

## Nghiên cứu mức độ biểu hiện của một số gene kháng *Magnaporthe oryzae* ở lúa bằng kỹ thuật qPCR

Expression levels of rice blast resistance genes in rice-*Magnaporthe oryzae* interaction by qPCR

Nguyễn Minh Hùng<sup>a\*</sup>, Vũ Văn Vân<sup>b</sup>  
Nguyen Minh Hung<sup>a\*</sup>, Vu Van Van<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Trung tâm Sinh học phân tử, Trường Y Dược, Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

<sup>a</sup>Center for Molecular Biology, College of Medicine and Pharmacy, Duy Tan University, 550000, Da Nang, Vietnam

<sup>b</sup>Viện Kỹ thuật Công nghệ Cao Nguyễn Tất Thành, Đại học Nguyễn Tất Thành

<sup>b</sup>NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

(Ngày nhận bài: 24/5/2022, ngày phản biện xong: 06/12/2022, ngày chấp nhận đăng: 25/12/2022)

### Tóm tắt

Nấm *Magnaporthe oryzae* gây ra bệnh đạo ôn ở cây lúa, làm giảm đáng kể năng suất và chất lượng lúa gạo ở tất cả các khu vực trồng lúa trên thế giới. Trong quá trình gây bệnh và hình thành thể appressorium, một số họ enzyme hoạt động trên cơ chất polysaccharide và lignin được tiết ra có thể giúp quá trình xâm nhiễm của nấm vào cây lúa được dễ dàng hơn. Trong nghiên cứu này chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu về tương tác giữa cây lúa và các dòng nấm đạo ôn đột biến KO dựa trên các phân tích mức độ biểu hiện của các gene liên quan đến tính kháng nấm đạo ôn của cây lúa bằng kỹ thuật pPCR. Kết quả đã phân tích thành công mức độ gây nhiễm các triệu chứng bệnh đạo ôn của các chủng đột biến KO lên cây lúa và đánh giá mức độ gây bệnh dựa theo các tiêu chí đánh giá của JIRCAS 2009. Phân tích mức độ biểu hiện của một số gene kháng bệnh đạo ôn ở lúa cho thấy mức độ biểu hiện gene của chúng bị suy giảm khi gây nhiễm với các chủng đột biến KO\_04732.9 và KO\_06064.3 so với đối chứng.

*Từ khóa:* Cây lúa; bệnh đạo ôn; qPCR; gene kháng đạo ôn; nấm đạo ôn.

### Abstract

The fungus *Magnaporthe oryzae* causes rice blast disease, which significantly reduces the yield and quality of rice in all rice-growing regions of the world. In response to the *pathogen* colonization and the formation of appressorium, several families of enzymes acting on polysaccharide and lignin substrates are secreted which might facilitate infection into rice plants. In this study, we present the results on the interaction between rice and KO mutants of *Magnaporthe oryzae* based on the analysis of expression levels of rice blast resistance genes by pPCR. The authors successfully analyzed and evaluated the symptom and the pathogenicity of KO mutant strains on rice based on the criteria of JIRCAS 2009. Analysis of expression levels of some rice blast resistance genes showed that their gene expression levels were decreased on rice plants infected with mutant strains KO\_04732.9 and KO\_06064.3 in comparison to wild-type control.

*Keywords:* Rice; rice blast; qPCR; rice blast resistance gene; *Magnaporthe oryzae*.

\* *Corresponding author:* Nguyen Minh Hung, Trung tâm Sinh học phân tử, Trường Y Dược, Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

*Email:* hungmolbio@gmail.com

## 1. Mở đầu

Lúa (*Oryza sativa* L.) là cây lương thực cung cấp nguồn dinh dưỡng chính của phần lớn dân cư trên thế giới, đặc biệt là các khu vực châu Á [1], và là cây ngũ cốc thứ hai trên thế giới sau lúa mì [2]. Tuy nhiên, dịch bệnh và sâu hại gây ảnh hưởng nghiêm trọng lên cây lúa và làm giảm đáng kể năng suất lúa gạo trên thế giới, đặc biệt là sự sụt giảm năng suất và chất lượng lúa gạo do nấm *Magnapotha oryzae* B. Couch sp. nov. (tên khác là *Pyricularia oryzae* Cavara) gây ra bệnh đạo ôn [3]. Loại nấm này xuất hiện lần đầu tiên khoảng 7000 năm trước ở thung lũng Middle Yangtze ở Trung Quốc. Chúng gây bệnh ở hầu hết các bộ phận của cây lúa như lá, thân, đọt và bông [3].

Quá trình nhiễm bệnh diễn ra bắt đầu khi thể ba conidia tiếp cận và dính vào bề mặt sáp (wax) kỵ nước của lá. Trong vòng vài giờ sau đó, conidia nảy mầm với sự có mặt của nước và ống nảy mầm ngấn biệt hóa ở đầu bằng cách tạo thành thể appressorium [3,4]. Lá bị nhiễm xuất hiện các đốm lá đặc trưng, tạo thành các vết (lesion) có hoại tử trung tâm và viền có màu lục xung quanh [3]. Thể appressorium sinh ra áp lực thẩm thấu rất lớn (có thể lên đến 8 MPa) để phá vỡ bề mặt của cây lúa. Trong quá trình này, rất nhiều enzyme, trong đó có họ enzyme PMO

(Polysaccharide monoxygenase) hoạt động trên các cơ chất polysaccharide và lignin được kích hoạt và rất có thể là nhân tố gây bệnh (virulence factor) quan trọng của *M. oryzae*. Qua sàng lọc và so sánh trình tự nucleotide, trình tự amino acid của các họ enzyme kể trên chưa xác định chức năng của *M. oryzae* chúng tôi thấy rằng một số gene có biểu hiện tăng cường trong quá trình xâm nhiễm và hình thành thể appressorium [5]. Trong nghiên cứu này chúng tôi báo cáo các kết quả thử nghiệm các chủng đột biến KO gene của một số gene đích được lựa chọn từ các họ enzyme kể trên lên cây lúa để đánh giá mức độ gây nhiễm và phân tích mức độ biểu hiện của một số gene kháng bệnh đạo ôn ở lúa bằng phương pháp PCR định lượng (qPCR).

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Gây nhiễm các thể đột biến lên lá lúa và nghiên cứu đặc điểm hình thành các vết bệnh

#### 2.1.1. Vật liệu nghiên cứu

Bộ 25 dòng/giống lúa chỉ thị mang đơn gen kháng đạo ôn do JIRCAS, Nhật Bản cung cấp [6] (Bảng 1). Các chủng nấm đạo ôn đột biến KO gene đích KO\_00245.3, KO\_04732.9, KO\_06064.3 và chủng gốc GUY11 (chủng đại không đột biến làm đối chứng).

**Bảng 1.** Danh sách các dòng/giống lúa được sử dụng trong thử nghiệm với các dòng nấm đạo ôn đột biến KO. Các gene kháng nấm đạo ôn được lựa chọn dựa trên các công bố trước đây [6-12].

Ký hiệu	Tên dòng/ giống lúa	Gene kháng	Ký hiệu	Tên dòng/ giống lúa	Gene kháng
J1	IRBLsh-B	Pish	J14	IRBL7-M	Pi7(t)
J2	IRBLb-B	Pib	J15	IRBL9-W	Pi9
J3	IRBLt-K59	Pita	J16	IRBLz-Fu	Piz
J4	IRBLa-A	Pia	J17	IRBLz5-CA-1	Piz5
J5	IRBLi-F5	Pii	J18	IRBLzt-T	Piz-t
J6	IRBL3-CP4	Pi3	J19	IRBLta2-Pi	Pita-2
J7	IRBL5-M	Pi5(t)	J20	IRBLta2-Re	Pita-2
J8	IRBLks-F5	Pik-s	J21	IRBL12-M	Pi12(t)
J9	IRBLkm-Ts	Pik-m	J22	IRBLta-K1	Pita

J10	IRBL1-CL	Pi1	J23	IRBL-ta-CP1	Pita
J11	IRBLkh-K3[LT]	Pik-h	J24	IRBL19-A	Pi19(t)
J12	IRBLk-Ka[LT]	Pik	J25	IRBL20-IR24	Pi20(t)
J13	IRBLkp-K60	Pik-p	ĐC	LTH	

### 2.1.2. Chuẩn bị mạ

Ngâm hạt giống 3 sôi 2 lạnh trong 20 phút sau đó chuyển lên đĩa petry nhựa có lót giấy thấm và ngâm hạt trong nước trong vòng 04 ngày cho đến khi hạt nảy mầm. Hạt giống của từng dòng/giống sau khi nảy mầm được cấy chuyển vào khay gieo mạ khô có lỗ (3 hạt/lỗ x 10 lỗ/dòng/giống). Mạ 21 ngày tuổi (4-5 lá) của các giống lúa được sử dụng cho thí nghiệm lây nhiễm.

### 2.1.3. Chuẩn bị bào tử nấm đạo ôn

#### Chuẩn bị bào tử nấm cho lây nhiễm

Bào tử nấm đạo ôn được chuẩn bị theo phương pháp của Hayashi *et al.*, 2009 [6]. Lấy những miếng giấy lọc chứa bào tử nấm đạo ôn đặt vào đĩa petry có môi trường thạch yến mạch. Để nấm bệnh phát triển trong 12-13 ngày ở điều kiện 25°C, dùng bàn chải chà bề mặt đĩa để loại bỏ cành bào tử. Đặt đĩa chứa bào tử nấm bệnh vào tủ nuôi ở nhiệt độ 25°C, dưới đèn huỳnh quang, trong 3-4 ngày để kích thích hình thành bào tử.

### Chuẩn bị dung dịch bào tử nấm

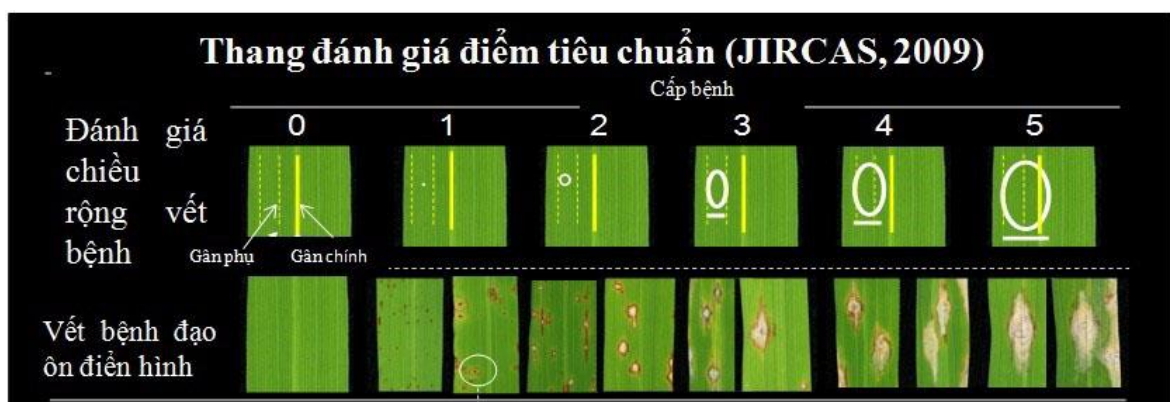
Chuẩn bị dung dịch nước cất khử trùng với vài giọt Tween 20 (khoảng 0,025%). Đổ dung dịch nước Tween vào đĩa chứa bào tử nấm, dùng bàn chải chà nhẹ nhàng, sau đó lọc dung dịch bào tử qua màng lọc 2-3 lần và giữ lạnh. Đếm số lượng bào tử nấm bằng dụng cụ hemacytometer. Điều chỉnh nồng độ bào tử đạt  $3-8 \times 10^4$  bào tử/ml.

### 2.1.4. Gây nhiễm *M. oryzae* lên cây mạ

Sử dụng súng phun Portable Mini Air Brush and Compressor Spray Paint Gun HS08 Series phun 500  $\mu$ L  $3-8.10^4$  tế bào/mL lên cây mạ 21 ngày tuổi. Ủ các khay mạ trong buồng tối, độ ẩm 100%, nhiệt độ 25°C trong 24 giờ để tạo điều kiện cho bào tử nấm nảy mầm. Đưa khay mạ ra ánh sáng thường và tiếp tục nuôi 08 ngày ở điều kiện bình thường và đánh giá mức độ nhiễm.

### 2.1.5. Đánh giá mức độ nhiễm bệnh của cây lúa do các thể đột biến gây ra

Đánh giá khả năng gây bệnh của chủng nấm đạo ôn dựa trên thang điểm đánh giá bệnh tiêu chuẩn của JIRCAS, 2009 [6] giữa các công thức thí nghiệm.



Hình 1. Thang đánh giá điểm tiêu chuẩn của JIRCAS, 2009 [6].

Thang điểm đánh giá bệnh tiêu chuẩn (JIRCAS, 2009):

- Điểm 0: không phát hiện thấy bất cứ vết thương nào trên cây.
- Điểm 1: Vết thương màu nâu có  $d < 0,5\text{mm}$ , không có sự hình thành bào tử.
- Điểm 2: Vết thương màu nâu có  $0,5\text{mm} < d < 1\text{mm}$ , không có sự hình thành bào tử.
- Điểm 3: Vết thương dạng hình elip, đường kính 1-3mm, vùng trung tâm màu xám bao quanh vòng màu nâu, có khả năng hình thành bào tử.
- Điểm 4: Vết thương dạng hình elip,  $d > 3\text{mm}$ , vết xám hoại tử, có khả năng hình thành bào tử.
- Điểm 5: Vết thương như dạng 4 nhưng có 1/2 hoặc hơn 1 hoặc 2 lá bị chết.

Quy tính kháng/nhiễm như sau: 0-3: Kháng (R); > 3-5: Nhiễm (S).

## 2.2. Phân tích mức độ biểu hiện qua một số gene kháng đạo ôn

### 2.2.1. Thiết kế các cặp mồi qPCR

Các cặp mồi sử dụng cho qPCR định lượng được thiết kế mới dựa trên thông tin về các gene/trình tự gene kháng bệnh đạo ôn đã được công bố trước đây (6-11) và trình tự được thu nhận trên các ngân hàng database về hệ gene của lúa như Rice Genome Annotation Project (<http://rice.uga.edu/>), Oryzaebase (<https://shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/gene/advanced/search>) và Trung tâm Thông tin CNSH quốc gia (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Trình tự primer được thiết kế bằng phần mềm PrimerQuest Tool của IDT (<https://www.idtdna.com/PrimerQuest>) trên các vùng gene mã hóa (CDS) cho protein đích (Bảng 2). Tiêu chuẩn để lựa chọn các cặp mồi là có nhiệt độ gắn mồi  $60 \pm 1-2^{\circ}\text{C}$ , tỷ lệ phần trăm GC khoảng 50%, kích thước sản phẩm PCR nhỏ hơn 200 bp, kích thước mồi khoảng 20-23 bp.

**Bảng 2.** Danh sách các cặp mồi được thiết kế mới để sử dụng trong phân tích qPCR.

TT	Tên mồi	Trình tự nucleotide (5'-3')	Size (nt)	Tm (°C)	Tên gene/mã số
1	PishF	GCCGAGTTCTTGGCTCTATTC	21	61	Pish/KY225901
2	PishR	CAATCTTCTCTGCGACCTCTTC	22	62	
3	PibF	GCACGAGGAGCAAGATAACA	20	58	Pib/AB013448
4	PibR	GAGGCTGTCCTCAACATCATAG	22	62	
5	PitaF	ACTGGAAGCAGATGCAAGAG	20	58	Pita/JN226114
6	PitaR	TGAGGGAGCAGATCAAGTAGTA	22	60	
7	PitF	ATCAGGCCAACGAGATTGAG	20	58	Pit/KF741814
8	PitR	CAGGGAACCCGACAAGAAATA	21	59	
9	PiiF	CTCTCATCGCCTTCATCTCATC	22	62	Pii/AB820896
10	PiiR	ATTAGGCACTGGATGCTCAC	20	58	
11	Pi3F	GCAGATGTTGCTTACTGGTAGA	22	60	Pi3/AK110932
12	Pi3R	AGTGGAACGGTGGAAATCAG	20	58	
13	PikhF	CTCGAAACCCTCCAACCTAAC	21	61	Pikh/KM043886
14	PikhR	TGGCTCAGTGCTTGTTATCC	20	58	
15	Pik1F	GACTCCATCAATCTGGTCTCTG	22	62	Pik1/HM048900
16	Pik1R	GCCGTTATCTCCTTCACATCTT	22	60	
17	Pik2F	GTATGCTCTCATCAGCGGTATC	22	62	Pik2/HM048900

18	Pik2R	TGCTTCATCCAGTCCTTCATC	21	59	
19	Pikp1F	CAAGATAGAGGTGGTCGGTTATG	23	63	Pikp1/HM035360
20	Pikp1R	CGTCGTCTCCTTCACATCTTT	21	59	
21	Pikp2F	AGGGTGGTGATACCTTCAAAC	21	59	Pikp1/HM035360
22	Pikp2R	GTCGCCCAGTGAGTTGATAA	20	58	
23	Piz-tF	CGGGAGCATTCCCAAATCTTA	21	59	Piz-t/HE580163
24	Piz-tR	CCTGCACCAGCCTATTTCTATC	22	62	
25	Pita2F	TGGAAATCTGCCAGGTGAAG	20	58	Pita2/ OS12g18729
26	Pita2R	CTGTCACCTTCGCCATAAA	20	58	
27	18SF	CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA	22	64	18S/X00755
28	18SR	ACACTTCACCGGACCATTCAA	21	59	

### 2.2.2. Tách chiết RNA tổng số

Phương pháp tách chiết RNA tổng số từ lá lúa được thực hiện bằng bộ kit Thermo Scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tóm tắt như sau:

- Cân 200mg lá lúa (đã được bảo quản ở tủ -80°C), cho vào cối chày sứ (đã được xử lý loại bỏ RNase và hấp khử trùng), bổ sung nitơ lỏng và nghiền thành bột mịn.
- Cho bột mịn đã nghiền vào ống eppendorf 2mL và bổ sung 500µL dung dịch Plant RNA Lysis Solution đã bổ sung trước đó 10µL beta β-Mercaptoethanol. Vortex trộn đều mẫu trong 10-20 giây.
- Ủ ở 56°C trong 3 phút và ly tâm 5 phút ở 14.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng.
- Hút 450µL dịch nổi cho vào ống eppendorf 1,5mL mới và bổ sung 250µL ethanol tuyệt đối. Trộn đều dung dịch bằng pipette.
- Chuyển toàn bộ dung dịch trên vào cột tinh sạch và ly tâm 1 phút ở 11.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng.
- Bổ sung 700µL dung dịch Wash Buffer WB 1 và ly tâm 1 phút ở 12.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng. Loại bỏ dịch chảy qua cột và chuyển cột tinh sạch vào ống thu dịch mới (loại 2mL được cung cấp sẵn).

- Bổ sung 500µL Wash Buffer WB 2 vào cột tinh sạch và ly tâm 1 phút ở 12.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng. Loại bỏ dịch chảy qua cột và tiếp tục ly tâm 1 phút ở 14.000 vòng/phút.
- Chuyển cột tinh sạch vào ống eppendorf 2mL mới và pha loãng RNA bằng cách bổ sung 50 µL nước đã loại bỏ RNase và ly tâm 1 phút ở 12.000 vòng/phút.
- Nồng độ và chất lượng RNA tổng số được xác định trên máy Nanodrop 2000.

### 2.2.3. Loại bỏ DNA genome

DNA genome được loại bỏ bằng cách sử dụng Dnase theo phản ứng sau đây:

**Bảng 3.** Thành phần phản ứng loại bỏ DNA genome.

TT	Thành phần phản ứng	Thể tích
1	RNA tổng số	2µg
2	10X Reaction Buffer with MgCl <sub>2</sub>	2µL
3	Dnase, Rnase free	2µL (2U)
4	Nước sạch RNase	Đến thể tích 20µL

Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C trong 30 phút và bất hoạt Dnase bằng cách ủ hỗn hợp phản ứng ở 65°C trong 10 phút. RNA tổng số sau đó được xác định nồng độ và chất lượng bằng máy Nanodrop 200°C và sẵn sàng cho phản ứng tổng hợp cDNA.

### 2.2.4. Tổng hợp cDNA

cDNA được tổng hợp bằng bộ kit Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis theo hướng dẫn của nhà sản xuất, được tóm tắt như trong Bảng 4.

**Bảng 4.** Thành phần phản ứng tổng hợp cDNA

TT	Thành phần phản ứng	Thể tích
1	RNA tổng số	1 $\mu$ g
2	Oligo (dT)	1 $\mu$ L
3	Nước sạch RNase	Đến thể tích 12 $\mu$ L
4	Ủ hỗn hợp phản ứng ở 65 $^{\circ}$ C trong 5 phút sau đó chuyển ngay vào nước đá	
5	5X Reaction buffer	4 $\mu$ L
6	RiboLock Rnase Inhibitor (20 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
7	10 mM dNTP Mix	2 $\mu$ L
8	RevertAid-M-MuLV RT (200 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
	Tổng thể tích phản ứng	20 $\mu$ L

Trộn đều hỗn hợp phản ứng và ủ ở 42 $^{\circ}$ C trong 60 phút. Kết thúc phản ứng bằng cách nâng nhiệt độ lên 70 $^{\circ}$ C trong 5 phút.

### 2.2.5. Phân tích qPCR

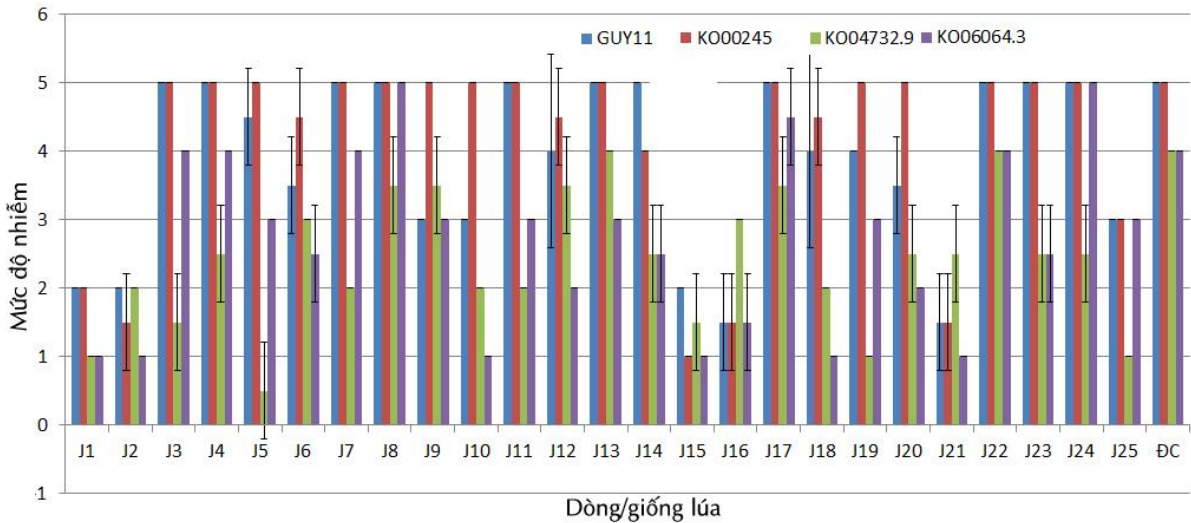
Phản ứng pPCR được thực hiện trên máy AB 7500 fast real-time PCR sử dụng cDNA làm khuôn và các primer được thiết kế đặc hiệu với các gene quan tâm. Hỗn hợp phản ứng có thể tích 20 $\mu$ L bao gồm 10 $\mu$ L 2X SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific), 0,5 $\mu$ M mỗi loại môi và 2,5 $\mu$ L cDNA (50ng). qPCR được thực hiện như sau: 2 phút ở 50 $^{\circ}$ C, 10 phút ở 95 $^{\circ}$ C, lặp lại 40 chu kỳ: 15 giây ở 95 $^{\circ}$ C; 1 phút ở 60 $^{\circ}$ C. Các phản ứng được thực hiện ba lần lặp lại. Gene đối chứng nội tại của lúa là 18S được sử dụng để chuẩn hóa biểu hiện gene.

## 3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

### 3.1. Kết quả phân tích gây nhiễm các thể đột biến KO lên cây lúa



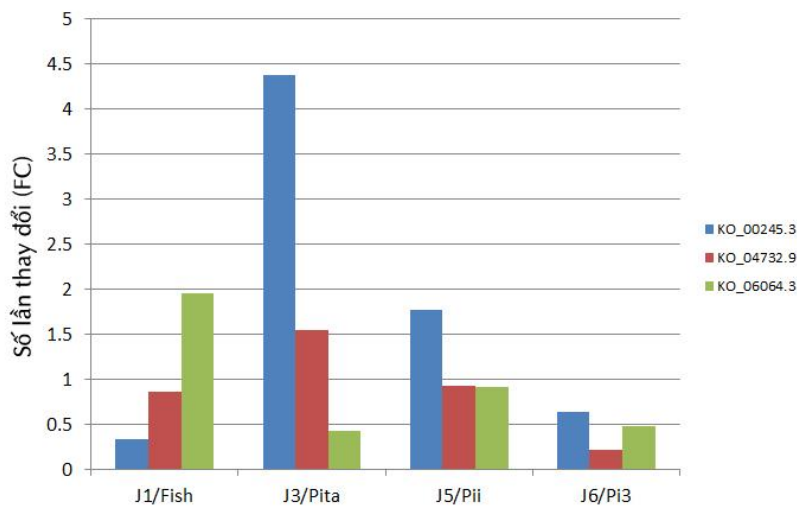
**Hình 2.** Hình ảnh đại diện cây lúa sau 08 ngày gây nhiễm với các chủng nấm đạo ôn. LTH là giống nhiễm chuẩn, J7 là tên trong bộ giống kháng dùng để thử nghiệm. A) Thử nghiệm với chủng gốc không đột biến Guy11; B) Thử với chủng đột biến KO\_00245.3; C) Thử với chủng đột biến KO\_04732.9; D) Thử với chủng đột biến KO\_06064.3.



**Hình 3.** Biểu đồ mức độ nhiễm bệnh đạo ôn trên các dòng/giống lúa thử nghiệm.

Kết quả thử nghiệm chủng gốc GUY11 và 03 chủng đột biến KO gene trên cây lúa cho thấy chủng không có sự sai khác đáng kể về triệu chứng bệnh đạo ôn trên cây lúa giữa giống gốc GUY11 và chủng đột biến KO\_00245.3, tuy nhiên triệu chứng bệnh gây ra của 02 chủng đột biến KO\_04732.9 và KO\_06064.3 nhẹ hơn

so với chủng đối chứng GUY11 (Hình 2). Kết quả phân tích đánh giá mức độ nhiễm bệnh theo thang của JIRCAS, 2009 được thể hiện trên Hình 3 cho thấy chủng đột biến KO\_04732.9 điểm nhiễm bệnh thấp nhất, tiếp theo là chủng KO\_06064.3.



**Hình 4.** Kết quả phân tích định lượng qPCR mức độ biểu hiện gene kháng của cây lúa khi xử lý với nấm đạo ôn.

Dựa vào các công bố trước đây và tìm kiếm trình tự nucleotide trên các ngân hàng dữ liệu gene, chúng tôi đã tìm thấy 13 gene liên quan đến tính kháng bệnh đạo ôn trong bộ sưu tập 25 dòng lúa sử dụng trong thử nghiệm tính kháng bệnh đạo ôn. Một số gene khác chỉ có marker mà chưa được giải trình tự nucleotide (Bảng

1,2). Mười ba cặp mồi đặc hiệu gene kháng bệnh đạo ôn và gene đối chứng nội tại 18S đã được thiết kế (Bảng 2). Kết quả phân tích mức độ biểu hiện gene bằng kỹ thuật qPCR chúng tôi chỉ nhận được tín hiệu huỳnh quang của 4/13 gene, đó là các gene Fish của dòng IRBLsh-B (ký hiệu thí nghiệm là J1), gene Pita

của dòng IRBLt-K59 (ký hiệu là J3), gene Pii của dòng IRBLi-F5 (ký hiệu là J5) và gene Pi3 của dòng IRBL3-CP4 (ký hiệu là J6). Các dòng khác có tín hiệu không ổn định hoặc không có tín hiệu nên không đưa vào phân tích. Kết quả cho thấy mức độ biểu hiện của gene Fish, Pii và Pi3 đều bị suy giảm ở chủng đột biến KO\_04732.9 so với đối chứng; mức độ biểu hiện của gene Pita, Pii và Pi3 đều bị suy giảm ở chủng đột biến KO\_06064.3; mức độ biểu hiện của gene Fish và Pi3 bị suy giảm biểu hiện ở chủng đột biến KO\_00245.3. Ngược lại mức độ biểu hiện của gene Pita và Pii được tăng cường ở chủng đột biến KO\_00245.3 (Hình 4). Các kết quả phân tích mức độ biểu hiện gene bằng qPCR cho thấy về cơ bản mức độ biểu hiện của các gene nghiên cứu bị suy giảm mạnh ở các chủng đột biến KO\_04732.9 và KO\_06064.3. Kết quả này tương đồng với phân tích triệu chứng bệnh đạo ôn của hai dòng đột biến KO này trên cây lúa (Hình 2 và 3). Giả thuyết được đưa ra là nhiều khả năng hai chủng đột biến KO\_04732.9 và KO\_06064.3 đã làm giảm khả năng lây nhiễm của chúng lên cây lúa và do đó cây lúa chỉ biểu hiện các gene kháng bệnh ở mức độ thấp.

#### 4. Kết luận

Đã phân tích thành công mức độ gây nhiễm các triệu chứng bệnh đạo ôn của các chủng đột biến lên cây lúa và đánh giá mức độ gây bệnh dựa theo các tiêu chí đánh giá của JIRCAS 2009.

Phân tích mức độ biểu hiện của một số gene kháng bệnh đạo ôn ở lúa cho thấy mức độ biểu hiện gene của chúng bị suy giảm khi gây nhiễm với các chủng đột biến KO\_04732.9 và KO\_06064.3.

**Lời cảm ơn:** Công trình khoa học này là một phần kết quả của Chương trình Hợp tác Khoa học và Công nghệ Nghị định thư giữa Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Bộ Ngoại giao và Hợp tác quốc tế Italia (Mã số NĐT.36.ITA/18).

#### Tài liệu tham khảo

- [1] McKeivith B. (2004), Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin*, 29(2), 111–142. <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2004.00418.x>
- [2] FAOSTAT (2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available at <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- [3] Wilson R. A. và Talbot, N. J. (2009). Under pressure: Investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nature Rev. Microbiol.* 7 (3), 185–195. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2032>
- [4] Kuroki M., *et al.* (2017), Chitin-deacetylase activity induces appressorium differentiation in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Sci. Rep.* 7, 1-8.
- [5] Soanes D., *et al.* (2012), Genome-wide transcriptional profiling of appressorium development by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS One Pathogens*;8. doi:10.1371/journal.ppat.1002514.
- [6] Hayashi N. và Fukuta, Y. (2009), Proposal for a new international system of differentiating races of blast (*Pyricularia oryzae* Cavara) by using LTH monogenic lines in rice (*Oryza sativa* L.). JIRCAS working report No. 63. Tsukuba, Ibaraki, Japan, Japan
- [7] Kim B. R., *et al.* (2003), Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnology Letters* 25: 1869–1872, 2003.
- [8] Divya D., *et al.* (2018), Expression Profile of Defense Genes in Rice Lines Pyramided with Resistance Genes Against Bacterial Blight, Fungal Blast and Insect Gall Midge. *Rice*. 11:40.
- [9] N.T.T. Thuy, *et al.* (2015), Khả năng kháng bệnh đạo ôn (*Pyricularia oryzae*) ở Nam Trung Bộ và đặc điểm nông sinh học của một số dòng lúa chứa gen kháng bệnh. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*. Kỳ 2, tháng 10/2015. 17-23.
- [10] Azizi P., *et al.* (2015), Differential Gene Expression Reflects Morphological Characteristics and Physiological Processes in Rice Immunity against Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae*. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0126188.
- [11] Kobayashi N., *et al.* (2007), Development of New Sets of International Standard Differential Varieties for Blast Resistance in Rice (*Oryza sativa* L.). *JARQ* 41(1) 31-37. International Research Center for Agricultural Sciences, pp. 11–15.
- [12] Hayashi N., *et al.* (2009), Protocols for the sampling of diseased specimens and evaluation of blast disease in rice. JIRCAS Working Report No 63. Tsukuba, Ibaraki, Japan, Japan International Research Center for Agricultural Sciences, pp. 17–33.