



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0041733

(51)^{2020.01} C12Q 1/686; C12N 15/11

(13) B

(21) 1-2021-03933

(22) 29/06/2021

(45) 25/11/2024 440

(43) 27/09/2021 402

(73) NGUYỄN BẢO QUỐC (VN)

160/10/16 Phạm Văn Đồng, phường 3, quận Gò Vấp, thành phố Hồ Chí Minh

(72) NGUYỄN BẢO QUỐC (VN); Nguyễn Ngọc Bảo Châu (VN).

(74) Công ty TNHH Dịch thuật sáng chế PROINVEN (PROINVEN CO.,LTD.)

(54) CẶP ĐOẠN MÔI PCR-MO VÀ CÁC ĐOẠN MÔI LAMP-MO ĐỂ PHÁT HIỆN
NẤM MAGNAPORTHE ORYZE GÂY BỆNH ĐẠO ÔN TRÊN LÚA

(57) Sáng chế đề cập đến trình tự vùng chỉ thị của vùng khuếch đại được đặc trưng trình tự (sequence characterized amplified region-SCAR-Mo) và cặp môi phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction-PCR-Mo) cũng như các đoạn môi khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng (loop-mediated isothermal amplification-LAMP-Mo) đặc hiệu để phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm *Magnaporthe oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học. Cụ thể, sáng chế đề cập đến trình tự của chỉ thị vùng khuếch đại được đặc trưng trình tự (sequence characterized amplified region-SCAR-Mo), cặp mồi phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction-PCR-Mo) và các đoạn mồi khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng (loop-mediated isothermal amplification-LAMP-Mo) đặc hiệu để phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm *Magnaporthe oryzae* (còn được gọi với tên khác là *Pyricularia oryzae*) gây bệnh đạo ôn trên lúa.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nấm *Magnaporthe oryzae* là tác nhân chính gây bệnh đạo ôn trên lúa vốn là một trong những dịch hại gây thiệt hại rất lớn cho những vùng sản xuất lúa trên thế giới trong đó có Việt Nam. Nấm *M.oryzae* là một mầm bệnh tự dưỡng và có thể lây nhiễm vào hầu hết các bộ phận của cây lúa như trên lá, hạt, bông, cổ bông thông qua việc hình thành các cấu trúc xâm nhiễm bao gồm bào tử, giác bám và ống xâm lấn tế bào (Wilson và Talbot, 2009).

Việc chẩn đoán nấm gây bệnh đạo ôn, đặc biệt ở giai đoạn đầu xâm nhiễm thường rất khó khăn do không có triệu chứng điển hình. Trên thực tế, các quy trình chẩn đoán nấm gây bệnh đạo ôn thường được thực hiện thông qua việc ủ mẫu bệnh trong ít nhất 24 giờ, sau đó kiểm tra bằng kính hiển vi trên các mẫu lá để quan sát sự xuất hiện của các bào tử nấm *M.oryzae*. Các phương pháp này đòi hỏi nhiều thời gian, công sức, chi phí.

Hiện tại, các phương pháp tiếp cận phân tử như PCR, qPCR đã được phát triển để phát hiện, xác định và định lượng nấm gây bệnh đạo ôn, *M.oryzae* (Harmon và cộng sự, 2003; Chadha và Gopalakrishna, 2006; Pieck và cộng sự, 2017; Sun và cộng sự, 2014; Thierry và cộng sự, 2020). Việc phân biệt nấm gây bệnh đạo ôn *M.oryzae* trên lúa và lúa mì có thể sử dụng trình tự của hai yếu tố nhảy là Pot2 và MoT3

(Harmon và cộng sự, 2003; Pieck và cộng sự, 2017). Mặc dù các môi PCR của trình tự MoT3 cho thấy tính đặc hiệu trong việc phát hiện và phân biệt bệnh đạo ôn trên lúa mì, nhưng các môi PCR được thiết kế từ Pot2 transposon lại chỉ có thể được sử dụng làm môi phổ quát (universal primer) để phát hiện tất cả các dạng gây bệnh (pathotypes) của nấm *M.oryzae* gây bệnh trên các ký chủ khác (Harmon và cộng sự, 2003; Pieck và cộng sự, 2017). Khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng (LAMP) đã được coi là một phương pháp mang tính thay thế để phát hiện nhanh nấm gây bệnh đạo ôn đặc biệt là phát hiện tại đồng ruộng. Cho đến nay, ngoại trừ bộ môi LAMP được phát triển đặc hiệu để phát hiện chủng *M.oryzae* gây bệnh trên lúa mì (*M.oryzae* pathotype Triticum) (Yasuhara-Bell và cộng sự, 2018), có rất ít bằng chứng được báo cáo về sự phát triển phương pháp phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa (*M.oryzae* pathotype Oryza).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, nhằm mục đích xác định nhanh và định danh chính xác với ít chi phí và có độ nhạy cao đối với nấm *Magnaporthe oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa, mục đích của sáng chế đề xuất trình tự của chỉ thị vùng khuếch đại được đặc trưng trình tự (SCAR-Mo) có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO.1; cặp đoạn môi phản ứng chuỗi polymeraza (PCR-Mo) với đoạn môi xuôi có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO.2 và đoạn môi ngược có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO.3; và đến các đoạn môi khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng (LAMP-Mo) với đoạn môi F3 có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO.4, đoạn môi B3 có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO.5, đoạn môi FIP có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO.6 và đoạn môi BIP có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO.7, đặc hiệu để phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm *Magnaporthe oryzae* (còn được gọi với tên khác là *Pyricularia oryzae*) gây bệnh đạo ôn trên lúa.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Khảo sát tính đa hình của Pot2 transposon với môi Pot2B3 giữa các loại nấm gây bệnh trên cây trồng khác nhau. Mũi tên chỉ mục tiêu để phát triển chỉ thị SCAR-

Mo đặc hiệu cho nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa, *M.oryzae*. M: Thang 1kb; 1. *Alternaria solani*; 2. *Bipolaris maydis*; 3. *Bipolaris rostrata*; 4. *Colletotrichum gloeosporioides*; 5. *Corynespora cassicola*; 6. *Magnaporthe oryzae*; 7. *Pestalotia mangiferae*; 8. *Phytophthora capsici*; 9. *Corticium salmonicolor*; 10. *Fusarium solani*; 11. *Fusarium oxysporum*; 12. *Athelia rolfsii*; 13. *Phytophthium helicoides*; 14. *Rhizoctonia solani*; 15. *Cladosporium cladosporioides*; 16. *Neosytalidium dimidiatum*; 17. *Lasisodiplodia theobromae*; 18. *Rhizopus stolonifer*; 19. *Nigrospora oryzae*; 20. *Curvularia lunata*

Hình 2. Sơ đồ plasmit pJET1.2 dùng để chèn sản phẩm PCR khuếch đại từ đoạn môi Pot3B3 để giải trình tự chỉ thị SCAR-Mo đặc hiệu cho nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa (*M.oryzae* pathotype Oryza)

Hình 3. Kết quả so sánh độ tương đồng của trình tự chỉ thị SCAR-Mo với các trình tự trong cơ sở dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST

Hình 4. Phản ứng PCR với cặp đoạn môi đặc hiệu cho *M.oryzae* phát triển từ vùng trình tự SCAR-Mo cho việc phát hiện nấm gây bệnh đạo ôn *M.oryzae* với các nấm gây bệnh cây trồng khác. Chỉ có một sản phẩm PCR duy nhất với kích thước là 610 bp được khuếch đại trên nấm gây bệnh đạo ôn, *M.oryzae* nhưng không có trên các nấm gây bệnh cây trồng khác. M: Thang 1kb; 1. *Alternaria solani*; 2. *Bipolaris maydis*; 3. *Bipolaris rostrata*; 4. *Colletotrichum gloeosporioides*; 5. *Corynespora cassicola*; 6. *Magnaporthe oryzae*; 7. *Pestalotia mangiferae*; 8. *Phytophthora capsici*; 9. *Corticium salmonicolor*; 10. *Fusarium solani*; 11. *Fusarium oxysporum*; 12. *Athelia rolfsii*; 13. *Phytophthium helicoides*; 14. *Rhizoctonia solani*; 15. *Cladosporium cladosporioides*; 16. *Neosytalidium dimidiatum*; 17. *Lasisodiplodia theobromae*; 18. *Rhizopus stolonifer*; 19. *Nigrospora oryzae*; 20. *Curvularia lunata*

Hình 5. Phản ứng PCR với cặp môi đặc hiệu cho *M.oryzae* phát triển từ vùng trình tự SCAR-Mo cho việc phân biệt tính chuyên biệt của nấm *M.oryzae* gây bệnh trên lúa với các chủng *M.oryzae* gây bệnh trên các cây trồng khác. Sản phẩm PCR với kích thước 620 bp được khuếch đại trên các mẫu *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa, *Oryza sativa* (O-1, O-7, O-14, O-21, O-25, O-26, O-27, O-28) nhưng không có trên các chủng *M.oryzae* gây bệnh trên cây trồng khác như *Setaria italica* (S-3, S-7); *Eleusine*

coracana (E-1, E-7); *Avena sativa* (A-1); *Triticum aestivum* (T-4); *Lolium perenne* (L-5); *Brachiaria plantag* (B-1); *Eragrostis lehmann* (X-1); *Leersia oryzoides* (X-2); *Digitaria sanguine* (D-1); *Digitaria smutsii* (D-4); *Sasa sp.* (X-5); *Zingiber mioga* (X-6).

Hình 6. Phản ứng LAMP với cặp mồi đặc hiệu cho *M.oryzae* phát triển từ vùng trình tự SCAR-Mo cho việc phát hiện nấm gây bệnh đạo ôn, *M.oryzae* với các nấm gây bệnh cây trồng khác.

Hình 7. Phản ứng LAMP với cặp mồi đặc hiệu cho *M.oryzae* phát triển từ vùng trình tự SCAR-Mo để phát hiện *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa (*M.oryzae* pathotype Oryza) với các chủng *M.oryzae* gây bệnh trên các ký chủ khác.

Mô tả chi tiết sáng chế

Mục đích của sáng chế đề xuất trình tự của chỉ thị vùng khuếch đại được đặc trưng trình tự (SCAR-Mo) và cặp mồi phản ứng chuỗi polymeraza (PCR-Mo) cũng như các đoạn mồi khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng (LAMP-Mo) đặc hiệu để phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm *Magnaporthe oryzae* (còn được gọi với tên khác là *Pyricularia oryzae*) gây bệnh đạo ôn trên lúa như trình bày trên đây. Tác giả sáng chế đã sử dụng 4 đoạn mồi của 2 trình tự LTR-retrotransposon Pyret và Pot2 transposon để khảo sát tính đa hình của các yếu tố nhảy (transposon) trên các mẫu nấm gây bệnh cây trồng khác nhau (Bảng 1 và Bảng 2). Phản ứng PCR với mồi Pot2B3 cho ra 6 sản phẩm khuếch đại trên nấm *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa và 1 trong số 6 sản phẩm đó được cắt, tinh sạch ADN từ gel agarosa và chèn vào trong plasmit pJET1.2 để giải trình tự (Hình 1). Trình tự của chỉ thị SCAR được sử dụng cho việc thiết kế đoạn mồi PCR bằng phần mềm Primer 3 (Untergasser và cộng sự, 2012) và mồi LAMP bằng phần mềm PrimerExplorer V5 (Eiken Chemical Co. Ltd., Tokyo).

Bảng 1. Trình tự đoạn mồi được dùng để khảo sát tính đa dạng di truyền của các nấm gây bệnh cây trồng khác nhau dựa trên trình tự của các yếu tố nhảy (transposable elements)

STT	Tên mồi	Trình tự (5' – 3')	Tham khảo
3	Pot2-F3	AACCAACGCTACTTCTTCACG	Tự thiết kế (SEQ ID NO.8)
4	Pot2-B3	CGGTTTCATTAACCTCTTCTTCA	Tự thiết kế (SEQ ID NO.9)
5	Pyr1	CCCTTGTCCGTTTGAGATCA	Chadha và Sharma, 2014 (SEQ ID NO.10)
6	Pot2L2	TGAACCGGAGAAGCGTGAAA	Chadha và Sharma, 2014 (SEQ ID NO.11)

Bảng 2. Các mẫu nấm gây bệnh trên cây trồng được sử dụng cho việc đánh giá tính chuyên biệt của đoạn mồi PCR và LAMP trong việc phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa

STT	Nấm gây bệnh cây trồng	Địa điểm	Cây ký chủ	Bộ phận	Năm
1	<i>Alternaria solani</i>	Viện NCCNSHMT	Cà chua	Lá	2013
2	<i>Bipolaris maydis</i>	TTQLCLSTH II	Bắp	Lá	2013
3	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Bình Thuận	Nho	Lá	2014
4	<i>Corticium salmonicolor</i>	RIBE	Cà phê	Thân	2013
5	<i>Corynespora cassiicola</i>	Bình Phước	Cao su	Lá	2014
6	<i>Curvularia lunata</i>	TP.HCM	Lúa	Hạt	2014
7	<i>Fusarium oxysporum</i>	TTQLCLSTH II	Lan Denbrobium	Thân	2014
8	<i>Fusarium solani</i>	TTQLCLSTH II	Lan hồ điệp	Thân	2014
9	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	TTQLCLSTH II	Vú sữa	Quả	2014
10	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Bắc Ninh	Lúa	Lá	2014
11	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	Bình Thuận	Thanh long	Cành	2014
12	<i>Nigrospora sphaeria</i>	TTQLCLSTH II	Cao lương	Quả	2014
13	<i>Pestalotia mangiferae</i>	Đồng Tháp	Xoài	Lá	2013
14	<i>Phytophthium helicoides</i>	TTQLCLSTH II	Dâu	Rễ	2014
15	<i>Rhizoctonia solani</i>	TTQLCLSTH II	Cà tím	Rễ	2014
16	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TTQLCLSTH II	Vú sữa	Quả	2014

17	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	TTQLCLSTH II	Thanh long	Cành	2014
18	<i>Athelia rolfsii</i>	TP.HCM	<i>Iris domestica</i>	Thân	2015
19	<i>Phytophthora capsici</i>	TTQLCLSTH II	Tiêu	Lá	2013
20	<i>Bipolaris rostrata</i>	Củ Chi	Hoa lan	Lá	2012

Trình tự đoạn mồi PCR-Mo để phát hiện tính chuyên biệt của nấm *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa:

Đoạn mồi xuôi : 5' GAAGCTTATCGACGTCACCTG 3' (SEQ ID NO. 2)

Đoạn mồi ngược: 5' CCTCTTCTTCATCGTTCAAAGC 3' (SEQ ID NO. 3)

Kích thước khuếch đại từ đoạn mồi xuôi và đoạn mồi ngược (SEQ ID No.2 và SEQ ID No.3): 610 bp

Trình tự của sản phẩm khuếch đại như được thể hiện trong SEQ ID NO.12.

Trình tự mồi LAMP-Mo để phát hiện tính chuyên biệt của nấm *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa:

Đoạn mồi F3: 5' GCTTATCGACGTCACCTG 3' (SEQ ID NO. 4)

Đoạn mồi B3: 5' GCTATTTTCTAACAAAAAAGGGT 3' (SEQ ID NO. 5)

Đoạn mồi FIP: 5'

TGGCTTTTCGATAGCAAAGTAGAAAATTTGTAAACCAGTTTTGCTGTT 3'
(SEQ ID NO. 6)

Đoạn mồi BIP: 5'

AACCATTCAATCTGGTTGGCGAAGTGGTTTTGCCAAGTTC 3'
(SEQ ID NO. 7)

Kích thước khuếch đại đẳng nhiệt dạng vòng khi sử dụng 4 đoạn mồi này như được nêu trong SEQ ID NO.13 (201 bp).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Minh chứng tính chuyên biệt của trình tự SCAR-Mo (SEQ ID NO.1) đối với nấm *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa.

Sản phẩm PCR với môi Pot3B3 trên nấm *M.oryzae* được tinh sạch ADN từ gel agarosa và chèn vào trong plasmit pJET1.2 để giải trình tự (Hình 1 và Hình 2). Trình tự của chỉ thị SCAR-Mo được so sánh trong cơ sở dữ liệu của NCBI bằng công cụ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Kết quả trên Hình 3 chỉ ra rằng trình tự của chỉ thị SCAR-Mo tương đồng trên 98% với duy nhất trình tự của nấm *M.oryzae* mà không có trên các nấm gây bệnh cây trồng khác. Điều này chỉ ra rằng trình tự SCAR-Mo là đặc hiệu cho nấm *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa và có thể sử dụng cho việc thiết kế môi của các phản ứng PCR, qPCR, hay LAMP.

Ví dụ 2: Đánh giá tính chuyên biệt của môi PCR-Mo cho việc phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa

Bước 1: Ly trích ADN tổng số của các mẫu nấm gây cây trồng (Bảng 2) và các mẫu nấm *M.oryzae* gây bệnh trên các ký chủ khác nhau (Bảng 3) bằng kit ADN GeneJet Plant Genomic (Thermoscientific, USA):

- Cân 0,1 g nấm (sợi nấm) và cho vào ống Eppendorf 1,5 ml; thêm 350 µl dung dịch đệm tan A vào và tạo lốc xoáy trong 10 – 20 giây
- Thêm 50 µl dung dịch đệm tan B, 20 µl RNaza và ủ mẫu ở 65°C trong 10 phút
- Thêm 130 µl dung dịch tạo kết tủa, tạo lốc xoáy trong 5 giây sau đó ủ 5 phút ở 20°C, ly tâm ở tốc độ 14.000 vòng/phút, trong 5 phút, thu được 450 – 500 µl dịch nổi và cho vào ống Eppendorf sạch
- Thêm 400 µl dung dịch gắn kết và 400 µl ethanol 96% vào, tạo lốc xoáy trong 5 giây, tính tổng thể tích vừa thu
- Chuyển ½ thể tích vừa thu vào cột, ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút, trong 1 phút và loại bỏ dịch ở đáy cột, chuyển phần thể tích còn lại vào cột, ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút, trong 1 phút

- Thêm 500 µl dung dịch đệm rửa I đã được thêm etanol 96%, ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút, trong 1 phút, loại bỏ dịch dưới và giữ lại cột
- Thêm 500 µl dung dịch đệm rửa II đã được thêm etanol 96%, ly tâm ở tốc độ 14.000 vòng/phút, trong 3 phút, bỏ dịch phía dưới.
- Thay ống Eppendorf mới, thêm 100 µl dung dịch tách rửa vào bằng cách nhỏ ở giữa cột, ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng. Ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 1 phút, thu được ADN và bảo quản ở -20°C.

Bảng 3. Các chủng nấm *M.oryzae* gây bệnh trên các ký chủ khác nhau được sử dụng cho việc đánh giá tính chuyên biệt của đoạn mồi PCR và LAMP trong việc phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa (*M.oryzae* pathotype Oryza). Các mẫu ADN này là món quà rất quý cung cấp bởi GS.TS.Yukio Tosa, Đại học Kobe, Nhật Bản

STT	Cây ký chủ	Ký hiệu	Chủng <i>M.oryzae</i>	Địa điểm	Năm
1	<i>Oryza sativa</i>	O-1	Guy11	Guiana	1978
2		O-7	Ken 53-33	Nhật Bản	1953
3		O-14	CHNOS 59-6-1	Trung Quốc	1992
4		O-16	Br10	Brazil	1990
5		O-21	PO-02-7501	Indonesia	1975
6		O-25	VHT6.1	Việt Nam	1998
7		O-26	VTB6.1	Việt Nam	1998
8		O-27	VHG4.5	Việt Nam	1996
9		O-28	VHT3.3	Việt Nam	1998
10	<i>Setaria italica</i>	S-3	NRSI3-1-1	Nhật Bản	1977
11		S-7	KANSV1-4-1	Nhật Bản	1975
12	<i>Eleusine coracana</i>	E-1	G10-1	Nhật Bản	1977
13		E-7	IN77-31-1-1	Ấn độ	1977
14	<i>Avena sativa</i>	A-1	Br58	Brazil	1990
15	<i>Triticum aestivum</i>	T-4	Br48	Brazil	1990

16	<i>Lolium perenne</i>	L-5	FI5	Nhật Bản	1998
17	<i>Brachiaria plantag</i>	B-1	Br35	Brazil	1990
18	<i>Eragrostis lehmann</i>	X-1	NI986	Nhật Bản	1975
19	<i>Leersia oryzoides</i>	X-2	NI919	Nhật Bản	1974
20	<i>Digitaria sanguine</i>	D-1	Dig4-1	Nhật Bản	1990
21	<i>Digitaria smutsii</i>	D-4	NI980	Nhật Bản	1975
22	<i>Sasa sp.</i>	X-5	INA-8-92-45	Nhật Bản	1990
23	<i>Zingiber mioga</i>	X-6	HYZiM101-1-1-1	Nhật Bản	1990

Bước 2: Quy trình phản ứng PCR

Thành phần phản ứng PCR cho việc phát hiện nhanh và xác định chính xác nấm *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa (*M.oryzae* pathotype Oryza) được thể hiện trong Bảng 4

Bảng 4. Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μl)
Go Taq hỗn hợp	1x	12
Đoạn mồi F	10 pmol/μl	1,2
Đoạn mồi R	10 pmol/μl	1,2
Khuôn ADN	20 ng	2
H ₂ O		8,6
Tổng thể tích		25 μl

Quy trình nhiệt của phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu của nấm *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5. Quy trình nhiệt của phản ứng PCR

Giai đoạn	Nhiệt độ(°C)	Thời gian	Số chu kỳ
Tiền biến tính	94°C	2 phút	35
Biến tính	94°C	30 giây	
Bắt cặp	52 °C		
Kéo dài	72 °C	1 phút	
Hậu kéo dài	72 °C	5 phút	

Cặp đoạn mồi PCR được sử dụng để phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa (*M.oryzae* pathotype Oryza) bao gồm đoạn mồi xuôi nêu trong SEQ ID NO. 2 và đoạn mồi ngược nêu trong SEQ ID NO. 3.

Kết quả: Kết quả cho thấy chỉ có một sản phẩm PCR-Mo với kích thước là 610 bp trên nấm *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa (*M.oryzae* pathotype Oryza) mà không có trên các nấm gây bệnh cây trồng khác và các chủng nấm *M.oryzae* gây bệnh trên các ký chủ khác (Hình 4 và Hình 5). Điều này cho thấy mồi PCR-Mo đặc hiệu cho nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa.

Ví dụ 3: Đánh giá tính chuyên biệt của đoạn mồi LAMP-Mo cho việc phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa

Bước 1: Ly trích ADN tổng số của các mẫu nấm gây cây trồng (Bảng 2) và các mẫu nấm *M.oryzae* gây bệnh trên các ký chủ khác nhau (Bảng 3) bằng kit ADN GeneJet Plant Genomic (Thermoscientific, USA) tương tự như ví dụ 2

Bước 2. Chuẩn bị hỗn hợp đoạn mồi LAMP

Thành phần	Thể tích
F3	4 µL
B3	4 µL
FIP	20 µL
BIP	20 µL
Nước cất	152 µL

Bước 3: Thực hiện phản ứng LAMP sử dụng MasterMix đẳng nhiệt (Optigene, UK) với bộ đoạn mồi phù hợp theo thành phần cho 8 phản ứng sau đây:

Thành phần	Thể tích 20 μ L
MasterMix đẳng nhiệt	115 μ L
Hỗn hợp mồi LAMP	23 μ L
Nước cất	46 μ L
Mẫu ADN	1 -2 μ L

Chuyển 20 μ L/phản ứng vào 8 ống phản ứng. Lưu ý, vị trí thứ 8 phải đóng nắp lại liền cho –LAMP (đối chứng âm). Chu trình nhiệt phản ứng LAMP bao gồm:

- Gia nhiệt sơ bộ ở 40°C trong 2 phút, tốc độ gia nhiệt 4,8°C/s
- Khuếch đại ở 63°C - 65°C trong 30 phút, tốc độ gia nhiệt 2,6°C/s
- Nung ở khoảng nhiệt độ từ 95°C trong vòng 30 giây đến 70°C trong vòng 30 giây, tốc độ gia nhiệt 0,11°C/s

Trong đó, đối chứng âm là phản ứng LAMP không loại bỏ ADN. Thiết bị chạy phản ứng LAMP là máy MyGo Mini thời gian thực (IT IS, UK) và GenieIII (Optigen, UK). Sản phẩm LAMP sau đó được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarosa 1% trong dung dịch đệm TBE 0,5X.

Hỗn hợp các mồi LAMP được sử dụng để phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa (*M.oryzae* pathotype Oryza) bao gồm đoạn mồi nêu trong SEQ ID NO. 4; đoạn mồi nêu trong SEQ ID NO. 5; đoạn mồi nêu trong SEQ ID NO. 6 và đoạn mồi nêu trong SEQ ID NO. 7.

Kết quả: Kết quả cho thấy chỉ có duy nhất đường khuếch đại của nấm *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa (*M.oryzae* pathotype Oryza) mà không có trên các nấm gây bệnh cây trồng khác và các chủng nấm *M.oryzae* gây bệnh trên các ký chủ khác (Hình 6 và Hình 7). Khả năng phát hiện ADN của nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa là trong khoảng 30 phút. Điều này cho thấy mồi LAMP-Mo đặc hiệu cho nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa và có khả năng ứng dụng cho việc phát hiện nhanh tác nhân gây bệnh này tại đồng ruộng

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Trình tự chỉ thị SCAR-Mo theo sáng chế là chuyên biệt cho nấm *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa (*M.oryzae* pathotype Oryza). Trình tự này có thể được sử dụng cho việc thiết kế các môi, đầu dò cho các tiếp cận phân tử trong chẩn đoán tác nhân gây bệnh này

Cặp môi PCR-Mo và LAMP-Mo đặc hiệu được thiết kế trong sáng chế có khả năng phát hiện nhanh và định danh chính xác nấm *M.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa (*M.oryzae* pathotype Oryza). Các đoạn môi PCR-Mo và LAMP-Mo giúp tiết kiệm rất nhiều thời gian, công sức và tiền bạc, độ tin cậy cao so với các phương pháp truyền thống dựa trên hình thái bào tử trong việc phát hiện tác nhân này.

Lợi ích của sáng chế là có thể ứng dụng cặp môi đặc hiệu này không chỉ cho các nghiên cứu trong phòng thí nghiệm mà còn cho các công tác kiểm định, chẩn đoán nhanh tác nhân gây bệnh trong hạt giống nhằm có những giải pháp kịp thời trong phòng trừ bệnh đạo ôn trên đồng ruộng.

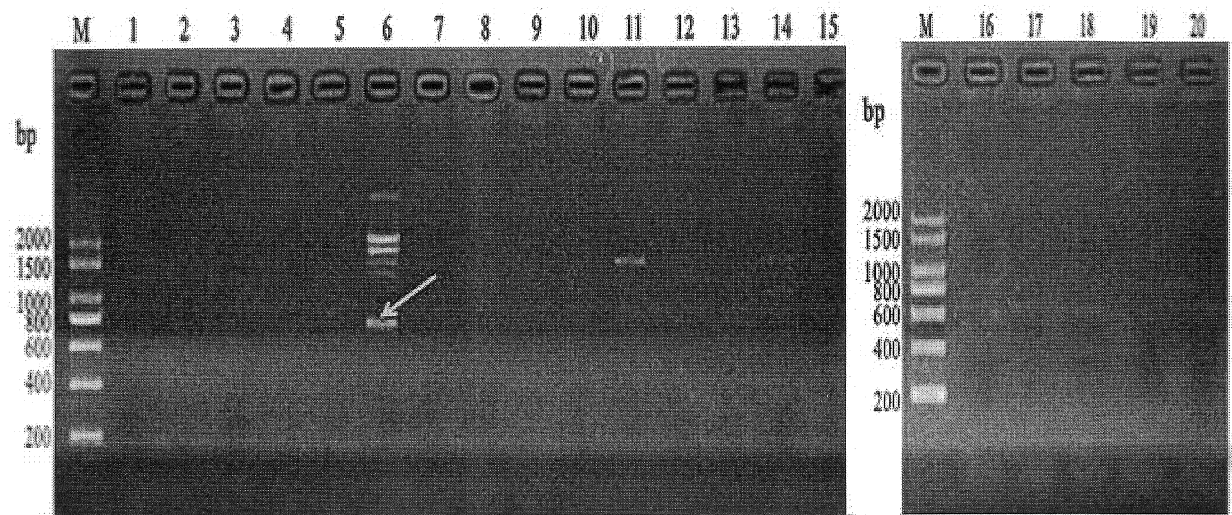
Danh mục tài liệu tham khảo

1. Chadha S, Gopalakrishna T. (2006) Detection of *Magnaporthe grisea* in infested rice seeds using polymerase chain reaction. Journal of Applied Microbiology. 100(5): 1147-1153.
2. 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.
3. Pieck ML, Ruck A, Farman ML, Stack JP, Valent B, Pedley KF. (2017) Genomics-based marker discovery and diagnostic assay development for wheat blast. Plant Disease 101: 103-109.
4. Sun G, Liu J, Li G, Zhang X, Chen T, Chen J, Zhang H, Wang D, Sun F, Pan H. (2014) Quick and accurate detection and quantification of *Magnaporthe oryzae* in rice using real-time quantitative polymerase chain reaction. Plant Disease 99(2):219-224
5. Thierry M, Chatet A, Fournier E, Tharreau D, Loos R. (2020) A PCR, qPCR and LAMP toolkit for the detection of the wheat blast pathogen in seeds. Plants 9(2): 277.
6. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. (2012) Primer3--new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res 40(15): e115.
7. Wilson RA, Talbot NJ (2009) Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. Nat Rev Microbiol 7(3): 185-95.
8. Yasuhara-Bell J, Pedley KF, Farman M, Valent B, Stack JP. (2018) Specific detection of the wheat blast pathogen (*Magnaporthe oryzae* Triticum) by Loop-Mediated Isothermal Amplification. Plant disease 102: 2550-2559.

YÊU CẦU BẢO HỘ

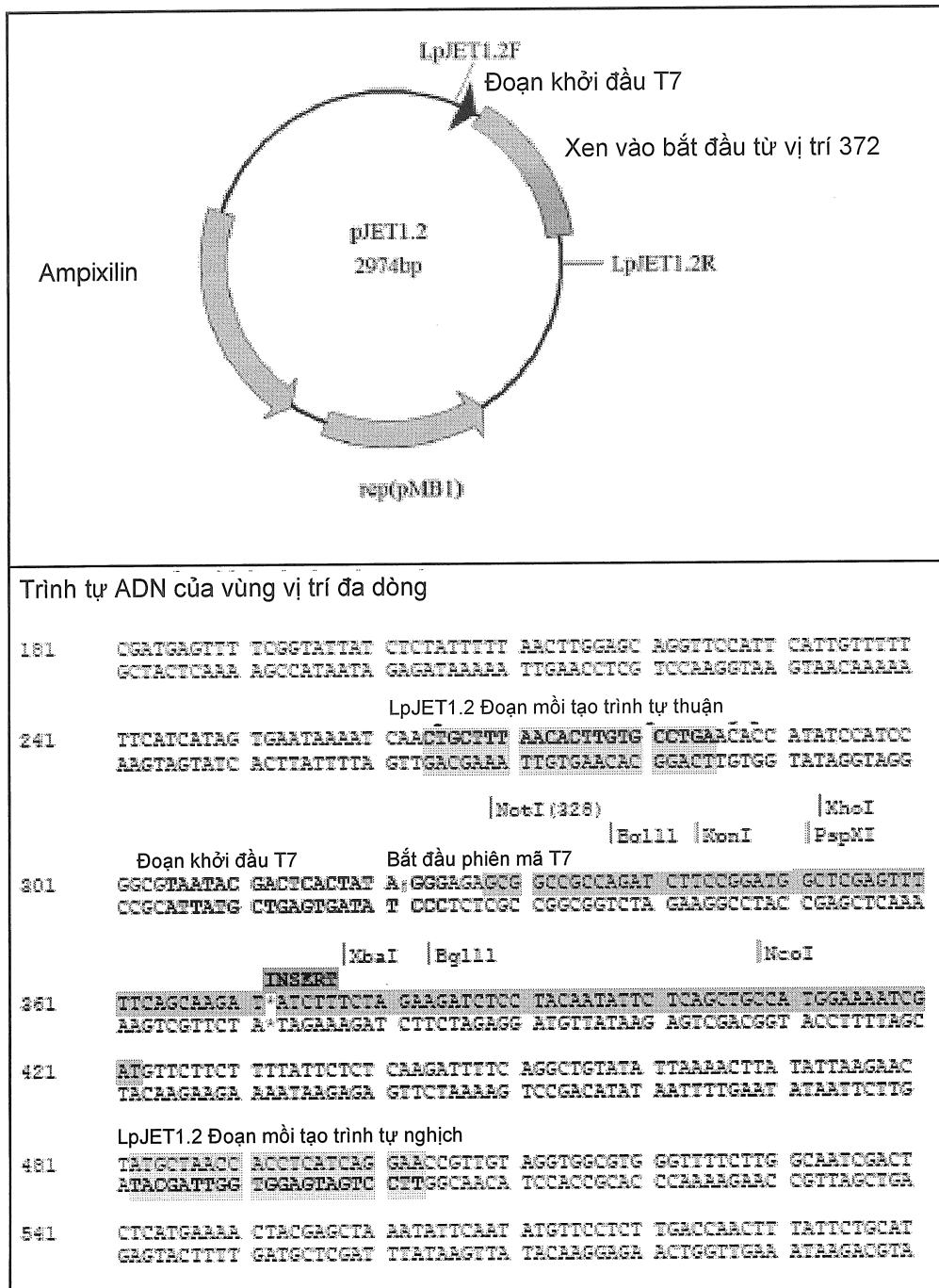
1. Cặp đoạn mồi PCR-Mo để phát hiện nấm *Magnaporthe oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa, trong đó đoạn mồi xuôi nêu trong SEQ ID NO.2 có trình tự GAAGCTTATCGACGTCACCTG và đoạn mồi ngược nêu trong SEQ ID NO.3 có trình tự CCTCTTCTTCATCGTTCAAAGC.

2. Các đoạn mồi LAMP-Mo để phát hiện nấm *Magnaporthe oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa bao gồm đoạn mồi F3, B3, FIP và BIP, trong đó đoạn mồi F3 nêu trong SEQ ID NO.4 có trình tự GCTTATCGACGTCACCTG; đoạn mồi B3 nêu trong SEQ ID NO.5 có trình tự GCTATTTTCTAACAAAAAAGGGT; đoạn mồi FIP nêu trong SEQ ID NO.6 có trình tự TGGCTTTTCGATAGCAAAGTAGAAAATTTGTAAACCAGTTTGTGCTGTT và đoạn mồi BIP nêu trong SEQ ID NO.7 có trình tự AACCAT TCAATCTGGTTGGCGAAGTGGTTTTGCCAAGTTC.



Hình 1

Tạo đơn dòng trong pJET1.2: Hướng dẫn thu được trình tự xen vào



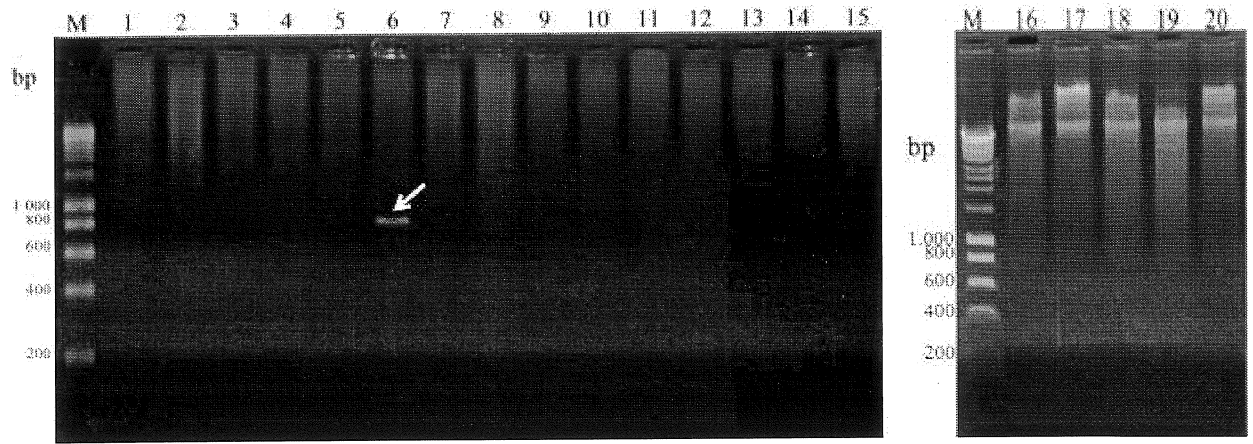
Hình 2

Mô tả Tổng kết Càng chỉnh Phân loại
 Trình tự tạo sự căn chỉnh đáng kể

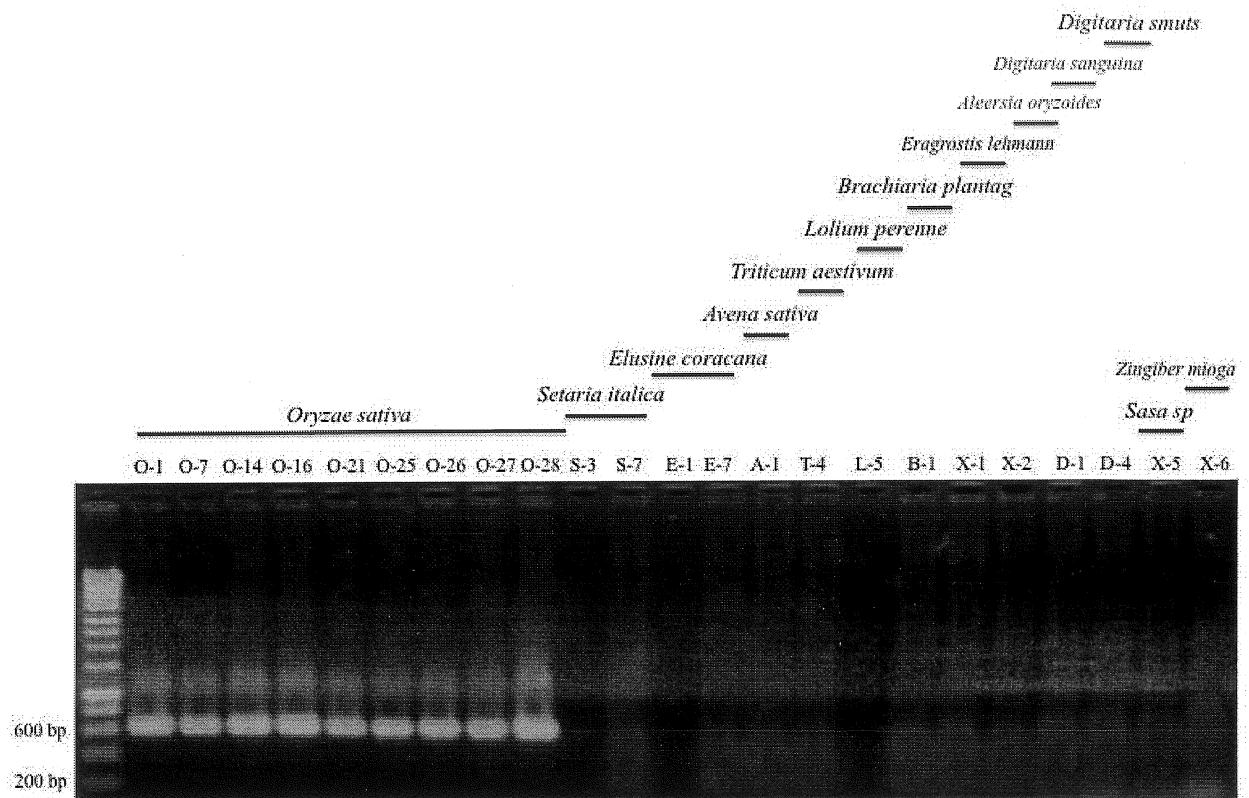
select all 63 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results			New	MSA Viewer	
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Magnaporthe oryzae strain BM1-24 clone fosmid SK2067 genomic sequence	Pyricularia oryzae	1184	1184	97%	0.0	98.94%	32433	KT599265.1
☒	Pyricularia oryzae 70-15 uncharacterized protein (MGC_14162), partial mRNA	Pyricularia oryzae	1184	1184	97%	0.0	98.94%	2769	XM_003720368.1
☒	Magnaporthe grisea 70-15 clone 25N20 telomere region, partial sequence	Pyricularia oryzae	1184	1184	97%	0.0	98.94%	41552	DQ493949.1
☒	Magnaporthe grisea 70-15 clone 72A13 telomere region, partial sequence	Pyricularia oryzae	1184	2343	97%	0.0	98.94%	40639	DQ493942.1
☒	Magnaporthe oryzae strain 61278ZB15 Avrpi2-1 gene locus, complete sequence	Pyricularia oryzae	1179	3430	97%	0.0	98.79%	120966	JN639897.1
☒	Magnaporthe oryzae AVR-Pita1 gene for effector protein AVR-Pita1, complete cds, isolate: 84R-82B	Pyricularia oryzae	1179	3072	97%	0.0	98.79%	39840	AB607334.1
☒	Magnaporthe grisea 70-15 clone 26K20 telomere region, partial sequence	Pyricularia oryzae	1179	1179	97%	0.0	98.79%	34667	DQ493950.1
☒	Magnaporthe grisea 70-15 clone 23E18 telomere region, partial sequence	Pyricularia oryzae	1179	1893	97%	0.0	98.79%	46418	DQ493948.1
☒	Magnaporthe oryzae AVR-Pita2 gene for effector protein AVR-Pita2, complete cds, isolate: Dig41	Pyricularia oryzae	1173	1861	97%	0.0	98.64%	39945	AB607343.1
☒	Magnaporthe grisea 70-15 clone 72H05 telomere region, partial sequence	Pyricularia oryzae	1173	1173	97%	0.0	98.64%	45496	DQ493943.1
☒	Magnaporthe grisea 70-15 clone 01G11 telomere region, partial sequence	Pyricularia oryzae	1168	1168	97%	0.0	98.45%	40546	DQ493944.1
☒	Magnaporthe oryzae isolate FJ81278 clone rnd-4, family-240 transposon TolMar-Pot1, complete sequence	Pyricularia oryzae	1164	1164	97%	0.0	98.34%	1862	KY509026.1
☒	Pyricularia oryzae strain B71 chromosome 3	Pyricularia oryzae	1157	9825	97%	0.0	98.19%	8237918	CP060332.1
☒	Pyricularia oryzae strain B71 chromosome mini	Pyricularia oryzae	1157	24184	97%	0.0	98.19%	1903245	CP060337.1
☒	Pyricularia oryzae strain B71 chromosome 5	Pyricularia oryzae	1151	1151	97%	0.0	98.04%	4460276	CP060334.1
☒	Pyricularia oryzae strain B71 chromosome 1	Pyricularia oryzae	1149	6725	97%	0.0	98.04%	6668242	CP060330.1

Hình 3

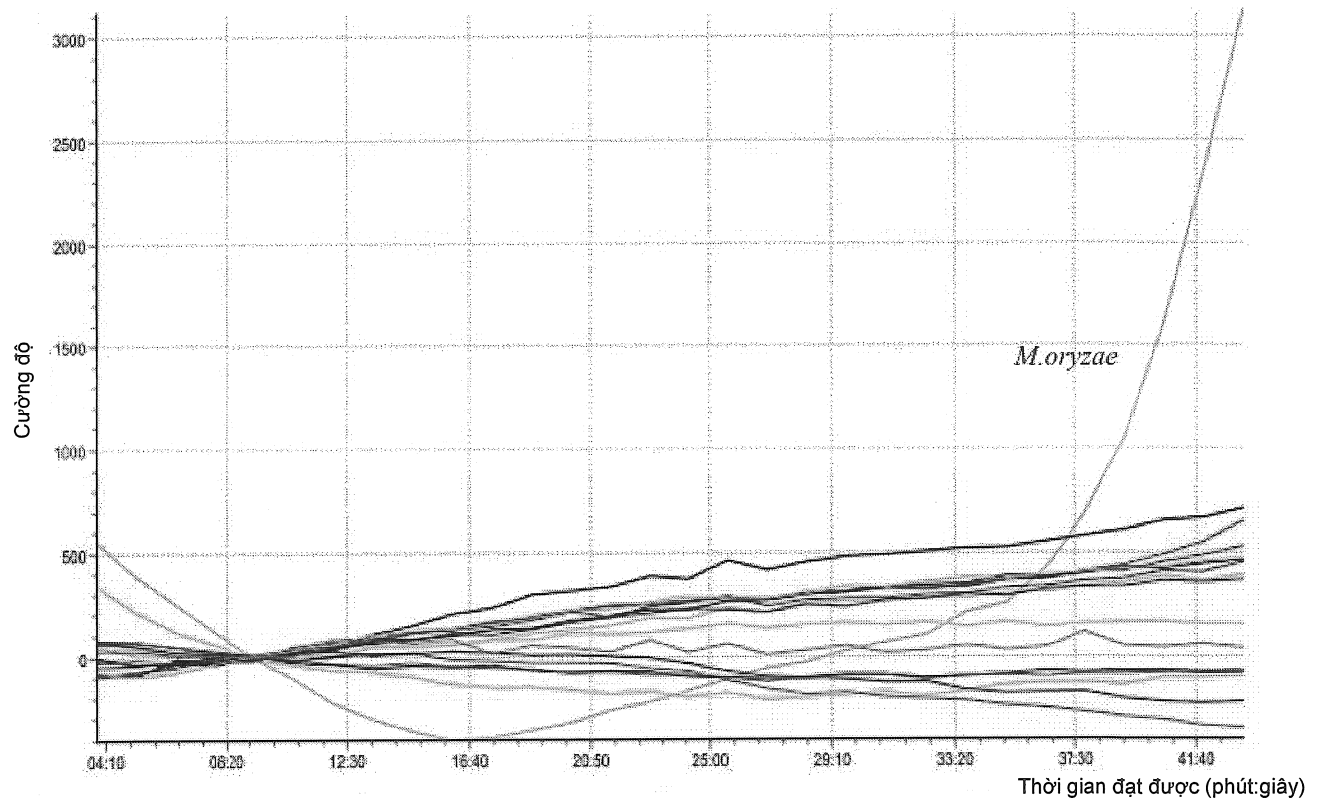
41733



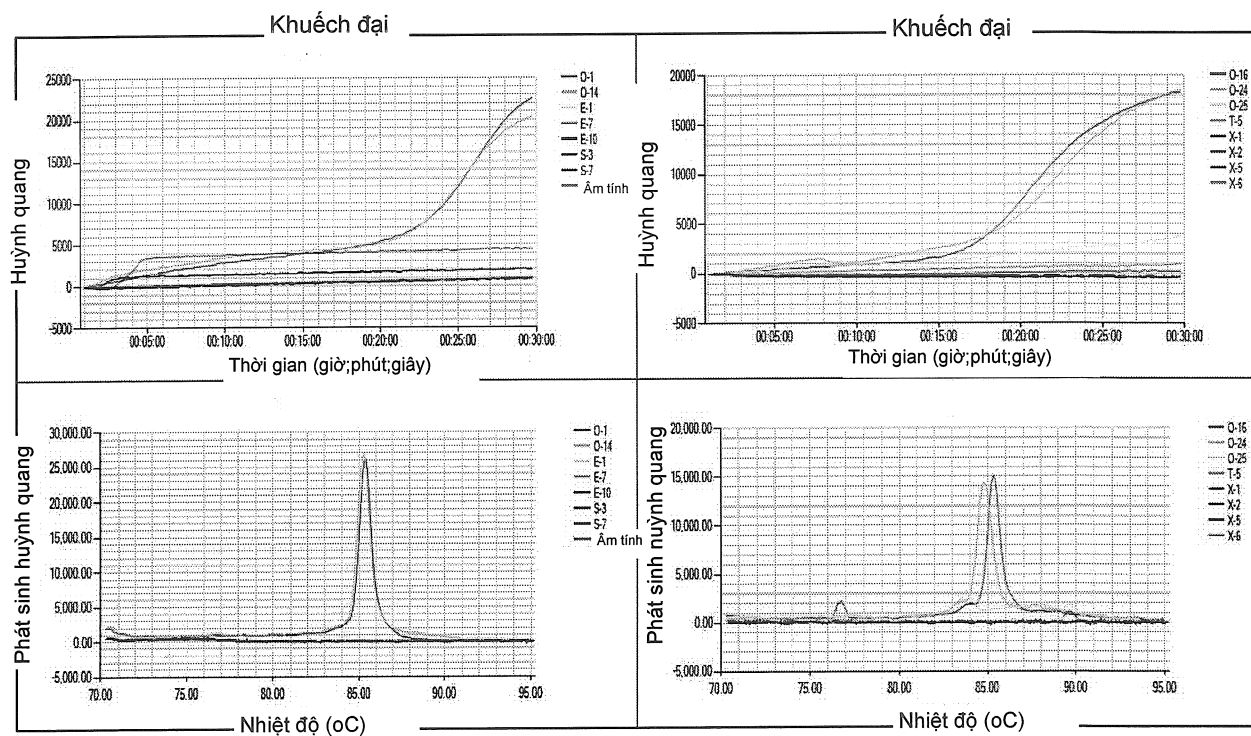
Hình 4



Hình 5



Hình 6



Hình 7

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> NGUYỄN BẢO QUỐC

<120> CẤP ĐOẠN MỖI PCR-M_o VÀ CÁC ĐOẠN MỖI LAMP-M_o ĐỂ PHÁT HIỆN NẤM
MAGNAPORTHE ORYZE GÂY BỆNH ĐẠO ÔN TRÊN LÚA

<160> 1

<210> SEQ ID NO.1

<211> 677

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400>

CGGTTTCATTAACCTCTTCTTCAACCGTTGGATTTATCGGTTTTTGGGCCGTAA
 AGGAAGCTTATCGACGTCACCTGGGATTTGTAAACCAGTTTTGCTGTTCAACG
 GTTGTTGGGAAACGAACTTTCTACTTTGCTATCGAAAAGCCAGATCAAAAG
 CATTTATAGCAAAAACCATTCAATCTGGTTGGCGTACGACGGGGTTATGGCC
 GGTGAACTTGGCAAAACCACTTTTAAACCCTTTTTTGTTAGAAAATAGCAACG
 CCAACGTCGAAAAAGGTAAAAATAACGGCTTCCAAAGGGATAAAACACCGG
 AAAATCCAACCCAACAAATTAACGACCGGTCTTTACTTATTTGGAAAACCCCT
 AAAACGACCCGAGATATTCGACTTCAACTACAGGAAATTTCCCGGTCCGAAA
 AAAGTAACGCCACTTCACGGCTTTTGTTTGCAAAAGTCCAAAAAAGCTTCGA
 AACCAAGGATATCTTATTGGCTGAAGCTCAGCAAAAAATCAGTTTGTTAAAC
 GCAAAATTGGAGGCGGTACGGCCGGTCAAAAGGAAAAGGGTGATTCCGGAT
 CCCAACGAGCTTTTGGTCAGCAAAAAAACGTTTATGAAGCACAGGAAAATA
 ATAGGGACTGTTTAGAAGCTTTGAACGATGAAGAAGAGGTTAATGAACCG

<160> 2

<210> SEQ ID NO.2

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400>

GAAGCTTATCGACGTCACCTG

<160> 3
<210> SEQ ID NO.3
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<400>

CCTCTTCTTCATCGTTCAAAGC

<160> 4
<210> SEQ ID NO.4
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<400>

GCTTATCGACGTCACCTG

<160> 5
<210> SEQ ID NO.5
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<400>

GCTATTTTCTAACAAAAAAGGGT

<160> 6
<210> SEQ ID NO.6
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<400>

TGGCTTTTCGATAGCAAAGTAGAAAATTTGTAAACCAGTTTTGCTGTT

<160> 7
<210> SEQ ID NO.7
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<400>

AACCATTCAATCTGGTTGGCGAAGTGGTTTTGCCAAGTTC

<160> 8
<210> SEQ ID NO.8
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<400>

AACCAACGCTACTTCTTCACG

<160> 9
<210> SEQ ID NO.9
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<400>

CGGTTCATTAACCTCTTCTTCA

<160> 10
<210> SEQ ID NO.10
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự tham khảo
<400>

CCCTTGTCCTGTTTGAGATCA

<160> 11
 <210> SEQ ID NO.11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự tham khảo
 <400>

TGAACCGGAGAAGCGTGAAA

<160> 12
 <210> SEQ ID NO.12
 <211> 610
 <212> ADN
 <213> Trình tự khuếch đại
 <400>

GAAGCTTATCGACGTCACCTGGGATTTGTAAACCAGTTTTGCTGTTCAACGGT
 TGTTGGGAAACGAACTTTCTACTTTGCTATCGAAAAGCCAGATCAAAAGCA
 TTTATAGCAAAAACCATTCATCTGGTTGGCGTACGACGGGGTTATGGCCGG
 TGAACCTGGCAAAACCACTTTTAAACCCTTTTTTGTAGAAAATAGCAACGCC
 AACGTCGAAAAAGGTAAAAATAACGGCTTCCAAAGGGATAAAACACCGGAA
 AATCCAACCCAACAAATTAACGACCGGTCTTTACTTATTTGGAAAACCCCTAA
 AACGACCCGAGATATTCGACTTCAACTACAGGAAATTTCCCGGTCCGAAAAA
 AGTAACGCCACTTCACGGCTTTTGTGTTGCAAAAAGTCCAAAAAAGCTTCGAAA
 CCAAGGATATCTTATTGGCTGAAGCTCAGCAAAAAATCAGTTTGTAAACGC
 AAAATTGGAGGCGGTACGGCCGGTCAAAAGGAAAAGGGTGATTCCGGATCC
 CAACGAGCTTTTGGTCAGCAAAAAAACGTTTATGAAGCACAGGAAAATAAT
 AGGGACTGTTTAGAAGCTTTGAACGATGAAGAAGAGG

<160> 13
 <210> SEQ ID NO.13
 <211> 201
 <212> ADN
 <213> Trình tự khuếch đại
 <400>

GCTTATCGACGTCACCTGGGATTTGTAAACCAGTTTTGCTGTTCAACGGTTGT
 TGGGAAACGAACTTTCTACTTTGCTATCGAAAAGCCAGATCAAAAGCATTT
 ATAGCAAAAACCATTCATCTGGTTGGCGTACGACGGGGTTATGGCCGGTGA
 ACTTGGCAAAACCACTTTTAAACCCTTTTTTGTAGAAAATAGC