

# NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP ADN TÁI TỔ HỢP NHẪM TĂNG CƯỜNG TÍNH ĐỐI KHÁNG CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN VỚI BỆNH HÉO XANH CÂY TRỒNG

Đoàn Thu Thủy  
Trần Quang Minh  
Nguyễn Thị Kim Thoa  
Lê Như Kiều

## I. MỞ ĐẦU

Sử dụng một loạt các gen được lấy từ thực vật hoặc phi thực vật nhằm mục đích tăng cường khả năng chống chịu bệnh nấm ở những cơ thể được chuyển gen đã được các tác giả Shah, 1997; Bushnell et al, 1998; Honee, 1999; Melckers và Stuiver, 2000 [6][1][2][5] đề cập đến. Sự biểu hiện của *glucanase* ở cơ thể chuyển gen cũng gần giống như sự biểu hiện của *chitinase*. Sự kết hợp giữa *chitinase* và *glucanase*; *glucanase* và *osmotin* đem lại hiệu quả cao hơn trong việc phòng ngừa sự phát triển của các loại nấm gây bệnh với phổ rộng hơn so với từng loại đơn độc, như sự kết hợp giữa *chitinase* và *glucanase* trong cây cà chua chuyển gen đã làm giảm sự mẫn cảm của cà chua với nấm *Fusarium oxysporum* (Jongedijk và cs, 1995; Lawrence và cs, 2000)[3][4]. Ở nước ta bệnh héo rũ do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* đã phát sinh ở hầu hết các địa phương có trồng cây như: cà chua, vừng, lạc, thuốc lá, khoai tây, ở các tỉnh, thành phố: Hà Nội, Vĩnh Phúc, Bắc Ninh, Thái Nguyên, Thanh Hoá, Nghệ An... có nơi có lúc bệnh đã gây thiệt hại nặng tới mức gây chết 100% cây trồng. Đã có nhiều nghiên cứu phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn đối kháng để ứng dụng trong phòng trừ bệnh héo xanh do vi khuẩn *R.solanacearum*. Nhưng cho tới nay các kết quả ứng dụng những chủng đối kháng này vẫn còn một số hạn chế do hoạt tính đối kháng bị giảm dần theo thời gian

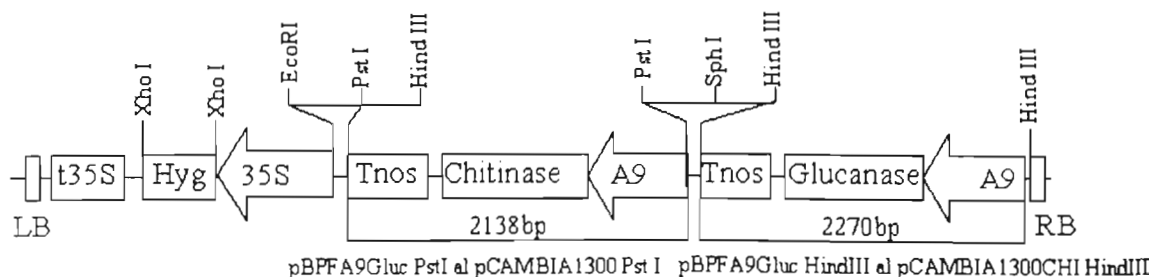
lưu giữ, phổ đối kháng hẹp.... Do đó cần phải có những biện pháp nhằm tăng thời gian lưu giữ hoạt tính đối kháng, phổ đối kháng rộng hơn, để khắc phục vấn đề này thì phương pháp ADN tái tổ hợp là có triển vọng nhất, vì nó cho phép chuyển những gen lựa chọn vào thể nhận để ứng dụng có hiệu quả hơn. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả sẽ thực hiện chuyển gen *chitinase* và *glucanase* vào chủng vi khuẩn đối kháng nhằm tạo chủng vi khuẩn mới có hoạt tính đối kháng cao hơn, phổ đối kháng rộng hơn chủng gốc để sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng trong phòng trừ vi khuẩn *R.solanacearum* gây bệnh héo xanh cây trồng.

Từ khóa: *R.solanacearum*, vi khuẩn đối kháng, gen *chitinase*, gen *glucanase*, gen *Osmotin*, vectơ *pCAMBIA1300*

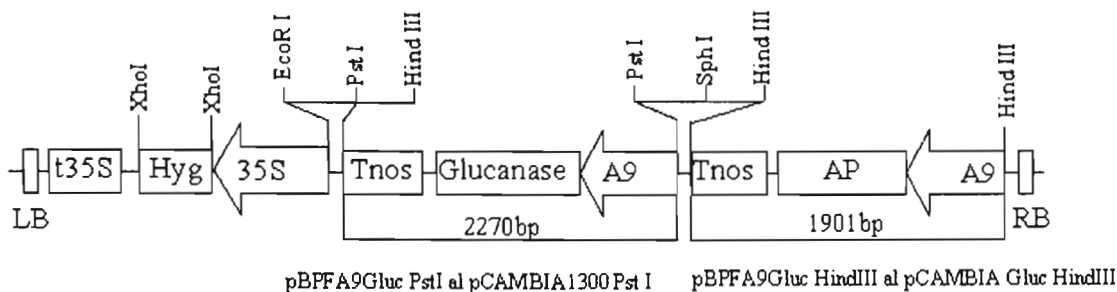
## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Các dòng vi khuẩn đối kháng *Pseudomonas* sp: H3, DM11; RS5; TK7; RL8 và HD5 được sử dụng để chọn lọc dòng vi khuẩn thích hợp cho biến nạp; chủng *E.coli*: DH5 $\alpha$  làm tế bào khả biến; 2 loại plasmid *pCAMBIA 1300* mang gen *chitinase* và *glucanase* và *pCAMBIA 1300* mang gen *glucanase* và AP(*Osmotin*) có khả năng phân hủy kitin (một thành phần chủ yếu trong thành tế bào nấm).



Hình 1. Plasmid pCAMBIA 1300 mang gen chitinase và glucanase



Hình 2. Plasmid pCAMBIA 1300 mang gen *glucanase* và AP(Osmotin)

Các thiết bị, hoá chất của Bộ môn vi sinh vật - Viện Thổ nhưỡng Nông hóa, các môi trường nuôi cấy vi khuẩn gồm: Môi trường LB (Luria Broth: Difco Bacto) để nuôi cấy vi khuẩn đối kháng, các dung dịch đệm chủ yếu để tách ADN vi sinh vật (đệm CTAB: 100 mM Tris HCl, pH = 9,0; 20 mM NaEDTA, pH = 8,0; 1,4M NaCl; 2% Cetyl trimethyl ammonium bromit (CTAB); 0,2%  $\beta$ - mercapto ethanol; đệm gầy tan tế bào "Lysis": 50 mM Tris - HCl; 50 mM EDTA; 3% SDS; 1% 2 - mercapto ethanol; chloroform; TE: saturated phenol (1/1 phenol bão hòa trong TE); TE: 10 mM Tris - HCl (pH = 8,0); 1 mM EDTA; 3M NaOAc (pH = 8,0); isopropanol, ethanol 70%. Dung dịch mẹ: dung dịch phenol bão hòa TE, dung dịch chloroform: isomyalcohol (24/1), dung dịch TE (10 mM Tris - HCl pH = 8,0; 1 mM EDTA), dung dịch đệm điện di 10xTBE: Tris base: 108g; boric axit 55g; 0,5M EDTA (pH = 8,0) 40 ml; nước 1000 ml.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Phương pháp chọn chủng vi khuẩn biến nạp

Các chủng vi khuẩn đối kháng lựa chọn được nuôi cấy trên môi trường LB không có và có *hygromycin* với nồng độ 50 mg/l *hygromycin*, ủ qua đêm ở 37°C, quan sát kết quả và chọn những chủng không có khả năng mọc trên môi trường có bổ sung *hygromycin* để tiến hành cho biến nạp. Môi trường không có *hygromycin* dùng để làm đối chứng.

### 2.2.2. Phương pháp tái tổ hợp ADN (S. O. Kotchoni & cs. 2003)

Quy trình chuẩn bị tế bào khả biến của vi khuẩn the; quy trình biến nạp plasmid pCAMBIA 1300 mang gen *glucanase* và AP(Osmotin) và pCAMBIA 1300 mang gen *chitinase* và *glucanase* vào vi khuẩn bằng sốc nhiệt; quy trình tách chiết plasmid

### 2.2.3. Phương pháp kiểm tra thể biến nạp

Hai plasmid trên ngoài việc mang các gen *chitinase* và *glucanase* còn mang gen kháng *hygromycin*, do vậy để khẳng định chủng vi khuẩn đã được biến nạp hay chưa thì phải kiểm tra chúng trên môi trường có và không có *hygromycin*. Thể biến nạp mà kháng

*hygromycin* - tức là phát triển được trên môi trường có *hygromycin*, thì chứng tỏ chủng vi khuẩn đó đã được biến nạp plasmid trên. Dựa trên cơ sở đó, các thể biến nạp sẽ được kiểm tra ngược trên môi trường có và không có *hygromycin*, để khẳng định các chủng được biến nạp. Các thể biến nạp được cấy trên hai loại môi trường LB, một loại không có và một loại có *hygromycin* với nồng độ 50mg/l, ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C và quan sát kết quả.

### 2.2.4. Phương pháp phân tích PCR

Để khẳng định chính xác các plasmid đã được biến nạp vào tế bào vi khuẩn, ngoài việc kiểm tra bằng hình thái phải tiến hành kiểm tra bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc trưng cho gen kháng *hygromycin* (HPT5/HPT3) với chu trình nhiệt: 95°C: 5 phút; 35 chu kỳ: 95°C: 1 phút; 55°C: 1 phút; 72°C: 1 phút và 1 chu kỳ 72°C: 5 phút. Phản ứng PCR với cặp mồi đặc trưng cho gen *glucanase* (GL/Tnos) với chu trình nhiệt tương tự như trên, chỉ thay 55°C bằng 66°C.

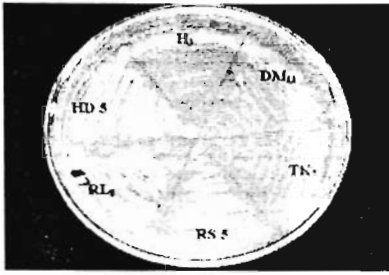
Trình tự các cặp mồi đặc hiệu xác định gen biến nạp

Gen đích	Cặp mồi	Trình tự
<i>hpt</i>	HPT5	5'-CTGCCTGAAACCGAAGTGC-3'
	HPT3	5'-CTTCTGCGGGCGATTGTG-3'
<i>chitinase</i>	CHI	5'ATGGGGAAGAATAGGATGATG-3'
	Tnos	5'-GATAATCATCGCAAGACCGGC-3'
<i>glucanase</i>	GL	5'-GGGGCTCAATCGATAGGTGGT-3'
	Tnos	5'-GATAATCATCGCAAGACCGGC-3'

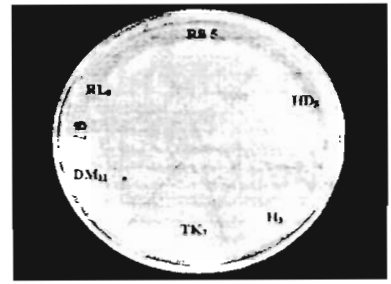
## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Chọn chủng vi khuẩn sử dụng cho biến nạp

Kết quả tuyển chọn các chủng vi khuẩn đối kháng trên môi trường chọn lọc được quan sát trên ảnh 1. Như vậy, trên môi trường LB không có *hygromycin* thì tất cả các chủng lựa chọn đều phát triển tốt, trái lại trên môi trường LB có *hygromycin* thì chỉ có chủng RS5 không phát triển (các chủng khác đều phát triển nhưng mức độ kém hơn trên môi trường LB không có *hygromycin*), chủng RL8 vẫn phát triển nhưng ở tỉ lệ thấp. Từ kết quả trên cho thấy chủng RS5 là không chứa gen kháng *hygromycin* và đủ điều kiện để sử dụng cho biến nạp.



Môi trường LB đặc không có hygromycin



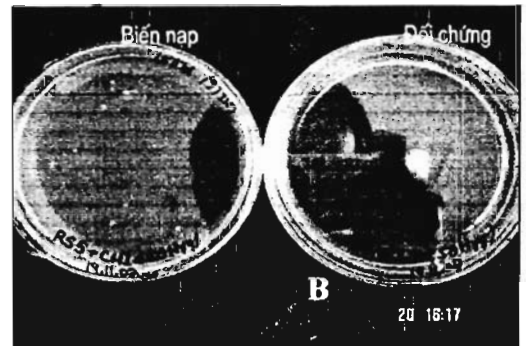
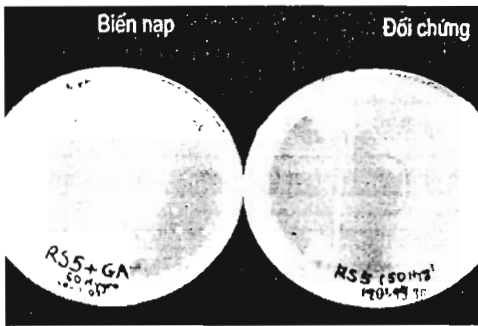
Môi trường LB đặc có hygromycin

Ảnh 1. Kết quả chọn lọc các chủng vi khuẩn đối kháng trên môi trường chọn lọc

### 3.2. Biến nạp plasmid vào vi khuẩn

Kết quả ảnh 2 cho thấy các chủng vi khuẩn RS5 sau khi được biến nạp đã phát triển tốt trên môi trường chọn lọc có chứa 50mg/l *hygromycin*. Như vậy, xét về

mặt hình thái thì chủng vi khuẩn RS5 đã được biến nạp hai plasmid *pCAMBIA 1300* mang gen glucanase và AP(Osmolin) và *pCAMBIA 1300* mang gen *chitinase* và *glucanase*.



Ảnh 2. Chọn lọc các tế bào vi khuẩn RS5 được biến nạp với plasmid mang gen glucanase (A) và gen chitinase (B)

Để khẳng định chắc chắn kết quả trên, chúng tôi đã tiến hành kiểm tra sự có mặt của plasmid trong tế bào được biến nạp bằng phương pháp PCR.

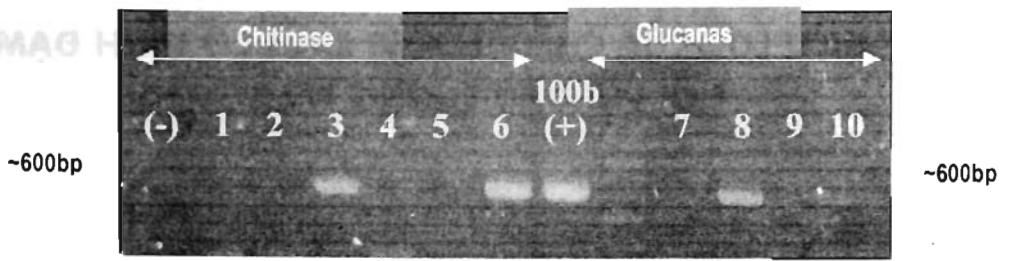
### 3.3. Kiểm tra sự có mặt của plasmid trong tế bào được biến nạp

Các tế bào vi khuẩn biến nạp phát triển trên môi trường LB có bổ sung *hygromycin* được kiểm tra bằng kết quả nhân bản gen (PCR) và sử dụng các cặp mồi nêu ở phần vật liệu. Chương trình PCR dựa theo các chương trình được thiết kế phù hợp với từng cặp mồi riêng biệt (ảnh 3, 4). Kết quả kiểm tra cho ta thấy, trong 6 dòng được biến nạp với *plasmid* có chứa gen *chitinase*, sử dụng cặp mồi HPT5/HPT3 thì có 2 dòng cho kết quả dương tính với sự khuếch đại của đoạn ADN mang gen kháng *hygromycin* (giếng 3 và 6) với đoạn được nhân lên có kích thước xấp xỉ 600bp.

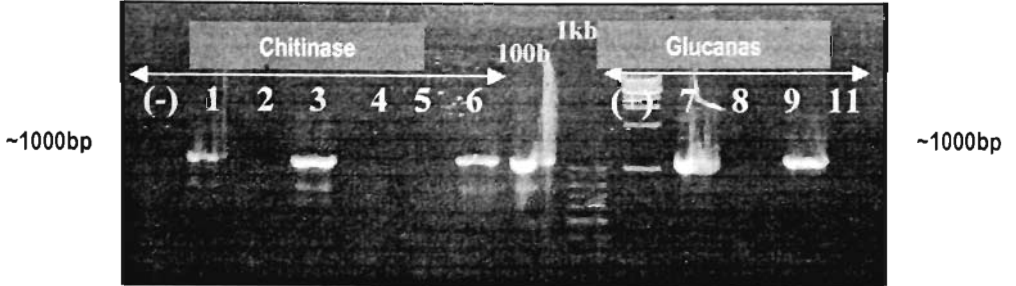
Đối với 5 dòng vi khuẩn biến nạp với plasmid mang gen *glucanase*, có 2 dòng cho kết quả dương tính với cặp mồi HPT5/HPT3 với đoạn ADN được khuếch đại 600bp (giếng 8 và 10). Những dòng được khuếch đại nhờ phản ứng PCR với bằng ADN có kích thước xấp xỉ 600bp, chứng tỏ có mang gen kháng *hygromycin*

(*hpt*). Những dòng vi khuẩn sống sót trên môi trường LB chọn lọc với 50mg/l *hygromycin* nhưng không khẳng định được bằng phản ứng PCR có thể do chủng vi khuẩn này bị đột biến và dạng đột biến của chủng vi khuẩn này có thể sống sót trên môi trường chọn lọc có kháng sinh, ảnh 4.

Để khẳng định sự có mặt của gen *chitinase* và gen *glucanase* trong các dòng vi khuẩn được biến nạp, chúng tôi đã tiến hành thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi khuếch đại sự có mặt của những đoạn gen này. Cặp mồi CHI/Tnos và cặp mồi GL/Tnos đã được sử dụng để nhân đoạn gen *chitinase* và *glucanase* tương ứng. Kết quả được thể hiện ở ảnh 4. Các mẫu thử của các dòng vi khuẩn biến nạp cho kết quả dương tính với cặp mồi HPT5/HPT3 đều cho kết quả dương tính với đoạn ADN được nhân với kích thước xấp xỉ 1000bp. Các *plasmid* được sử dụng để biến nạp (xem cấu trúc) là những plasmid *pCAMBIA1300* mang gen *chitinase-glucanase* và *pCAMBIA1300* mang gen *glucanase-AP* (Osmotin). Vì vậy, nếu phát hiện sự có mặt của *chitinase* sẽ đi kèm với sự có mặt của *glucanase* (cấu trúc 1). Đối với cấu trúc 2, nếu phát hiện sự có mặt của *glucanase*, sẽ khẳng định được sự có mặt của gen AP (Osmotin).



Ảnh 3. Kết quả PCR kiểm tra sự có mặt của gen *hpt*



Chú thích: (+): đối chứng dương; (-): đối chứng âm

Ảnh 4. Kết quả PCR kiểm tra sự có mặt của gen *chitinase* và *glucanase*

#### IV. KẾT LUẬN

Đã biến nạp thành công và thu được 2 dòng vi khuẩn RS5 có chứa plasmid mang gen *chitinase* và *glucanase* và một số dòng vi khuẩn RS5 biến nạp plasmid mang gen *glucanase* và AP (Osmotin). Sự có

mặt của các gen biến nạp trong chủng vi khuẩn tái tổ hợp đã được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR. Đây là hướng nghiên cứu rất khả thi và hiệu quả trong việc áp dụng công nghệ vi sinh trong phát triển nông nghiệp theo hướng bền vững.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bushnell WR, Somers DA, Giroirs RW, Szabi LJ and Zeyen RJ (1998). Genetic engineering of disease resistance in cereals can. J. Plant Pathol. 20: 137-149.
2. Honee G (1999). Engineered resistance against fungal pathogen. Eur.J.Plant Pathol 105: 319-326.
3. Jongedijk E et al (1995). Synergistic activity of chitinase and  $\alpha$ -1,3- glucanase enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. Euphytica 85: 173-180.

4. Lawrence CB et al (2000). Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as an elicitor release mechanism. Physiol. Mol. Plant Pathol 57: 211-220.
5. Melchers L S. and Stuiver M H (2000). Novel genes for disease resistance breeding. Curr. Opin. Plant. Biol 3: 147-162.
6. Shah DM (1997). Genetic engineering of fungal and bacterial diseases. Curr. Opin. Biotechnol. S: 208-214.

#### Summary

### IMPROVEMENT ANTAGONISTIC ACTIVITY OF BACTERIA ISOLATES AGAINST CROPS WILT DISEASE BY GENE TRANSFER METHOD

Đoan Thu Thuy, Tran Quang Minh  
Nguyen Thi Kim Thoa, Le Nhu Kieu

The combinations of two genes *chitinase* and *glucanase* or *glucanase* and *osmotin*, in the vector *pCAMBIA 1300*, bring stronger effect with wider spectrum in preventing growth of pathogenous fungi than that of single gene. For this reason, gene transfer is the most potential method to overcome the above difficulties. When being test on medium LB with hygromycin, antagonistic bacterium isolate RS5 was not able to survive. This proved that, there is no *hygromycin* gene in genome of the isolate. Therefore this isolate can be used as material for gene transferring. In this study, the target genes had been transferred to RS5, creating to two forms of antagonistic bacterium isolates from RS5 containing *chitinase* and *glucanase* plasmids, and some forms containing *glucanase* and *osmotin* plasmid. When being

tested on the medium containing *hygromycin*, these isolates performed well thriving, indicating the possession of *hygromycin* resistance gene (*hpt*). The expression of transferred genes was then reassessed by PCR technique. Results from PCR analysis showed that, 02 isolates expressed positive response to primer HPT5/HPT3 (with DNA band sized 600bps) and HPT5/HPT3 (with DNA band sized 1000 bps); This reconfirmed the existence of *hygromycin*, *glucanase* and *chitinase* genes in the genomes of these isolates.

**Key words:** *R.solanacearum*, antagonistic bacteria, *chitinase* gene, *glucanase* gene, *Osmotin* gene, vector *pCAMBIA1300*.