, Miền núi)	6	10,7	0,148	Không quan hệ
Màu tản nấm (Xám nhạt, Xám đậm, Xám hồng, Đen)	6	3,02	0,807	Không quan hệ
Kích thước tản nấm (mm) (0 - 3,4; > 3,4 - 6,8; > 6,8 - 10,1; > 10,1)	6	6,1	0,412	Không quan hệ

Ghi chú: * Kết luận được dựa trên ngưỡng tìm cây chung là $\alpha = 0,05$

4. KẾT LUẬN

Phân tích trình tự vùng ITS của 11 mẫu nấm đốm đen lác tại Việt Nam, chủ yếu tại Nghệ An đã chứng tỏ chúng thuộc loài *Mycosphaerella berkeleyi*. Trình tự vùng ITS của các mẫu nấm rất bảo thủ, đồng nhất 100% với nhau.

Phân tích đã dạng di truyền 33 mẫu nấm đốm đen hại lác thu thập ở Việt Nam, chủ yếu tại Nghệ An, bằng kỹ thuật Rep-PCR đã chứng tỏ chỉ có marker BOX-PCR tạo bằng sản phẩm đa hình. Phân tích đã chứng tỏ quần thể nấm đốm đen hại lác tại Nghệ An khá đồng nhất về di truyền

Không có mối liên hệ giữa các cụm nấm được xác định bởi BOX-PCR với nguồn gốc thu thập mẫu cũng như đặc điểm hình thái mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdollahzadeh, J., and Zolfaghari, S. (2014). Efficiency of rep-PCR fingerprinting as a useful technique for molecular typing of plant pathogenic fungal species: Botryosphaeriaceae species as a case study. *FEMS microbiology letters*, 361: 144 - 157.
- Adiver, K. (2008). Studies on molecular variation in *Phaeoisariopsis personata* (Berk and M.A. Curtis) van Arx. causing late leaf spot of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Master Thesis University of Agricultural Sciences, Dharwad (India).
- Adiver, S., Benagi, V., Byadgi, A., and Nadaf, H. (2009). Molecular variation in *Phaeoisariopsis personata* (Berk. and MA Curtis) van Arx causing late leaf spot of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 22: 336 - 339.
- Doyle, J. J., and Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11 - 15.
- Ebadi, M., Riahi, H., and Zare, R. (2014). Genetic diversity of *Fusarium semitectum* isolates from rice, using RAPD and REP - PCR markers. *Mycologia Iranica*, 1: 19 - 26.
- Ferrater, J. (2003). Analysis of genetic variation in strains of *Cercospora canescens* Ellis and Martin, the cause of leaf spot of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) using Rep - PCR.
- Gillings, M., and Holley, M. (1997). Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Letters in Applied Microbiology*, 25: 17 - 21.
- Goodwin, S. B., Dunkle, L. D., and Zismann, V. L. (2001). Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Phytopathology*, 91: 648 - 658.
- Grichar, W., Besler, B., and Jaks, A. (1998). Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Cultivar Response to Leaf Spot Disease Development Under Four Disease Management Programs 1. *Peanut Science*, 25: 35 - 39.
- Gurel, F., Albayrak, G., Diken, O., Cepni, E., and Tunali, B. (2010). Use of Rep-PCR for Genetic Diversity Analyses in *Fusarium culmorum*. *Journal of phytopathology*, 158: 387 - 389.
- Komatsu, T., Sumino, A., and Kageyama, K. (2001). Characterization of *Verticillium dahliae* isolates from potato on Hokkaido by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and REP-PCR analyses. *Journal of General Plant Pathology*, 67: 23 - 27.
- Kurose, D., Evans, H. C., Djeddour, D. H., Cannon, P. F., Furuya, N., and Tsuchiya, K. (2009). Systematics of *Mycosphaerella* species associated with the invasive weed *Fallopia japonica*, including the potential biological control agent *M. polygoni-cuspidati*. *Mycoscience*, 50: 179 - 189.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., and Lopez, R. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947 - 2948.
- Matsumoto, M. (2014). Distribution analysis of population structures for *Rhizoctonia solani* AG - 1 IA in Japanese paddy field, using rep - PCR assay. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47: 1082 - 1088.
- Matsumoto, M., and Cuong, H. (2014). Genetic characterization of the rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* AG1 - IA in North Vietnam by rep - PCR and sequence analysis. *Journal of Plant Pathology*, 96: 377 - 380.
- McDonald, D., Subrahmanyam, P., Gibbons, R., and Smith, D. (1985). Early and Late Leaf Spots of Groundnut. *Information Bulletin No. 21*.
- Miller, I., Norden, A., Knauff, D., and Gorbet, D. (1990). Influence of Maturity and Fruit Yield on Susceptibility of Peanut to *Cercosporidium personatum* (Late Leafspot Pathogen) 1. *Peanut Science*, 17: 52 - 58.
- Muiru, W., Koopmann, B., Tiedemann, A., Mutitu, E., and Kimenju, J. (2010). Use of repetitive extragenic palindromic (REP), enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) and BOX sequences to fingerprint *Exserohilum turcicum* isolates. *Journal of Applied Biosciences*, 30: 1828 - 1838.
- Palencia, E. R., Klich, M. A., Glenn, A. E., and Bacon, C. W. (2009). Use of a rep - PCR system to predict species in the *Aspergillus* section *Nigri*. *Journal of microbiological methods*, 79: 1 - 7.
- Rademaker, J., Louws, F., Versalovic, J., De Bruijn, F., Kowalchuk, G., Head, I., Akkermans, A., and van Elsas, J. (2004). Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep - PCR genomic fingerprinting. *Molecular microbial ecology manual*, (1 + 2): 611 - 643.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., and Crous, P. W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode

- marker for Fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109: 6241 - 6246.
- Stewart, E. L., Liu, Z., Crous, P. W., and Szabo, L. J. (1999). Phylogenetic relationships among some cercosporoid anamorphs of *Mycosphaerella* based on rDNA sequence analysis. *Mycological Research*, 103: 1491 - 1499.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30: 2725 - 2729.
- Toda, T., Hyakumachi, M., and Arora, D. K. (1999). Genetic relatedness among and within different *Rhizoctonia solani* anastomosis groups as assessed by RAPD, ERIC and REP - PCR. *Microbiological research*, 154: 247 - 258.
- Versalovic, J., Koeuth, T., and Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research*, 19: 6823 - 6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., and Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence - based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology*, 5: 25 - 40.