

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG NẤM ĐẠO ÔN LÚA (*Pyricularia oryzae*) TẠI ĐỒNG BẰNG SÔNG HỒNG BẰNG KỸ THUẬT REP-PCR

Hà Viết Cường^{1,2*}, Nguyễn Văn Viên¹, Trần Ngọc Tiệp², Hà Giang²
Trần Thị Như Hoa², Nguyễn Đức Huy¹

¹Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

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

Email*: hvcuongnh@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 27.05.2015

Ngày chấp nhận: 09.10.2015

TÓM TẮT

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 đã được sử dụng để đánh giá mức độ đa dạng di truyền của 22 mẫu nấm đạo ôn (*Pyricularia oryzae*) thu thập trên lúa vụ xuân năm 2012 tại Đồng bằng sông Hồng. Phản ứng PCR dùng bộ mồi REP đã tạo nhiều băng sản phẩm đa hình. Phân tích Rep-PCR đã chứng tỏ quần thể nấm đạo ôn Đồng bằng sông Hồng rất đa dạng về di truyền giống như các công bố trước đây. Không có mối liên hệ rõ rệt giữa các nhóm nấm được xác định dựa trên phân tích Rep-PCR và các đặc điểm khác của nấm như màu sắc tản nấm, địa điểm thu thập và chủng nấm.

Từ khóa: Đạo ôn, Đồng bằng sông Hồng, lúa, *Pyricularia oryzae*, Rep-PCR, Việt Nam.

Genetic Diversity Analysis of *Pyricularia oryzae* in the Red River Delta of Viet Nam Using Rep-PCR

ABSTRACT

Rep-PCR technique (Repetitive sequence primed PCR) with 3 sets of primers designed on the repetitive sequences of bacterial genome including the extragenic repetitive palindromic (REP), enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) and BOX element was used to assess the genetic diversity of 22 *Pyricularia oryzae* isolates isolated from blast infected rice plants collected in 2012 spring season in the Red River Delta of North Viet Nam. PCR using REP primers (REP-PCR) produced polymorphic bands from blast fungus isolates. Rep-PCR analysis showed that blast fungus populations in this region are genetically diverse as previously reported. No clear correlation existed between fungus groups based on Rep-PCR analysis and other characteristics such as the color of the fungal culture, location of collection, and isolates.

Keywords: *Pyricularia oryzae*, blast, rice, Red River Delta, Viet Nam, Rep-PCR.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn lúa là tác nhân nguy hiểm nhất đối với lúa trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Nấm *P. oryzae* là một quần thể không đồng nhất. Dựa trên các phân tích phân tử, nhìn chung nấm được phân nhóm trên cơ sở phân bố địa lý (Levy et al.,

1991; George et al., 1998). Các quần thể nấm thuộc các khu vực khởi nguyên cây lúa (chẳng hạn ở khu vực dãy Himalaya, hoặc Đông Nam Á) đã được khẳng định có mức độ đa dạng cao hơn các khu vực khác (Zeigler, 1998; Kumar et al., 1999; Thuan et al., 2006).

Nhiều kỹ thuật phân tích phân tử đã được sử dụng để nghiên cứu đa dạng vi sinh vật. Gần

đây, kỹ thuật 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 - 40bp, các chuỗi lặp bảo thủ vùng liên gen (ERIC, enterobacterial repetitive intergenic consensus) có kích thước 124 - 127bp, chuỗi BOX có kích thước 54bp. 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 and 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* (Toda et al., 1999, Matsumoto 2014, Matsumoto and Cuong 2014), *Verticillium dahliae* (Komatsu et al., 2001), *Fusarium* spp. (Gurel et al., 2010, Ebadi et al., 2014), *Cercospora canescens* (Ferrater, 2003), *Macrophomina phaseolina* (Purkayastha et al., 2008), thậm chí có thể ứng dụng để phân loại nấm ở mức loài (Palencia et al., 2009, Abdollahzadeh and Zolfaghari, 2014).

Kỹ thuật Rep-PCR cũng đã được ứng dụng để nghiên cứu đa dạng quần thể nấm đạo ôn trên thế giới. Cho tới nay, chuỗi lặp phổ biến nhất dùng để thiết kế môi cho Rep-PCR nấm đạo ôn là gen mã hóa yếu tố di động *Pot2* (viết tắt từ *P. oryzae* transposon) dài 1857bp đặc hiệu nấm đạo ôn. Gen này lặp lại khoảng 100 phiên bản và phân bố rải rác khắp bộ gen nấm đạo ôn (Kachroo et al., 1994, George et al., 1998, Correll et al., 2000, Javan-Nikkhah et al., 2004, Prabhu et al., 2007). Ngoài ra, kỹ thuật Rep-PCR dựa trên các chuỗi lặp ERIC, REP và BOX truyền thống cũng đã được sử dụng trong nghiên cứu nấm đạo ôn (Motallebi et al., 2013)

Do nấm đạo ôn có quan hệ với cây lúa theo thuyết gen-đối-gen điển hình nên thông tin về mức độ đa dạng của nấm rất cần thiết cho các chương trình chọn tạo giống kháng bệnh. Mục

tiêu của nghiên cứu này là tìm hiểu mức độ đa dạng di truyền của quần thể nấm đạo ôn tại Đồng bằng sông Hồng bằng kỹ thuật Rep PCR dùng các môi ERIC, REP và BOX truyền thống.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Mẫu bệnh, mẫu nấm

22 mẫu bệnh đạo ôn được thu từ 16 giống lúa được gieo cấy phổ biến và đại diện trong vụ đông xuân 2012 ở vùng Đồng bằng sông Hồng, nấm *P. oryzae* được phân lập bằng cách cấy đơn bào tử từ vết bệnh trên lúa. Mẫu lá lúa có vết bệnh điển hình được rửa sạch bằng nước vòi, sau đó bằng nước cất vô trùng. Lá bệnh sạch được thấm khô bằng giấy thấm vô trùng, ủ trong ống nghiệm có sẵn 1ml nước cất vô trùng. Sau 15 - 18 giờ, bào tử nấm đạo ôn mới hình thành nhiều trên vết bệnh. Chạm nhẹ vết bệnh trên bề mặt môi trường WA 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 PSA để được mẫu nấm thuần.

2.2. Xác định chủng nấm

Chủng nấm đạo ôn được xác định dựa trên phản ứng với 12 giống lúa đẳng gen của Nhật Bản mang gen kháng (Bảng 1). Cây lúa ở giai

Bảng 1. Các giống lúa đẳng gen của Nhật Bản mang gen kháng dùng để xác định chủng nấm đạo ôn

STT	Tên giống	Gen kháng
1	Shin 2	Pik- s
2	Aichi- asahi	Pia
3	Ishikari- Shorke	Pii
4	Kanto 51	Pik
5	Tsuyake	Pik- m
6	Fukunishiki	Piz
7	Yashimochi	Pita
8	Pin. 4	Pita- 2
9	Toride 1	Pita- 1
10	K60	Pik- p
11	BL1	Pib
12	K59	Pit

đoạn 4 - 5 lá được phun với dịch bào tử nấm ở nồng độ 10^4 bào tử/ml. Cây lây nhiễm được giữ ẩm liên tục trong vòng 20 giờ (ẩm độ > 90%), nhiệt độ 26 - 28°C, sau đó được chăm sóc trong nhà lưới. Sau lây nhiễm 7 ngày, phản ứng của các giống lúa đối với các mẫu nấm được đánh giá theo thang phân cấp của Kato (1993). Các chủng nấm xác định được cũng được ký hiệu theo phương pháp của Kato (1993).

2.3. Chiết DNA từ nấm

Khoảng 50mg tản nấm thuần được nghiền bằng chày nhựa chuyên dụng (Kontes™ Pellet Pestle) với 0,5mL đệm CTAB Doyle & Doyle (1987) trong ống Eppendorf loại 1,5mL. DNA được chiết 2 lần với Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1). Cặn DNA được rửa 2 lần bằng ethanol 70% và hòa trong 100uL nước cất 2 lần vô trùng. Mẫu DNA được bảo quản ở -20°C.

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

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 mỗi 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 100V trong 30 - 40 phút. Bản gel được kiểm tra dưới ánh sáng tử ngoại và được chụp bằng máy ảnh số.

2.5. Phân tích kết quả

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 đạo ôn là đơn bội và Rep-PCR thuộc nhóm marker trội nên hệ số phù hợp đơn giản SMC (simple matching coefficient) được sử dụng để tính hệ số tương đồng (S) theo công thức sau:

$$S = (a+d)/(a+b+c+d)$$

Trong đó, a là số băng giống nhau của 2 mẫu, b là số băng chỉ xuất hiện ở mẫu thứ i, c là số băng chỉ xuất hiện ở mẫu thứ j, d là số băng 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).

Bảng 2. Các môi được sử dụng trong Rep-PCR

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

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Rep-PCR

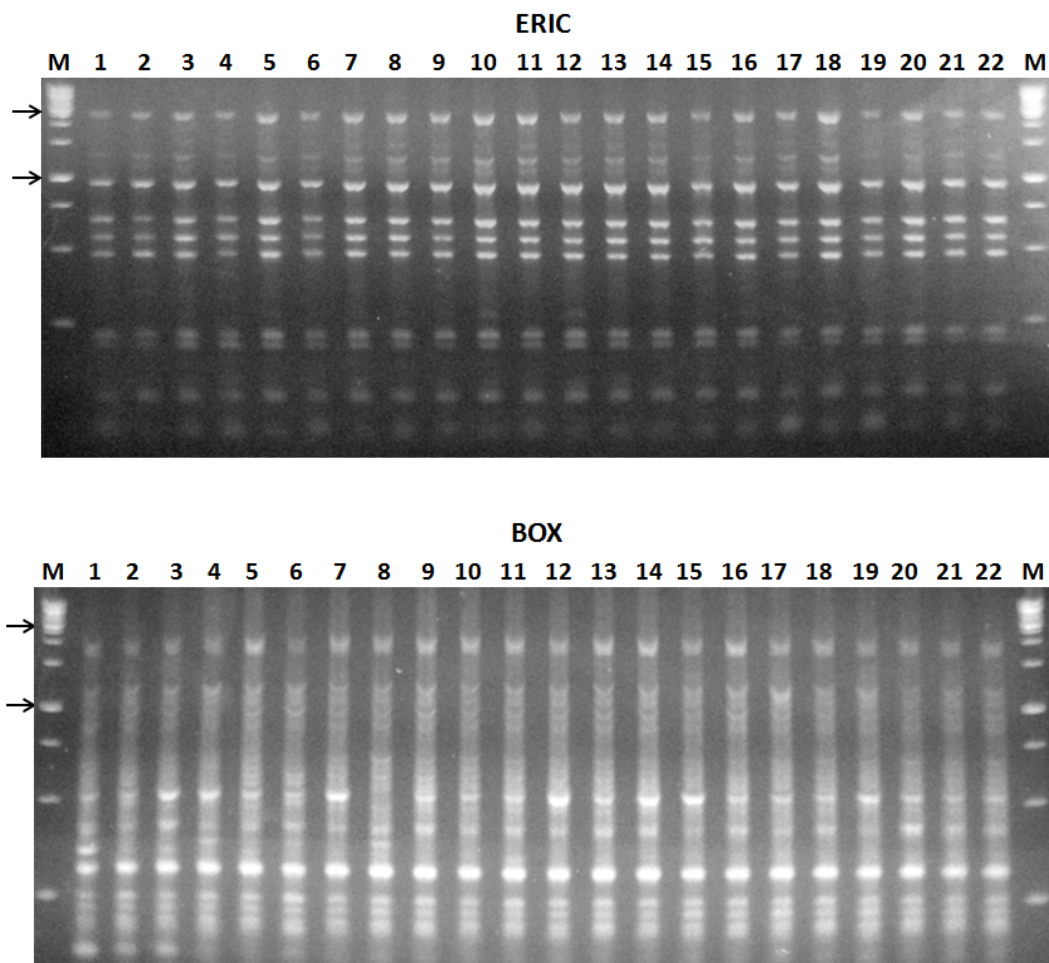
Tổng số 22 mẫu nấm đạo ôn đã được phân lập từ lá lúa bệnh của 16 giống trồng vụ xuân năm 2012 tại 6 tỉnh Đồng bằng sông Hồng gồm Hà Nội (3 mẫu), Nam Định (7 mẫu), Ninh Bình (2 mẫu), Bắc Ninh (3 mẫu), Thái Bình (2 mẫu), Hải Phòng (2 mẫu), Hải Dương (1 mẫu), Hưng Yên (1 mẫu) và 1 mẫu thu tại Vĩnh Phúc (Bảng 3). Sau khi được phân lập thuần, các mẫu nấm được phân tích đa dạng bằng Rep-PCR.

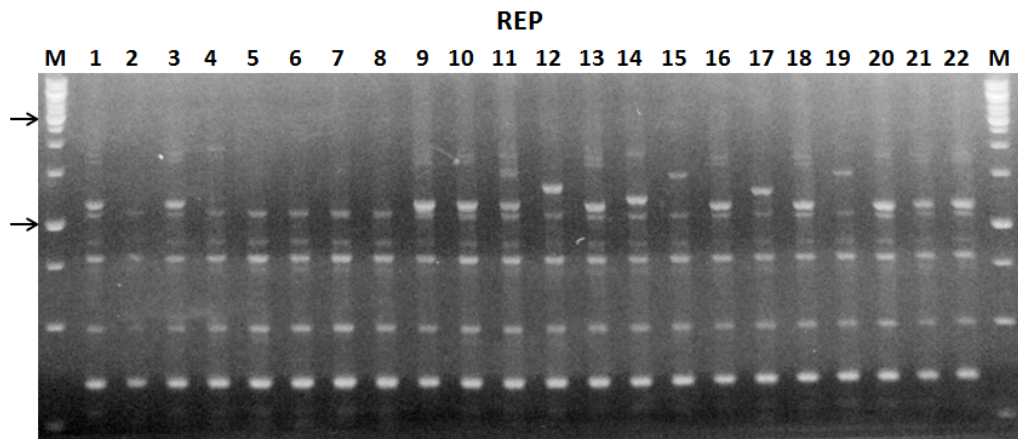
Kết quả phân tích Rep-PCR cho thấy tổng số băng sản phẩm của các phản ứng PCR với 3 bộ mồi ERIC, BOX và REP là 46 với kích thước từ ~ 1,7 tới ~ 3kb. Số băng sản phẩm của cả 3 bộ mồi khá đồng đều gồm 15 băng (ERIC và REP) và 16 băng (BOX) (Bảng 3, Hình 1).

Kiểm tra các băng sản phẩm trên gel agarose cho thấy bộ mồi ERIC không tạo băng đa hình giữa tất cả các mẫu, bộ mồi BOX chỉ tạo 1 băng đa hình ở vị trí ~ 0,6kb đối với mẫu số 8 (NB9) (Hình 1). Đáng chú ý, bộ mồi REP đã tạo tới 7 băng đa hình nằm giữa vị trí 1 và 2kb (Hình 1).

Bảng 3. Sản phẩm của phân tích Rep-PCR đối với 22 mẫu nấm đạo ôn

Rep-PCR	Số băng hình thành	Số locus đa hình	Kích thước băng tối đa (kb)
ERIC-PCR	15	0	3
BOX-PCR	16	1	1.7
REP-PCR	15	7	1.8
	46	8	





Hình 1. Rep-PCR trên các mẫu nấm đạo ôn thu tại Đồng bằng sông Hồng năm 2012

Ghi chú: Số thứ tự mẫu tương ứng với số thứ tự trong bảng 3. M là thang DNA 1kb (GeneRuler 1kb, Thermo Scientific) với băng tham khảo 3kb và 1kb được chỉ rõ bằng mũi tên.

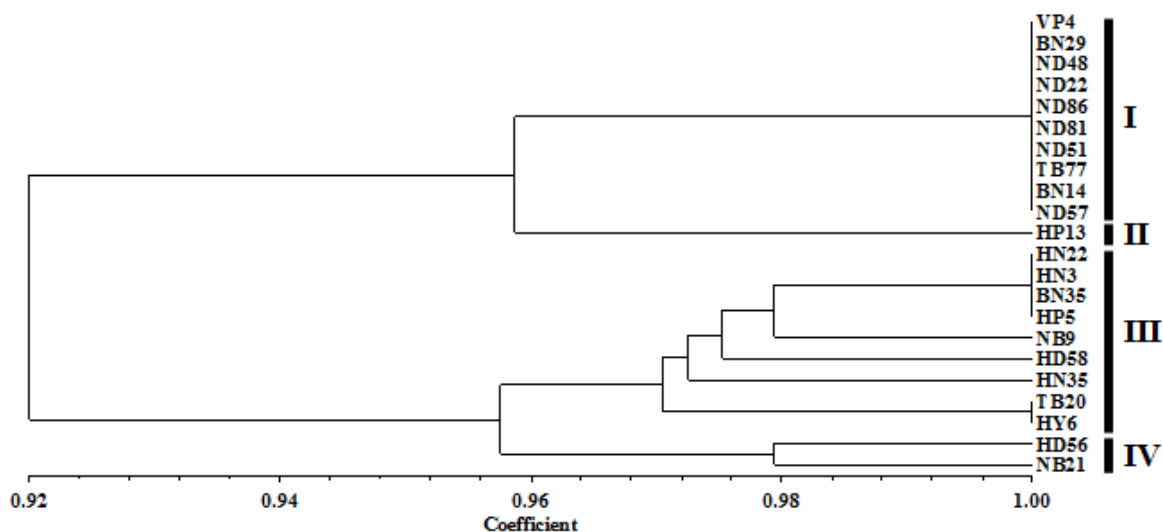
3.2. Phân tích cụm

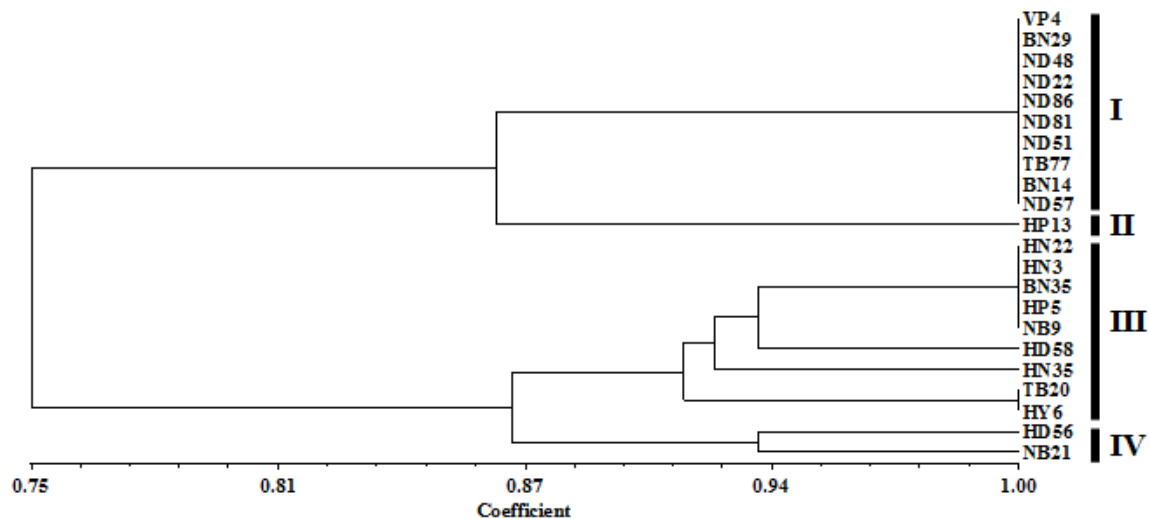
Các băng sản phẩm PCR của cả 3 bộ môi đã được chuyển sang số liệu nhị phân để tạo ra dữ liệu đầu vào cho phân tích cụm dùng phần mềm NTSYS nhằm tìm hiểu mức độ đa dạng và quan hệ của các mẫu nấm đạo ôn. Kết quả phân tích cụm cho thấy sử dụng dữ liệu của cả 3 bộ môi hoặc chỉ của bộ môi REP đều tạo ra 4 cụm mẫu (ký hiệu là I, II, III, IV) với ngưỡng phân chia tương ứng dựa trên hệ số tương đồng là 96% và 87%. Trong số 4 cụm, cụm II chỉ gồm 1 mẫu là HP13, cụm II gồm 2 mẫu là HD66 và NB21, hai cụm còn lại gồm 9-10 mẫu mỗi cụm (Hình 2).

3.3. Quan hệ giữa các nhóm Rep và các đặc điểm hình thái và sinh học

Các mẫu nấm phân lập được có màu sắc tản nấm khác nhau trên môi trường nuôi cấy nhân tạo, biểu hiện tới 5 màu từ trắng xám tới xám đậm. Nấm cũng có phản ứng khác nhau với 12 giống lúa chỉ thị Nhật Bản. Căn cứ phản ứng trên các giống chỉ thị, 22 mẫu nấm được xếp vào 8 chủng sinh lý khác nhau (Bảng 3).

Phân tích χ^2 (Bảng 4) đã cho thấy không có mối quan hệ nào giữa các nhóm được phân biệt dựa trên phân tích Rep-PCR với nguồn gốc mẫu (tỉnh), đặc điểm hình thái (màu sắc tản nấm) và chủng sinh lý nấm.





Hình 2. Phân tích cụm dựa trên số liệu Rep-PCR của các mẫu nấm đạo ôn thu tại Đồng bằng sông Hồng

Ghi chú: Hình trên là phân tích dựa trên số liệu của 3 phản ứng ERIC-, BOX- và REP-PCR. Hình dưới là phân tích chỉ dựa trên số liệu REP-PCR. 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 4. Quan hệ của các nhóm Rep với nguồn gốc địa lý, đặc điểm hình thái và chủng nấm

Quan hệ giữa các nhóm Rep: 4 (I, II, III, IV) với các đặc điểm mẫu (tỉnh, màu tảo nấm, chủng)	Độ tự do df	χ^2	p	Kết luận*
Tỉnh: 9 (Bắc Ninh, Hà Nội, Hải Dương, Hải Phòng, Hưng Yên, Nam Định, Ninh Bình, Thái Bình, Vĩnh Phúc)	24	35,2	0,066	Không quan hệ
Màu tảo nấm: 5 (Trắng xám, Xám nhạt, Xám, Xám đậm, Xám đen)	12	15,6	0,212	Không quan hệ
Chủng: 8 (000,0; 001,0; 002,6; 005,0; 040,0; 100,2; 300,2; 400,4)	21	22,5	0,373	Không quan hệ

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

3.4. Thảo luận

Đa dạng quần thể nấm đạo ôn tại Việt Nam đã được nghiên cứu. Sử dụng kỹ thuật AFLP (amplified fragment length polymorphism) đã nghiên cứu mức độ đa dạng và tính gây bệnh của 114 mẫu nấm đạo ôn thu thập tại nhiều tỉnh thuộc Đồng bằng sông Hồng (Thuan et al., 2006). Nghiên cứu này cho thấy: (i) quần thể nấm đạo ôn tại Đồng bằng sông Hồng rất đa dạng về di truyền, gồm ít nhất 7 nhóm, đại diện các nhóm có tính gây bệnh khác nhau trên các giống chỉ thị mang gen kháng; và (ii) các quần thể nấm phân lập trên các giống lúa tẻ (nhóm Indica) khác với quần thể nấm phân lập trên các giống lúa nếp (nhóm Japonica).

Sử dụng kỹ thuật RFLP (Restriction fragment length polymorphism) với dò đa locus, Lê Đình Đôn đã cho thấy quần thể nấm đạo ôn ở Đồng bằng sông Hồng đa dạng hơn và khác với quần thể nấm đạo ôn ở đồng bằng Sông Mê Kông (Don et al., 1999). Sử dụng kỹ thuật Rep-PCR với bộ mồi *Pot2* đặc hiệu nấm đạo ôn, Lê Minh Tường đã chứng tỏ quần thể nấm đạo ôn ở đồng bằng sông Mê Kông cũng đa dạng và đang tiến hóa nhanh chóng (Le et al., 2010). Đáng chú ý, cả 2 nghiên cứu này đều cho thấy không có mối liên quan rõ rệt giữa các nhóm nấm được xác định dựa trên marker phân tử với các chủng nấm được xác định dựa trên phản ứng với bộ giống chỉ thị của Nhật Bản.

Bảng 3. Đặc điểm của 22 mẫu nấm đạo ôn thu thập tại Đồng bằng sông Hồng vụ xuân 2012

Mẫu nấm	Địa điểm	Giống	Shin 2	Aishiasahi	Ishikarishiroke	Kanto 51	Tsuyuake	Fukunishik i	Yashir omoch i	Pino 4	Toride 1	K60	BL 1	K5 9	Chủng	Màu sắc tân nấm	Nhóm Rep
			Pik- s	Pia	Pii	Pik	Pik- m	Piz	Pita	Pita-2	Piz-1	Pik- p	Pib	Pit			
VP4	Vĩnh Phúc	Khang dân 18	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	400,4	Trắng xám	I
HN22	Hà Nội	Nếp TK 90	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	005,0	Xám nhạt	III
BN29	Bắc Ninh	Syn 6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	000,0	Xám nhạt	I
HD56	Hải Dương	Nếp DT 22	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	100,2	Xám đậm	IV
HN3	Hà Nội	Nếp 44	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	100,2	Xám đậm	III
BN35	Bắc Ninh	Nếp PD2	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	002,6	Xám	III
HP5	Hải Phòng	Nếp 44	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	005,0	Xám đậm	III
NB9	Ninh Bình	BC 15	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	040,0	Xám đen	III
ND48	Nam Định	Ải 32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	000,0	Xám nhạt	I
ND22	Nam Định	BT 7	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	300,2	Xám	I
HP13	Hải Phòng	BC15	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	040,0	Xám đen	II
HD58	Nam Định	Nếp 87	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	100,2	Xám đậm	III
ND86	Nam Định	Nếp 97	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	100,2	Xám đậm	I
NB21	Ninh Bình	Nhị Ưu 838	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	000,0	Xám nhạt	IV
TB20	Thái Bình	Q5	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	001,0	Xám đậm	III
ND81	Nam Định	Tạp giao 903	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	400,4	Xám	I
HN35	Hà Nội	Xi 23	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	000,0	Xám nhạt	III
ND51	Nam Định	Thục hưng	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	400,4	Xám	I
HY6	Hưng Yên	Nếp DT 22	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	100,2	Xám đậm	III
TB77	Thái Bình	BC 15	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	040,0	Xám đen	I
BN14	Bắc Ninh	Khang dân 18	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	400,4	Trắng xám	I
ND57	Nam Định	Khang dân 18	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	400,4	Trắng xám	I

Nghiên cứu này mặc dù chỉ dựa trên một số lượng tương đối ít mẫu nấm, được thu thập gần đây nhất, đã một lần nữa khẳng định mức độ đa dạng cao của quần thể nấm đạo ôn ở vùng Đồng bằng sông Hồng. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của chúng tôi, cùng với các nghiên cứu khác trên thế giới cũng như của 2 nhóm tác giả Lê Đình Đôn và Lê Minh Tường đã khẳng định các marker dựa trên các chuỗi lặp hiện có không liên quan tới các gen qui định chủng của nấm đạo ôn.

Trong nghiên cứu này, marker dựa trên chuỗi lặp REP của vi khuẩn (REP-PCR), mặc dù đã được áp dụng cho nhiều loại nấm khác nhưng lần đầu tiên được áp dụng đối với nấm đạo ôn và đã chứng tỏ sự hữu ích trong đánh giá đa dạng di truyền loài nấm này khi tạo ra số lượng băng đa hình đáng kể.

4. KẾT LUẬN

Đã lần đầu tiên tại Việt Nam ứng dụng kỹ thuật Rep-PCR để phân tích mức độ đa dạng các mẫu nấm đạo ôn thu tại Đồng bằng sông Hồng. Các marker ERIC-PCR và BOX-PCR không tạo ra các băng đa hình. Đáng chú ý, marker REP-PCR, được áp dụng lần đầu tiên trên thế giới để nghiên cứu đa dạng nấm đạo ôn, tạo nhiều sản phẩm đa hình với kích thước trong khoảng 1-2 kb và có thể ứng dụng để nghiên cứu đa dạng nấm này.

Phân tích Rep-PCR đã chứng tỏ quần thể nấm đạo ôn tại khu vực Đồng bằng sông Hồng rất đa dạng về di truyền giống như các công bố trước đây. Trong nghiên cứu này đã xác định 8 chủng sinh lý nấm *P. oryzae*

Không có mối liên hệ rõ rệt giữa các cụm nấm được xác định bởi Rep-PCR với nguồn gốc địa lý, đặc điểm màu sắc tản nấm và chủng nấm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abdollahzadeh, J., and S. Zolfaghari (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.

- Correll, J., T. Harp, J. Guerber, R. Zeigler, B. Liu, R. Cartwright, and F. Lee (2000). Characterization of *Pyricularia grisea* in the United States using independent genetic and molecular markers. *Phytopathology* 90: 1396 - 1404.
- Don, L. D., Y. Tosa, H. Nakayashiki, and S. Mayam (1999). Population Structure of the Rice Blast Pathogen in Vietnam. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 65: 475 - 479.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11 - 15.
- Ebadi, M., H. Riahi, and R. Zare (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.
- George, M., R. Nelson, R. Zeigler, and H. Leung. 1998. Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. *Phytopathology* 88: 223 - 229.
- Gillings, M., and M. Holley (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.
- Gurel, F., G. Albayrak, O. Diken, E. Cepni, and B. Tunali (2010). Use of Rep-PCR for Genetic Diversity Analyses in *Fusarium culmorum*. *Journal of phytopathology*, 158: 387 - 389.
- Javan-Nikkhah, M., B. McDonald, S. Banke, and G.-a. Hedjaroude (2004). Genetic structure of Iranian *Pyricularia grisea* populations based on rep-PCR fingerprinting. *European journal of plant pathology*, 110: 909 - 919.
- Kachroo, P., S. Leong, and B. Chattoo (1994). Pot2, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular and General Genetics MGG*, 245: 339 - 348.
- Kato (1993). *Plant disease*, 77: 1211 - 1216.
- Komatsu, T., A. Sumino, and K. Kageyama (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.
- Kumar, J., R. Nelson, and R. Zeigler (1999). Population structure and dynamics of *Magnaporthe grisea* in the Indian Himalayas. *Genetics*, 152: 971 - 984.
- Le, M. T., T. Arie, and T. Teraoka (2010). Population dynamics and pathogenic races of rice blast

- fungus, *Magnaporthe oryzae* in the Mekong Delta in Vietnam. *Journal of General Plant Pathology*, 76: 177 - 182.
- Levy, M., J. Romao, M. A. Marchetti, and J. E. Hamer (1991). DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. *The Plant Cell Online*, 3: 95 - 102.
- 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 H. Cuong (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.
- Motallebi, P., M. Javan-Nikkhah, and S. Okhovvat (2013). Characterization of *Magnaporthe grisea* populations associated with rice and weeds in Iran. *Australasian Plant Pathology*, 42: 693 - 700.
- Muiru, W., B. Koopmann, A. Tiedemann, E. Mutitu, and J. Kimenju (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., M. A. Klich, A. E. Glenn, and C. W. Bacon (2009). Use of a rep-PCR system to predict species in the *Aspergillus* section *Nigri*. *Journal of microbiological methods*, 79: 1 - 7.
- Prabhu, A. S., L. G. Araújo, G. B. Silva, and M. G. Trindade (2007). Virulence and rep-PCR analysis of *Pyricularia grisea* isolates from two Brazilian upland rice cultivars. *Fitopatologia Brasileira*, 32: 13 - 20.
- Purkayastha, S., B. Kaur, P. Arora, I. Bisyer, N. Dilbaghi, and A. Chaudhury (2008). Molecular Genotyping of *Macrophomina phaseolina* Isolates: Comparison of Microsatellite Primed PCR and Repetitive Element Sequence-based PCR. *Journal of phytopathology*, 156: 372 - 381.
- Rademaker, J., F. Louws, J. Versalovic, F. De Bruijn, G. Kowalchuk, I. Head, A. Akkermans, and J. van Elsas (2004). Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. *Molecular microbial ecology manual*. 1 + 2: 611 - 643.
- Thuan, N. T. N., J. Bigirimana, E. Roumen, D. Van Der Straeten, and M. Höfte (2006). Molecular and pathotype analysis of the rice blast fungus in North Vietnam. *European journal of plant pathology*, 114: 381-396.
- Toda, T., M. Hyakumachi, and D. K. Arora (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., T. Koeuth, and R. Lupski (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research*, 19: 6823 - 6831.
- Versalovic, J., M. Schneider, F. J. De Bruijn, and J. R. Lupski (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology*, 5: 25 - 40.
- Zeigler, R. S. (1998). Recombination in *Magnaporthe grisea*. *Annual review of phytopathology*, 36: 249 - 275.