

ĐA DẠNG ADN GENOME CÁC CHỦNG VI KHUẨN (*PSEUDOMONAS SOLANACEARUM*) GÂY BỆNH HÉO XANH CÂY LẠC BẰNG KỸ THUẬT RADP

ĐINH THỊ PHÒNG, ĐỖ TIẾN PHÁT, NGUYỄN THỊ YẾN

1. MỞ ĐẦU

Bệnh héo xanh vi khuẩn (còn gọi là bệnh héo rũ) là một trong những loại bệnh gây tổn thất khá lớn cho sản xuất lạc ở trên thế giới và Việt Nam. Nguyên nhân gây bệnh là do vi khuẩn *Pseudomonas solanacearum*. Cây lạc bị bệnh có biểu hiện: các lá ngọn bị héo rũ trước và củ màu xanh tái, tiếp đến là các lá và cành phía dưới cũng héo rũ, cây lạc chết rất nhanh, chóp rễ có màu nâu đen và thối, khi cắt ngang thân cây bị bệnh có thể thấy bó mạch dẫn màu nâu đen, bóp mạnh vết cắt ở bó mạch có thể thấy dịch nhờn vi khuẩn tiết ra có màu trắng sữa [8]. Nguồn bệnh chủ yếu tồn đọng ở đất và hạt giống. Tác hại của bệnh héo xanh vi khuẩn tùy thuộc vào đất trồng. Qua thực tế sản xuất ở nước ta cho thấy những vùng đất thấp có độ cao dưới 600 m so với mực nước biển dễ xuất hiện bệnh héo xanh, trong khi ở những vùng đất cao trên 1500 m thường ít xuất hiện. Mức độ thiệt hại về năng suất khi cây lạc bị bệnh là tương đối lớn, chẳng hạn ở Trung Quốc là từ 1% - 100%, Indonesia từ 5% - 65%, Thái Lan trên 50% và ở Việt Nam là từ 5% - 80% [6].

Vi khuẩn gây bệnh có phạm vi ký chủ rộng, ngoài lạc còn gây bệnh cho cà chua, cà tím, khoai tây, thuốc lá, vừng... Vì vậy, việc phòng trừ bệnh và chọn tạo giống kháng bệnh gặp rất nhiều khó khăn. Nghiên cứu về vi khuẩn gây bệnh héo xanh đã được tiến hành tại nhiều cơ quan như: Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam, Viện Bảo vệ Thực vật và Trường Đại học Nông nghiệp I Hà Nội. Tuy nhiên các nghiên cứu mới chỉ dừng lại ở mức độ đánh giá đa dạng hình thái vi khuẩn trên môi trường phân lập. Hiện nay phương pháp sinh học phân tử trong đánh giá đa dạng di truyền rất có giá trị ở hầu hết các loài sinh vật [1 - 5, 7]. Trong đó kỹ thuật RAPD tỏ ra hiệu quả cao và kỹ thuật tương đối đơn giản [10]. Để đánh giá sự đa dạng di truyền của các chủng vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên cây lạc, Bộ môn Di truyền và Miễn dịch thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam đã tiến hành xác định và phân lập các nòi của vi khuẩn *P. solanacearum* Smith thu thập từ một số địa phương ở phía Bắc. Bài báo tập trung vào nghiên cứu “*phân tích sự đa dạng genome của các chủng khuẩn Pseudomonas solanacearum gây bệnh héo xanh cây lạc bằng kỹ thuật RADP*” làm cơ sở khoa học cho việc xác định nhận dạng độc tính của các nòi gây bệnh ở một số địa phương khác nhau để tìm ra các giải pháp phòng trừ thích hợp.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Chủng khuẩn: Bao gồm 6 chủng vi khuẩn *Pseudomonas solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cây lạc do Bộ môn Di truyền và Miễn dịch thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam (KHNNVN) thu thập tại một số địa phương năm 2005 như bảng 1.

Bảng 1. Địa điểm thu thập các chủng vi khuẩn gây bệnh héo xanh lác

STT	Tên chủng	Nơi thu thập
1	Chủng P1	Nông trường Thanh Hà, Kim Bôi, Hòa Bình
2	Chủng P2	Huyện Chờ Linh, Hải Dương
3	Chủng P3	Huyện Chương Mỹ, Hà Tây
4	Chủng P4	Huyện Lương Sơn, Hòa Bình
5	Chủng P5	Huyện Phong Vân, Ba Vì, Hà Tây
6	Chủng P6	Huyện Phật Lại, Ba Vì, Hà Tây

Phương pháp phân lập và nuôi cấy vi khuẩn *P. solanacearum* dựa theo Kelman và cộng sự, 1995. Phân lập vi khuẩn trên môi trường TZCA và nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường SPA (Các công việc này do Bộ môn Miễn dịch thực vật, Viện KHNNVN thực hiện).

Các môi sử dụng trong phản ứng RADP: Trình tự các nucleotide của 20 môi ngẫu nhiên sử dụng cho phân tích genome của 6 chủng vi khuẩn *P. solanacearum* gây bệnh héo xanh cây lác như trong bảng 2.

Bảng 2. Trình tự các nucleotide của 20 môi RAPD sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên môi	Trình tự môi	STT	Tên môi	Trình tự môi
1	RA31	5'AACCGACGGG3'	11	OPE20	5'AACGGTGACC3'
2	RA32	5'GGGGGTCGTT3'	12	UBC302	5'CGGCCACGT3'
3	RA36	5'TACCACCCCG3'	13	OPO11	5'AACGCGTCGG3'
4	RA40	5'GGCGGACTGT3'	14	OPL3	5'CCAGCAGCTT3'
5	RA45	5'TACCACCCCG3'	15	OPG13	5'CTCTCCGCCA3'
6	RA46	5'CCAGACCCTG3'	16	OPA04	5'AATCGGGCTG3'
7	RA50	5'GCTGTGCCAG3'	17	OPF10	5'GGAAGCTTGG3'
8	RA142	5'CAATCGCCGT3'	18	UBC348	5'CACGGCTGCG3'
9	RA143	5'TCGGCGATAG3'	19	OPA17	5'GACCGCTTGT3'
10	RA159	5'GTCCACACGG3'	20	OPD11	5'AGCGCCATTG3'

Hoá chất và thiết bị máy móc: Taq ADN polymeraza (Perkin-Elmer); máy đo quang phổ Diod Array Spectrophotometer (Mỹ), máy li tâm AvantiTM30, máy PCR-Thermal Cycler PTC 100 và các hoá chất sinh học phân tử của hãng Sigma (Mỹ).

2.2. Phương pháp

Tách chiết ADN tổng số từ dịch khuẩn: Tách chiết ADN dựa theo phương pháp của Murray và Thompson, 1980.

Phản ứng PCR – RAPD: Một phản ứng PCR có thể tích 25 μ l: Bao gồm dung dịch đệm PCR 1X, 2,5 mM $MgCl_2$, 100 μ l dNTPs, 200 nM đoạn mồi, 0,125 đơn vị *Taq* polymeraza và 10 ng ADN khuôn. Phản ứng PCR-RAPD thực hiện trong máy PCR - Thermal Cycler PTC 100 theo chu trình nhiệt: Bước 1: 94°C trong 3 phút; Bước 2: 92°C trong 1 phút; Bước 3: 35°C trong 1 phút; Bước 4: 72°C trong 1 phút, từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 45 chu kỳ; Bước 5: 72°C trong 10 phút; Bước 6: giữ ở 4°C. Điện di sản phẩm PCR trên gel agarosa 1,8%, nhuộm Ethidium bromide và chụp ảnh trên máy soi gel.

Phân tích số liệu: Dựa trên sự xuất hiện hay không xuất hiện của các phân đoạn ADN khi điện di sản phẩm RAPD với các đoạn mồi ngẫu nhiên của 6 chủng vi khuẩn làm cơ sở cho việc phân tích số liệu. Tiêu chuẩn hoá sản phẩm RAPD theo quy ước: số 1- xuất hiện phân đoạn ADN; số 0 - không xuất hiện phân đoạn ADN. Xác định hệ số di truyền giống nhau, giá trị PIC, giá trị tương quan kiểu hình (r)... để lập ra biểu đồ so sánh hệ số tương đồng di truyền giữa 6 chủng vi khuẩn ở mức độ phân tử như trong công trình của Đinh Thị Phòng và CS, 2004. Số liệu được xử lý bằng chương trình NTSYSp version 2.0 (Applied Biostatistics Inc., USA., 1998).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân tích đa hình ADN bằng kỹ thuật RAPD

ADN genome của 6 chủng vi khuẩn đã được phân tích với 20 mồi ngẫu nhiên. Đánh giá tính đa hình thông qua giá trị PIC (giá trị PIC càng lớn thì tính đa hình của cặp mồi đó càng cao), khoảng cách di truyền thông qua hệ số tương đồng và biểu đồ hình cây.

Sản phẩm PCR-RAPD khi phân tích với 20 mồi ngẫu nhiên được điện di trên gel agarosa 1,8% để phân tích tính đa hình ADN của 6 chủng vi khuẩn nghiên cứu. Số phân đoạn ADN nhân bản được dao động từ 1 - 13 phân đoạn, tổng số phân đoạn ADN nhân bản được là 616 (bảng 3).

Bảng 3. Tổng số phân đoạn ADN xuất hiện của 6 chủng vi khuẩn khi phân tích với 20 mồi ngẫu nhiên

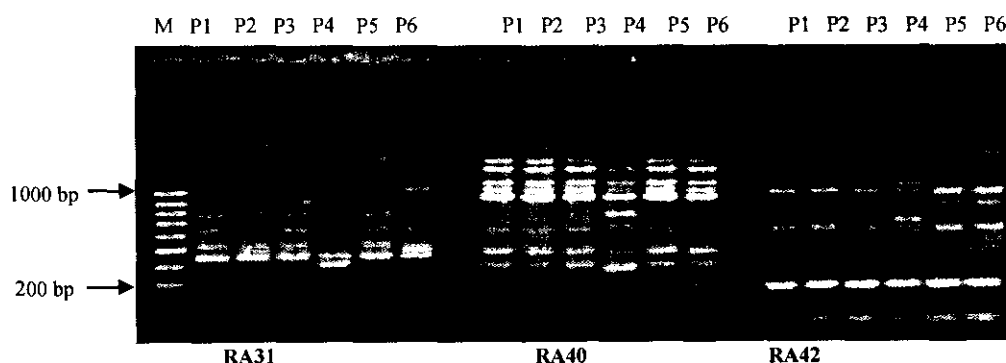
STT	Mồi	P1	P2	P3	P4	P5	P6	Tổng phân đoạn ADN
1	RA31	6	7	6	3	6	7	35
2	RA32	11	11	11	12	12	13	70
3	RA36	6	5	6	5	5	6	33
4	RA40	8	8	8	8	8	9	49
5	RA45	5	5	5	6	5	5	31
6	RA46	3	3	3	3	3	3	18
7	RA50	8	8	8	9	8	8	49
8	RA142	6	6	7	7	7	7	40
9	RA143	6	6	6	6	6	6	36
10	RA159	7	7	7	8	7	4	40

11	OPE20	6	6	6	5	6	4	33
12	UPC302	5	5	4	5	4	4	27
13	OPO11	3	3	3	2	3	3	17
14	OPL3	5	4	5	4	5	5	28
15	OPG13	3	3	3	2	3	3	17
16	OPA04	6	7	6	3	6	4	32
17	OPF10	1	1	1	1	1	1	6
18	UBC384	3	3	3	3	3	3	18
19	OPA17	1	1	1	1	1	2	7
20	OPD11	5	5	5	5	5	5	30
	Tổng	104	104	104	98	104	102	616

Bảng 3 cho thấy, trong số 20 môi phân tích, số phân đoạn ADN nhân bản được của 6 chủng vi khuẩn với mỗi RA32 là nhiều nhất (70 phân đoạn) và ít nhất là mỗi OPF10 (6 phân đoạn). Bốn chủng vi khuẩn (P1; P2; P3; P5) có số phân đoạn ADN được nhân bản bằng nhau (104 phân đoạn). Trong sáu chủng vi khuẩn phân tích thì có chủng P4 là có số phân đoạn ADN nhân bản được thấp nhất (98 phân đoạn).

Tổng số phân đoạn ADN của 6 chủng vi khuẩn khi phân tích 20 mỗi ngẫu nhiên là 126 phân đoạn. Trong đó có 47 phân đoạn là đa hình (chiếm 37,30%) và không đa hình là 79 phân đoạn (62,69%). Mỗi RA31 cho tính đa hình cao nhất (77,77%) và năm mỗi RA46; RA143; OPF10; UBC384 và OPD11 không cho tính đa hình (0%) đối với cả 6 chủng vi khuẩn (bảng 4). Kết quả này cũng phù hợp khi phân tích hàm lượng thông tin đa hình (giá trị PIC). Cụ thể: giá trị PIC của mỗi RA46; RA143; OPF10; UBC384 và OPD11 là 0 (không đa hình) và giá trị PIC của mỗi RA31 lớn nhất là 0,48 (đa hình cao nhất).

Tính đa hình thể hiện ở sự xuất hiện hay không xuất hiện của các phân đoạn ADN khi so sánh giữa các chủng với nhau trong cùng 1 môi. Chẳng hạn tại vị trí khoảng 300 bp, 800 bp và 600 bp, chủng P4 xuất hiện phân đoạn ADN mới khi phân tích với mỗi RA31, RA40 và RA42 (tương ứng) (hình 1).



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm RAPD của 6 chủng vi khuẩn với các môi RA31; RA40; RA42. (M. Thang ADN chuẩn 100 bp; P1, P2...P6 các chủng khuẩn nghiên cứu)

Bảng 4. Tính đa hình của 6 chủng vi khuẩn khi phân tích với 20 môi ngẫu nhiên

STT	Môi	Số phân đoạn ADN được nhân bản	Số phân đoạn đa hình	Số phân đoạn không đa hình	% phân đoạn đa hình (%)	Giá trị PIC
1	RA31	9	7	2	77,77	0,48
2	RA32	13	4	9	30,76	0,21
3	RA36	8	4	4	50,00	0,39
4	RA40	11	5	6	45,45	0,32
5	RA45	6	1	5	16,66	0,16
6	RA46	3	0	3	0,00	0,00
7	RA50	9	1	8	11,11	0,11
8	RA142	9	4	5	44,44	0,33
9	RA143	6	0	6	0,00	0,00
10	RA159	10	7	3	70,00	0,41
11	OPE20	7	3	4	42,85	0,32
12	UPC302	6	2	4	33,33	0,30
13	OPO11	3	1	2	33,33	0,10
14	OPL3	5	1	4	0,20	0,11
15	OPG13	3	1	2	33,33	0,10
16	OPA04	7	5	2	71,43	0,47
17	OPF10	1	0	1	0,00	0,00
18	UBC384	3	0	3	0,00	0,00
19	OPA17	2	1	1	50,00	0,44
20	OPD11	5	0	5	0,00	0,00
	Tổng	126	47	79	37,30	

3.2. Mối quan hệ di truyền giữa sáu chủng vi khuẩn dựa trên phân tích RAPD

Trước khi thiết lập biểu đồ hình cây, chúng tôi đã tiến hành xác định giá trị tương quan kiểu hình theo ba phương pháp tính hệ số di truyền giống nhau (phương pháp của Jaccard, Nei & Li và Sokal) với bốn kiểu phân nhóm (WPGMA, UPGMA, liên kết hoàn toàn và liên kết đơn lẻ) (bảng 5). Biểu đồ hình cây được thiết lập dựa trên giá trị tương quan cao nhất với các giá trị khi $r \geq 0,9$: tương quan rất chặt, $r = 0,8 - 0,9$: tương quan chặt, $r = 0,7 - 0,8$: tương quan tương đối chặt, $r \leq 0,7$: tương quan không chặt.

Bảng 5. Giá trị tương quan kiểu hình (r)

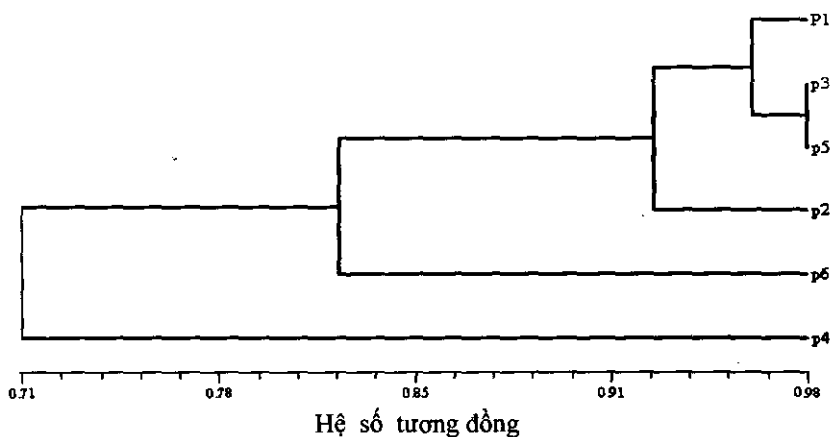
	UPGMA	WPGMA	Liên kết hoàn toàn	Liên kết đơn lẻ
SM	0,98879	0,98842	0,98849	0,98852
Dice	0,98809	0,98768	0,98778	0,98782
Jaccar	0,99013	0,98980	0,98978	0,98979

Bảng 6 cho thấy, với ba cách tính hệ số di truyền giống nhau và bốn kiểu phân nhóm đều phản ánh mối tương quan kiểu hình của 6 chủng vi khuẩn héo xanh lục là rất chặt (hệ số r đạt từ 0,98768 tới 0,99013). Trong đó giá trị tương quan kiểu hình (r) lớn nhất là 0,99013 khi tính theo hệ số di truyền của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA. Vì vậy, sơ đồ hình cây được thiết lập theo hệ số di truyền giống nhau Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA.

Bảng 6. Hệ số tương đồng giữa các chủng vi khuẩn nghiên cứu

	P1	P2	P3	P4	P5	P6
P1	1,000					
P2	0,935	1,000				
P3	0,971	0,926	1,000			
P4	0,712	0,720	0,720	1,000		
P5	0,953	0,926	0,981	0,735	1,000	
P6	0,798	0,823	0,823	0,675	0,839	1,000

Hệ số tương đồng của các chủng vi khuẩn khá cao từ 0,675 - 0,981, hệ số tương đồng thấp nhất khi so sánh giữa P4 và P6 (0,675) và đạt cao nhất giữa P3 và P5 (0,981) (bảng 6). Mức độ sai khác giữa các chủng khuẩn khi phân tích với 20 mỗi ngẫu nhiên trên sơ đồ hình cây (hình 2) chia thành 2 nhánh cây chính:



Hình 2. Biểu đồ hình cây của 6 chủng vi khuẩn theo hệ số di truyền giống nhau của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA

- Nhánh 1 chỉ có một chủng P4 và có sự sai khác so với 5 chủng vi khuẩn còn lại là 29% (1 - 0,71).

- Nhánh còn lại chứa 5 chủng P1; P2; P3; P5; P6, giữa các chủng có sự sai khác di truyền là 18% (1 - 0,82). Trong đó có hai chủng P3 và P5 có sai khác về hệ số di truyền rất thấp 0,02% (1 - 0,98). Tuy nhiên để có thể kết luận hai chủng này có giống nhau hoàn toàn hay không thì nên sử dụng số lượng mẫu lớn hơn để phân tích.

Xét mối quan hệ địa lý giữa các chủng chúng tôi thấy: Các chủng phân lập trong cùng một vùng địa lý cũng có sự sai khác rõ ràng. Chẳng hạn như ba chủng P3, P5 và P6 cùng thu tại Hà Tây nhưng chủng P6 lại khác biệt với hai chủng còn lại. Tương tự như vậy, chủng P1 và P4 cùng được phân lập tại Hòa Bình nhưng lại có sự khác biệt lớn về di truyền và nằm tách biệt ở hai nhánh của cây phân loại. Điều này cho thấy sự đa dạng của vi khuẩn gây bệnh héo xanh *Pseudomonas solanacearum* không chỉ thể hiện ở nhiều ký chủ mà còn đa dạng về môi trường sống trong cùng một vùng sinh thái.

Như vậy, với việc sử dụng 20 mẫu phân tích đã chỉ ra được sự sai khác di truyền của 6 chủng khuẩn phân lập ở các địa phương khác nhau.

4. KẾT LUẬN

Khi phân tích tính đa hình của 6 chủng khuẩn với 20 mẫu ngẫu nhiên thì có 15/20 cho tính đa hình. Trong phạm vi vùng phân tích có 126 phân đoạn ADN được nhân bản, số lượng phân đoạn ADN được nhân bản của các mẫu dao động từ 1 đến 13.

Hệ số sai khác di truyền giữa 6 chủng khuẩn nghiên cứu là từ 0,02% đến 29%. Chủng P4 có sự sai khác rõ rệt với các chủng còn lại, hai chủng P3 và P5 có sự giống nhau đến 98%. Sự đa dạng của các chủng còn thể hiện ngay trên cùng một vùng địa lý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đinh Thị Phong, Jonathan H Crouch - Diversity of late leaf spot resistant cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm based on SSR markers, *Advance in Natural Science* 6 (1) (2005) 12-21.
2. Đinh Thị Phòng, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội, Nguyễn Thị Hải Hà, Lê Duy Thành, Nguyễn Văn Viết - Nghiên cứu đa dạng tập đoàn giống lúa có tính kháng khác nhau với bệnh bạc lá lúa vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* bằng kỹ thuật RAPD, *Báo cáo khoa học Hội nghị toàn quốc về Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống định hướng nông lâm nghiệp miền núi*, Thái Nguyên 23/9/2004, tr. 571-574.
3. Đinh Thị Phòng, Nguyễn Văn Thắng, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội - Sử dụng chỉ thị SSR để phân tích đa dạng tập đoàn giống lạc (*Arachis hypogaea* L.) Việt Nam kháng bệnh rỉ sắt, *Tạp chí KH và CN* 43 (1) (2005) 84-92.
4. Đinh Thị Phong, Emma Marce, Jonathan H. C. - Application of SSR in diversity analysis of groundnut genotypes resistant to early leaf spot, *Tạp chí Sinh học* 1 (3) (2003) 333-346.
5. Kelman A.- The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium, *Phytopathology* 44 (1954) 639-695.
6. <http://www.ppd.gov.vn/tapsanbvtv/2005/so5/Thành phần gây bệnh héo xanh trên đồng ruộng>
7. Lê Thị Muội, Đinh Thị Phòng, Nguyễn Thị Hải, Lê Duy Thành, Trần Văn Dương, Nguyễn Văn Thắng - Đa hình genome tập đoàn giống lạc có phản ứng khác nhau với bệnh héo

xanh vi khuẩn bằng các chỉ thị SSR, BCKHHN toàn quốc về *Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống*, Hà Nội 2/11/2005, tr. 1321-1324.

8. Murray M. G., Thompson W. F. - Rapid isolation of high molecular weight DNA, *Nucleic Acids Res.* 8 (1980) 4321-4325.
9. Vũ Triệu Mân, Lê lương Tề - *Giáo trình bệnh cây nông nghiệp*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, 2001.
10. Wachia FN., Waugh R. , Hackett CA., Powell W (1995) Detection of genetic diversity in tea using RAPD markers. *Genome* 38: 201 – 210.

SUMMARY

DNA DIVERSITY OF BACTERIAL STRAINS (*PSEUDOMONAS SOLANACEARUM*) CAUSED BACTERIAL WILT DISEASE IN PEANUT BY RAPD MARKERS

Bacterial wilt disease of peanut caused by *pseudomonas solanacearum* is among the major diseases causing significant yield loss in peanut. Molecular marker analysis of bacterial strains would be of use for peanut breeders, geneticists and taxonomists. Twenty RAPD primers were screened for their ability to reveal polymorphism between sixty collected *pseudomonas solanacearum* strains in the different local of bacterial wilt disease. Overall, 20 markers employed in this study revealed polymorphism, with a total of 616 fragments observed in the 6 bacterial strains screened with values PIC from 0 to 0,48.

The dendrogram was divided into two the main group. The first group includes a strain P4 at a dissimilarity threshold of 28% in the dendrogram. The second group includes 5 strains, among two strains P3 and P5 have lowest genetic coefficient 98%.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 29 tháng 2 năm 2008

Đinh Thị Phòng, Đỗ Tiến Phát,

Viện Công nghệ sinh học, Viện KH và CNVN.

Nguyễn Thị Yến,

Viện Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam.