

ISSN 1859-4581

Tap chí

**NÔNG NGHIỆP
&
PHÁT TRIỂN
NÔNG THÔN**

*Science and Technology Journal
of Agriculture & Rural Development*

MINISTRY OF AGRICULTURE AND RURAL DEVELOPMENT, VIETNAM

Tap chí Khoa học và Công nghệ

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN

18

2016

- | | | |
|-------------------------------------|--|---------|
| <input type="checkbox"/> | NGUYỄN THỊ ÁNH TUYẾT, NGUYỄN VĂN CHIẾN. Chính sách và thực tiễn phát huy vai trò của phụ nữ trong phát triển kinh tế, xóa đói giảm nghèo phục vụ xây dựng nông thôn mới | 3-11 |
| <input type="checkbox"/> | TẠ ĐÌNH THI, TẠ VĂN TRUNG. Phát triển kinh tế bền vững vùng kinh tế trọng điểm đồng bằng sông Cửu Long trong bối cảnh biến đổi khí hậu | 12-19 |
| <input type="checkbox"/> | VÕ HỮU HÒA. Nghiên cứu quan điểm và nhận thức của các bên liên quan về khó khăn và các giải pháp nhằm nâng cao hiệu quả sử dụng lao động nông thôn | 20- 25 |
| <input type="checkbox"/> | LÊ VĂN THÀNH. Nghiên cứu hiện trạng và giải pháp phát triển bền vững thị trường xuất khẩu tôm nuôi Việt Nam | 26-34 |
| <input type="checkbox"/> | NGUYỄN VĂN QUÍ, CHÂU MINH KHÔI, NGUYỄN MINH ĐÔNG, TRẦN HUỖNH KHANH, BENNET MACDONAL, TÔ PHÚC TƯỜNG. Triển vọng canh tác giống lúa ngắn ngày trong hệ thống canh tác lúa – tôm tại Bạc Liêu | 35-43 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | TRƯƠNG THỊ HỒNG HẢI, TRẦN THỊ THANH, HATSADONG CHANTHANOUSONE. Nghiên cứu đa dạng di truyền của các chủng vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i> Smith ở một số tỉnh miền Bắc bằng chỉ thị RAPD | 44-51 |
| <input type="checkbox"/> | PHẠM ANH TUẤN. Xây dựng bản đồ đơn vị đất đai huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định | 52-58 |
| <input type="checkbox"/> | NGUYỄN NHƯ HÀ. Hiệu lực của phân lân và kali cho cây ngô trên đất đỏ vàng tại tỉnh Sơn La | 59-64 |
| <input type="checkbox"/> | NGUYỄN THÀNH LÊ. Kết quả thí nghiệm ảnh hưởng của phụ gia hóa dẻo kéo dài thời gian đông kết đến thời điểm đầm nén tốt nhất trong thi công đập trọng lực bê tông đầm lăn | 65-70 |
| <input type="checkbox"/> | TRƯƠNG HỒNG, TRỊNH THỊ HƯƠNG, NGUYỄN VĂN GIANG, BÙI VĂN VĨNH. Xác định chế độ nước tưới cho cây ca cao thời kỳ kinh doanh tại Bình Phước | 71-75 |
| <input type="checkbox"/> | LÊ VĂN KHẮN. Nghiên cứu ảnh hưởng của phốt phát natri đến biến đổi khối lượng và chất lượng mực ống (<i>Loligo chinensis</i>) trong quá trình bảo quản đông | 76-80 |
| <input type="checkbox"/> | BÁO VĂN TUY, LÊ ANH TUẤN. Đánh giá tính dễ bị tổn thương tài nguyên nước mặt tỉnh Ninh Thuận | 81-87 |
| <input type="checkbox"/> | NGUYỄN THỊ MAI, TRẦN THỊ NẮNG THU. Nghiên cứu sinh trưởng của cá chim vây vàng (<i>Trachinotus</i> sp) sử dụng một số loại thức ăn khác nhau | 88-93 |
| <input type="checkbox"/> | NGUYỄN THỊ KIM LIÊN, VŨ NGỌC ÚT. So sánh sự phát triển của động vật đáy (Zoobenthos) giữa khu vực đầu nguồn, giữa nguồn và cuối nguồn của sông Hậu | 94-102 |
| <input type="checkbox"/> | NGUYỄN VĂN HẢO, NGÔ SỸ VÂN, NGUYỄN VĂN GIANG. Mô tả giống cá mới <i>Vietnamia</i> gen.n. và một loài mới <i>Vietnamia remtua</i> sp.n thuộc phân họ Labeoninae (Cyprinidae, Cypryniformes) được phát hiện ở Cao Bằng, Việt Nam | 103-111 |
| <input type="checkbox"/> | NGUYỄN VĂN THAO, NGUYỄN TRƯỜNG HẢI, NGUYỄN THU HÀ, ĐỖ NGUYỄN HẢI. Ảnh hưởng của phân bón chứa Ca, S, B đến sinh trưởng và năng suất cây hồ tiêu trên đất xám tại Phú Giáo, Bình Dương | 112-118 |
| <input type="checkbox"/> | PHẠM MINH TOẠI. Khả năng sinh trưởng và phục hồi môi trường của rừng trồng loài cây thông, keo lá tràm và phi lao trên bãi thải than Nam Đèo Nai, tỉnh Quảng Ninh | 119-127 |
| <input type="checkbox"/> | NGUYỄN VĂN THIẾT, SICHALEUNE OUDONE. Ảnh hưởng của phương pháp xẻ đến mức độ biến dạng và nứt của gỗ xẻ từ gỗ bạch đàn trắng (<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehn.) | 128-134 |
| <input type="checkbox"/> | LÊ HỒNG SINH, HÀ THỊ MỪNG. Đa dạng sinh học tầng cây gỗ phục hồi sau canh tác nương rẫy tại huyện Mường Lát, tỉnh Thanh Hóa | 135-145 |
| <input type="checkbox"/> | NGUYỄN THANH TÂN. Tăng trưởng và sản lượng rừng khộp tại Đắk Lắk: Kết quả nghiên cứu từ các ô tiêu chuẩn định vị | 146-151 |
| <input type="checkbox"/> | NGUYỄN CÔNG HOAN, ĐỖ HOÀNG CHUNG. Một số quy luật phân bố và tương quan rừng trồng thông đuôi ngựa (<i>Pinus massoniana</i> Lamb) tại huyện Lộc Bình, tỉnh Lạng Sơn | 152-156 |

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN *Ralstonia solanacearum* Smith Ở MỘT SỐ TỈNH MIỀN BẮC BẰNG CHỈ THỊ RAPD

Trương Thị Hồng Hải¹, Trần Thị Thanh¹, Hatsadong Chanthanousone¹

TÓM TẮT

Để tài được thực hiện nhằm đánh giá đa dạng di truyền của 26 chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith được thu thập ở các vùng trồng cây họ cà và bầu bí ở miền Bắc bằng chỉ thị phân tử RAPD. Tổng số 100 chỉ thị phân tử RAPD được dùng để đánh giá kiểu gen của một số chủng vi khuẩn đại diện cho cây họ cà và bầu bí, trong đó có 44 chỉ thị biểu hiện đa hình. Tuy nhiên, trong số các chỉ thị đa hình chỉ có 21 chỉ thị phân tử RAPD khuếch đại các đoạn ADN rõ nét và ổn định và được chọn để đánh giá kiểu gen của 26 chủng vi khuẩn. Sản phẩm PCR của chỉ thị RAPD được phân tích bằng phần mềm NTSYSpc 2.1. Kết quả cho thấy 26 chủng vi khuẩn được chia thành 6 nhóm chính. Nhóm I gồm có 12 chủng vi khuẩn có hệ số tương đồng di truyền dao động 0,65 - 0,78 và được chia thành 3 nhóm nhỏ. Nhóm II gồm có 4 chủng vi khuẩn có hệ số tương đồng di truyền 0,62 - 0,7 và được chia thành 3 nhóm nhỏ. Nhóm III gồm 6 chủng vi khuẩn có hệ số tương đồng di truyền 0,62 - 0,77 và được chia thành 3 nhóm nhỏ. Nhóm IV gồm 2 chủng vi khuẩn có hệ số tương đồng 0,64 và được chia thành 2 nhóm nhỏ. Nhóm V gồm 1 chủng vi khuẩn có hệ số tương đồng 0,6. Nhóm VI gồm 1 chủng vi khuẩn có hệ số tương đồng 0,55. Như vậy, các chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* được thu thập trên các ký chủ khác nhau có sự khác biệt về di truyền cao hơn so với các chủng ở các vùng sinh thái khác nhau. Kết quả trong nghiên cứu này có thể sử dụng trong công tác chọn tạo giống kháng bệnh héo xanh vi khuẩn.

Từ khóa: Đa dạng di truyền, *Ralstonia solanacearum*, RAPD, cà chua, bầu bí.

1. MỞ ĐẦU

Bệnh héo xanh vi khuẩn (HXVK) do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây ra và được xem là một trong năm loại bệnh cây trồng thuộc đối tượng quan tâm nhất của chương trình phòng trừ sâu bệnh tổng hợp của FAO (1992) và chịu sự kiểm soát chặt chẽ của kiểm dịch Quốc tế (Lê Thị Thanh Thủy, 2014). Bệnh gây hại trên 200 loài thực vật thuộc hơn 50 họ và đã gây tổn thất nghiêm trọng đến kinh tế của nhiều loài cây trồng họ cà, vừng, lạc, khoai tây,... (Hayward, 1994).

Việt Nam là một nước có khí hậu nhiệt đới nóng ẩm, thuộc vùng phân bố chính của loài vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*. Ở miền Bắc nước ta có diện tích trồng rau màu lớn, phát triển với nhiều chủng loại cây trồng phong phú và chịu ảnh hưởng nặng nề của sâu bệnh hại, trong đó bệnh HXVK là một trong những vấn đề nan giải. Trước tình hình đó, đã có nhiều nghiên cứu về canh tác và chọn giống cây trồng, sử dụng thuốc hóa học cũng như các chế phẩm sinh học có khả năng ức chế và làm giảm tính độc của *R. solanacearum* (Lê Như Kiều và cs, 2010;

Trần Vũ Phấn và cs, 2010; Lê Thị Thanh Thủy, 2014). Tuy nhiên, các biện pháp đó còn nhiều hạn chế, bệnh HXVK vẫn luôn hiện diện, gây hại và luôn là mối lo ngại đối với người sản xuất.

Chọn tạo giống mang gen kháng bệnh được xem là biện pháp ưu việt và hiệu quả nhất (Ngô Văn Ngôn, 2015). Nhưng tính kháng của giống phụ thuộc rất nhiều vào độ độc tính của các chủng vi khuẩn (Nguyễn Thị Yến và cs, 2002; Trương và cs, 2008; Wang và cs, 2013; Tạ Thị Hào, 2014; Trương Thị Hồng Hải và cs, 2015). Chính vì vậy để tạo ra được giống kháng bền vững phải hiểu được đặc điểm di truyền cũng như độ độc tính của các chủng vi khuẩn ở các vùng sinh thái khác nhau. Ở Việt Nam, nghiên cứu đa dạng di truyền của các chủng vi khuẩn gây hại trên họ cà được thu thập ở miền Nam (Trương Thị Hồng Hải và cs, 2015) và trên cây lạc ở miền Bắc bằng chỉ thị RAPD đã được công bố (Đinh Thị Phóng và cs, 2008). Trong nghiên cứu này, đã đánh giá đa dạng di truyền của các chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* được thu thập ở một số vùng trồng cây họ cà và bầu bí ở một số tỉnh thuộc miền Bắc bằng chỉ thị RAPD nhằm hiểu được tính đa dạng di truyền của các chủng vi khuẩn để ứng dụng trong chọn giống kháng bệnh.

¹ Bộ môn Công nghệ sinh học, Khoa Nông học, Trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. *Chủng vi khuẩn*: 297 mẫu bệnh HXVK được thu thập từ 6 tỉnh/ thành phía Bắc (Hải Dương, Hải Phòng, Hà Nội, Thái Bình, Nam Định, Nghệ An) trên cây cà chua, bí đao, cà pháo, dưa chuột và ớt. Kết quả phân lập được 170 mẫu bệnh, trong đó 26 mẫu bệnh phân lập khác nhau về vùng địa lý và ký chủ gây bệnh được chọn để đánh giá đa dạng di truyền (Bảng 1).

2.1.2. *Mỗi RAPD*: 100 mỗi RAPD đã sử dụng trong nghiên cứu của Trương Thị Hồng Hải và cs (2015) được dùng để đánh giá kiểu gen của 2 chủng vi khuẩn gây hại đại diện cho cây họ cà (Rs285) và họ bầu bí (Rs368) được thu thập ở Hà Nội và Nghệ An, tương ứng. Trong số này, 41 chỉ thị biểu hiện đa hình, tuy nhiên chỉ có 21 chỉ thị khuếch đại các đoạn ADN rõ nét và ổn định (Bảng 2)

2.1.3. *Phạm vi nghiên cứu*: các chủng vi khuẩn được thu thập ở một số tỉnh miền Bắc được thể hiện qua bảng 1.

Bảng 1. Địa điểm thu thập các chủng vi khuẩn gây bệnh HXVK

STT	Ký hiệu	Ký chủ	Địa điểm
1	Rs101	Cà chua	Nguyên Giáp, Tứ Kỳ, Hải Dương
2	Rs124	Cà chua	Đại Thắng, Tiên Lãng, Hải Phòng
3	Rs127	Cà chua	Đại Thắng, Tiên Lãng, Hải Phòng
4	Rs136	Ớt	Tiên Cường, Tiên Lãng, Hải Phòng
5	Rs139	Cà chua	Tiên Cường, Tiên Lãng, Hải Phòng
6	Rs150	Cà chua	Tiên Hưng, Tiên Lãng, Hải Phòng
7	Rs169	Cà chua	Tiên Hưng, Tiên Lãng, Hải Phòng
8	Rs182	Cà chua	An Cường, An Dương, Hải Phòng
9	Rs183	Cà chua	Đặng Cương, An Dương, Hải Phòng
10	Rs196	Cà chua	Thôn Thiểu Trung, Hồng Thái, An Dương, Hải Phòng
11	Rs204	Cà chua	Thôn Thiểu Trung, Hồng Thái, An Dương, Hải Phòng
12	Rs217	Cà chua	Đội 6, Thượng Đạ, Nam Sách, Hải Phòng
13	Rs226	Bí đao	Tiên Phong, Mê Linh, Hà Nội
14	Rs239	Cà chua	Tiên Phong, Mê Linh, Hà Nội
15	Rs249	Cà chua	Thôn 6, Song Phương, Hoài Đức, Hà Nội
16	Rs285	Cà chua	Hộ 7, Vân Canh, Duyên Hà, Thanh Trì, Hà Nội
17	Rs301	Cà chua	Xóm 1, Vinh Quang, Vũ Thư, Thái Bình
18	Rs307	Cà pháo	Xóm 2, Quỳnh Phụ, Quỳnh Xá, Thái Bình
19	Rs319	Cà chua	Thông Nương, Quỳnh Côi, Thái Bình
20	Rs327	Cà chua	Làng Bá Dương, Nam Dương, Nam Trực, Nam Định
21	Rs341	Cà chua	Xóm Đình Tiên Hoàng, Xã Hải Lý, Huyện Hải Hậu, Nam Định
22	Rs352	Cà chua	Xóm Đình Tiên Hoàng, Xã Hải Lý, Huyện Hải Hậu, Nam Định
23	Rs354	Cà chua	Xóm Quang Trung, Xã Hải Lý, Huyện Hải Hậu, Nam Định
24	Rs361	Cà chua	Xóm Đình Tiên Hoàng, Xã Hải Lý, Huyện Hải Hậu, Nam Định
25	Rs368	Dưa chuột	Xóm Quyết Tiến, Quỳnh Bảng, Quỳnh Lưu, Nghệ An
26	Rs373	Cà chua	Xóm 9, Quỳnh Văn, Quỳnh Lưu, Nghệ An

2.1.4. *Địa điểm*: thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm của Bộ môn Công nghệ Sinh học, Khoa Nông học, trường Đại học Nông Lâm Huế.

2.1.5. *Thời gian tiến hành thí nghiệm*: Từ tháng 10/2014 đến tháng 11/2015.

Bảng 2. Các môi RAPD sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền các chủng vi khuẩn

STT	Tên môi	Trình tự môi
1	UBC#308	AGCGGCTAGG
2	UBC#309	ACATCCTGCG
3	UBC#310	GAGCCAGAAG
4	UBC#312	ACGGCGTCAC
5	UBC#317	CTAGGGGCTG
6	UBC#333	GAATGCGACG
7	UBC#335	TGGACCACCC
8	UBC#338	CTGTGGCGGT
9	UBC#348	CACGGCTGCG
10	UBC#349	GGAGCCCCCT
11	UBC#350	TGACGCGCTC
12	UBC#353	TGGGCTCGCT
13	UBC#354	CTAGAGGCCG
14	UBC#356	GCGGCCCTCT
15	UBC#358	GGTCAGGCCC
16	UBC#366	CCTGATTGCC
17	UBC#368	ACTTGTGCGG
18	UBC#385	ACCGGGAACG
19	UBC#388	CGGTGCGGTC
20	UBC#391	GCGAACCTCG
21	UBC#399	TTGCTGGGCG

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. *Phương pháp phân lập mẫu bệnh, phân lập và nuôi cấy vi khuẩn*: thu thập mẫu bệnh theo phương pháp quản lý mẫu bệnh thực vật (Roger et al., 2005). Phân lập vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trên môi trường TTC (Kelman, 1954).

2.2.2. *Phương pháp xác định vi khuẩn Ralstonia solanacearum bằng kỹ thuật PCR* sử dụng cặp môi AU.P759/760 (Opina, et al., 1997) đặc hiệu cho loài vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*.

AU P.759: 5'GTCGCCGTCAGCAATCCGGAATCG 3'

AU P.760: 5'GTCGCCGTCAGCAATGGAATCG 3'

2.2.3. *Phương pháp đánh giá đa dạng di truyền vi khuẩn Ralstonia solanacearum*. Mỗi phản ứng gồm 15 µl, trong đó: 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 10X PCR buffer, 25 mM MgCl₂, 1 U of Taq ADN

polymeraza và 0,25 µM mỗi ngẫu nhiên và 5-10 ng ADN tổng số.

Khuếch đại PCR theo chu kì nhiệt như sau: bước 1 gồm 1 chu kỳ ở 94°C trong 3 phút; bước 2 gồm 40 chu kỳ: 94°C trong 1 phút, 37°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút; bước 3 gồm 1 chu kỳ ở 72°C trong 7 phút và cuối cùng ủ ở 4°C.

Sản phẩm RAPD - PCR được nhuộm bằng SYBGR (10000X) và điện di trên agarosa gel 2% với 120 V trong 3 giờ.

2.2.4. *Các chỉ tiêu theo dõi*:

Số môi biểu hiện đa hình, tổng số băng được khuếch đại của mỗi chỉ thị đa hình RAPD, tổng số băng biểu hiện đa hình của mỗi chỉ thị đa hình RAPD, tổng số băng biểu hiện đa hình của mỗi chủng, tỷ lệ băng đa hình của mỗi chủng (%).

2.2.5. *Phương pháp xử lý số liệu*:

Số liệu RAPD được ghi nhận dựa vào thang chuẩn 100 bp. Tiêu chuẩn hóa sản phẩm RAPD theo quy ước: "1" xuất hiện phân đoạn ADN, "0" không xuất hiện phân đoạn ADN. Các số liệu này sẽ được đưa vào chương trình NTSYS pc 2.1 để tính ma trận tương đồng giữa các đôi mẫu.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát tính đa hình của các môi RAPD

Để xác định các nhóm chủng, 26 chủng vi khuẩn được chọn từ 170 chủng vi khuẩn đại diện cho các vùng trồng cây họ cà và bầu bí của một số tỉnh miền Bắc. Hai chủng vi khuẩn đại diện cho cây họ cà (Rs285) và họ bầu bí (Rs368) được thu thập ở Hà Nội và Nghệ An, tương ứng, được chọn để khảo sát sơ bộ tính đa hình của 100 môi RAPD. Trong số đó chỉ có 41 chỉ thị RAPD biểu hiện đa hình. Để kiểm chứng tính ổn định của 41 chỉ thị đa hình RAPD, 6 chủng vi khuẩn được thu thập trên cây họ cà đại diện cho 6 tỉnh ở phía Bắc như Rs101 (Hải Dương), Rs136 (Hải Phòng), Rs239 (Hà Nội), Rs307 (Thái Bình), Rs352 (Nam Định), Rs373 (Nghệ An) cùng với 2 chủng vi khuẩn (Rs285 và Rs368) sử dụng trong khảo sát sơ bộ được chọn để khảo sát tính đa hình lần 2. Kết quả cho thấy 21 trong 41 chỉ thị đa hình RAPD biểu hiện các đoạn ADN rõ nét và ổn định (Hình 1). Các môi còn lại hoặc là không nhân lên được đoạn ADN nào hoặc là chỉ có 1 đoạn, không có ý nghĩa trong việc xác định đa hình AND.

10 ng

: bước
ôm 40
, 72°C
trong 7

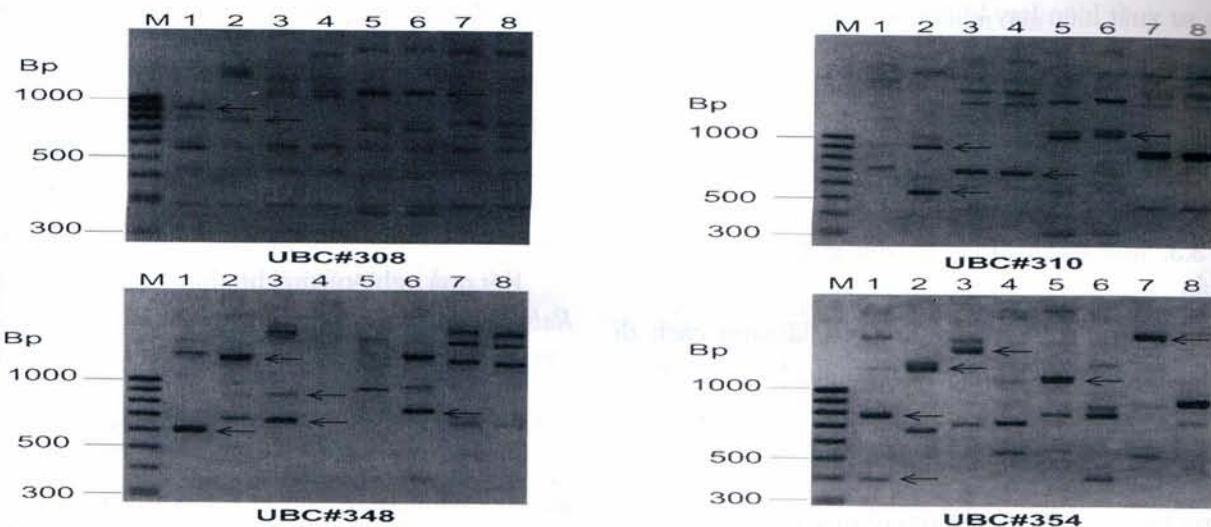
bằng
2% với

g được
ổng số
a hình
ủa mỗi

o thang
PD theo
không
sẽ được
ma trận

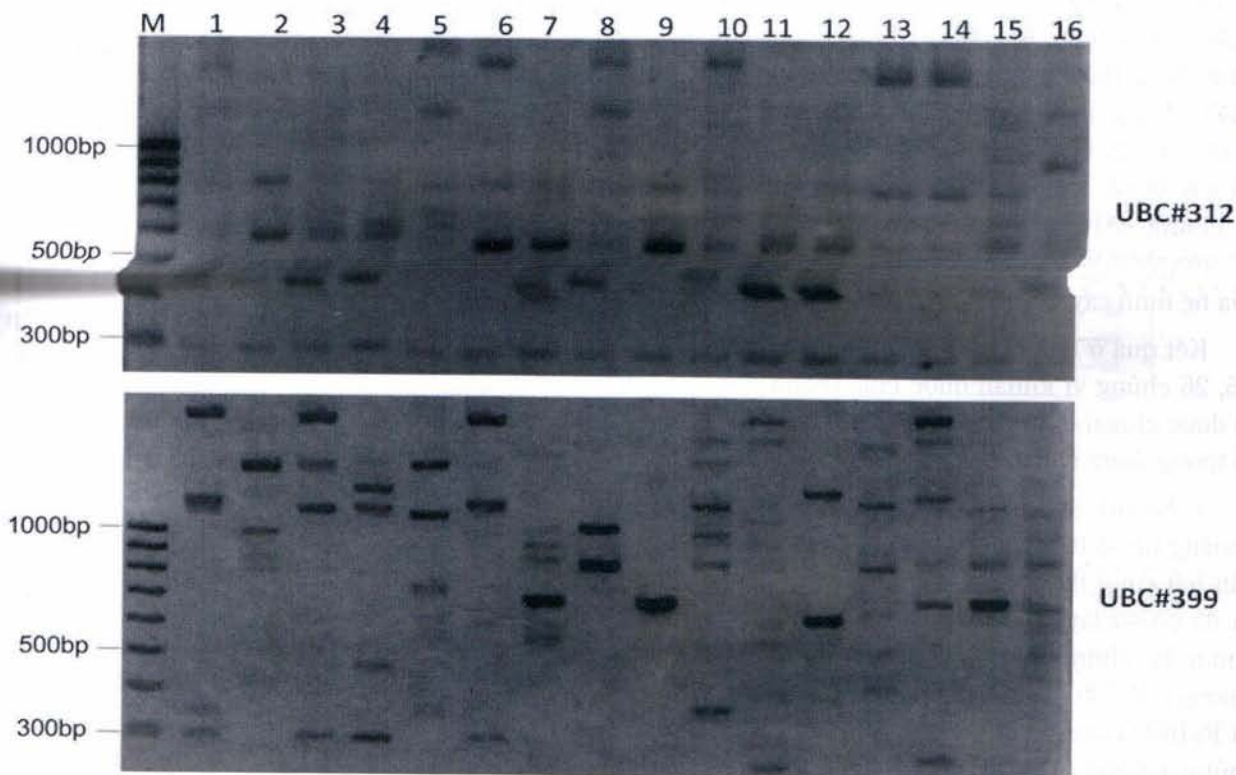
RAPD

hùng vi
đại diện
a một số
cho cây
u thập ở
để khảo
Trong số
hình. Để
đa hình
n cây họ
101 (Hải
Hà Nội),
, Rs373
Rs285 và
c chọn để
b thấy 21
các đoạn
ồi còn lại
nào hoặc
g việc xác



Hình 1. Kết quả điện di của một số mồi RAPD biểu hiện đa hình được khảo sát từ một số chủng vi khuẩn đại diện. Lanes: M: 100 bp ADN ladder; 1: Rs101, 2: Rs136, 3: Rs239, 4: Rs285, 5: Rs307, 6: Rs352, 7: Rs368; 8: Rs373. Mũi tên chỉ các đoạn ADN biểu hiện đa hình

3.2. Đánh giá kiểu gen của các chủng vi khuẩn bằng kỹ thuật RAPD



Hình 2. Kết quả điện di mồi UBC#312 và UBC#399 của các chủng vi khuẩn đại diện. Lanes: M: 100 bp ADN ladder 1: Rs101; 2: Rs124; 3: Rs127; 4: Rs136; 5: Rs139; 6: Rs150; 7: Rs169; 8: Rs182; 9: Rs183; 10: Rs196; 11: Rs204; 12: Rs217; 13: Rs226; 14: Rs239; 15: Rs249; 16: Rs285

Tổng 21 mồi RAPD biểu hiện đa hình được sử dụng để đánh giá kiểu gen của 26 chủng vi khuẩn. Số đoạn ADN được khuếch đại dao động từ 50 đến 194 đoạn, tổng số ADN khuếch đại là 2230. Trong số 21 mồi RAPD, số đoạn ADN khuếch đại của 26

chủng vi khuẩn với mồi UBC#368 là nhiều nhất (194 đoạn) và mồi UBC#309 là ít nhất (50 đoạn). Trong 26 chủng vi khuẩn thì chủng Rs301 có nhiều đoạn ADN khuếch đại nhất (111 đoạn) và chủng Rs319 có số đoạn khuếch đại ít nhất (5 đoạn). Tính đa hình thể

hiện sự xuất hiện hay không xuất hiện của các phân đoạn ADN khi so sánh giữa các chủng vi khuẩn với nhau trong cùng 1 môi. Ở đây, các chủng vi khuẩn thu thập tại các tỉnh miền Bắc cho thấy sự đa hình hoàn toàn giữa các chủng (tỷ lệ các đoạn ADN khuếch đại đạt 100%) (Hình 2).

3.3. Mối quan hệ di truyền giữa các chủng vi khuẩn

Đánh giá mức độ đa dạng và khoảng cách di truyền của các chủng vi khuẩn đem lại cái nhìn chung nhất về quan hệ di truyền của chúng. Mối tương quan di truyền đó được xác lập dựa trên ma trận số thiết lập giữa các chủng vi khuẩn. Các chủng có giá trị hệ số di truyền tương ứng càng gần đến 0 thì sự khác biệt về di truyền càng lớn và khả năng sử dụng trong chọn tạo giống kháng bệnh càng cao, còn các chủng có hệ số di truyền giống nhau tương ứng càng gần tới 1 thì càng gần nhau về mặt di truyền.

Hệ số tương đồng di truyền giữa các chủng vi khuẩn là khá thấp, từ 0,49 đến 0,78 (Bảng 3). Hệ số tương đồng thấp nhất khi so sánh chủng Rs226 và Rs249, chủng Rs301 và Rs226 cùng đạt hệ số 0,49, các chủng này đều khác nhau về cả vùng địa lý và ký chủ gây bệnh. Hệ số di truyền cao nhất là 0,78 giữa các chủng Rs101 và Rs139, chủng Rs139 và Rs169. Kết quả phân tích được mô hình hóa dưới dạng sơ đồ phả hệ hình cây (Hình 3).

Kết quả ở hình 4 cho thấy, tại hệ số tương đồng 0,6, 26 chủng vi khuẩn được chia thành 6 nhóm lớn và được chia thành các nhóm nhỏ khác nhau theo hệ số tương đồng di truyền.

+ Nhóm Ia, Ib, IIc, IIIa chủ yếu nằm trong khoảng hệ số tương đồng 0,66 – 0,73. Các chủng này hầu hết cùng thuộc một đối tượng ký chủ (cà chua) và đã có sự lây lan giữa các vùng địa lý. Trong đó nhóm Ia: chủng Rs101 (Nguyên Giáp, Từ Kỳ, Hải Dương), Rs139 (Tiên Cường, Tiên Lãng, Hải Phòng) và Rs169 (Tiên Hưng, Tiên Lãng, Hải Phòng) là các chủng có vùng địa lý gần nhau nên nguồn gốc di truyền gần nhau hơn các chủng khác trong nhóm với hệ số tương đồng là 0,78; nhóm IIIa: chủng Rs150 (Tiên Lãng, Hải Phòng) và Rs196 (An Dương, Hải Phòng) cũng có hệ số tương đồng là 0,78.

+ Các chủng còn lại: Rs183, Rs124, Rs182, Rs341, Rs127, Rs354, Rs373, Rs368, Rs226 có hệ số tương đồng di truyền khá thấp 0,55 – 0,66. Các chủng này

có sự khác nhau giữa vùng địa lý và đối tượng ký chủ. Chủng Rs368 (Quỳnh Lưu, Nghệ An) có đối tượng ký chủ dưa chuột nên hệ số tương đồng là 0,59. Chủng Rs226 (Mê Linh, Hà Nội) có hệ số tương đồng di truyền là 0,55 thấp nhất trong 26 chủng nghiên cứu. Sự khác biệt này là hợp lý vì ký chủ là bí đao.

Kết quả nghiên cứu cho thấy các chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* được thu thập trên các đối tượng ký chủ khác nhau có sự khác biệt về di truyền cao hơn so với các chủng ở các vùng sinh thái khác nhau. Xét các chủng gây bệnh trên cùng đối tượng ký chủ nhưng khác nhau về vùng sinh thái: có 5 nhóm, nhóm cà chua gồm 22 chủng (Rs101, Rs124, Rs127, Rs139, Rs150, Rs169, Rs182, Rs183, Rs196, Rs204, Rs217, Rs239, Rs249, Rs285, Rs301, Rs319, Rs327, Rs341, Rs352, Rs354, Rs361, Rs373) có hệ số tương đồng 0,62 – 0,78; nhóm bí đao gồm chủng Rs226 có hệ số tương đồng là 0,55; nhóm cà pháo có chủng Rs307 với hệ số tương đồng 0,7; nhóm dưa chuột có chủng Rs368 với hệ số tương đồng 0,59; nhóm ớt có 1 chủng duy nhất là Rs136 hệ số tương đồng 0,72. Xét các chủng gây bệnh trên cùng vùng sinh thái nhưng khác đối tượng ký chủ: có 1 nhóm giữa cà pháo (Rs307) và cà chua (Rs319) có hệ số tương đồng di truyền là 0,58.

Như vậy, việc phân tích đa hình đã chỉ ra sự sai khác di truyền giữa 26 chủng vi khuẩn đại diện phân lập ở 6 tỉnh/ thành miền Bắc, tạo cơ sở cho các công tác chọn tạo giống kháng bệnh về sau.

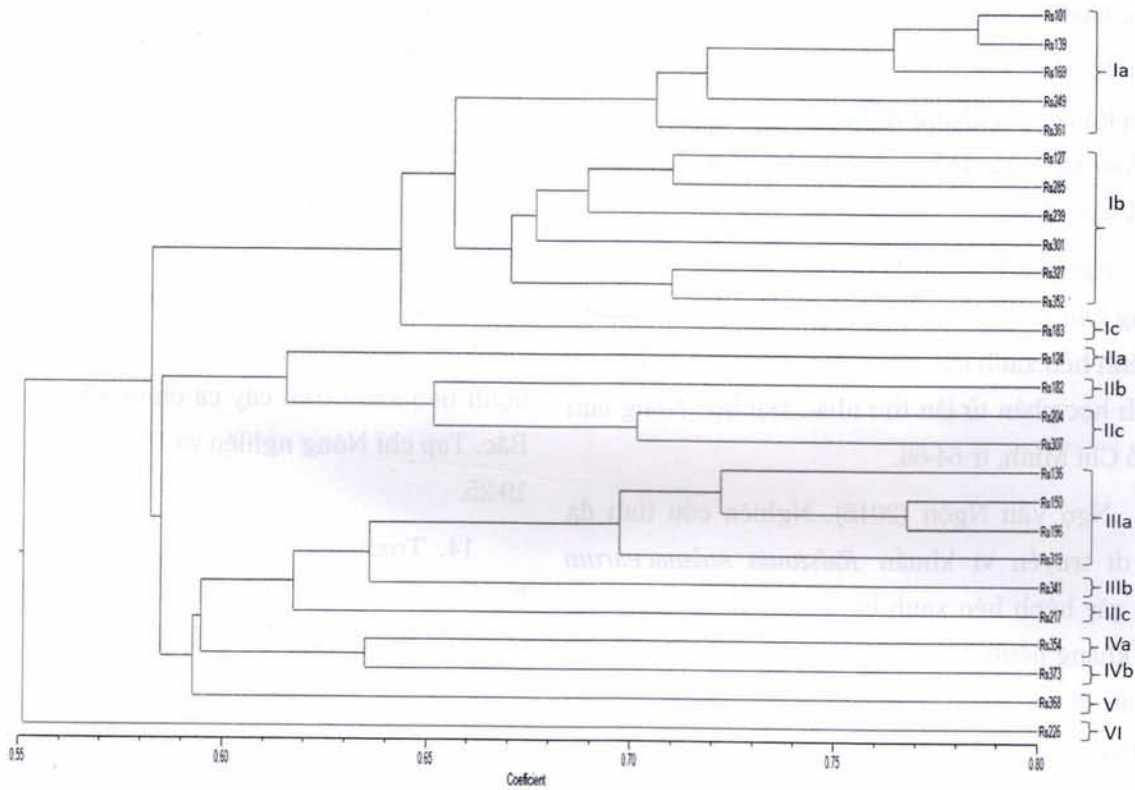
4. KẾT LUẬN

- 21 môi RAPD đã được sử dụng hiệu quả trong việc đánh giá mối quan hệ di truyền của 26 chủng vi khuẩn *Ralsotonia solanacearum* thu thập từ cây trồng họ cà và Bầu bí. Kết quả cho thấy, các chủng vi khuẩn có sự đa dạng di truyền cao thể hiện qua số băng ADN trung bình/môi là 106,2.

- 26 chủng vi khuẩn *R. solanacearum* nghiên cứu đã được phân nhóm thể hiện ở cây phân loại dựa trên hệ số tương đồng. 26 chủng vi khuẩn được chia thành 6 nhóm có mức độ tương đồng dao động 0,55 – 0,78. Trong đó nhóm I, II và III có hệ số tương đồng khá cao, đồng thời kết quả phân tích cũng cho thấy mối liên hệ di truyền giữa các chủng gây bệnh trên cùng đối tượng ký chủ của vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*.

Bảng 3. Hệ số tương đồng giữa các chủng sử dụng trong nghiên cứu

	Rs101	Rs124	Rs127	Rs136	Rs139	Rs150	Rs169	Rs182	Rs183	Rs196	Rs204	Rs217	Rs226	Rs239	Rs249	Rs285	Rs301	Rs307	Rs319	Rs327	Rs341	Rs352	Rs354	Rs361	Rs368	Rs373
Rs101	1																									
Rs124	0.55	1																								
Rs127	0.67	0.59	1																							
Rs136	0.57	0.56	0.62	1																						
Rs139	0.78	0.57	0.68	0.54	1																					
Rs150	0.54	0.57	0.57	0.73	0.53	1																				
Rs169	0.74	0.58	0.74	0.58	0.78	0.54	1																			
Rs182	0.58	0.62	0.62	0.59	0.56	0.57	0.56	1																		
Rs183	0.61	0.59	0.71	0.61	0.66	0.59	0.69	0.56	1																	
Rs196	0.51	0.59	0.60	0.71	0.60	0.77	0.56	0.63	0.64	1																
Rs204	0.56	0.62	0.60	0.59	0.58	0.57	0.59	0.64	0.57	0.64	1															
Rs217	0.53	0.57	0.65	0.60	0.60	0.59	0.58	0.56	0.62	0.63	0.59	1														
Rs226	0.52	0.54	0.52	0.56	0.56	0.60	0.55	0.58	0.54	0.60	0.58	0.61	1													
Rs239	0.61	0.62	0.70	0.61	0.65	0.58	0.65	0.58	0.67	0.61	0.56	0.62	0.53	1												
Rs249	0.72	0.56	0.64	0.51	0.73	0.51	0.70	0.55	0.63	0.51	0.61	0.57	0.49	0.68	1											
Rs285	0.61	0.57	0.71	0.61	0.63	0.59	0.68	0.60	0.63	0.60	0.63	0.60	0.60	0.68	0.67	1										
Rs301	0.65	0.56	0.66	0.56	0.63	0.56	0.66	0.61	0.63	0.55	0.58	0.56	0.49	0.68	0.67	0.69	1									
Rs307	0.57	0.61	0.58	0.58	0.61	0.55	0.57	0.66	0.57	0.61	0.70	0.55	0.61	0.58	0.56	0.61	0.59	1								
Rs319	0.63	0.64	0.67	0.67	0.59	0.70	0.62	0.63	0.65	0.71	0.62	0.64	0.59	0.62	0.58	0.67	0.54	0.59	1							
Rs327	0.63	0.58	0.70	0.61	0.63	0.56	0.68	0.60	0.62	0.57	0.63	0.59	0.53	0.70	0.68	0.69	0.57	0.56	0.63	1						
Rs341	0.58	0.56	0.63	0.59	0.56	0.67	0.56	0.58	0.62	0.66	0.59	0.63	0.54	0.61	0.54	0.65	0.59	0.60	0.62	0.57	1					
Rs352	0.65	0.56	0.66	0.53	0.65	0.53	0.63	0.55	0.61	0.53	0.54	0.59	0.50	0.61	0.64	0.66	0.65	0.51	0.63	0.71	0.61	1				
Rs354	0.58	0.59	0.62	0.60	0.60	0.59	0.57	0.54	0.61	0.59	0.59	0.58	0.56	0.58	0.55	0.68	0.53	0.54	0.70	0.57	0.59	0.57	1			
Rs361	0.73	0.55	0.68	0.53	0.70	0.52	0.72	0.54	0.62	0.52	0.56	0.61	0.50	0.61	0.68	0.61	0.65	0.54	0.57	0.68	0.58	0.70	0.59	1		
Rs368	0.58	0.57	0.64	0.57	0.55	0.61	0.56	0.62	0.56	0.61	0.60	0.54	0.56	0.60	0.56	0.66	0.56	0.54	0.57	0.59	0.57	0.56	0.59	0.56	1	
Rs373	0.61	0.58	0.62	0.59	0.61	0.53	0.60	0.56	0.59	0.59	0.63	0.59	0.54	0.59	0.61	0.61	0.56	0.57	0.61	0.61	0.61	0.60	0.63	0.57	0.59	1



Hình 3. Biểu đồ về mối quan hệ di truyền giữa 26 chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đinh Thị Phòng, Đỗ Tiến Phát và Nguyễn Thị Yến (2008). Đa dạng bộ gen ADN các chủng vi khuẩn (*Pseudomonas solanacearum*) gây bệnh héo xanh cây lạc bằng kỹ thuật RADP. Tạp chí Khoa học và Công nghệ 46 (6): 43-50.
2. Hayward, A. C. (1994). The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hayward A. C., Hartman G. L. (Eds.). Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Willingford UK. CAB International. pp. 25-34.
3. Kelman, A. (1954). The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:493-495.
4. Lê Thị Thanh Thủy (2014). Nghiên cứu, tuyển chọn vi sinh vật đối kháng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh cây trồng. Luận án tiến sĩ sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc Gia Hà Nội.
5. Lê Như Kiều và cs (2010). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh lạc và vừng. Tạp chí Khoa học Công nghệ 48 (3): 33-41.
6. Nguyễn Thị Yến, Nguyễn Văn Việt, Đặng Thị Phương Lan (2002). Thành phần nòi, biovar vi khuẩn gây bệnh héo xanh cây trồng cạn. Hội thảo Bệnh cây và Sinh học phân tử lần thứ nhất. Đại học Nông lâm Tp. Hồ Chí Minh, tr.64-66.
7. Ngô Văn Ngôn (2015). Nghiên cứu tính đa dạng di truyền vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh lạc và xác định các dòng, giống kháng bệnh ở một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. Luận án tiến sĩ 2015. Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.
8. Opina, N., Tavner, F., Holloway, G., Wang, J. F., Li, T.-H., Maghirang, R., Fegan, M., Hayward, A. C., Krishnapillai, V., Hong, W. F., Holloway, B. W., and Timmis, J. N., 1997. A novel method for development of species and strain-specific ADN probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (Formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 5: 19-30.
9. Tạ Thị Hào (2014). Nghiên cứu tuyển chọn một số giống cà chua chống chịu bệnh héo xanh vi khuẩn (*Ralstonia solanacearum*). Khóa luận tốt nghiệp. Trường ĐH Sư phạm Hà Nội 2.
10. Roger S., Dean, B. (2005). Phương pháp quản lý mẫu bệnh thực vật. Bộ Nông nghiệp, Thủy sản và Lâm nghiệp Australia.
11. Scott, J. W., Wang, J. F., & Hanson, P. (2005). Breeding tomatoes for resistance to bacterial wilt, a global view. *Acta Horticulttore* 695: 161.
12. Trần Vũ Phấn, Phan Thị Mỹ Phúc, Nhan Hoàng Phong và Duy Văn Ai, 2010. Tuyển chọn vi khuẩn vùng rễ kích thích tăng trưởng và phòng trừ sinh học bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây cà chua. Tạp chí Khoa học-ĐH Cần Thơ 15a:97-106.
13. Trương Thị Hồng Hải, Trần Việt Thắng, Phạm Thanh Bình, Trần Ngọc Hùng, Nguyễn Thị Thu Thủy (2015). Đánh giá độ độc tính của các chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh trên cây cà chua ở một số tỉnh phía Bắc. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn 5: 19-25.
14. Trương Thị Hồng Hải, Phạm Thanh Bình, Nguyễn Thị Thu Thủy (2015). Đánh giá đa dạng di truyền của các chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith ở một số tỉnh miền Nam bằng chỉ thị RAPD. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn 16: 32-38.
15. Truong, H. T. H., Esch, E., Wang, J. F., 2008. Resistance to Taiwanese race 1 strains of *Ralstonia*

solanacearum in wild tomato germplasm. European Journal of Plant Pathology 122: 471-9.

16. Wang, J. F., Ho, F. I., Truong, H. T. H., et al., 2013. Identification of major QTLs associated with

stable resistance of tomato cultivar 'Hawaii 7996' to *Ralstonia solanacearum*. Euphytica 190: 241-252.

STUDY ON GENETIC DIVERSITY OF *Ralstonia solanacearum* ISOLATES IN NORTHERN VIETNAM BY RAPD

Truong Thi Hong Hai¹, Tran Thi Thanh¹,
Hatsadong Chanthanousone¹

¹Department of Biotechnology, Faculty of Agronomy, Hue University of Agriculture and Forestry

Summary

In this study, 26 *R. solanacearum* isolates collected from vegetable production areas in Northern Vietnam were used to assess their genetic diversity using RAPD markers. Total of 100 primers were used to preliminary screen presentatively selected isolates. Of these, 41 primers were polymorphic, but only 21 primers showed consistence and clear ADN bands and were used for genotyping. Genetic diversity was analysed using NTSYSpc 2.1 program. The result showed that 26 isolates were devided into 6 clusters. Cluster I included 12 isolates was devided into 3 subcluster with similar coefficient ranged from 0.65 to 0.78. Cluster II included 4 isolates was devided into 3 subcluster with similar coefficient ranged from 0.62 to 0.70. Cluster III included 6 isolates was devided into 3 subcluster with similar coefficient ranged from 0.67 to 0.77. Cluster IV included 2 isolates with similar coefficient of 0.64. Cluster V included 1 isolates with similar coefficient of 0.6. Cluster VI included 1 isolates with similar coefficient of 0.55. Thus, the *R. solanacearum* isolates collected on different hosts have a higher level on genetic difference compared with those in different ecological zones. The results of this study can be used in the breeding program for bacterial wilt resistance.

Keywords: Genetic diversity, *Ralstonia solanacearum*, RAPD, tomato, cucurbitaceae.

Người phản biện: GS.TS. Nguyễn Văn Tuất

Ngày nhận bài: 18/02/2016

Ngày thông qua phản biện: 18/3/2016

Ngày duyệt đăng: 28/3/2016