

Phát hiện và giám định nhanh vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn bằng kỹ thuật PCR

Dương Thị Nguyên¹, Trịnh Xuân Hoat^{2*}

¹Trường Đại học Nông lâm, Đại học Thái Nguyên

²Viện Bảo vệ thực vật, VAAAS

Ngày nhận bài 7/9/2017, ngày chuyển phản biện 11/9/2017, ngày nhận phản biện 6/10/2017, ngày chấp nhận đăng 18/10/2017

Tóm tắt:

Sắn (*Manihot esculenta* Crantz) là một trong những loại cây trồng quan trọng ở Việt Nam, cung cấp tinh bột và nguyên liệu thô phục vụ sản xuất nhiên liệu sinh học. Bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn do *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* gây ra, đã ảnh hưởng đến sản xuất sắn tại Việt Nam. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật PCR đã được áp dụng với 2 cặp primer rpoD_17F/rpoD_1005R và XgyrconpcrF1/Xgyrconpcr1 đặc hiệu cho gen *rpoD* và *gyrB* tương ứng và sử dụng ADN tổng số được chiết xuất trực tiếp từ vết bệnh không qua bước phân lập và nuôi cấy vi khuẩn gây bệnh trên môi trường nhân tạo. Hai cặp primer đã khuếch đại đoạn ADN khoảng 900 bp từ 30 mẫu lá biểu hiện triệu chứng bệnh vi khuẩn tàn lụi. Sản phẩm PCR được giải trình tự trực tiếp và kết quả cho thấy, tất cả các trình tự ADN đều đồng nhất. Kết quả phân tích dựa trên trình tự gen *rpoD* hoặc *gyrB* đều có độ tương đồng 100% với 2 gen này của vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *manihotis* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi tại Đồng Nai (mã số MF774491 và MF774490 đối với gen *rpoD* và *gyrB*, tương ứng) và trên thế giới. Phân tích ADN và cây phả hệ đã khẳng định vi khuẩn *X. axonopodis* pv. *manihotis* là nguyên nhân gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn tại huyện Krông Pắc, M'Đrăk và Ea Kar, tỉnh Đắk Lắk. Đây là quy trình nhanh, có độ nhạy cao trong việc phát hiện và định loại loài *X. axonopodis* pv. *manihotis* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn không qua bước phân lập, nuôi cấy và làm thuần vi khuẩn gây bệnh.

Từ khóa: Bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn, *gyrB*, PCR, *rpoD*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Sắn (*Manihot esculenta* Crantz) với hàm lượng tinh bột cao (chiếm khoảng 30-60%) tổng lượng chất khô đã trở thành một trong những cây trồng quan trọng nhất trên thế giới, là nguồn thực phẩm và cung cấp nguyên liệu cho các ngành công nghiệp với nhiều mục đích khác nhau. Ở Việt Nam, cây sắn được coi là cây trồng cung cấp lương thực, nguồn tinh bột và nguyên liệu thô cho sản xuất ethanol sinh học... Đặc điểm quan trọng nhất của cây sắn là chịu được hạn hán và do đó được trồng rộng rãi ở các vùng miền núi, loại đất cận biên, nơi không có hệ thống tưới tiêu, nhu cầu phân bón thấp.

Tuy nhiên, trong những năm gần đây, sản xuất sắn ở Việt Nam đã bị ảnh hưởng bởi nhiều loại sâu, bệnh khác nhau, đặc biệt là rệp sáp bột hồng (*Phenacoccus manihoti*), bệnh chổi rồng (Cassava witches' broom - CaWB), bệnh thán thư (*Colletotrichum gloeosporioides*), bệnh vi khuẩn tàn lụi (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* - Xam) và bệnh vi rút khảm lá sắn (Cassava mosaic virus - CaMV). Ngoài bệnh chổi rồng và bệnh vi rút khảm lá sắn, thì bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn cũng được xem là một trong những bệnh quan trọng, ảnh hưởng đến cây sắn từ giai đoạn trồng đến

thu hoạch và có thể làm giảm sản lượng sắn lên đến 100% [1, 2].

Các phương pháp truyền thống để chẩn đoán và giám định vi khuẩn gây bệnh thực vật chủ yếu là nuôi cấy và phân tích khuẩn lạc trên đĩa môi trường, phản ứng sinh hóa, phân tích các axit béo và lây nhiễm nhân tạo [3-5]. Tuy nhiên, các phương pháp này thường tốn nhiều thời gian và có độ đặc hiệu thấp.

PCR và phân tích ADN đã trở thành công cụ hữu hiệu để phát hiện và giám định tác nhân gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn như PCR [6], RAPDs [7], RFLPs [8], AFLP [9], nested-PCR và dot-blot assay [10, 11]. Tuy nhiên, những phương pháp này thường vẫn phải thực hiện bước phân lập, nuôi cấy và làm thuần vi khuẩn gây bệnh trên môi trường nhân tạo; và ADN của vi khuẩn được chiết xuất từ dung dịch môi trường lỏng nuôi cấy vi khuẩn.

Để phát triển kỹ thuật giám định nhanh tác nhân gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn, kỹ thuật PCR đã được áp dụng với hai cặp primer đặc hiệu cho gen *rpoD* và *gyrB* sử dụng ADN chiết xuất trực tiếp từ vết bệnh mà không qua bước phân lập, nuôi cấy, làm thuần và nhân sinh khối vi khuẩn gây bệnh.

*Tác giả liên hệ: Tel: 0912363688; Email: trinxuanhoatppri@gmail.com

Rapid detection and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* causing cassava bacterial blight based on PCR technique

Thi Nguyen Duong¹, Xuan Hoat Trinh^{2*}

¹College of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen University

²Plant Protection Research Institute, VAAS

Received 7 September 2017; accepted 18 October 2017

Abstract:

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is one of the most important crops in Vietnam, providing food, starch sources, and raw materials for production of bio-fuel. Cassava bacterial blight disease caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) has affected cassava production in Vietnam. In the present study, PCR technique applied the primers rpoD_17F/rpoD_1005R and XgyrconpcrF1/Xgyrconpcr1 specific for *rpoD* and *gyrB* genes, respectively with genomic DNAs extracted directly from the symptomatic leaves without isolation and pure culture of the causal bacterium. The two primer pairs amplified amplicons of about 900 bp from the 30 symptomatic leaf samples collected from Krong Pac, M'Drak, and Ea Kar districts of Dak Lak province. The amplified DNA sequences were identical in each gene and shared 100% similarity to that of Xam. Phylogenetic trees were constructed with the sequences of *rpoD* and *gyrB* genes of different *Xanthomonas* species from GenBank. The results indicated that the bacterial species analysed by either *rpoD* or *gyrB* as the target genes showed 100% identity with that of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* causing cassava bacterial blight disease in Dong Nai, Vietnam (Accession numbers: MF774491 and MF774490, respectively) and in some other countries. DNA and phylogenetic analysis based on the sequences of *rpoD* and *gyrB* genes have confirmed that *X. axonopodis* pv. *manihotis* is the causal agent of cassava bacterial blight in Krong Pak, M'Drak, and Ea Kar districts of Dak Lak province, Vietnam. The protocol in this study is rapid and sensitive for detection and identification of *X. axonopodis* pv. *manihotis* without isolation and pure culture of the causal bacterium.

Keywords: Cassava bacterial blight, *gyrB*, PCR, *rpoD*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.

Classification number: 4.6

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

30 mẫu lá sắn biểu hiện triệu chứng bệnh vi khuẩn tàn lụi đã được thu thập tại các huyện Krông Pắc, M'Đrăk và Ea Kar của tỉnh Đắk Lắk trong tháng 8/2017.

Chiết xuất ADN tổng số và phân tích gen

ADN tổng số được chiết xuất từ mẫu lá sắn bao gồm một phần mô khỏe và mô bệnh (như mô tả ở hình 1) bằng phương pháp CTAB theo J.J. Doyle và J.L. Doyle (1990) [12].



Hình 1. Thu thập, lựa chọn mẫu phục vụ chiết xuất ADN trực tiếp từ mô lá sắn bị nhiễm bệnh vi khuẩn tàn lụi.

(A) Triệu chứng điển hình của bệnh vi khuẩn tàn lụi thu thập trên đồng ruộng; (B) Loại bỏ mô lá bị hoại tử, có màu nâu (giới hạn trong hình thoi màu đỏ); (C) Chỉ sử dụng mô khỏe xung quanh viền vết bệnh và mô bệnh còn mới, có màu xanh tái phục vụ chiết xuất ADN.

Nồng độ ADN tổng số được đo bằng máy UV-Vis Spectrophotometer Optima SP-3000Nano (Indonesia) và được điều chỉnh thành nồng độ cuối cùng là 20 ng/μl cho tất cả các mẫu. Phản ứng PCR được thực hiện bằng cặp primer đặc hiệu cho gen *rpoD* rpoD_17F (5'-ATCTGACCTACGCCGAAGTC-3')/rpoD_1005R (5'-CTGCTGCTCGGAGATGATCT-3') đã được thiết kế và sử dụng bởi Kone và cs (2015) [13]; và cặp primer đặc hiệu cho gen *gyrB*, XgyrconpcrF1 (5'-AAGAGCGAGCTGTATCTGAAGGACGA-3')/Xgyrconpcr1 (5'-CGCGTCCTCGATGCGCACCTGCA-3') đã được thiết kế và sử dụng bởi Parkinson và cs (2007) [14].

Phản ứng PCR được thực hiện trong 25 μl dung dịch phản ứng, gồm 2,5 μl 10×PCR buffer (bao gồm 15 mM MgCl₂), 0,75 μl mỗi loại primer (10 μM), 2 μl dNTP mix (2,5 mM each), 0,125 μl Taq polymerase, 1 μl ADN tổng số (20 ng/μl) và điều chỉnh H₂O thành 25 μl. Mẫu ADN chiết xuất từ dung dịch nuôi cấy vi khuẩn Xam phân lập tại Đồng Nai làm đối chứng dương, ADN chiết xuất từ mẫu lá sắn khỏe và nước cất làm đối chứng âm. Điều kiện nhiệt độ cho phản ứng PCR bao gồm 4 phút tại 94°C, 35 chu kỳ với 94°C trong 30 s, Tm (50°C trong 45 s đối với cặp primer XgyrconpcrF1/Xgyrconpcr1 và 60°C trong 30 s đối với cặp primer rpoD_17F/rpoD_1005R) và 72°C trong 1 phút [13, 14] bằng thiết bị Mastercycler Pro (Eppendorf, Đức). Sản

phẩm PCR được điện di bằng 1% agarose gels trong 1×TAE buffer có chứa 0,5 µg/ml ethidium bromide và chụp ảnh bằng UV light of GelDoc-It® 310 Imaging System (United Kingdom).

Sản phẩm PCR được tinh sạch từ agarose gel sử dụng QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Đức) và được giải trình tự gen trực tiếp cả hai chiều bằng máy ABI3100 của Hàn Quốc sử dụng BigDye Terminator 3.1 Kit (Applied Biotech). Trình tự các mẫu được so sánh với Ngân hàng gen bằng phần mềm trực tuyến <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; cây phả hệ xây dựng theo phương pháp Neighbor-joining với khoảng cách di truyền giữa các chuỗi được xác định dựa trên mô hình thay thế Kimura hai tham số, giá trị thống kê bootstrap (%) với 1.000 lần lặp lại trong phần mềm MEGA 6.0 [15].

Kết quả và thảo luận

Kết quả thu thập mẫu bệnh và triệu chứng điển hình của bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn

Bảng 1. Kết quả thu thập mẫu bệnh vi khuẩn tàn lụi tại Đắk Lắk năm 2017

TT	Ký hiệu mẫu	Vị trí thu mẫu
1	EKBKPD1	Ea K'ly, Krông Pắc, Đắk Lắk
2	EKBKPD2	Ea K'ly, Krông Pắc, Đắk Lắk
3	EKBKPD3	Ea K'ly, Krông Pắc, Đắk Lắk
4	EKBKPD4	Ea K'ly, Krông Pắc, Đắk Lắk
5	EKBKPD5	Ea K'ly, Krông Pắc, Đắk Lắk
6	EKBKPD6	Ea K'ly, Krông Pắc, Đắk Lắk
7	ESEKDL1	Ea Sar, Ea Kar, Đắk Lắk
8	ESEKDL2	Ea Sar, Ea Kar, Đắk Lắk
9	ESEKDL3	Ea Sar, Ea Kar, Đắk Lắk
10	ESEKDL4	Ea Sar, Ea Kar, Đắk Lắk
11	ESEKDL5	Ea Sar, Ea Kar, Đắk Lắk
12	ESEKDL6	Ea Sar, Ea Kar, Đắk Lắk
13	KAMDDL1	Krông Á, M'Đrăk, Đắk Lắk
14	KAMDDL2	Krông Á, M'Đrăk, Đắk Lắk
15	KAMDDL3	Krông Á, M'Đrăk, Đắk Lắk
16	KAMDDL4	Krông Á, M'Đrăk, Đắk Lắk
17	KAMDDL5	Krông Á, M'Đrăk, Đắk Lắk
18	KAMDDL6	Krông Á, M'Đrăk, Đắk Lắk
19	QL26MDDL1	Quốc lộ 26, M'Đrăk, Đắk Lắk
20	QL26MDDL2	Quốc lộ 26, M'Đrăk, Đắk Lắk
21	QL26MDDL3	Quốc lộ 26, M'Đrăk, Đắk Lắk
22	QL26MDDL4	Quốc lộ 26, M'Đrăk, Đắk Lắk
23	QL26MDDL5	Quốc lộ 26, M'Đrăk, Đắk Lắk
24	QL26MDDL6	Quốc lộ 26, M'Đrăk, Đắk Lắk
25	QTMDDL1	Quang Trung, thị trấn M'Đrăk, M'Đrăk, Đắk Lắk
26	QTMDDL2	Quang Trung, thị trấn M'Đrăk, M'Đrăk, Đắk Lắk
27	QTMDDL3	Quang Trung, thị trấn M'Đrăk, M'Đrăk, Đắk Lắk
28	QTMDDL4	Quang Trung, thị trấn M'Đrăk, M'Đrăk, Đắk Lắk
29	QTMDDL5	Quang Trung, thị trấn M'Đrăk, M'Đrăk, Đắk Lắk
30	QTMDDL6	Quang Trung, thị trấn M'Đrăk, M'Đrăk, Đắk Lắk

Trong tháng 8/2017, đã thu thập 30 mẫu lá sắn biểu hiện triệu chứng điển hình của bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn tại tỉnh Đắk Lắk, bao gồm 6 mẫu tại xã Ea K'ly, huyện Krông Pắc; 6 mẫu tại xã Ea Sar, huyện Ea Kar; 6 mẫu tại xã Krông Á, huyện M'Đrăk; 6 mẫu tại Quốc lộ 26, huyện M'Đrăk; 6 mẫu tại đường Quang Trung, thị trấn M'Đrăk, huyện M'Đrăk (bảng 1).

Tất cả các mẫu đều có chung triệu chứng bệnh như: Bệnh có thể xuất hiện từ đầu lá hoặc mép lá và lan rộng vào phía trong phiến lá tạo thành vết bệnh có kích thước lớn và về sau vết bệnh có thể chiếm hết diện tích của lá. Vết bệnh thường có màu nâu, loang lổ; phần tiếp giáp với viền vết bệnh thường có màu xanh xám; phần mô khỏe giáp viền vết bệnh có thể có màu vàng (hình 2).



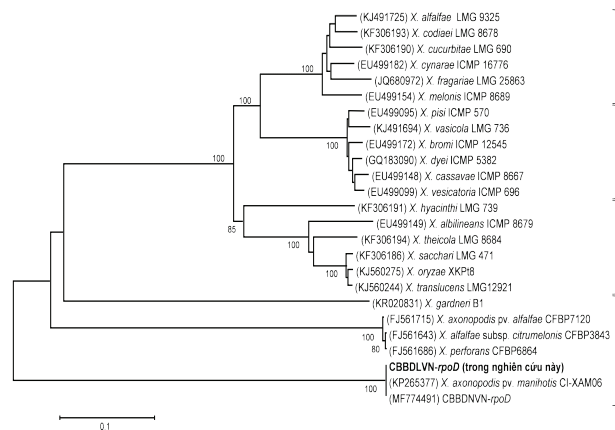
Hình 2. Triệu chứng điển hình của bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn thu thập tại huyện Krông Pắc, M'Đrăk và Ea Kar, tỉnh Đắk Lắk trong tháng 8/2017.

Phát hiện và xác định vi khuẩn tàn lụi dựa trên trình tự đoạn gen rpoD

Các sản phẩm PCR với chiều dài khoảng 900 bp được khuếch đại bằng cặp primer rpoD_17F/rpoD_1005R từ 30 mẫu lá sắn biểu hiện triệu chứng điển hình của bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn và mẫu ADN chiết xuất từ vi khuẩn *Xam* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn phân lập tại Đồng Nai (đối chứng dương), trong khi không có sản phẩm PCR nào được khuếch đại từ mẫu lá khỏe và mẫu nước (đối chứng âm) (số liệu không thể hiện). Tất cả 30 sản phẩm PCR được chiết xuất từ gel agarose và được giải mã trực tiếp cả hai chiều bằng các primer rpoD_17F và rpoD_1005. Kết quả giải trình tự cho thấy, các trình tự ADN của tất cả 30 sản

phẩm PCR đều đồng nhất và mẫu đại diện được ký hiệu là CBBDLVN-*rpoD* (Cassava Bacterial Blight in Dak Lak, Vietnam, gen *rpoD*).

Kết quả tìm kiếm BLAST cho thấy, CBBDLVN-*rpoD* có độ tương đồng 100% với trình tự đoạn gen *ropD* của *Xam* có mã số Ngân hàng gen KP265372, FJ561609, FJ561607 và MF774491; trong số đó, MF774491 là *Xam* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sản tại Đồng Nai, Việt Nam.



Hình 3. Cây phả hệ được xây dựng bằng phương pháp neighbour-joining, so sánh trình tự đoạn gen *rpoD* của vi khuẩn gây bệnh tàn lụi sản tại Đắk Lắk (CBBDLVN-*rpoD*) với 23 đoạn trình tự gen *rpoD* của vi khuẩn *Xam* khác nhau từ Ngân hàng gen và của vi khuẩn *Xam* phân lập từ Đồng Nai (CBBDNVN-*rpoD*, mã số MF774491). Mã số Ngân hàng Gen được ghi trong dấu ngoặc đơn.

Cây phả hệ được xây dựng dựa trên trình tự đoạn gen *rpoD* của vi khuẩn phân lập tại Đắk Lắk (CBBDLVN-*rpoD*) với 23 đoạn trình tự gen *rpoD* của các loài vi khuẩn khác nhau thuộc *Xanthomonas* từ Ngân hàng gen và vi khuẩn *Xam* phân lập từ Đồng Nai (CBBDNVN-*rpoD*, mã số MF774490) bằng phương pháp neighbour-joining với 1.000 bootstrap trong phần mềm MEGA6.0.

Các loài *Xam* phân nhánh đầu tiên bao gồm CBBDNVN-*rpoD* của Đồng Nai (mã số MF774490), CI-XAM06 (mã số KP265377), CBBDLVN-*rpoD* (trong nghiên cứu này), *X. perforans* CFBP6864 (mã số FJ561686), *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* CFBP3843 (mã số FJ561643) và *X. axonopodis* pv. *alfalfae* (mã số FJ561715).

Các loài *Xam* còn lại chia thành 3 nhóm chính khác nhau. Nhóm I với giá trị bootstrap là 85% bao gồm *X. translucens* LMG12921 (mã số KJ560244), *X. oryzae* XKPt8 (mã số KJ560275), *X. sacchari* LMG 471 (mã số KF306186), *X. theicola* LMG 8684, *X. albilineans* ICMP 8679 (mã số EU499149) và *X. hyacinthi* LMG 739 (mã số KF306191). Nhóm II với giá trị bootstrap 100% bao gồm *X. vesicatoria* ICMP 696 (EU499099), *X. cassavae* LMG 8667

(mã số EU499148), *X. dyei* ICMP 5382 (mã số GQ183090), *X. bromi* ICMP 12545 (mã số EU499172), *X. vasicola* LMG 736 (mã số KJ491694) và *X. pisi* ICMP 570 (mã số EU499095). Nhóm III với giá trị bootstrap 100% bao gồm *X. melonis* ICMP 8689 (EU499154), *X. fragariae* LMG 25863 (mã số JQ680972), *X. cynarae* ICMP 16776 (mã số EU499182), *X. cucurbitae* LMG 690 (mã số KF306190), *X. codiae* LMG 8678 (mã số KF306193) và *X. alfalfae* LMG 9325 (mã số KJ491725) (hình 3).

Như vậy, loài vi khuẩn phân lập tại Đắk Lắk thuộc nhóm các loài phân nhánh đầu tiên và có khoảng cách tương đồng khá xa so với 3 nhóm còn lại trên cây phả hệ.

Phát hiện và xác định vi khuẩn *Xam* dựa vào gen *gyrB*

Cặp primer XgyrconpcrF1/Xgyrconrper1 cũng khuếch đại trình tự của gen *gyrB* từ 30 mẫu lá sản biểu hiện triệu chứng vi khuẩn tàn lụi và mẫu ADN chiết xuất từ vi khuẩn *Xam* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sản phân lập tại Đồng Nai (đối chứng dương), trong khi không có sản phẩm PCR nào được khuếch đại từ mẫu lá khỏe và mẫu nước (đối chứng âm) (số liệu không thể hiện).

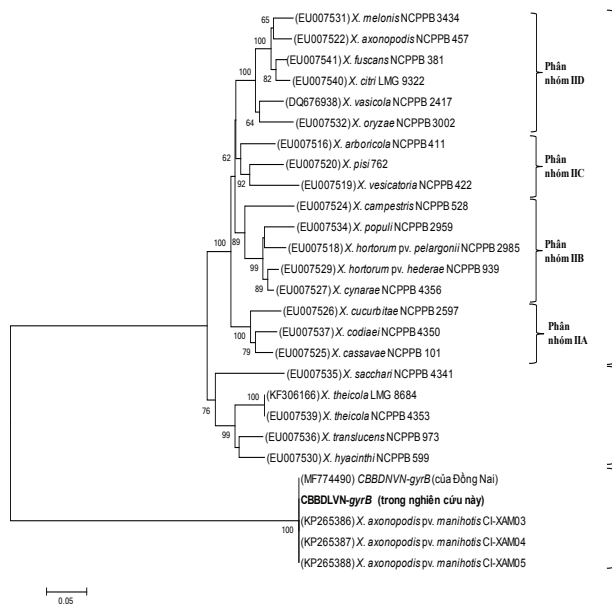
Tất cả các sản phẩm PCR được giải mã trực tiếp cả hai chiều bằng cặp primer XgyrconpcrF1/Xgyrconrper1. Tất cả sản phẩm đều có trình tự giống nhau và mẫu đại diện được ký hiệu CBBDLVN-*gyrB* (Cassava Bacterial Blight in Dak Lak, Vietnam, gene *gyrB*). CBBDLVN-*gyrB* có độ tương đồng 100% với trình tự đoạn gen *gyrB* của vi khuẩn *Xam* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sản phân lập tại Đồng Nai (mã số MF77490).

Cây phả hệ được xây dựng dựa trên trình tự đoạn gen *gyrB* của vi khuẩn phân lập tại Đắk Lắk (CBBDLVN-*gyrB*) với 26 trình tự đoạn gen *gyrB* của các loài vi khuẩn thuộc *Xanthomonas* khác nhau từ Ngân hàng gen. CBBDLVN-*gyrB* của Đắk Lắk có độ tương đồng 100% với *Xam* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sản tại Đồng Nai (mã số MF774490), tại Ivory Coast (mã số KP265386, KP265387, KP265388) và tạo thành nhóm những loài phân nhánh đầu tiên trong cây phả hệ.

Các loài vi khuẩn còn lại tạo thành 2 nhóm chính, trong đó, nhóm I với giá trị bootstrap 76% bao gồm *X. hyacinthi* NCPPB 599 (mã số EU007530), *X. translucens* NCPPB 973 (mã số EU007536), *X. theicola* NCPPB 4353 (mã số EU7539), *X. theicola* LMG 8684 (mã số KF306166) và *X. sacchari* NCPPB 4341 (mã số EU007535). Nhóm II, với giá trị bootstrap 100% bao gồm 4 phân nhóm khác nhau. Phân nhóm IIA với giá trị bootstrap 100% bao gồm *X. cassavae* NCPPB 101 (mã số EU007525), *X. codiae* NCPPB 4350 (mã số EU007537), *X. cucurbitae* NCPPB 2597 (mã số EU007526). Phân nhóm IIB với giá trị bootstrap 99% bao gồm *X. cynarae* NCPPB 4356 (mã số EU007527), *X. hortorum* pc. *Hederar* NCPPB 939 (mã số EU007529), *X.*

hortorum pv. *pelargonii* NCPPB 2985 (mã số EU007518), *X. populi* NCPPB 2959 (mã số EU007534) và *X. campestris* NCPPB 528 (mã số EU007524). Phân nhóm IIC với giá trị bootstrap 62% bao gồm *X. vesicatoria* NCPPB 422 (mã số EU007519), *X. pisi* 762 (mã số EU007520) và *X. arboricola* NCPPB 411 (EU007516). Phân nhóm IID với giá trị bootstrap 100% bao gồm *X. oryzae* NCPPB 3002 (mã số EU007532), *X. vasicola* NCPPB 2419 (mã số DQ676938), *X. citri* LMG 9322 (mã số EU007540), *X. fuscans* NCPPB 381 (mã số EU7541), *X. axonopodis* NCPPB457 (mã số EU007522) và *X. melonis* NCPPB 3434 (mã số EU007531).

Như vậy, tương tự như đối với trường hợp sử dụng gen *rpoD* để phân loại *Xam*, khi sử dụng gen *gyrB*, vi khuẩn gây bệnh tàn lụi sắn của Việt Nam cũng thuộc nhóm các loài phân nhánh đầu tiên và có khoảng cách tương đồng khá xa so với 2 nhóm còn lại trên cây phả hệ (hình 4).



Hình 4. Cây phân loại được xây dựng bằng phương pháp neighbour-joining sử dụng trình tự đoạn gen *gyrB* phân lập từ Đăk Lăk (CBBDLVN-*gyrB*) với 26 trình tự gen *gyrB* của *Xam* khác nhau từ Ngân hàng gen và của *Xam* phân lập tại Đồng Nai (CBBDNVN-*gyrB*, mã số MF774490).

Như vậy, trong nghiên cứu này, thông qua việc khuếch đại và phân tích trình tự của gen *rpoD* và *gyrB* đều đã đưa ra những bằng chứng chứng minh vi khuẩn phân lập từ triệu chứng bệnh vi khuẩn tàn lụi thu tại Đăk Lăk là *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.

Trong những năm gần đây, để giám định và phân loại loài vi khuẩn thuộc *Xanthomonas*, kỹ thuật phân tử sử dụng các gen khác nhau đã được áp dụng như 16S rRNA [16], 16S-23S rRNA [17], *rpjB* và *atpD* [18], *gyrB* [14, 19], *rpoB* [20] và *rpoD* [13, 21]. Tại Việt Nam, những năm trước đây,

khi kỹ thuật phân tử chưa phổ biến, việc chẩn đoán, giám định vi khuẩn gây bệnh thực vật nói chung đều chủ yếu dựa vào đặc điểm hình thái của khuẩn lạc, đặc điểm hình thái và cấu trúc của tế bào vi khuẩn và kết quả của các phản ứng sinh hóa. Tuy nhiên, phương pháp này thường mất nhiều thời gian và có thể không giám định được đến loài và dưới loài do độ đặc hiệu thấp.

Để hướng tới hoàn thiện quy trình giám định nhanh và chính xác tác nhân gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn, cần từng bước kiểm tra độ tin cậy, chính xác và độ nhạy của các cặp primer sử dụng. Trong nghiên cứu trước, chúng tôi cũng đã áp dụng kỹ thuật PCR với 2 cặp primer *rpoD*_17F/*rpoD*_1005R và *XgyrconpcrF1*/*Xgyrconrprc1* đặc hiệu cho gen *rpoD* và *gyrB* trong việc phát hiện và giám định vi khuẩn gây bệnh tàn lụi sắn [22]. Mặc dù vẫn phải thực hiện các bước phân lập, nuôi cấy, làm thuần, nhân sinh khối vi khuẩn gây bệnh, và ADN tổng số được chiết xuất từ dung dịch nuôi cấy khi khuẩn thuần khiết chứ không phải trực tiếp từ vết bệnh (như trong nghiên cứu này), nhưng kết quả cũng đã đưa ra những bằng chứng ghi nhận tính đặc hiệu, độ nhạy của 2 cặp primer sử dụng.

Phương pháp sử dụng trong nghiên cứu này đã lược bỏ bớt các bước nêu trên và chỉ bao gồm một số bước đơn giản: (i) Chiết xuất ADN từ mẫu lá cây sắn biểu hiện triệu chứng (như mô tả ở phần phương pháp nghiên cứu); (ii) Chạy PCR với cặp primer *rpoD*_17F/*rpoD*_1005R hoặc *XgyrconpcrF1*/*Xgyrconrprc1*; và (iii) Giải mã và phân tích gen. Kết quả sử dụng cặp primer *rpoD*_17F/*rpoD*_1005R hoặc *XgyrconpcrF1*/*Xgyrconrprc1* đều đưa ra những bằng chứng chứng minh tính ổn định về vị trí phân loại của trình tự đoạn gen *rpoD* và *gyrB* khuếch đại từ chủng *Xam* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn tại Đăk Lăk. Việc sử dụng một trong hai cặp primer đều cho thấy sự tương đồng cao đối với trình tự các đoạn gen tương ứng của *Xam* gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn đã được công bố. Như vậy, một trong hai cặp primer này đều có thể sử dụng riêng lẻ phục vụ công tác chẩn đoán và giám định nhanh tác nhân gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn tại Việt Nam.

Kết luận

Nguyên nhân gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn thu tại huyện Krông Pắc, M'Đrăk và Ea Kar của tỉnh Đăk Lăk là do vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* gây ra. Phương pháp PCR sử dụng cặp primer *rpoD*_17F/*rpoD*_1005R và *XgyrconpcrF1*/*Xgyrconrprc1* khuếch đại đoạn gen *rpoD* và *gyrB* sử dụng ADN chiết xuất trực tiếp từ vết bệnh không qua bước phân lập và nhân nuôi vi khuẩn gây bệnh là phương pháp đơn giản, dễ sử dụng, có tính đặc hiệu cao. Cần nghiên cứu và áp dụng phương pháp này đối với các loài vi khuẩn gây bệnh cây khác phục vụ công tác chẩn đoán và giám định nhanh tác nhân gây bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.A. Ogunjobi (2006), "Molecular variation in population structure of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in the south eastern Nigeria", *Afr. J. Biotechnol.*, **5**(20), pp.1868-1872.
- [2] V. Verdier, S. Restrepo, G. Mosquera, V. Jorge, C. Lopez (2004), "Recent progress in the characterization of molecular determinants in the *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* - cassava interaction", *Plant Mol. Biol.*, **56**(4), pp.573-584.
- [3] Y. Berthier, V. Verdier, J.L. Guesdon, D. Chevrier, J.B. Denis, G. Decoux, M. Lemattre (1993), "Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by rRNA gene restriction patterns", *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, pp.851-859.
- [4] M. Van den Mooter, J. Swings (1990), "Numerical analysis of 295 phenotypic features from 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, pp.348-369.
- [5] P. Yang, L. Vauterin, M. Vancanneyt, J. Swings, K. Kersters (1993), "Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of genus *Xanthomonas*", *Syst. Appl. Microbiol.*, **16**, pp.47-71.
- [6] V. Verdier, G. Mosquera, K. Assigbetsé (1998), "Detection of the cassava bacterial blight pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, by polymerase chain reaction", *Plant Dis.*, **82**, pp.79-83.
- [7] R.L. Miesfeld (1997), *Applied Molecular Genetics*, John Wiley & Sons, INC Publication.
- [8] V. Verdier, B. Boher, H. Maraite, V. Verdier, J. Geiger (1994), "Pathological and molecular characterization of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of cassava (*Manihot esculenta*)", *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**(12), pp.4478-4486.
- [9] S. Restrepo, V. Verdier (1997), "Geographical Differentiation of the Population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia", *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(11), pp.4427-4434.
- [10] V. Verdier, S. Ojeda, G. Mosquera (2001), "Methods for detecting the cassava bacterial blight pathogen: A practical approach for managing the disease", *Euphytica*, **120**(1), pp.103-107.
- [11] S. Ojeda, V. Verdier (2009), "Detecting *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in cassava true seeds by nested polymerase chain reaction assay", *Can. J. of Plant Pathol.*, **22**(3), pp.21-24.
- [12] J.J. Doyle, J.L. Doyle (1990), "Isolation of plant DNA from fresh tissue", *Focus*, **12**, pp.13-15.
- [13] D. Kone, S. Dao, C. Tekete, I. Doumbia, O. Koita, K. Abo, E. Wicker, V. Verdier (2015), "Confirmation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* causing cassava bacterial blight in Ivory Coast", *Plant Dis.*, **99**(10), pp.14-45.
- [14] N. Parkinson, V. Aritua, J. Heeney, C. Cowie, J. Bew, D. Stead (2007), "Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial *gyrase B* gene sequences", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**, pp.2881-2887.
- [15] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar (2013), "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0", *Mol. Biol. Evol.*, **30**, pp.2725-2729.
- [16] E.R.B. Moore, et al. (1997), "16S rRNA gene sequence analyses and inter- and intragenic relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*", *FEMS Microbiol. Lett.*, **151**, pp.145-153.
- [17] E.R. Goncalves, Y.B. Rosato (2002), "Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, pp.355-361.
- [18] T.H.N. Simoes, E.R. Goncalves, Y.B. Rosato, A. Mehta (2007), "Differentiation of *Xanthomonas* species by PCR-RFLP of *rpfB* and *atpD* genes", *FEMS Microbiol. Lett.*, **271**, pp.33-39.
- [19] N. Parkinson, C. Cowie, J. Heeney, D. Stead (2009), "Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**, pp.264-274.
- [20] M. Ferreira-Tonin, J. Rodrigues-Neto, R. Harakava, S.A.L. Destefano (2012), "Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* based on partial *rpoB* gene sequences and species differentiation by PCR-RFLP", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **62**, pp.1419-1424.
- [21] I. Wonni, L. Ouedraogo, S. Dao, C. Tekete, O. Koita, G. Taghouti, P. Portier, B. Szurek, V. Verdier (2015), "Report of cassava bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Burkina Faso", *Plant Dis.*, **99**(4), pp.551.
- [22] Duong Thi Nguyen, Nguyen Huy Hoang (2017), "Identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, causing cassava bacterial blight based on *rpoD* and *gyrB* genes", *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **15**(3), tr.1-8.