

THU THẬP VÀ PHÂN LẬP CÁC CHỦNG NẤM ĐẠO ÔN *Magnaporthe oryzae* HẠI LÚA Ở MIỀN BẮC VÀ MIỀN TRUNG VIỆT NAM

Lê Thị Liễu^{1,2}, Henri Adreit³, Michel Lebrun²,
Elisabeth Fournier³, Hoàng Thị Giang^{1*}

TÓM TẮT

Bệnh đạo ôn lúa (*Magnaporthe oryzae*) gây ra những thiệt hại nghiêm trọng cho sản xuất lúa trên thế giới và Việt Nam. Để phát triển giống lúa kháng đạo ôn hiệu quả và bền vững, cần có hiểu biết sâu rộng về đa dạng di truyền và sự tiến hóa của quần thể nấm *M. oryzae* trong một vùng sinh thái cụ thể. Nghiên cứu này đã áp dụng phương pháp thu thập và phân lập mẫu nấm đạo ôn trên diện rộng, bao phủ 5 trong 7 vùng sinh thái nông nghiệp, gồm: Trung du miền núi phía Bắc và đồng bằng sông Hồng thuộc khu vực miền Bắc; Bắc Trung Bộ, Duyên hải Nam Trung Bộ và Tây Nguyên thuộc khu vực miền Trung, nhằm phục vụ nghiên cứu đa dạng di truyền của quần thể nấm đạo ôn. Kết quả đã thu thập được 214 mẫu bệnh từ 39 tỉnh, với số mẫu ở miền Bắc là 148 và miền Trung là 66. Dựa vào đặc điểm hình thái bào tử nấm đã phân lập được 945 isolates từ 124 mẫu trong tổng số 214 mẫu thu thập. Các isolates được tách chiết ADN và được xác định là nấm *M. oryzae* dựa trên cặp mồi ITS5/ITS4. Bộ chủng nấm *M. oryzae* được bảo quản dưới dạng sợi nấm trên giấy thấm ở -20°C và ADN, là vật liệu khởi đầu cho các nghiên cứu di truyền của quần thể nấm đạo ôn.

Từ khóa: Bệnh đạo ôn, nấm *Magnaporthe oryzae*, lúa, isolate

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa là một trong số các cây trồng quan trọng nhất cho kinh tế và an ninh lương thực không chỉ của Việt Nam mà còn toàn thế giới. Tuy nhiên, sản xuất lúa thường xuyên bị đe dọa bởi các dịch bệnh nguy hiểm, trong số đó có sự đóng góp đáng kể của bệnh đạo ôn gây nên bởi nấm *Magnaporthe oryzae* (anamorph, *Pyricularia oryzae*). *Magnaporthe oryzae* là một loài đơn bội của ngành nấm *Ascomycota*, phân ly từ *Magnaporthe grisea*, gây bệnh đạo ôn chủ yếu trên cây cỏ và một số loài khác trong đó có lúa. Là hai loài phát sinh khác nhau nhưng *M. oryzae* và *M. grisea* không có sự khác biệt rõ ràng về hình thái (Couch and Kohn, 2002).

Bệnh đạo ôn làm giảm năng suất lúa từ 10 - 30% trên toàn thế giới (Pooja and Katoch, 2014) nhưng cũng có nơi bị thiệt hại lên tới 80 - 100% (Talbot, 2003). Ở Việt Nam, bệnh đạo ôn gây hại trên tất cả các vùng sinh thái nông nghiệp, đặc biệt nghiêm trọng hơn ở các khu vực áp dụng hệ thống canh tác hiện đại, như đồng bằng sông Hồng (ĐBSH), đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) và các hệ sinh thái nông nghiệp ở miền Trung do tập trung khai thác các giống thương mại cho năng suất cao, tuy nhiên

các giống đó lại dễ mẫn cảm với các loại sâu, bệnh hại cây trồng (Khanh *et al.*, 2021). Hơn nữa, ở các vùng sinh thái trên thường có ít giống lúa khác nhau được trồng xen kẽ trên một cánh đồng, điều này dẫn đến sâu, bệnh sẽ lan rộng nếu giống được khai thác mẫn cảm với sâu, bệnh (Akem *et al.*, 2000).

Hiện nay, biện pháp kiểm soát bệnh đạo ôn đang được áp dụng nhiều nhất tại Việt Nam là biện pháp hóa học phun thuốc phòng, trừ bệnh, tuy hiệu quả nhưng ảnh hưởng tới môi trường sinh thái và sức khỏe con người. Sử dụng các giống lúa mang gen kháng được coi là định hướng an toàn, tuy nhiên hiệu quả của phương pháp này thường chỉ được duy trì trong một thời gian ngắn (khoảng 2 đến 3 năm), do nấm *M. oryzae* xuất hiện những chủng gây bệnh mới có độc tính cao mà gen kháng hiện tại không nhận biết được (Bonman *et al.*, 1992). Để chọn tạo giống lúa có tính kháng đạo ôn hiệu quả và bền vững cần thiết phải nắm rõ đặc tính di truyền, mức độ đa dạng và sự tiến hóa của quần thể tác nhân gây bệnh trong các vùng sinh thái cụ thể.

Cấu trúc quần thể nấm đạo ôn *M. oryzae* đã được nghiên cứu trên phạm vi toàn cầu trong thập kỷ qua bằng nhiều phương pháp khác nhau

¹ Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Tế bào thực vật, LMI-RICE, Viện Di truyền Nông nghiệp

² Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội

³ PHIM Plant Health Institute, Univ Montpellier, INRAE, CIRAD, Institut Agro, IRD, Montpellier, Pháp

* Tác giả liên hệ, e-mail: nuocngamos@yahoo.com

(Gladieux *et al.*, 2018; Saleh *et al.*, 2012, 2013; Thierry *et al.*, 2021; Zhong *et al.*, 2018). Phân tích 55 quần thể nấm đạo ôn từ 15 quốc gia cho thấy, vùng Đông Nam Á là nguồn gốc của nấm đạo ôn, vì hầu hết các cấu trúc di truyền trên thế giới đều có sự góp mặt của cấu trúc ở vùng này (Saleh *et al.*, 2012, 2013). Nghiên cứu trên cũng cho thấy có 4 phân dòng nấm đạo ôn được xác định, trong đó một dòng đặc hữu ở Châu Á với dấu hiệu tái tổ hợp, các phân dòng còn lại có mặt ở khắp nơi và hoàn toàn vô tính. Trong nghiên cứu của Gladieux và cộng tác viên (2018) dựa trên giải trình tự 50 chủng nấm *M. oryzae* trên thế giới cũng cho kết quả tương tự như trên, và bổ sung thêm 2 phân dòng, 1 phân dòng đặc trưng cho các chủng nhiễm trên nhóm lúa *japonica*, và 1 phân dòng cho nhóm *indica*. Ở Việt Nam, sự hiểu biết về cấu trúc di truyền quần thể nấm đạo ôn vẫn còn hạn chế do mới có một số ít nghiên cứu được thực hiện trên số lượng mẫu chưa lớn và trên phạm vi cục bộ. Bằng mẫu dò MAGGY, 78 chủng nấm đạo ôn từ một vài tỉnh ở ĐBSH và ĐBSCL được phân thành 5 dòng đặc hữu, trong đó 4 dòng ở ĐBSH và 1 dòng ở ĐBSCL (Don *et al.*, 1999). Tuy nhiên, nghiên cứu dựa trên 160 chỉ thị phân tử AFLP của 123 chủng đạo ôn ở ĐBSH, xác định được 12 nhóm di truyền, phân biệt nhóm chủng từ *japonica* và nhóm chủng từ *indica* (Thuan *et al.*, 2006).

Internal Transcribed Spacer (ITS) là vùng sao mã bên trong của các đơn vị ribosome nhân, thường tiến hóa nhanh và thay đổi giữa các loài trong cùng một giống hoặc giữa các quần thể (White *et al.*, 1990). Các môi ITS sử dụng các vùng bảo tồn của các gen ribosome để khuếch đại các vùng không mã hóa giữa chúng. Mỗi ITS được sử dụng để phát hiện, xác định và phân loại các isolates của *Magnaporthe* (Hirata *et al.*, 2007).

Các kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy, sự biến đổi kiểu gây bệnh của nấm đạo ôn *M. oryzae* diễn ra nhanh và có động lực cao hơn so với sự đa dạng di truyền quan sát được (Le *et al.*, 2010). Tuy nhiên, các nghiên cứu trước đây chủ yếu sử dụng các phương pháp nghiên cứu đa hình di truyền khác nhau và trên quy mô cục bộ nên khó để phân tích tổng quát đặc điểm cấu trúc quần thể đặc trưng cho Việt Nam. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đã áp dụng một phương pháp thu thập mẫu chặt chẽ, hoàn chỉnh theo vùng địa lý, mức độ đại diện của mẫu và thông tin mẫu thu thập. Do hạn chế

về kinh phí và thời gian nên quy mô thu thập mẫu nấm đạo ôn được thực hiện ở hai khu vực bao phủ 5 vùng sinh thái nông nghiệp: miền Bắc (Trung du miền núi phía Bắc và Đồng bằng sông Hồng) và miền Trung (Bắc Trung Bộ, Duyên hải Nam Trung Bộ và Tây Nguyên thuộc khu vực miền Trung), nhằm phân lập được số lượng lớn chủng nấm phục vụ nghiên cứu đa dạng di truyền của quần thể nấm trên quy mô các vùng trồng lúa đặc trưng của Việt Nam. Thu thập mẫu bệnh được thực hiện trên các giống lúa khác nhau thuộc nhóm *indica* và *japonica*, giống thương mại và địa phương nhằm phục vụ nghiên cứu đa dạng di truyền và tiến hóa của quần thể nấm *M. oryzae* ở Việt Nam, góp phần định hướng đúng trong phát triển chiến lược kiểm soát bệnh đạo ôn lúa hiệu quả hơn. Các chủng nấm *M. oryzae* phân lập được góp phần bổ sung nguồn gen và là nguồn vật liệu phục vụ cho nghiên cứu di truyền quần thể nấm đạo ôn tại Việt Nam và cho công tác chọn tạo giống lúa kháng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu lúa nhiễm nấm bệnh đạo ôn được thu thập vào thời điểm phát sinh dịch bệnh tại các vùng sinh thái nông nghiệp đã chọn.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu thập mẫu

Tiến hành thu thập mẫu tại khu vực miền Bắc (gồm hai vùng sinh thái nông nghiệp là trung du miền núi phía Bắc và đồng bằng sông Hồng) và miền Trung (gồm ba vùng sinh thái nông nghiệp là Bắc Trung Bộ, Duyên hải Nam Trung Bộ và Tây Nguyên). Ở mỗi tỉnh thực hiện thu mẫu tại hai điểm (hai huyện) khác nhau, mỗi điểm thu mẫu trên hai giống lúa khác nhau, mỗi giống lúa thu ít nhất 10 cây lúa (lá, bông) bị bệnh. Thu ít nhất 10 mẫu bệnh khác nhau cho 1 giống, tại 1 điểm nhằm mục đích phân lập được tối đa 10 chủng nấm, để so sánh mức độ đa dạng di truyền lặp lại của các chủng nấm trong cùng một mẫu lúa, tại cùng một địa điểm. Quá trình thu mẫu được tổ chức vào thời điểm phát hiện dịch bệnh trên đồng ruộng, ở giai đoạn phát triển bệnh đạo ôn trên lá hay trên cổ bông.

Thu thập các mẫu bệnh dựa vào triệu chứng đặc trưng của bệnh đạo ôn. Trên lá, vết bệnh có dạng hình thoi, xung quanh màu nâu đậm, giữa màu

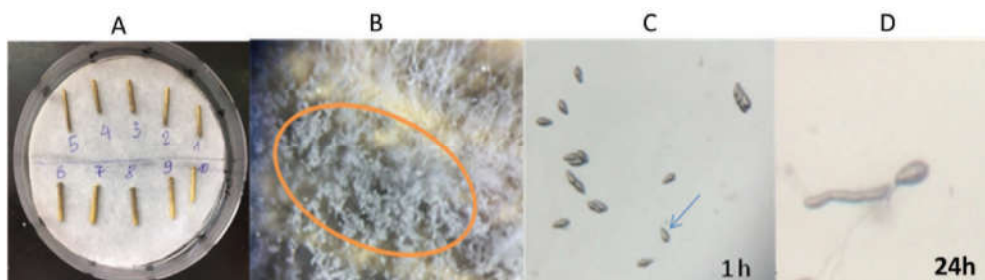
xám trắng. Trên cổ lá, vết bệnh hình khum theo chiều cong giữa cổ lá và phiến lá, từ cổ lá vết bệnh sẽ lan ra bẹ lá và phiến lá làm cho lá lúa bị khô lụi và gãy gục. Trên cổ bông và bông, đoạn cổ bông có màu nâu xám, khô tóp.

Các thông tin của mẫu bệnh như tên giống lúa, loại giống lúa (thường mại hay địa phương), vị trí địa lý (GPS) được ghi chi tiết nhằm tìm ra ảnh hưởng của cây chủ và môi trường tới cấu trúc và sự đa dạng của quần thể nấm đạo ôn ở Việt Nam.

2.2.2. Phương pháp phân lập chủng nấm đạo ôn

Phương pháp phân lập đơn bào tử được tiến hành theo mô tả của Silué và Nottéghem (1990) (Hình 1). Đối với mỗi mẫu bệnh thu thập được, cắt 10 đoạn lá hoặc cổ bông bị bệnh, đặt vào đĩa petri đã có sẵn giấy thấm ướt (Hình 1A). Để đĩa mẫu ở nhiệt độ phòng (thích hợp từ 25 - 28°C) để bào tử nấm đạo ôn phát triển. Sau khoảng 24 giờ, tiến hành quan sát mẫu bệnh dưới kính hiển vi và thực hiện bước phân lập bào tử nấm. Bào tử nấm đạo ôn được xác định bằng hình thái, có dạng hình quả lê, hoặc hình nụ

sen phình to ở phía đáy, hơi nhọn ở phía ngọn (Hình 1C, 1D), thường có 2 vách ngăn ngang. Dưới kính hiển vi, có thể quan sát được bào tử nấm tạo thành ở chóp cành bào tử phân sinh, màu trắng (Hình 1B). Dùng que thủy tinh chạm vào bề mặt vết bệnh nơi có bào tử nấm để bào tử nấm dính vào, sau đó cấy bào tử nấm lên bề mặt đĩa môi trường thạch (agar 35 g/L), dùng que thủy tinh gạt bào tử nấm tách rời nhau nhằm thu được bào tử đơn (Hình 1C). Sau 24 giờ, bào tử nấm phát triển sợi nấm (Hình 1D). Sử dụng dao nhọn để cắt miếng thạch nhỏ có chứa bào tử nấm đã phát triển sợi, chuyển sang môi trường bột gạo (Tài Ký) 20 g/L, dịch chiết nấm men (Titan Biotech) 2 g/L và agar 15 g/L có bổ sung kháng sinh penicilline 500 mg/L. Từ mỗi đoạn lá hoặc cổ bông của một mẫu bệnh thực hiện tách 5 bào tử đơn nhưng chỉ chọn một bào tử phát triển tốt nhất, không bị nhiễm nấm, khuẩn để thu mẫu nấm thuần (Hình 1D). Mỗi bào tử đơn gọi là một chủng phân lập (isolate). Mỗi đoạn lá hoặc cổ bông của một mẫu bệnh phân lập một isolate, như vậy một mẫu bệnh có tối đa 10 isolate.



Hình 1. Quá trình phân lập bào tử nấm

Ghi chú: A - mẫu cổ bông trong đĩa petri có giấy thấm ẩm; B - bào tử nấm phát triển trên bề mặt mẫu bệnh; C, D - bào tử nấm đạo ôn trên môi trường thạch sau 1h và 24h.

2.2.3. Phương pháp xác định nấm đạo ôn bằng cặp môi ITS

a) Phương pháp tách chiết ADN

ADN của các isolate được tách chiết theo phương pháp phân giải tế bào bằng enzyme (Sweigard *et al.*, 1990). Nuôi nấm trong môi trường lỏng (1 lít môi trường gồm: 10 g D-glucose, 3 g KNO₃, 2 g KH₂PO₄, 2 g dịch chiết nấm men) ở điều kiện tối, 25°C trong 4 ngày. Thu sợi nấm và chuyển sang ống eppendorf có chứa dịch chiết enzyme extralyse (Laffort) (100 mL chứa 70 mL NaCl 1 M; 1,5 g extralyse; pH = 6), ủ trong mẫu 1,5 giờ ở nhiệt độ phòng để phá vỡ tế bào. Ly tâm mẫu 5 phút ở 14.000 vòng, sau đó đổ bỏ dịch trong. Bổ sung 600 µL dung dịch đệm hòa

tan tế bào (100 mL: 2 mL Triton 100X, 5 mL SDS 20%, 10 mL NaCl 1 M, 1 mL Tris HCl pH 8 10 mM, 500 µL EDTA 0,2 M) đã được đặt trong tủ nhiệt 65°C và ủ mẫu từ 30 phút đến 1 giờ ở 65°C. Thêm 600 µL chloroform : isoamylalcohol (24 : 1), đảo đều và ly tâm 20 phút ở 14.000 vòng với nhiệt độ trên 15°C. Chuyển pha lỏng ở phía trên sang ống eppendorf mới và bổ sung isopropanol lạnh với thể tích tương đương; đảo đều, để lạnh mẫu 1 giờ hoặc qua đêm; ly tâm mẫu 20 phút, 14.000 vòng; sau đó đổ bỏ dịch trong và rửa mẫu bằng 400 µL cồn 70%. Các mẫu ADN đã tách chiết được kiểm tra độ nguyên vẹn bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% và định lượng tổng số bằng máy Nanodrop (NanoDrop 8000 - Thermo scientific).

b) Phương pháp xác định nấm đạo ôn bằng chỉ thị di truyền

Kiểm tra các mẫu ADN bằng cặp mỗi ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) nhằm đảm bảo ADN được phân lập đúng nấm đạo ôn *M. oryzae*. Sử dụng ADN của chủng nấm đạo ôn FRD127 (do Đơn vị nghiên cứu Sinh học và Di truyền tương tác giữa sinh vật và cây trồng, Viện Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc gia Pháp (BGPI, INRA, Pháp) cung cấp) làm đối chứng.

Thành phần phản ứng PCR thể tích 20 µL gồm: 20 ng ADN, 1X PCR buffer, 0,2 µM dNTPs, 0,2 µL Taq polymerase 1U (Thermo Scientific) và 1 µM primer mỗi loại. Chu trình nhiệt như sau: biến tính tách mạch đôi ADN ở 95°C - 15 phút; khuếch đại 40 chu kỳ gồm: biến tính tách mạch ở 94°C - 30 giây, gắn mỗi ở 55°C - 90 giây, kéo dài mạch ở 72°C - 1 phút; kết thúc chu trình ở 60°C - 30 phút. Sản phẩm PCR được đánh giá bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1%, nhuộm ethidium bromide, sử dụng thang ADN 1 kb (Fermentas).

2.3 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ năm 2018 - 2019. Quá trình thu mẫu được thực hiện trên đồng ruộng khắp các tỉnh thuộc hai miền đã chọn. Quá trình phân lập chủng nấm đạo ôn được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Việt - Pháp thuộc Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thu thập mẫu bệnh đạo ôn

Tổng số 214 mẫu bệnh đạo ôn đã được thu thập trong vụ Xuân năm 2018 và 2019, vụ Mùa năm 2018, trên 70 giống lúa khác nhau tại 39 tỉnh của hai khu vực nghiên cứu. Các điểm thu thập mẫu được biểu diễn trên bản đồ hình 2. Các mẫu bệnh được thu thập đa dạng, đại diện cho các vùng sinh thái đã chọn. Tổng số 66 mẫu được thu tại khu vực miền Trung, 148 mẫu tại khu vực miền Bắc. Thông tin chi tiết của các mẫu bệnh thu thập được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Thông tin của mẫu bệnh đạo ôn thu thập được

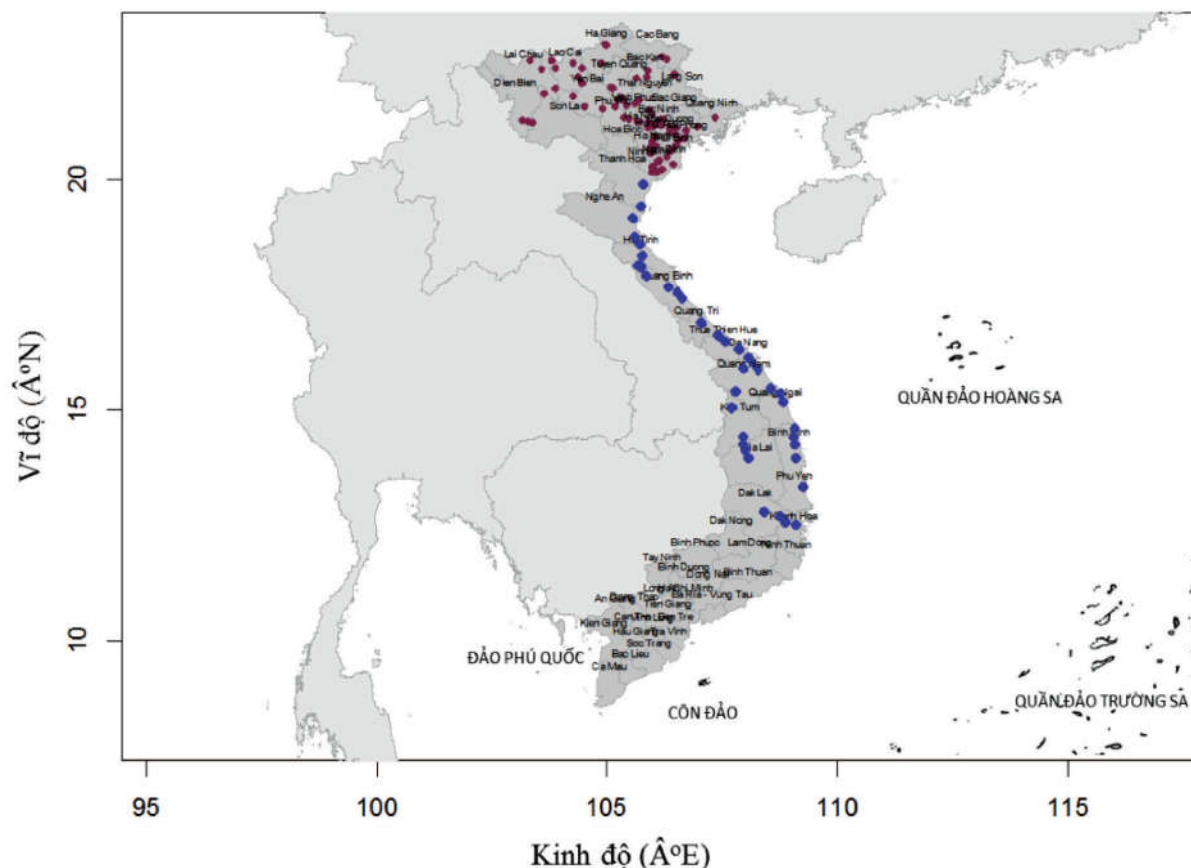
Vùng sinh thái	Số mẫu thu thập	Số điểm thu thập mẫu	Số giống lúa	Loài phụ		Loại giống		Bộ phận cây lúa bị nhiễm bệnh			
				<i>Indica</i>	<i>Japonica</i>	Địa phương	Thương mại	Cổ bông	Lá	Cổ bông + lá	Cổ lá
Miền Bắc	148	79	67	91	45	41	95	48	96	3	1
Miền Trung	66	41	17	30	1	1	30	43	14	7	2

Ở vùng ĐBSH, quá trình thu mẫu được tiến hành trong vụ Xuân của hai năm 2018 và 2019. Việc thu thập mẫu bổ sung vào vụ Xuân năm 2019 là do có rất nhiều mẫu thu thập năm 2018 không phân lập được nấm đạo ôn mặc dù mẫu thu thập có triệu chứng bệnh điển hình. Lý giải hiện tượng này, có thể do nông dân đã phun thuốc hóa học để ngăn chặn dịch bệnh đạo ôn phát triển nên nấm đã bị chết mặc dù vết bệnh vẫn còn. Để tránh hiện tượng tương tự xảy ra, mẫu được thực hiện thu sớm trong vụ Xuân năm 2019, ngay khi phát hiện bệnh đạo ôn trên đồng ruộng.

Dựa trên tần suất mẫu bệnh thu được ở mỗi giống lúa và mức độ nghiêm trọng của bệnh ghi chép trong quá trình thu thập mẫu thấy rằng, các giống bị nhiễm bệnh đạo ôn nặng là Khang dân 18,

TBR225, BC15, Thiên ưu 8, Hương thơm 1 và Bắc thơm số 7. Mặc dù tần suất mẫu bệnh thu thập được trên mỗi giống lúa địa phương là không cao, nhưng ghi nhận các giống lúa địa phương khá miễn cảm với bệnh đạo ôn, chẳng hạn như: Sóng cù (5 mẫu), Tam nông (3 mẫu), Khẩu nua lương (3 mẫu), Nếp Tú Lệ (4 mẫu), Nếp cái hoa vàng (3 mẫu) và Nếp vải (3 mẫu). Do đặc điểm các giống lúa địa phương mang tính chất đặc thù riêng nên chỉ còn duy trì canh tác ở một số khu vực, chủ yếu ở khu vực Trung du miền núi phía Bắc.

Do được thu thập trên diện rộng và có hệ thống, số lượng mẫu bệnh thu thập được trong nghiên cứu này thích hợp cho các nghiên cứu về di truyền quần thể nấm gây bệnh.



Hình 2. Bản đồ các điểm thu mẫu bệnh đạo ôn. Mỗi chấm trên bản đồ là một điểm thu mẫu; Chấm tròn đỏ đậm: vùng miền Bắc; Chấm thoi xanh: vùng miền Trung

3.2. Kết quả phân lập chủng nấm đạo ôn dựa vào đặc điểm hình thái nấm

Quan sát dưới kính hiển vi, bào tử nấm đạo ôn đặc trưng có dạng búp sen hoặc quả lê. Trong 214 mẫu bệnh thu thập có 124 mẫu phân lập được bào tử nấm đạo ôn với số lượng mẫu ở miền Bắc là 85 và miền Trung là 39. Tổng số 945 isolate được phân lập, trong đó 627 isolates ở miền Bắc và 318 isolates

ở miền Trung (Bảng 2). Các isolate nấm phân lập được chủ yếu từ các giống thương mại *indica*, phân bố ở cả năm vùng sinh thái thuộc hai khu vực địa lý nghiên cứu. Các giống lúa địa phương, bao gồm cả *indica* và *japonica* phần lớn thu được ở miền Bắc, cụ thể là vùng Trung du miền núi phía Bắc (Bảng 2). Thông tin chi tiết của các mẫu lúa phân lập nấm đạo ôn được trình bày ở bảng 3.

Bảng 2. Kết quả thống kê các isolate nấm đạo ôn phân lập được

Vùng	Số lượng isolate phân lập được	Số mẫu đã phân lập được nấm đạo ôn	Loài phụ		Loại giống	
			<i>Indica</i>	<i>Japonica</i>	Địa phương	Thương mại
Miền Bắc	627	85	45	28	28	45
Miền Trung	318	39	18	1	0	19

Có 90 mẫu bệnh không phân lập được nấm đạo ôn *M. oryzae*, trong đó có cả các mẫu mà bào tử nấm không phải là đạo ôn, hoặc không phát triển

bào tử nấm hoặc phát hiện bào tử nấm đạo ôn nhưng bào tử không phát triển sau khi phân lập.

Bảng 3. Tên mẫu và thông tin của các isolates nấm đạo ôn phân lập được ở miền Bắc và miền Trung Việt Nam

TT	Tên mẫu	Khu vực	Tỉnh	Vĩ độ Bắc	Kinh độ Đông	Giống lúa	Số lượng isolate
1	VNN-016	Miền Bắc	Hải Phòng	20°42'56,0"	106°29'44,8"	TBR225	10
2	VNN-028	Miền Bắc	Hải Phòng	20°42'56,0"	106°29'44,8"	TBR225	10
3	VNN-112	Miền Bắc	Hải Phòng	20°48'45"	106°33'42"	Nếp phú quý	9
4	VNN-113	Miền Bắc	Hải Phòng	20°48'45"	106°33'42"	TBR225	8
5	VNN-038	Miền Bắc	Hà Nam	20°38'53,0"	105°56'52,0"	T10	9
6	VNN-039	Miền Bắc	Hà Nam	20°31'56,2"	105°57'48,2"	Tắm thơm	9
7	VNN-127	Miền Bắc	Hà Nam	20°39'4"	105°58'57"	Bắc thơm 7	8
8	VNN-128	Miền Bắc	Hà Nam	20°39'4"	105°58'57"	Khang dân 18	8
9	VNN-107	Miền Bắc	Hải Dương	20°58'48"	106°21'52"	Nếp TK90	10
10	VNN-109	Miền Bắc	Hải Dương	20°58'9"	106°28'5"	TBR225	9
11	VNN-110	Miền Bắc	Hải Dương	20°58'9"	106°28'5"	Thiên ưu 8	10
12	VNN-111	Miền Bắc	Hải Dương	20°58'9"	106°28'5"	Nếp K lùn	7
13	VNN-114	Miền Bắc	Thái Bình	20°38'6"	106°25'48"	BC15	9
14	VNN-115	Miền Bắc	Thái Bình	20°38'6"	106°25'48"	TBR225	10
15	VNN-117	Miền Bắc	Thái Bình	20°35'9"	106°22'8"	Nếp Hải Phòng	7
16	VNN-118	Miền Bắc	Thái Bình	20°35'9"	106°22'8"	BC15	10
17	VNN-119	Miền Bắc	Nam Định	20°17'05"	106°26'42"	J02	10
18	VNN-120	Miền Bắc	Nam Định	20°17'05"	106°26'42"	Bắc thơm 7	10
19	VNN-121	Miền Bắc	Nam Định	20°20'36"	106°6'2"	Bắc thơm 7	8
20	VNN-122	Miền Bắc	Nam Định	20°20'36"	106°6'2"	Chiêm hương	10
21	VNN-123	Miền Bắc	Ninh Bình	20°12'55"	106°2'3"	Đài thơm 8	8
22	VNN-124	Miền Bắc	Ninh Bình	20°8'12"	106°6'6"	Nếp mỹ	9
23	VNN-125	Miền Bắc	Ninh Bình	20°8'12"	106°6'6"	Nếp Hà Nội	9
24	VNN-126	Miền Bắc	Ninh Bình	20°8'12"	106°6'6"	Bắc thơm 7	7
25	VNN-129	Miền Bắc	Hưng Yên	20°48'7"	105°58'57"	BC15	10
26	VNN-130	Miền Bắc	Hưng Yên	20°48'7"	105°58'57"	AN13	8
27	VNN-131	Miền Bắc	Vĩnh Phúc	21°13'20,4"	105°41'42,7"	TBR225	10
28	VNN-156	Miền Bắc	Bắc Ninh	21°7'50,8"	106°57'52,4"	Nếp nhung	10
29	VNN-051	Miền Bắc	Tuyên Quang	21°35'22,6"	105°25'35,5"	BC15	8
30	VNN-053	Miền Bắc	Tuyên Quang	21°44'33,1"	105°19'21,7"	TBR225	9
31	VNN-054	Miền Bắc	Tuyên Quang	21°56'13,8"	105°7'48,8"	Nhị ưu 838	1
32	VNN-055	Miền Bắc	Tuyên Quang	21°56'13,8"	105°7'48,8"	J02	2
33	VNN-056	Miền Bắc	Hà Giang	22°29'5,0"	104°52'11,6"	Hương biển 3	8
34	VNN-057	Miền Bắc	Hà Giang	22°29'5,0"	104°52'11,6"	Nếp 97	5
35	VNN-058	Miền Bắc	Hà Giang	22°53'9,8"	104°59'43,8"	Thiên ưu 8	8
36	VNN-059	Miền Bắc	Hà Giang	22°54'40,0"	104°57'15,4"	TBR225	9
37	VNN-060	Miền Bắc	Lào Cai	22°23'58,6"	104°28'0,3"	Nếp 1	9
38	VNN-061	Miền Bắc	Lào Cai	22°23'58,6"	104°28'0,3"	Nếp 2	8
39	VNN-062	Miền Bắc	Lào Cai	22°23'58,6"	104°28'0,3"	Nếp cái hoa vàng	5
40	VNN-063	Miền Bắc	Lào Cai	22°11'28,6"	104°22'44,1"	BC15	9
41	VNN-064	Miền Bắc	Lào Cai	22°11'28,6"	104°22'44,1"	Séng cù	3

TT	Tên mẫu	Khu vực	Tỉnh	Vĩ độ Bắc	Kinh độ Đông	Giống lúa	Số lượng isolate
42	VNN-070	Miền Bắc	Yên Bái	21°34'21,9"	104°31'47,3"	Séng cù	10
43	VNN-071	Miền Bắc	Yên Bái	21°34'21,9"	104°31'47,3"	Chiêm hương	4
44	VNN-072	Miền Bắc	Yên Bái	21°34'21,9"	104°31'47,3"	HT1	10
45	VNN-073	Miền Bắc	Yên Bái	21°47'29,5"	104°16'44,1"	Nếp Tú Lệ	10
46	VNN-075	Miền Bắc	Sơn La	21°50'45"	103°39'18"	Nếp pòm	10
47	VNN-076	Miền Bắc	Sơn La	21°50'45"	103°39'18"	Nếp tan	10
48	VNN-077	Miền Bắc	Điện Biên	21°15'47,5"	103°10'45,6"	Nương Thái	5
49	VNN-078	Miền Bắc	Điện Biên	21°14'1,5"	103°17'31,2"	Nếp cẩm khảo lệch	10
50	VNN-079	Miền Bắc	Điện Biên	21°12'43,1"	103°24'5,8"	Nếp tan	3
51	VNN-082	Miền Bắc	Lai Châu	22°21'40,8"	103°34'53,4"	Tám thơm	10
52	VNN-083	Miền Bắc	Lai Châu	22°21'40,8"	103°34'53,4"	Séng cù	10
53	VNN-084	Miền Bắc	Lào Cai	22°23'15,4"	103°52'55,3"	Nếp Pờ lè	9
54	VNN-085	Miền Bắc	Lào Cai	22°23'15,4"	103°52'55,3"	Nhị ưu 838	6
55	VNN-086	Miền Bắc	Lào Cai	22°33'30,7"	103°48'6,6"	Séng cù	5
56	VNN-088	Miền Bắc	Lào Cai	22°29'37,9"	104°16'32,7"	Ma làng	1
57	VNN-089	Miền Bắc	Lào Cai	22°29'37,9"	104°16'32,7"	Nếp nương	8
58	VNN-090	Miền Bắc	Lào Cai	22°30'4"	104°15'45,1"	Bản Liễn	9
59	VNN-091	Miền Bắc	Thái Nguyên	21°37'17,8"	105°37'6,8"	BTE-1	10
60	VNN-092	Miền Bắc	Thái Nguyên	21°37'17,8"	105°37'6,8"	Nếp Vải	7
61	VNN-093	Miền Bắc	Thái Nguyên	21°42'44,3"	105°43'4,5"	Nếp Vải	6
62	VNN-094	Miền Bắc	Bắc Kạn	22°11'58,3"	105°51'47,7"	Nếp Lào	10
63	VNN-095	Miền Bắc	Bắc Kạn	22°11'58,3"	105°51'47,7"	Khẩu nua nương	9
64	VNN-096	Miền Bắc	Bắc Kạn	22°11'58,3"	105°51'47,7"	Bao thai	2
65	VNN-097	Miền Bắc	Bắc Kạn	22°19'22,6"	105°54'21,6"	Nếp 97	2
66	VNN-098	Miền Bắc	Bắc Kạn	22°19'22,6"	105°54'21,6"	Khau nua lệch	3
67	VNN-099	Miền Bắc	Bắc Kạn	22°19'22,6"	105°54'21,6"	Đoàn Kết	1
68	VNN-102	Miền Bắc	Bắc Kạn	22°10'32,7"	105°39'4,0"	Nếp Vải	6
69	VNN-103	Miền Bắc	Bắc Kạn	22°10'32,7"	105°39'4,0"	Khẩu nua nương	5
70	VNN-132	Miền Bắc	Phú Thọ	21°18'35,5"	105°23'6,2"	J02	4
71	VNN-133	Miền Bắc	Phú Thọ	21°33'9,1"	105°11'35,5"	BC15	4
72	VNN-136	Miền Bắc	Tuyên Quang	21°42'47,5"	105°13'47,8"	Kháng mản	3
73	VNN-139	Miền Bắc	Tuyên Quang	21°58'23,1"	105°5'50,2"	J02	2
74	VNN-140	Miền Bắc	Cao Bằng	22°38'54,3"	106°11'30,8"	Tam nông	6
75	VNN-141	Miền Bắc	Cao Bằng	22°34'19,5"	106°18'56,8"	Tam nông	10
76	VNN-142	Miền Bắc	Lạng Sơn	22°15'37,6"	106°27'56,2"	Tam nông	8
77	VNN-143	Miền Bắc	Lạng Sơn	22°14'49,8"	106°29'1,6"	Nếp chiêm	6
78	VNN-144	Miền Bắc	Lạng Sơn	22°14'49,8"	106°29'1,6"	Khang dân 18	6
79	VNN-145	Miền Bắc	Quảng Ninh	21°19'23,9"	107°21'27,3"	Khang dân 18	4
80	VNN-146	Miền Bắc	Quảng Ninh	21°19'23,9"	107°21'27,3"	Thiên ưu 8	7
81	VNN-149	Miền Bắc	Quảng Ninh	21°2'11,6"	106°42'39,5"	Hương thơm	9
82	VNN-151	Miền Bắc	Quảng Ninh	21°2'11,6"	106°42'39,5"	Nếp chiêm	4
83	VNN-152	Miền Bắc	Bắc Giang	21°18'2,3"	106°13'2,8"	-	9

TT	Tên mẫu	Khu vực	Tỉnh	Vĩ độ Bắc	Kinh độ Đông	Giống lúa	Số lượng isolate
84	VNN-154	Miền Bắc	Bắc Giang	21°18'2,3"	106°13'2,8"	TBR225	5
85	VNN-155	Miền Bắc	Bắc Giang	21°12'41,9"	106°5'45,7"	BC15	7
86	VNC-003	Miền Trung	Quảng Bình	17°24'45,3"	106°38'4,6"	-	10
87	VNC-004	Miền Trung	Quảng Bình	17°24'45,3"	106°38'4,6"	-	10
88	VNC-005	Miền Trung	Huế	16°33'17,2"	107°27'3"	-	10
89	VNC-006	Miền Trung	Huế	16°33'17,2"	107°27'3"	-	10
90	VNC-007	Miền Trung	Huế	16°31'54,8"	107°28'7,0"	Khang dân 18	10
91	VNC-008	Miền Trung	Huế	16°31'54,8"	107°28'7,0"	ML48	10
92	VNC-009	Miền Trung	Huế	16°29'49,1"	107°31'27,9"	HT1	7
93	VNC-010	Miền Trung	Huế	16°29'49,1"	107°31'27,9"	Khang dân 18	10
94	VNC-011	Miền Trung	Huế	16°16'53,4"	107°54'41,4"	Khang dân 18	10
95	VNC-012	Miền Trung	Huế	16°16'53,4"	107°54'41,4"	-	4
96	VNC-015	Miền Trung	Quảng Nam	15°49'59,0"	108°17'16,6"	Thiên ưu 8	10
97	VNC-016	Miền Trung	Quảng Nam	15°49'13,3"	108°17'38,3"	HT1	7
98	VNC-017	Miền Trung	Quảng Ngãi	15°20'0,9"	108°44'27,2"	X23	10
99	VNC-018	Miền Trung	Quảng Ngãi	15°20'0,9"	108°44'27,2"	HT1	10
100	VNC-019	Miền Trung	Quảng Ngãi	15°08'40,4"	108°48'32,9"	-	10
101	VNC-020	Miền Trung	Quảng Ngãi	15°08'40,4"	108°48'32,9"	-	10
102	VNC-021	Miền Trung	Quảng Ngãi	15°08'40,4"	108°48'32,9"	HT1	10
103	VNC-024	Miền Trung	Bình Định	14°23'52,5"	109°01'10,4"	BTR1	10
104	VNC-025	Miền Trung	Bình Định	14°12'42,5"	109°03'25,6"	Khang dân 18	6
105	VNC-026	Miền Trung	Bình Định	13°57'17,7"	109°4'57,0"	DV8	7
106	VNC-029	Miền Trung	Phú Yên	13°18'2,1"	109°13'14,8"	-	10
107	VNC-030	Miền Trung	Khánh Hòa	12°29'45,2"	109°7'18,1"	-	2
108	VNC-031	Miền Trung	Đắk Lắk	12°33'56,8"	108°52'55,2"	-	1
109	VNC-034	Miền Trung	Gia Lai	13°58'58,7"	108°4'44,4"	-	10
110	VNC-035	Miền Trung	Gia Lai	14°5'39,7"	107°58'36,9"	-	4
111	VNC-036	Miền Trung	Gia Lai	14°5'39,7"	107°58'34,9"	-	10
112	VNC-039	Miền Trung	Kon Tum	14°24'23,0"	107°58'14,2"	Nàng hương	1
113	VNC-040	Miền Trung	Kon Tum	14°24'23,0"	107°58'14,2"	-	10
114	VNC-041	Miền Trung	Kon Tum	14°24'23,0"	107°58'14,2"	-	6
115	VNC-044	Miền Trung	Quảng Nam	15°50'44,0"	107°58'52,1"	-	10
116	VNC-046	Miền Trung	Quảng Nam	15°50'44,0"	107°58'52,1"	-	9
117	VNC-049	Miền Trung	Quảng Bình	17°23'27,0"	106°39'4,4"	-	10
118	VNC-050	Miền Trung	Quảng Bình	17°37'1,6"	106°21'38,2"	-	10
119	VNC-055	Miền Trung	Hà Tĩnh	18°19'56,3"	105°47'13,1"	Tám thơm	2
120	VNC-056	Miền Trung	Hà Tĩnh	18°34'7,4"	105°43'56,9"	XT28	9
121	VNC-057	Miền Trung	Hà Tĩnh	18°34'7,4"	105°43'56,9"	NX30	9
122	VNC-063	Miền Trung	Thanh Hóa	19°24'11,4"	105°45'6,9"	Thiên ưu 8	9
123	VNC-064	Miền Trung	Thanh Hóa	19°24'11,4"	105°45'6,9"	Thái xuyên 111	10
124	VNC-066	Miền Trung	Thanh Hóa	19°52'16,6"	105°48'36,9"	Nếp thơm	5

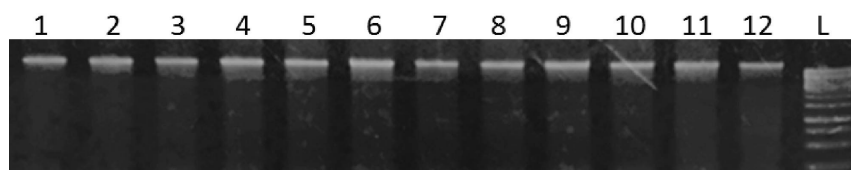
Trong quá trình phân lập, quan sát thấy sự phát triển của nấm *Magnaporthe grisea* trên một vài mẫu bệnh. Bào tử của loại nấm này cũng có đặc điểm hình thái giống như nấm *M. oryzae*, tuy nhiên dưới ánh sáng của kính hiển vi, bào tử nấm này cho màu tối sậm. Điểm khác biệt nữa là sợi nấm của *M. grisea* phát triển rất nhanh. Khi phát hiện nấm *M. grisea*, quá trình phân lập sẽ dừng lại và chuẩn bị mẫu khác để thay thế. Điều đó chứng tỏ, ngoài *M. oryzae*, *M. grisea* cũng có thể gây bệnh đạo ôn trên lúa. Ngoài ra, còn phát hiện nấm *Bipolaris oryzae* gây bệnh đốm nâu trên lúa. Bào tử của loại nấm này dễ dàng phân biệt với nấm *M. oryzae* trong quá trình phân lập do kích thước lớn hơn và có nhiều vách ngăn hơn.

Trong nghiên cứu này, số lượng isolate trung bình phân lập được trên một mẫu bệnh là 7,6. Việc phân lập nhiều isolate phát triển trên cùng một mẫu bệnh nhằm phục vụ nghiên cứu đánh giá mức độ đa dạng di truyền của các isolate trên cùng một

cây chủ với mục tiêu xác định xem trên một mẫu bệnh có phát sinh các chủng nấm (strain) khác nhau hay không. Phương pháp phân lập này khác với các các nghiên cứu trước đây chỉ phân lập một isolate cho một mẫu bệnh (Le *et al.*, 2010; Don *et al.*, 1999; Nguyet *et al.*, 2020).

3.3. Kết quả xác định nấm đạo ôn bằng chỉ thị phân tử

Đã tách chiết được ADN của 945 isolate phân lập. Hàm lượng ADN tổng số thu được dao động từ 1.500 - 30.000 ng, với độ tinh sạch thông qua chỉ số OD_{260/280} dao động từ 1,7 đến 2,1. Ảnh điện di cho thấy, mỗi sản phẩm ADN cho một băng sáng rất rõ nét, gọn, không đứt gãy hay lẫn tạp trong quá trình tách chiết (Hình 3). Điều đó cho thấy, các mẫu ADN đạt yêu cầu về số lượng và chất lượng, đảm bảo đủ độ tinh sạch cho chạy phản ứng PCR. ADN của tất cả các mẫu được pha loãng về cùng một nồng độ và được bảo quản ở tủ -20°C.



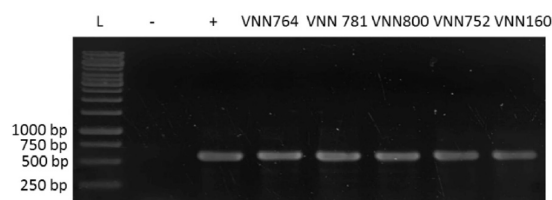
Hình 3. Điện di kiểm tra kết quả tách chiết ADN tổng số

Ghi chú: 1 - 12: Đại diện các isolates đã phân lập (VNN0161, VNN0162, VNN0163, VNN0164, VNN0165, VNN0166, VNN0167, VNN0168, VNN0281, VNN0282, VNN0283, VNN0284); L: thang ADN 1 kb.

Phương pháp tách chiết ADN của nấm đạo ôn bằng phân giải tế bào chưa được sử dụng trong các nghiên cứu nấm đạo ôn trước đây ở Việt Nam, tuy nhiên phương pháp này đã được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu nấm đạo ôn trên thế giới (Sweigard *et al.*, 1990, Adreit *et al.*, 2007; Saleh *et al.*, 2013).

Kết quả phân tích PCR của các isolate với cặp mồi ITS5/ITS4 cho thấy, tất cả 945 isolate phân lập được đều xuất hiện vạch băng đặc trưng cho nấm *M. oryzae* ở vị trí khoảng 550 bp, tương đương với kích thước băng xuất hiện ở mẫu đối chứng dương FRD127 (Hình 4). Vùng ITS có đặc điểm vừa có trình tự bảo thủ, vừa có trình tự biến đổi nên rất có hiệu quả trong việc phân biệt các loài khác nhau hoặc thậm chí giữa các chủng trong cùng một loài (Chen *et al.*, 2000; 2001). Điều này chứng tỏ các chủng nấm đã được phân lập đúng là nấm bệnh đạo ôn *M. oryzae*. Đây là một bước quan trọng giúp

khẳng định quá trình phân lập nấm được đảm bảo, không bị lẫn tạp các vi sinh vật khác. Cho đến nay, trong các nghiên cứu về nấm đạo ôn ở Việt Nam, mới có nghiên cứu của Thụy và cộng tác viên (2020) ứng dụng kỹ thuật PCR với cặp mồi ITS5/ITS4 để xác định đúng nấm đạo ôn trước khi thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 4. Kết quả PCR của các isolate nấm đạo ôn phân lập bằng cặp mồi ITS5/ITS4

Ghi chú: L: Thang ADN 1 kb; "-": H₂O; "+": chủng đối chứng dương FRD127; VNN764, VNN781, VNN800, VNN752 và VNN160 - các isolate đã phân lập.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Đã thu thập được 214 mẫu bệnh đạo ôn ở năm vùng sinh thái nông nghiệp thuộc khu vực miền Bắc và miền Trung. Bằng phương pháp quan sát hình thái bào tử nấm, phân lập được 945 isolate từ 124 mẫu bệnh thu thập. Kết quả phân tích PCR với cặp mồi ITS5/ITS4 đã xác định 945 isolate được phân lập chính xác từ nấm đạo ôn *M. oryzae*.

4.2. Đề nghị

Sử dụng bộ 945 isolate nấm đạo ôn đã phân lập để nghiên cứu phân tích đa dạng di truyền, cấu trúc quần thể và tiến hóa của nấm *M. oryzae* gây hại ở Việt Nam. Từ đó góp phần xây dựng phương pháp kiểm soát bệnh đạo ôn hiệu quả và bền vững.

LỜI CẢM ƠN

Trân trọng cảm ơn Chương trình CRP RICE và Đại sứ quán Pháp tại Việt Nam đã tài trợ kinh phí để nghiên cứu được thực hiện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Adreit, H., Santoso, Andriantsimalona, D., Utami, D.W., Nottéghem, J.L., Lebrun, M.H. and Tharreau, D., 2007. Microsatellite markers for population studies of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecular Ecology Notes*, 7: 667-670.

Akem, C., Ceccarelli, S., Erskine W., and Lenné, J., 2000. Using genetic diversity for disease resistance in agricultural production. *Outlook Agriculture*, 29 (1): 25-30.

Bonman, L.M., Khush, G.S. and Nelson, R.J., 1992. Breeding rice for resistance to pests. *Phytopathology*, 30: 507-528.

Chen, Y.C., Eisner, J.D. and Katter, M.M., Rasoulian-Barrett, S.L., LaFe, K., Yarfitz, S.L., Limaye, A.P. and Cookson, B.T., 2000. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 2302-2310.

Chen, Y.C., Eisner, J.D. and Katter, M.M., Rasoulian-Barrett, S.L., LaFe, K., Bui, U., Limaye, A.P. and Cookson, B.T., 2001. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 4042-4051.

Couch, B.C., and Kohn, L.M., 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates

segregation of a new species *Magnaporthe oryzae* from *M. grisea*. *Mycologia*, 94: 683-693.

Don, L.D., Tosa, Y., Nakayashiki, H. and Mayama, S., 1999. Population structure of the rice blast fungus in Vietnam. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 65: 475-479.

Gladieux, P., Ravel, S., Rieux, A., Cros-Arteil, S., Adreit, H., Milazzo, J., Thierry, M., Fournier, E., Terauchi, R. and Tharreau, D., 2018. Coexistence of multiple endemic and pandemic lineages of the rice blast pathogen. *mBio*, 9 (2): e01806-17.

Hirata, K., Kusaba, M., Chuma, I., Osue, J., Nakayashiki, H., Mayama, S.H., Tosa, Y., 2007. Speciation in *Pyricularia* inferred from multilocus phylogenetic analysis. *Mycological Research*, 111: 799-808.

Khanh, T.D., Duong, V.X., Nguyen, P.C., Xuan, T.D., Trung, N.T., Trung, K.H., Gioi, D.H., Hoang, N.H., Tran, H.-D., Trung, D.M., 2021. Rice Breeding in Vietnam: Retrospects, Challenges and Prospects. *Agriculture*, 11: 397.

Le, M.T., Arie, T., Teraoka, T., 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.

Nguyet, N.T.M., Long, H.H., Ngoc, N.B., Nhai, N.T., Thuy, N.T.T., Nagao, H. and Yoshimichi, F., 2019. Diversity and distribution of rice blast (*Pyricularia oryzae* Cavara) races in Vietnam. *Plant Disease*, 104 (2): 381-387.

Pooja, K., & Katoch, A., 2014. Past, present and future of rice blast management. *Plant Science Today*, 1 (3): 165-173.

Saleh, D., Xu P., Shen, Y., Li, C., Adreit, H., Milazzo, J., Ravigné, V., Bazin, E., Nottéghem, J.L., Fournier, E. and Tharreau, D., 2012. Sex at the origin: an Asian population of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* reproduces sexually. *Molecular Ecology*, 21: 1330-1344.

Saleh, D., Milazzo, J., Adreit, H., Fournier, E. and Tharreau, D., 2013. South-East Asia is the center of origin, diversity and dispersion of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *New Phytologist*, 201: 1440-1456.

Silué, D. and Nottéghem, J.L., 1990. Production of perithecia of *Magnaporthe oryzae* on rice plants. *Mycological Research*, 94 (4): 1151-1152.

Sweigard, J.A., Orbach, M.J., Valent, B., Chumley, F.G., 1990. A miniprep procedure for isolating genomic DNA from *Magnaporthe grisea*. *Fung Genet Newsletter*, 37: 28.

Talbot, N.J., 2003. On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Review Microbiology*, 57: 177-202.

- Thierry, M., Milazzo, J., Adreit, H., Ravel, S., Borron, S., Sella, V., Ioos, R., Fournier, E., Tharreau, D. and Gladieux, P., 2021. *Ecological differentiation and incipient speciation in the fungal pathogen causing rice blast*. bioRxiv The preprint server for biology, 38 pp. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.02.129296>.
- Thuan, N.T.N., Bigirimana, J., Roumen, E., Van, D.D. and Hofte, M., 2006. Molecular and pathotype analysis of the rice blast fungus in North Vietnam. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 381-396.
- Thuy, N.T.T., Long, N.T., Lieu L.T., Giang H.T., Trung K.H., Xuan T.D., Tran H.D., Hoi P.X., Trung N.T., Tuan N.T., Duong V.X. and Khanh T.D., 2020. Evaluation of genetic diversity of rice blast fungus (*Magnaporthe oryzae* Barr) isolates collected from South central coast areas of Viet Nam. *Chiang Mai Journal of Science*, 47 (6): 1102-1117.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. and Taylor, J.W. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York: 315-322.
- Zhong, Z., Chen, M., Lin, L., Han, Y., Bao, J., Tang, W., Lin, L., Lin, Y., Somai, R., Lu, L., Zhang, W., Chen, J., Hong, Y., Chen, X., Wang, B., Shen, W., Lu, G., Norvienyeku, J., Ebbale, J.D. and Wang, Z., 2018. Population genomic analysis of the rice blast fungus reveals specific events associated with expansion of three main clades. *The ISME Journal*, 12: 1867-1878.

Collection and isolation of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in Northern and Central Vietnam

Le Thi Lieu, Henri Adreit, Michel Lebrun,
Elisabeth Fournier, Hoang Thi Giang

Abstract

Rice blast disease caused by the fungus *Magnaporthe oryzae* leads to serious damage to rice production in the world and in Vietnam. It is necessary to have deep knowledge of the genetic diversity and evolution of *M. oryzae* population in a specific eco-region for developing effective and durable blast-resistant rice varieties. To study the genetic biodiversity of this fungal population, a total of 214 blast diseased samples were systematically collected from 39 provinces across five out of seven agro-ecological zones, including: North Midlands and Mountains, and Red River Delta belonging to the North (148 samples); North Central, South Central Coast, and Central Highlands belonging to the Central (66 samples). Based on the morphological characteristics of the spores, a total of 945 isolates were isolated from 124 out of 214 collected samples. The isolates were used to extract DNA and identified as *M. oryzae* based on the primer pairs ITS5/ITS4. The isolates were preserved under mycelium on filter paper at -20°C and genomic DNAs for the study of the population genetics of blast fungus.

Keywords: Rice blast, fungus *Magnaporthe oryzae*, rice, isolate

Ngày nhận bài: 05/8/2022

Ngày phản biện: 15/8/2022

Người phản biện: PGS.TS. Trịnh Xuân Hoạt

Ngày duyệt đăng: 28/8/2022

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ XÁC ĐỊNH CHỦNG VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG VỚI NẤM *Sclerotium rolfii* GÂY BỆNH TRÊN CÂY LẠC

Đinh Trường Sơn¹, Tạ Hà Trang¹, Nguyễn Khánh Ly¹, Dương Văn Hoàn¹,
Trần Thị Đào¹, Nguyễn Thanh Huyền¹, Mai Thanh Tinh²,
Vũ Hiền Anh¹, Nguyễn Xuân Cảnh^{1*}

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm tuyển chọn và định danh một số chủng vi khuẩn đối kháng với nấm *Sclerotium rolfii* gây bệnh thối gốc lạc. Trong số 57 chủng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu đất thu thập tại tỉnh Thái Bình

¹ Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Công ty Cổ phần Tập đoàn Đức Hạnh Marphavet

* Tác giả liên hệ, e-mail: nxcanh@vnua.edu.vn, xuancanh79@yahoo.com