

# ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP PCR TRONG VIỆC XÁC ĐỊNH NẤM GÂY BỆNH ĐẠO ÔN TRÊN LÚA, *MAGNAPORTHE ORYZAE*

**ĐOÀN THỊ HÒA**

Viện Nghiên Cứu Công Nghệ Sinh Học và Môi Trường, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh  
nientincsk33@gmail.com

**VÕ THỊ NGỌC LINH**

Viện Nghiên Cứu Công Nghệ Sinh Học và Môi Trường, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh  
hoarequat2005@gmail.com

**TRƯƠNG THÀNH NHẬP**

Viện Nghiên Cứu Công Nghệ Sinh Học và Môi Trường, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh  
11126341@st.hcmuaf.edu.vn

**NGUYỄN BẰNG PHI**

Khoa Tài Nguyên Môi Trường, Đại Học Thủ Dầu Một, Bình Dương  
bangphibdu@gmail.com

**NGUYỄN NGỌC BẢO CHÂU**

Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh – chau.nnb@ou.edu.vn

**NGUYỄN BẢO QUỐC**

Viện Nghiên Cứu Công Nghệ Sinh Học và Môi Trường, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh  
baoquoc@hcmuaf.edu.vn

(Ngày nhận: 19/01/2016; Ngày nhận lại: 15/03/2016; Ngày duyệt đăng: 10/06/2016)

## TÓM TẮT

Nấm đạo ôn, *Magnaporthe oryzae*, là một trong những tác nhân gây thiệt hại rất lớn đến canh tác và sản xuất lúa trên thế giới. Triệu chứng của bệnh đạo ôn trên lúa ở giai đoạn đầu thường rất dễ bị nhầm lẫn với triệu chứng bệnh do các nấm khác gây ra, dẫn đến những khó khăn cho công tác phòng trừ bệnh kịp thời. Việc xác định nấm *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa bằng phương pháp truyền thống thường mất nhiều thời gian, công sức và đôi khi không chính xác. Một phương pháp thay thế khác bằng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) với cặp mồi chuyên biệt Pot2 transposon nhằm giúp giảm chi phí, thời gian và công sức sẽ được thực hiện và đánh giá trong việc xác định nấm đạo ôn trong nghiên cứu này. Kết quả đã chỉ ra được tính chuyên biệt của Pot2 transposon trong việc phát hiện nấm đạo ôn và lá/cổ bông nhiễm đạo ôn trên lúa nhưng không phát hiện trên các mẫu nấm bệnh khác. Chính vì vậy phương pháp PCR được xem là phương pháp thay thế trong chẩn đoán, đặc biệt là việc phát hiện bệnh đạo ôn trên đồng ruộng.

**Từ khóa:** PCR; nấm đạo ôn; bào tử; Pot2 transposon; *Magnaporthe oryzae*.

## Identification of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* by the polymerase chain reaction (PCR)

### ABSTRACT

*Magnaporthe oryzae* is a causal agent of the rice blast disease resulting serious damages in the production of rice worldwide. The early symptom of rice blast disease can be confused with those caused by other fungal diseases leading to many difficulties in efficient and effective disease management. Currently, identification of the rice blast fungus by using conventional method requires more time (at least 24 hours), labour and unreliability. An alternative method by using polymerase chain reaction (PCR) with the primers of Pot2 transposon known to reduce those factors for detection of the rice blast fungus will be done in this study. The results indicated the specificity of Pot2 transposon can be used for the rapid detection of both *Magnaporthe oryzae* and blast fungus infected leaf/neck in rice, but not in other phytopathogenic fungi. Therefore, PCR method has been considered as an alternative tool of diagnostic, particularly in-field detection of blast disease in practice.

**Keywords:** PCR; rice blast fungus; conidia; Pot2 transposon; *Magnaporthe oryzae*.

## 1. Đặt vấn đề

Bệnh đạo ôn hay còn gọi là bệnh cháy lá trên lúa được biết đến là do một loại nấm sợi có tên khoa học chung là *Magnaporthe oryzae* (các tên khác như *Pyricularia oryzae*, *Pyricularia grisea*, *Magnaporthe grisea*) gây ra và cũng là một trong những mối đe dọa gây thiệt hại nghiêm trọng cho việc trồng lúa. Nấm đạo ôn cũng được xem là một trong những mô hình chuẩn trong nghiên cứu tương tác giữa nấm bệnh và cây trồng (Talbot, 2003; Hà Viết Cường và cộng sự, 2015). Nấm *M.oryzae* tấn công cây lúa ở tất cả các giai đoạn phát triển và có thể gây nhiễm trên lá, thân, nốt thân và cổ bông bằng các công cụ xâm nhiễm như bào tử, giác bám và cọc xâm nhiễm để tấn công tế bào của cây lúa nhằm lấy chất dinh dưỡng cho sự tồn tại và phát triển của nấm đạo ôn (Howard và cộng sự, 1991). Việc xác định sự hiện diện của *M.oryzae* gây bệnh trên lúa thường rất khó khăn và mất thời gian vì tùy thuộc vào kinh nghiệm của chuyên gia, điều kiện mẫu, vết bệnh quan sát và sự hiện diện đồng thời nhiều tác nhân nấm gây bệnh khác trên mẫu.

Các quy trình phát hiện *M.oryzae* hiện giờ vẫn dùng là theo phương pháp truyền thống thông qua việc lấy mẫu lá nhiễm, ủ lá ít nhất 24 tiếng đồng hồ và quan sát hình thái bào tử của nấm đạo ôn xuất hiện. Tuy nhiên phương pháp này đòi hỏi rất nhiều thời gian và công sức. Việc phát hiện bệnh có thể thực hiện trên đồng ruộng theo phương pháp quan sát và điều tra tỷ lệ bệnh, chỉ số bệnh. Phương pháp này có thể chính xác khi vết bệnh đã hình thành rõ trên lúa, mức độ bệnh đã lan rộng và gây thiệt hại rõ rệt trên đồng ruộng. Do đó công tác phát hiện kịp thời và chính xác sự hiện diện của *M.oryzae* trên lúa sẽ giúp ích rất nhiều trong việc đưa ra các biện pháp phòng trị sớm, kịp thời và hiệu quả. Ngày nay, phản ứng chuỗi polymerase (PCR) đã được xem là một phương pháp hết sức phổ thông và thông dụng trong việc phát hiện và xác định các tác nhân gây bệnh trên cây trồng vì kết quả đáng tin cậy, tiết kiệm thời gian so với phương pháp truyền thống và tính chính

xác cao (Barros và cộng sự, 2001; Beretta và cộng sự, 1997; Chiocchetti và cộng sự, 1999; Errampalli và cộng sự, 2001; Kerkoud và cộng sự, 2002; Larsen và cộng sự, 2002; Oliveira và Vallim, 2002; Pooler và Hartung, 1995). Một ưu điểm nữa của phương pháp PCR so với phương pháp phát hiện bệnh truyền thống là khả năng tìm ra tác nhân gây bệnh trên cây trồng ngay ở giai đoạn đầu khi mới nhiễm bệnh mà với phương pháp truyền thống đôi khi dễ nhầm lẫn với các tác nhân gây bệnh khác. Chính vì vậy trong nghiên cứu này cặp môi Pot2 transposon vốn được biết là chỉ hiện diện ở các nòi đạo ôn khác nhau sẽ được sử dụng để phát triển phương pháp PCR phát hiện chính xác *M.oryzae* trên lúa (Kachroo và cộng sự, 1994). Quy trình PCR này sẽ được tiến hành và đánh giá nhằm phát hiện *M.oryzae* trên lá lúa nhiễm bệnh một cách nhanh chóng và chính xác

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. *Chủng nấm, môi trường nuôi cấy*

Các mẫu nấm bệnh dùng trong nghiên cứu này được phân lập từ các mẫu lá lúa nhiễm bệnh đạo ôn tại Đồng Nai, Tiền Giang theo phương pháp với một số thay đổi đã được mô tả trước đây (Harmon và cộng sự, 2003). Những mẫu này được giữ trong môi trường PDA (potato dextrose agar) trong nhiều tháng. Mẫu nấm sẽ được nuôi cấy trong 100 ml môi trường CM lỏng (0,3% casamino acids, 0,3% yeast extract, 0,5% sucrose) ở 26<sup>0</sup>C cho việc chiết xuất DNA tổng số.

### 2.2. *Kích hoạt sự hình thành bào tử nấm*

Kích hoạt sự hình thành bào tử nấm được thực hiện theo hướng dẫn của các nghiên cứu trước đây (Nguyen và cộng sự, 2008). Tóm tắt phương pháp như sau: Mẫu nấm phân lập được nuôi trong môi trường oat meal agar (OMA) ở nhiệt độ 25<sup>0</sup>C trong thời gian 6 ngày. Các sợi nấm sẽ được loại bỏ bằng cách chà sát trên bề mặt môi trường nuôi cấy bằng thanh bông gòn đã được tiệt trùng với nước cất và giữ mẫu ở nhiệt độ 25<sup>0</sup>C trong hai ngày dưới đèn UV chuyên biệt. Bào tử sẽ được thu bằng cách thêm nước cất vào môi trường nuôi cấy, chà sát trên bề mặt bằng thanh bông gòn

tiệt trùng và được lọc bằng giấy kimwipe. Việc đếm và quan sát bào tử sẽ được thực hiện trên buồng đếm tế bào chuyên biệt dưới kính hiển vi.

### 2.3. Chiết xuất genomic DNA từ mẫu nấm đạo ôn và mẫu lúa biểu hiện triệu chứng bệnh đạo ôn

Genomic DNA được chiết xuất và tinh sạch từ các mẫu nấm đạo ôn và nấm gây bệnh khác trên lúa dùng làm đối chứng. Cho khoảng 100 mg bột sợi nấm sau khi nghiền trong nitor lỏng vào ống eppendorf 1,5 ml. 700 $\mu$ L dung dịch lysis buffer (50mM Tris HCl + 50mM EDTA +3% SDS+ 1%  $\beta$ -mercaptoethanol) được cho vào ống, ủ qua đêm ở nhiệt độ 65 $^{\circ}$ C. Ống đựng mẫu được ly tâm 13.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Thu hồi phần dung dịch phía trên cho vào trong ống eppendorf 1,5 ml mới và loại bỏ phần cặn. Các tạp chất của mẫu chiết xuất được loại bỏ bằng cách thêm 700  $\mu$ l phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1 v/v/v), lắc đều ống và ly tâm với vận tốc 13.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Phần dịch nổi thu được tiếp tục rửa bằng chloroform theo tỷ lệ thể tích (1:1 v/v) và ly tâm với cùng thông số như các bước trên. Lắng tủa DNA bằng phương pháp ethanol (cho tỷ lệ 1/10 thể tích mẫu DNA bằng dung dịch 3M sodium acetate, pH 5.2 và 3 lần thể tích mẫu DNA bằng dung dịch 100% ethanol, sau đó ủ mẫu ở -20 $^{\circ}$ C trong 2 tiếng đồng hồ và ly tâm ở tốc độ 15.000 vòng/phút trong thời gian 20 phút). Loại bỏ dung dịch phía trên và rửa kết tủa bằng ethanol 70%, ly tâm mẫu ở tốc độ 15.000 vòng/phút trong thời gian 5 phút, loại bỏ dung dịch phía trên, làm khô cặn và hòa tan DNA bằng 100 $\mu$ l TE buffer. Genomic DNA của các mẫu nấm bệnh được chạy điện di kiểm tra trước khi thực hiện phản ứng PCR.

Genomic DNA của mẫu lá, cỏ bông lúa nhiễm đạo ôn được ly trích bằng GeneJET Plant Genomic DNA purification kit (Cat#K0791, Thermo) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

### 2.4. Khuếch đại PCR phát hiện nấm đạo ôn

Trình tự đoạn mồi trong nghiên cứu này

(Pot2-F: 5' CGTCACACGTTCTTCAACC 3' và Pot2-R: 5' CGTTTCACGCTTCTCCG 3') được sử dụng để khuếch đại một vùng có chiều dài 687 bp của Pot2 transposon (Harmon và cộng sự, 2003). Phản ứng PCR được thực hiện trong 50 $\mu$ l hỗn hợp phản ứng/mẫu với DNA Taq polymerase (Cat#200403, Qiagen) và genomic DNA từ các mẫu nấm và lá, cỏ bông nhiễm đạo ôn thông qua máy khuếch đại DNA (Model Nexus Cycler, Eppendorf). Thành phần phản ứng PCR như sau (25  $\mu$ l Toptaq Master Mix; 0,2  $\mu$ M cho mỗi đoạn mồi, < 1  $\mu$ g mẫu DNA và điều chỉnh bằng nước cất đã khử trùng sạch RNase/DNase lên đến 50  $\mu$ l). Chu trình phản ứng PCR được thực hiện như sau: Bước 1 khởi đầu: 94 $^{\circ}$ C trong 3 phút; Bước 2 biến tính: 94 $^{\circ}$ C trong 30 giây; Bước 3 gắn mồi: 53 $^{\circ}$ C trong 30 giây; Bước 4 kéo dài: 72 $^{\circ}$ C trong 1 phút; số lần lặp lại từ bước 2 đến bước 4 là 35; bước kéo dài cuối cùng: 72 $^{\circ}$ C trong 10 phút. Dừng phản ứng và giữ mẫu ở nhiệt độ là 4 $^{\circ}$ C. Sản phẩm PCR được nhuộm bằng thuốc nhuộm DNA (Cat# PCR-255-bl, Jena Bioscience) và được điện di trong 1% gel agarose. Các vạch DNA trên gel được quan sát dưới đèn UV bằng máy chụp ảnh gel chuyên dụng (UVP Biodoc-It Imaging system, Hoa Kỳ). Các vạch DNA của sản phẩm PCR mong đợi sẽ được tinh sạch bằng GeneJET Gel Extraction Kit (Cat#K0691, Thermo) và được gửi giải trình tự để xác định nấm gây bệnh đạo ôn và lá nhiễm bệnh bằng các công cụ tin sinh học như BLAST.

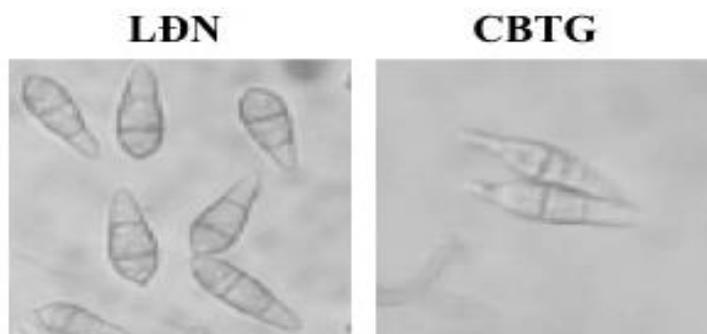
## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Phân lập và xác định nấm gây bệnh đạo ôn, *M.oryzae* bằng quan sát hình thái bào tử

Từ các nguồn mẫu lúa biểu hiện nhiễm bệnh đạo ôn, ít nhất 7 mẫu nấm bao gồm 4 mẫu phân lập từ lá và 3 mẫu phân lập từ cỏ bông được sử dụng để tiến hành quan sát đặc điểm hình thái cấu trúc xâm nhiễm chuyên biệt của nấm *M.oryzae*. Khả năng hình thành các cấu trúc xâm nhiễm của nấm đạo ôn bao gồm số lượng bào tử, tỉ lệ nảy mầm và hình thành giác bám là những yếu tố quan trọng đánh giá khả năng gây bệnh của nấm đạo ôn

trên cây trồng. Trong thí nghiệm này hình thái bào tử của tất cả các mẫu nấm phân lập được quan sát sau khi cấy nấm trên môi trường OMA và được kích thích sản sinh bào tử dưới bước sóng khoảng 300-400 nm của đèn UV chuyên biệt. Kết quả cho thấy có nhiều hình dạng bào tử khác nhau từ các mẫu nấm phân lập được (không thể hiện kết quả). Sự đa dạng hình thái bào tử này là do lá nhiễm bệnh đạo ôn không chỉ có sự hiện diện của *M. oryzae* mà còn nhiều nấm gây bệnh khác có triệu chứng gây bệnh trên lúa giống như đạo ôn như *Curvularia luneta*, *Bipolaris oryzae*. Tuy nhiên, ít nhất hai mẫu nấm trong đó một mẫu phân lập từ lá nhiễm tại Đồng Nai (LĐN) và cỏ bông nhiễm tại Tiền Giang (CBTG) có hình thái bào tử giống nấm đạo ôn với hình dạng bầu dục hoặc thuôn dài và có hai vách ngăn đặc trưng (Hình 1). Để tìm hiểu khả năng hình thành các cấu trúc xâm nhiễm, bào tử của LĐN và CBTG được nhỏ trên tấm lam kính làm bề mặt nhân tạo và ủ trong môi trường tối, ẩm. Kết quả chỉ ra rằng sau 6 giờ,

trên 95% bào tử đều nảy mầm và trên 80% của số bào tử nảy mầm hình thành giác bám trên bề mặt nhân tạo được quan sát trên hai mẫu nấm (Hình 2). Trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng kính lam như bề mặt nhân tạo để quan sát khả năng hình thành giác bám (appressoria) của bào tử nấm đạo ôn nên tỉ lệ hình thành giác bám sẽ thấp hơn so với bề mặt nhân tạo gần giống với lá hơn hoặc trực tiếp trên lá trong các nghiên cứu trước đây. Tuy nhiên với tỉ lệ quan sát trên chúng tôi có thể kết luận là sức sống của hai mẫu nấm này và khả năng gây bệnh bằng các cấu trúc xâm nhiễm trên của chúng là khá mạnh. Dựa trên kết quả hình thái của hai mẫu nấm LĐN và CBTG có thể kết luận chúng là nấm đạo ôn, *M. oryzae*. Phát hiện này sẽ giúp ích rất nhiều trong các thí nghiệm về sau liên quan đến khả năng lây bệnh của chúng trong quá trình lây bệnh trên cây trồng hay làm nguồn vật liệu cho việc nghiên cứu sâu hơn về phân tích chức năng của các gen gây bệnh ở mức độ toàn hệ gen của nấm đạo ôn.



**Hình 1.** Hình thái bào tử của hai mẫu nấm phân lập từ lá và cỏ bông biểu hiện triệu chứng bệnh đạo ôn. Bào tử của hai mẫu nấm đều có dạng bầu dục hoặc thuôn dài với hai vách ngăn đặc trưng của nấm đạo ôn, *Magnaporthe oryzae*. LĐN: mẫu nấm phân lập từ lá lúa nhiễm đạo ôn tại Đồng Nai. CBTG: mẫu nấm phân lập từ cỏ bông lúa nhiễm đạo ôn tại Tiền Giang

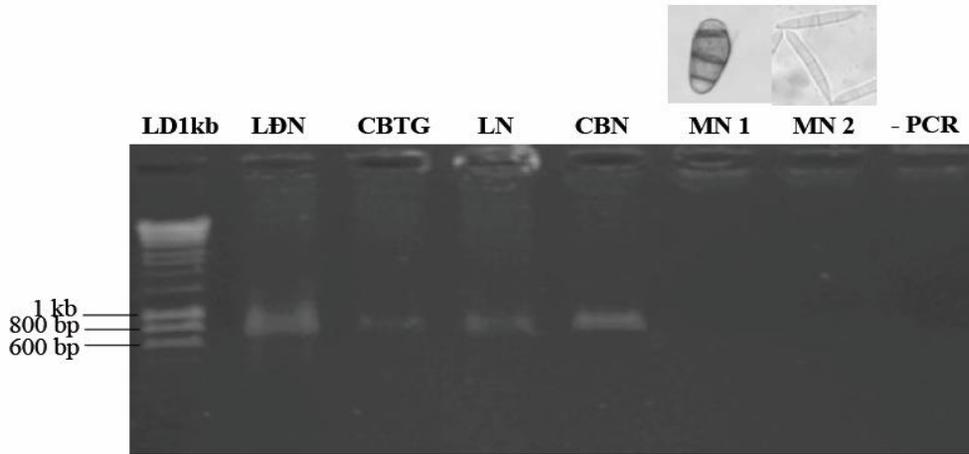


**Hình 2.** Sự hình thành các cấu trúc xâm nhiễm của mẫu nấm đạo ôn phân lập được sau các thời gian quan sát khác nhau. (c) bào tử, (g) nảy mầm, (a) giác bám (appressorium)

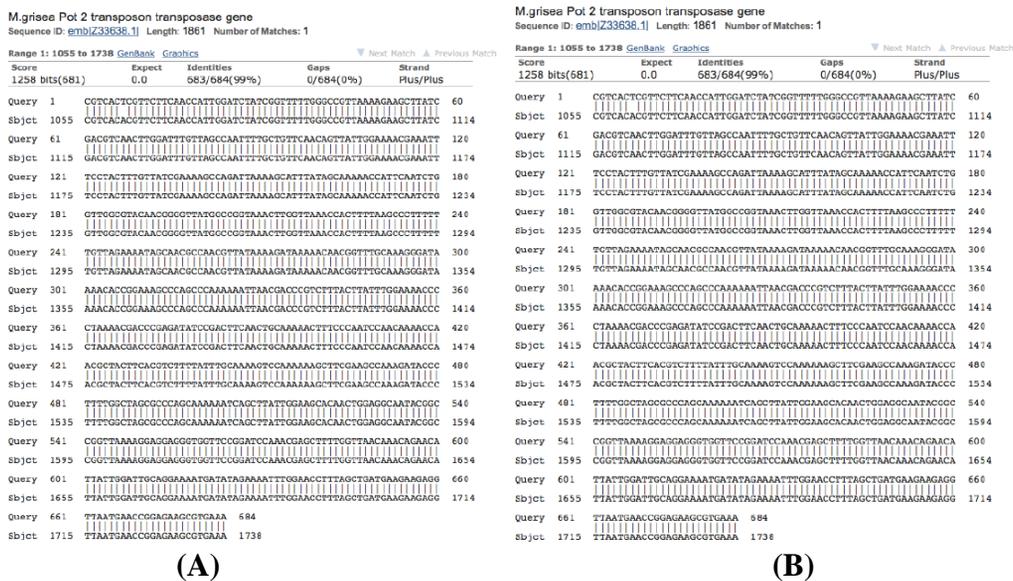
### 3.2. Xác định nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa, *M. oryzae* bằng phương pháp PCR

Để khẳng định thêm hai mẫu nấm phân lập trên có phải là nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa, *M. oryzae* hay không, phương pháp PCR đã được sử dụng với cặp mồi Pot2 transposon đã được nghiên cứu trên các chủng nấm *M. oryzae* gây bệnh đạo ôn trên loài cỏ chùm trước đây (Harmon và cộng sự, 2003; Kachroova và cộng sự, 2000). Pot2 là yếu tố nhảy đảo ngược có tính lặp lại (inverse repeat transposon) và đoạn mồi dùng trong nghiên cứu này khuếch đại đoạn DNA có chiều dài là 687 bp nằm trong vùng từ vị trí 1055 đến 1741 trong tổng số 1861 bp của Pot2 transposon. Trình tự đoạn DNA khuếch đại này không được tìm thấy sự tương đồng trên các chủng nấm khác (Harmon và cộng sự, 2003). Trong nghiên cứu này, hai mẫu nấm được phân lập từ lá nhiễm bệnh đạo ôn (LDN) và cỏ bông nhiễm bệnh đạo ôn (CBTG) được nuôi trong môi trường CM lỏng sau đó được chiết suất genomic DNA làm nguồn vật liệu cho PCR như đã trình bày trong phần phương pháp thí nghiệm. Để đánh giá thêm khả năng ứng dụng của PCR trong việc giám định nấm đạo ôn trên đồng ruộng, hai mẫu nhiễm bệnh bao gồm lá nhiễm đạo ôn (LN) và cỏ bông nhiễm đạo ôn (CBN) được thu thập trên đồng ruộng và được chiết xuất genomic DNA như đã trình bày trên. Để đánh giá tính chuyên biệt của cặp mồi Pot2 transposon trong việc phát hiện *M. oryzae*, hai mẫu nấm có hình thái bào tử khác biệt so với bào tử của nấm đạo ôn (nấm 1, nấm 2) được sử dụng như là mẫu đối chứng vì trình tự amplicon của transposon được mô tả là tương đồng cao trên nấm đạo ôn nhưng không cao trên các mẫu nấm khác cho nên

khả năng các motif bắt cặp trên hệ gen của nấm đạo ôn sẽ chuyên biệt hơn (Harmon và cộng sự, 2003). Dựa trên phân tích hình thái nấm 1 và nấm 2 lần lượt là *Curvularia lunata* and *Fusarium* spp. Kết quả ở hình 3 cho thấy giếng 2 và 3 tương ứng với các mẫu genomic DNA từ các chủng nấm đạo ôn LDN, CBTG khi tham gia phản ứng PCR với cặp mồi Pot2 đều cho sản phẩm khuếch đại với giá trị vạch khuếch đại khoảng gần 700 bp. Mẫu LN và CBN (tương ứng giếng 4 và 5) nhiễm nấm đạo ôn đều cho sản phẩm khuếch đại PCR với kích thước tương tự như hai mẫu nấm đạo ôn. Điều này cho thấy có sự hiện diện của nấm đạo ôn trên mẫu lá và cỏ bông bị nhiễm. Riêng các mẫu genomic DNA của nấm 1 và nấm 2 (tương ứng với giếng 6 và 7) là những mẫu nấm không phải là nấm đạo ôn thì kết quả PCR đã chỉ ra không có sản phẩm khuếch đại khi dùng đoạn mồi Pot2 transposon. Kết quả giải trình tự hai chiều DNA sản phẩm PCR bằng cặp mồi Pot2 transposon và so sánh với dữ liệu gen trên NCBI bằng công cụ BLAST nucleotide đã chỉ ra rằng trình tự DNA sản phẩm PCR của các mẫu nấm phân lập từ lá, cỏ bông lúa và mẫu lá, cỏ bông nhiễm đạo ôn đều là Pot2 transposon của *M. oryzae* (Hình 4). Điều này cho thấy tính chuyên biệt của Pot2 transposon trong việc xác định nấm gây bệnh đạo ôn cũng như trong việc chẩn đoán bệnh đạo ôn trên đồng ruộng. Độ tin cậy của quy trình này đã được kiểm chứng trên một số chủng nấm đạo ôn được phân lập từ lá và cỏ bông của lúa nhiễm ở miền Nam, miền Trung và miền Bắc Việt Nam. Sự hiện diện sản phẩm PCR của Pot2 transposon từ các mẫu nấm phân lập này đã giúp kết luận chúng là nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa, *M. oryzae*.



**Hình 3.** Tính chuyên biệt của cặp mồi Pot2 transposon trong việc xác định nấm gây bệnh đạo ôn và trong chẩn đoán bệnh đạo ôn trên đồng ruộng. LD1kb: HyperLadder™ 1 kb (Bioline, Hoa Kỳ); LĐN: mẫu nấm chiết xuất từ lá biểu hiện triệu chứng đạo ôn thu tại Đồng Nai; CBTG: mẫu nấm chiết xuất từ cỏ bông biểu hiện triệu chứng đạo ôn thu tại Tiền Giang; LN: Lá lúa biểu hiện triệu chứng bệnh đạo ôn; CBN: Cỏ bông lúa biểu hiện triệu chứng bệnh đạo ôn; MN1: mẫu nấm bệnh cây 1; MN2: mẫu nấm bệnh cây 2; -PCR: Đối chứng âm (sử dụng nước)



**Hình 4.** Kết quả BLAST trình tự DNA sản phẩm PCR bằng cặp mồi Pot2 transposon của mẫu nấm đạo ôn phân lập từ lá lúa và lá lúa biểu hiện triệu chứng bệnh đạo ôn trên cơ sở dữ liệu DNA của NCBI. (A) Kết quả BLAST trình tự sản phẩm PCR của mẫu nấm phân lập từ lá lúa nhiễm bệnh tại Đồng Nai (LĐN) (B) Kết quả BLAST trình tự sản phẩm PCR của mẫu lá lúa nhiễm bệnh đạo ôn (LN)

**4. Kết luận**

Việc phân lập và xác định nấm gây bệnh đạo ôn bằng phương pháp PCR có ý nghĩa rất lớn không chỉ trong việc phát hiện nhanh, kịp thời bệnh đạo ôn trên lúa mà còn giúp giảm rất nhiều thời gian và công sức trong việc xác

định nấm đạo ôn. Nếu so với phương pháp truyền thống vốn mất từ 1 đến 2 ngày để quan sát sự xuất hiện của bào tử *M. oryzae* dưới kính hiển vi thì phương pháp này chỉ mất 5 tiếng đồng hồ từ khâu chiết xuất nhanh DNA, phản ứng PCR, điện di và chụp ảnh

gel mà không cần phải giải trình tự sản phẩm vạch DNA vì tính chuyên biệt của cặp môi Pot2 transposon. Việc phát hiện nhanh và sớm bệnh đạo ôn trên đồng ruộng sẽ giúp giảm chi phí trong việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật và có biện pháp phòng trừ bệnh kịp thời. Phương pháp này cũng giảm rất nhiều

công sức lao động trong phòng thí nghiệm cũng như tăng tính chính xác trong các thí nghiệm định danh nấm bệnh đạo ôn. Kết quả trong nghiên cứu này đã khẳng định thêm PCR là một công cụ chẩn đoán các tác nhân gây bệnh chính xác và mang tính ứng dụng rộng rãi ■

### Lời cảm ơn

Bài báo nghiên cứu này được sự hỗ trợ từ kinh phí đề tài sinh viên Đại học Nông Lâm TP.Hồ Chí Minh với mã số: CS – SV13 – NL – 06.

### Tài liệu tham khảo

- Barros TSL, Davis RE, Resende RO, Dally EL (2001). Design of a polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma. *Plant Disease*, 85, 475-480.
- Beretta MJG, Barthe GA, Ceccardi TL, Lee RF, Derrick KS (1997). A survey for strains of *Xylella fastidiosa* in citrus affected by citrus variegated chlorosis and citrus blight in Brazil. *Plant Disease*, 81, 1196-1198.
- Chiocchetti A, Bernardo I, Daboussi MJ, Garibaldi A, Gullino ML, Langin T, Migheli Q (1999). Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in carnation tissue by PCR amplification of transposon insertions. *Phytopathology*, 89, 1169-1175.
- Errampalli D, Saunders J, Cullen D (2001). A PCR-based method for detection of potato pathogen, *Helminthosporium solani*, in silver scurf infected tuber tissue and soils. *J Microbiol Methods*, 44, 59-68.
- Hà Viêt Cường, Nguyễn Văn Viên, Trần Ngọc Tiệp, Hà Giang, Trần Thị Như Hoa, Nguyễn Đức Huy (2015). Đánh giá đa dạng nấm đạo ôn lúa (*Pyricularia oryzae*) tại đồng bằng sông cửu long bằng kỹ thuật REP-PCR. *Tạp chí khoa học và phát triển*, 13(7), 1061-1069.
- Harmon PF, Dunkle LD, Latin R (2003). A rapid PCR based method for the detection of *Magnaporthe oryzae* from infected perennial ryegrass. *Plant Disease*, 87(9), 1072-1076.
- Howard RJ, Ferrari MA, Roach DH, Money NP (1991). Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 11281-11284.
- Kachroo P, Leong SA, Chattoo BB (1994). Pot2, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Gen Genet*, 245, 339-348.
- Kerkoud M, Manceau C, Paulin JP (2002). Rapid diagnosis of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*, the causal agent of blister spot of apple, by polymerase chain reaction using specifically designed *hrpL* gene primers. *Phytopathology*, 92, 1077-1083.
- Larsen RC, Hollingsworth CR, Vandemark GJ, Gritsenko MA, Gray FA (2002). A rapid method using PCR-based SCAR markers for the detection and identification of *Phoma sclerotoides*: The cause of brown root rot disease of alfalfa. *Plant Disease*, 86, 928-932.
- Nguyen QB, Kadotani N, Kasahara S, Tosa Y, Mayama S, Nakayashiki H (2008). Systemic functional analysis of calcium signaling proteins in the genome of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA silencing system. *Mol Microbiol*, 68, 1348-1365.
- Oliveira AC, Vallim MA (2002). Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, 92, 1048-1054.
- Pooler MR, Hartung JS (1995). Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Curr Microbiol*, 31, 377-381.
- Talbot NJ (2003). On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev Microbiol*, 57, 177-202.