

taxonomy of the oak powdery mildew *Erysiphe alphitoides* sensu lato. *Mycological Research* 111(7):809-826.

10. Takamatsu, S., Hirata, T., Sato, Y., Nomura, Y. and Sato, Y. 1999. Phylogenetic relationships of *Microspora* and *Erysiphe* section *Erysiphe* (powdery mildews) inferred from the rDNA ITS sequences. *Journal Mycology* 40, 259-268.

11. Takamatsu S, Kano Y, 2001. PCR primers

useful for nucleotide sequences of rDNA of the powdery mildew fungi. *Mycoscience* 42:135-139.

12. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.

**Phân biệt:** TS. Ngô Vinh Viễn

## XÁC ĐỊNH PHYTOPLASMA NHÓM 16SRII-A GÂY HẠI TRÊN CÂY Sắn TẠI ĐÔNG NAM BỘ BẰNG KỸ THUẬT PCR, RFLP

**Molecular Identification of a 16SrII-A Phytoplasma Associated  
with Witches' Broom Disease of Cassava in South Eastern Region**

**Nguyễn Đức Thành<sup>1</sup>, Trịnh Xuân Hoạt<sup>2</sup>, Mai Văn Quân<sup>2</sup> và Hà Việt Cường<sup>3</sup>**

*Ngày gửi bài: 10.3.2015*

*Ngày chấp nhận đăng: 15.4.2015*

### Abstract

In recent years, witches' broom disease of cassava is one of the most serious disease in the South Eastern region. The infected plants showing typical witches' broom symptoms were observed on cassava: small leaves, yellowing and formation of excessive buds. Total DNAs were extracted from the symptomatic and the asymptomatic cassava plants. Using universal primer P1/P7 followed by R16mF2/R16mR1 by nested polymerase chain reaction assay to detect the presence of phytoplasma in symptomatic cassava plants. No amplification products were obtained from templates of asymptomatic. PCR products were sequenced directly and the result of BLAST search in the GenBank confirmed that the nucleotide sequences had 99% identity with several members of the peanut witches' broom group. Virtual restriction fragment length polymorphism pattern and phylogenetic analysis showed that phytoplasma associated with diseased cassava plants belongs to the subgroup A of the peanut witches' broom group. This is the first report of a 16SrII-A phytoplasma infecting cassava in Vietnam.

**Keywords:** 16SrII-A, cassava, virtual RFLP, witches' broom.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh phytoplasma gây hại trên cây sắn (*Manihot esculenta*) là một trong những nguyên nhân quan trọng làm giảm sút năng suất và chất lượng sắn, ảnh hưởng đến lợi ích của người trồng sắn tại nhiều vùng trên thế giới. Tại Việt Nam, cây sắn bị bệnh chổi rồng giảm năng suất từ 10-30%, hàm lượng tinh bột giảm từ 20-30% (Nguyễn Khuê, 2011). Ở Brazil, tại một số vùng

trồng sắn thuộc phía đông bắc nước này, tỷ lệ cây sắn bị bệnh chổi rồng lên đến 85% và làm giảm năng suất củ đến 70%, thậm chí năng suất củ giảm sút đến 90% cũng đã được ghi nhận (Lozano, 1992). Bệnh phytoplasma gây hại trên cây sắn được ghi nhận lần đầu ở Brazil và phía nam Mexico. Lúc đó, nguyên nhân gây bệnh được xác định là do MLOs (phytoplasma) gây ra. Dựa vào vùng gen rDNA mã hóa 16S rRNA (RNA ribosome), phytoplasma xác định được thuộc nhiều nhóm khác nhau bao gồm nhóm 16SrI (Davis *et al.*, 2005), 16SrII (Arocha *et al.*, 2008b) và 16SrIII (Alvarez *et al.*, 2009; Flores *et*

1. Nghiên cứu sinh, Học viện Nông nghiệp Việt Nam;

2. Viện Bảo vệ thực vật;

3. Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*et al.*, 2013) liên quan đến bệnh biến vàng, bệnh chổi rồng (hay chổi phù thủy) và bệnh da cóc gây hại trên cây sắn. Các nghiên cứu trước đó cho biết, tại Việt Nam phytoplasma gây hại trên cây sắn bị bệnh chổi rồng thuộc nhóm 16SrI (Trịnh Xuân Hoạt và cs., 2012; Alvarez *et al.*, 2013).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi ứng dụng nguyên lý của kỹ thuật PCR kết hợp với giải trình tự vùng 16S rDNA và phân tích đa hình RFLP để phát hiện tác nhân gây bệnh là phytoplasma gây hại trên cây sắn tại Đông Nam Bộ.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Nguồn DNA tổng số được tách chiết từ mẫu cây sắn bị nhiễm bệnh chổi rồng thu thập tại một số tỉnh gồm Bà Rịa-Vũng Tàu, Bình Dương, Đồng Nai, Tây Ninh trong năm 2013-2014 và mẫu cây sắn thu thập tại Quảng Ngãi được bảo quản silicagel từ những năm trước.

Hóa chất dùng trong phản ứng PCR (polymerase chain reaction): 2x GoTaq Green Master mix (Promega, Madison, WI, Hoa Kỳ), nước cất vô trùng.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Tách chiết DNA tổng số

Tách chiết DNA tổng số từ mô cây thu thập bằng phương pháp CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) dựa theo tài liệu mô tả của Doyle and Doyle (1990). Hòa cạn DNA tổng số với 50  $\mu$ l TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 và 1 mM EDTA, pH 8,0). Bảo quản tube có chứa DNA tổng số ở điều kiện nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$  cho đến khi sử dụng.

#### 2.2.2. Kỹ thuật PCR

Sử dụng kỹ thuật PCR để khuếch đại đoạn gen 16S rDNA của phytoplasma. Cặp mồi sử dụng ban đầu là P1 (Deng and Hiruki, 1991) và P7 (Schneider *et al.*, 1995). Sản phẩm PCR lần 1 được pha loãng với nước cất vô trùng để làm khuôn mẫu DNA trong phản ứng nested PCR sử dụng cặp mồi R16mF2/R16mR1 (Gundersen and Lee, 1996). Thành phần phản ứng PCR được dựa theo tài liệu đã công bố. Quy trình thực hiện trong phản ứng PCR được thực hiện trên máy PTC-100 (M.J Research Inc.) với điều kiện sau: khởi đầu biến tính ở ( $94^{\circ}\text{C}$ -3 phút) x 1 chu kỳ; tiếp theo là chu trình ( $94^{\circ}\text{C}$ -1 phút;  $52^{\circ}\text{C}$ -2 phút;  $94^{\circ}\text{C}$ -3 phút) x 35 chu kỳ. Phản ứng kết thúc ở ( $72^{\circ}\text{C}$ -10 phút) x 1 chu kỳ. Kiểm

tra phản ứng PCR trên bản điện di agarose gel 1% trong TAE 1X.

#### 2.2.3. Tinh sạch sản phẩm PCR và giải trình tự

Tinh chiết sản phẩm PCR trong phản ứng nested PCR dùng QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, GmbH, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR sau khi tinh chiết được giải trình tự trực tiếp. Sản phẩm giải trình tự được gửi đọc tại Công ty Bioneer của Hàn Quốc bằng BigDye Terminator 3.1 Kit (Applied Biotech).

#### 2.2.4. Phân tích đa hình RFLP và xác định mức đồng nhất trình tự nucleotide

Phân tích đa hình (RFLP) thực hiện mô phỏng trên chương trình iPhyClassifier. Các trình tự nucleotide đọc được, giải trực tiếp từ sản phẩm PCR nhân với cặp mồi R16mF2/R16mR1 được cắt bằng enzyme *AluI*, *HaellI*, *HinfI*, *MseI*, *RsaI* và *TaqI* theo tài liệu mô tả của Zhao *et al.* (2009). Phytoplasma gây hại trên sắn tại Yên Bái - Việt Nam (CWBYB.01, mã truy cập KM360166, nhóm 16SrI); phytoplasma gây hại trên sắn tại Trung Quốc (CWB.TQ, JQ957931, nhóm 16SrII-A) và phytoplasma gây hại trên cây lạc tại Đài Loan (PnWB, L33765, nhóm 16SrII-A) thuộc nhóm 16SrII-A; và HibWB (mã truy cập AF147708, nhóm 16SrXV-A) được đưa vào làm đối chứng. Các băng DNA được xác định từ kết quả chạy điện di trên gel ảo và được ghi nhận dựa trên sự có mặt hay vắng mặt của chúng. Hệ số đồng nhất (F) do phần mềm tính toán dựa trên ma trận nhị phân theo công thức:  $F = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$ ; trong đó:  $N_{xy}$  là số băng DNA chung có ở cả hai mẫu x và y;  $N_x$  là số băng DNA của mẫu x;  $N_y$  là số băng DNA của mẫu y (Wei *et al.*, 2007).

#### 2.2.5. Phân tích phả hệ

Trình tự các mẫu được so sánh mức độ tương đồng với nhau bằng ClustalW2, BioEdit 7.0.0 và dùng chương trình trực tuyến BLAST (basic local alignment search tool) để tìm kiếm các chuỗi nucleotide gần gũi có sẵn trên Ngân hàng Gen của NCBI (Bethesda, Hoa Kỳ) tại địa chỉ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Cây phả hệ được xây dựng theo phương pháp Neighbor-Joining (N-J) với khoảng cách di truyền giữa các chuỗi được xác định dựa trên mô hình thay thế Kimura 2 tham số, giá trị thống kê bằng kỹ thuật bootstrap (%) với 1.000 lần lặp lại trong MEGA 5.0.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Mô tả triệu chứng bệnh

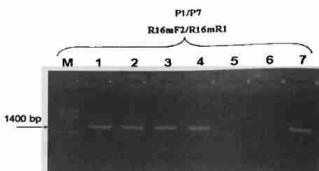
Kết quả điều tra cho thấy, cây sắn *Manihot esculenta* Crantz bị nhiễm bệnh chổi rồng được quan sát thấy có biểu hiện triệu chứng như mọc nhiều chồi ngọn và chồi thân ở phần thân chính, lá cây nhỏ lại, biến màu vàng nhạt, thô cứng, thân sắn ngả màu thâm đen (hình 1). Cây sắn nhiễm bệnh quan sát thấy tại các vùng trồng sắn thuộc Đông Nam Bộ bao gồm Bà Rịa-Vũng Tàu, Bình Dương, Đồng Nai và Tây Ninh. Loại hình triệu chứng bệnh chổi rồng gây hại trên cây sắn giống với các mô tả trước đó (Trịnh Xuân Hoạt và cs., 2012; Alvarez *et al.*, 2013), nhưng khác hẳn so với triệu chứng của bệnh khảm lá sắn, bệnh đốm sọc nâu củ sắn, bệnh đốm lá xì mù hại sắn do các tác nhân gây bệnh là virus và vi khuẩn gây ra đã được công bố trên thế giới.



Hình 1. Triệu chứng bệnh chổi rồng hại trên giống sắn KM94 ở giai đoạn chờ thu hoạch

#### 3.2. Kiểm tra mẫu tách chiết DNA tổng số bằng kỹ thuật PCR

Nhằm phát hiện phytoplasma trong các mẫu tách chiết DNA tổng số, sử dụng kỹ thuật nested PCR là điều cần thiết khi phytoplasma xuất hiện và phân bố với mức độ thấp hoặc phân bố không đồng đều trong cây chủ và nhằm tăng tính đặc hiệu của phản ứng. Lặp lại thí nghiệm nhiều lần với các cặp mồi P1/P7 và R16mF2/R16mR1. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm nested PCR. M-Thang DNA 1kb (Fermentas); 1-T7-DN (chổi rồng sắn, Đồng Nai); 2-T11-QNG (chổi rồng sắn, Quảng Ngãi); 3-T18-TN (chổi rồng sắn, Tây Ninh); 4-T19-BRVT (chổi rồng sắn, Bà Rịa-Vũng Tàu); 5-Cây sắn khỏe 1 (Đồng Nai); 6-Cây sắn khỏe 2 (Đồng Nai); 7-Đối chứng (+) (chổi rồng sắn, Đồng Nai); Kích thước sản phẩm được chỉ rõ bằng mũi tên.

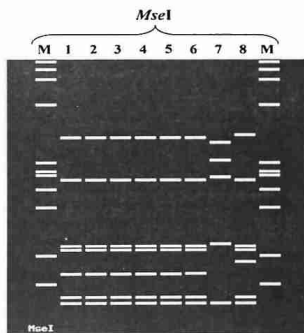
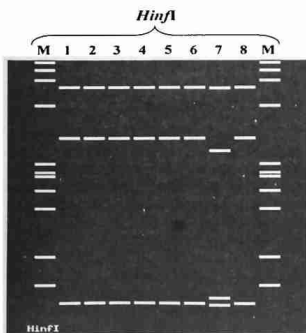
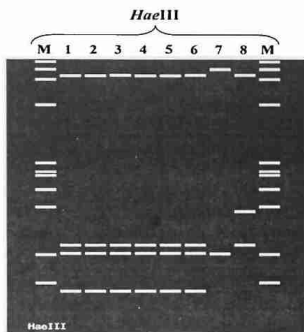
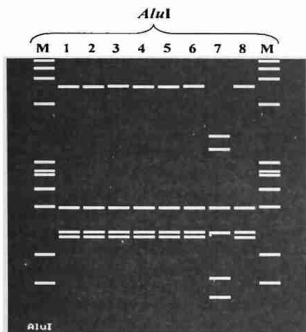
Kết quả kiểm tra cho thấy, ở trên bản điện di, các mẫu T7-DN, T11-QNG, T18-TN và T19-BRVT có phản ứng PCR (+) xuất hiện vạch băng trên bản điện di, với kích thước đặc trưng là 1.400 bp, cũng giống với đối chứng (+). Đối chứng là cây sắn khỏe có phản ứng PCR (-) không xuất hiện vạch băng trên bản điện di. Kết quả phản ứng PCR đã xác nhận sự có mặt của phytoplasma trong mẫu cây sắn bị nhiễm bệnh chổi rồng.

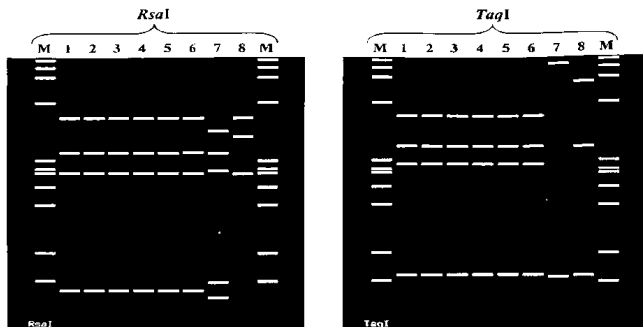
Để khẳng định cặp mồi dùng trong phản ứng PCR có bắt cặp đúng phytoplasma hay không, giải trình tự trực tiếp sản phẩm PCR đã được làm tinh sạch. Sử dụng công cụ tìm kiếm BLAST, chúng tôi đã tìm các chuỗi gần gũi nhất trên Ngân hàng Gen dựa trên đoạn gen đã giải trình tự vùng bảo thủ 16S. Kết quả BLAST cho thấy, sản phẩm PCR của mẫu T7-DN, T11-QNG, T18-TN và T19-BRVT (có mức đồng nhất trình tự 99%, phần trăm đoạn so sánh là 100%) phân lập trên cây sắn bị bệnh chổi rồng thu thập đều là các chuỗi mã hóa ribosome RNA 16S của phytoplasma gây bệnh cây, trong đó có các mẫu phytoplasma gây hại sắn xác định tại Trung Quốc và Uganda (Arocha *et al.*, 2008). Trình tự gen 16S rRNA phytoplasma của các mẫu phân lập trên sắn đều có chất lượng tốt và được đăng ký trên Ngân hàng Gen với các mã truy cập lần lượt là KM280679 (T7-DN, 1340 nts), KM280680 (T11-QNG, 1330 nts), KM280681 (T18-TN, 1341 nts) và KM280682 (T19-BRVT, 1340 nts).

**3.3. Phân tích đa hình RFLP và xác định mức đồng nhất trình tự nucleotide**

Phân tích đa hình (RFLP) thực hiện mô phỏng trên chương trình iPhyClassifier. Áp dụng kỹ thuật phân tích này khi trình tự nucleotide phải  $\geq 1.200$  bp. Mục đích nhằm đánh giá mức độ tương đồng giữa các cặp trình tự nucleotide vùng bảo thủ 16S rDNA của phytoplasma gây

bệnh cây. Các trình tự nucleotide đọc được của phytoplasma thuộc nhóm 16SrII gồm mẫu T7-DN, T11-QNg, T18-TN và T19-BRVT giải trực tiếp từ sản phẩm PCR nhân với cặp mồi R16mF2/R16mR1 được cắt với enzyme *AluI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MseI*, *RsaI* và *TaqI* theo tài liệu mô tả của Zhao *et al.* (2009). Kết quả được thể hiện ở hình 3.





**Hình 3. Kết quả phân tích RFLP trên gel ào dùng chương trình iPhyClassifier.**

1-T7-DN: Chối rỗng sẵn (Đồng Nai); 2-T11-QNg, Chối rỗng sẵn (Quảng Ngãi); 3-T18-TN: Chối rỗng sẵn (Tây Ninh); 4-T19-BRVT: Chối rỗng sẵn (Bà Rịa-Vũng Tàu), 5-Chối rỗng sẵn (Trung Quốc, nhóm 16SrII-A); 6-Chối rỗng lạc (Đài Loan, nhóm 16SrII-A); 7-YB-01: Chối rỗng sẵn (Yên Bái, nhóm 16SrI) và 8-Chối rỗng dâm bụi (Bra-xin, nhóm 16SrXV-A) được đưa vào làm đối chứng.

Kết quả điện di trên gel ào cho thấy, trình tự nucleotide của các mẫu thử nghiệm T7-DN, T11-QNg, T18-TN và T19-BRVT là giống hệt nhau khi cắt với enzyme *AluI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MseI*, *RsaI* và *TaqI*. Kết quả gợi ý rằng các mẫu phân lập được trong nghiên cứu này thuộc cùng một nhóm gây bệnh. Các trình tự này cũng giống với trình tự nucleotide của phytoplasma gây hại trên cây sắn tại Trung Quốc (JQ957931, nhóm 16SrII-A) và trên cây lạc tại Đài Loan (L33765, nhóm 16SrII-A) đã được công bố, nhưng sai khác hẳn so với đối chứng là trình tự nucleotide của phytoplasma gây hại trên sắn tại Yên Bái (KM360166, nhóm 16SrI) và HibWB (AF147708, nhóm 16SrXV-A). Ngoài 6 enzyme cắt đã dùng này, chúng tôi còn sử dụng 11 enzyme khác (gồm *BamHI*, *BfaI*, *BstXI*, *DraI*, *EcoRI*, *HhaI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI* và *SspI*) theo tài liệu mô tả của Zhao *et al.* (2009), kết quả phân tích gel ào cho thấy không có sự khác biệt giữa trình tự nucleotide của các mẫu T7-DN (KM280679), T11-QNg (KM280680), T18-TN (KM280681) và T19-BRVT (KM280682) (hình ảnh không đưa ra).

16S rDNA của các mẫu T7-DN (KM280679), T11-QNg (KM280680), T18-TN (KM280681) và T19-BRVT (KM280682) dựa trên phân tích kết quả điện di gel ào. Các băng DNA được ghi nhận dựa trên sự có mặt hay vắng mặt của chúng. Hệ số đồng nhất (F) do phần mềm tính toán dựa trên ma trận nhị phân (Wei *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009). Kết quả trình bày ở bảng 1.

Kết quả cho thấy, trình tự nucleotide của các mẫu thử nghiệm T7-DN, T11-QNg, T18-TN và T19-BRVT có cùng hệ số đồng nhất cao nhất (F = 1,00) với trình tự nucleotide của phytoplasma gây hại trên cây sắn tại Trung Quốc (JQ957931) đều thuộc nhóm 16SrII, nhóm phụ A đã được công bố và sai khác hẳn so với phytoplasma nhóm 16SrI, nhóm phụ A (F = 0,47), phytoplasma hai sản tại Yên Bái, nhóm 16SrI (F = 0,40-0,44) và phytoplasma nhóm 16SrIII, nhóm phụ B (F = 0,63) liên quan đến bệnh chối rỗng hại sắn, bệnh đa cóc hại sắn (Davis *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2009). So sánh các trình tự này với các nhóm phụ khác trong cùng một nhóm phytoplasma 16SrII như nhóm phụ 16SrII-B (WBDL, U15442), 16SrII-C (FBP, X83432),

So sánh mức đồng nhất trình tự nucleotide vùng

16SrII-D (PpM, Y10096), 16SrII-E (PEY, Y16393) và 16SrII-F (CoP, EF186827) thì đều có hệ số đồng nhất cao thấp hơn ( $F = 0,88-0,95$ ). Kết quả này cho biết rằng, các trình tự

nucleotide (Việt Nam) của các mã truy cập Ngân hàng Gen gồm KM280679, KM280680, KM280681 và KM280682 đều cùng thuộc nhóm phytoplasma 16SrII, nhóm phụ A (16SrII-A).

**Bảng 1. So sánh mức đồng nhất trình tự nucleotide vùng 16S rDNA**

STT	Mẫu phân tích	Nhóm 16Sr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	T7.DN	-	1,00													
2	T11.QNg		1,00	1,00												
3	T18.TN		1,00	1,00	1,00											
4	T19.BRVT	-	1,00	1,00	1,00	1,00										
5	CWB.WF	16SrI-A	0,47	0,47	0,47	0,47	1,00									
6	CWB.YB.01	16SrI	0,40	0,40	0,44	0,40	0,78	1,00								
7	CWB.TQ	16SrII-A	1,00	1,00	1,00	1,00	0,47	0,40	1,00							
8	PnWB	16SrII-A	1,00	1,00	1,00	1,00	0,47	0,42	1,00	1,00						
9	WBDL	16SrII-B	0,88	0,88	0,88	0,88	0,48	0,39	0,88	0,88	1,00					
10	FBP	16SrII-C	0,94	0,94	0,94	0,94	0,50	0,41	0,94	0,94	0,94	1,00				
11	PpM	16SrII-D	0,95	0,95	0,95	0,95	0,49	0,40	0,95	0,95	0,91	0,97	1,00			
12	PEY	16SrII-E	0,90	0,90	0,90	0,90	0,47	0,38	0,90	0,90	0,85	0,91	0,94	1,00		
13	CoP	16SrII-F	0,92	0,92	0,92	0,92	0,50	0,41	0,92	0,92	0,92	0,98	0,95	0,89	1,00	
14	CWB.Br02	16SrII-B	0,63	0,63	0,63	0,63	0,59	0,46	0,63	0,63	0,63	0,67	0,66	0,64	0,67	1,00

Ghi chú: Mã truy cập Ngân hàng Gen của các mẫu phân tích T7 DN (KM280679); T11.QNg (KM280680); T18.TN (KM280681); T19.BRVT (KM280682); CWB.WF (AY787139); CWB.YB.01 (KM360166); CWB.TQ (JQ957931); PnWB (L33765); WBDL (U15442); FBP (X83432); PpM (Y10096); PEY (Y16393); CoP (EF186827); CWB.Br02 (GU193977). Số thứ tự ở hàng trên cũng tương ứng với tên mẫu phân tích ở cột phía bên tay trái.

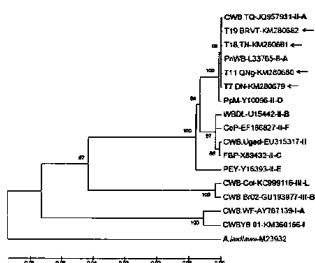
Để nghiên cứu mối quan hệ di truyền giữa các mẫu phytoplasma trong nghiên cứu này với các loài phytoplasma khác và cung cấp cơ sở khoa học cho phân loại, chúng tôi tiến hành xây dựng cây phả hệ dựa trên đoạn gen 16S rRNA của phytoplasma gây bệnh thực vật đã được công bố trên Ngân hàng Gen (bảng 2). Trước khi

xây dựng quan hệ phả hệ, các trình tự được căn chỉnh tự đa chuỗi bằng phần mềm ClustalX. Cây phả hệ được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining và độ tin cậy của các mối quan hệ phả hệ được tính toán bằng kỹ thuật "bootstrap" với 1.000 lần lặp. Kết quả phân tích phả hệ được trình bày ở hình 4

**Bảng 2. Danh mục phytoplasma dùng trong phân tích phả hệ**

Nhóm-nhóm phụ 16S rRNA	Bệnh liên quan đến phytoplasma	Tên viết tắt	Mã số		Nguồn gốc*
			Ngân hàng Gen		
I-A	Chối rỗng sắn	CWB.WF	AY787139		Wallis - Futuna
I	Chối rỗng sắn Yên Bái	CWB.YB.01	KM360166		Việt Nam
II-A	Chối rỗng sắn	CWB.TQ	JQ957931		Trung Quốc
II	Chối rỗng sắn	CWB.Ugad	EU315317		Uganda
II-A	Chối rỗng lạc	PnWB	L33765		Đài Loan
II-B	Chối rỗng cây chanh	WBDL	U15442		Ô-man
II-C	Chối rỗng đậu Hà Lan	FBP	X83432		không rõ
II-D	Khảm lá đu đủ	PpM	Y10096		Ôi-xtrây-li-a
II-E	Diệp hóa hoa mơ	PEY	Y16393		I-ta-li-a
II-F	Diệp hóa bông	CoP	EF186827		Burkina Faso
III-B	Chối rỗng sắn	CWB.Br02	GU193977		Bra-xin
III-L	Chối rỗng sắn	CWB.Col	KC999116		Cô-lôm-bi-a
-	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>A. laidlawii</i>	M23932		-

Ghi chú: \* Tham khảo trên Ngân hàng Gen.



**Hình 4. Cây phả hệ xây dựng theo phương pháp Neighbor-Joining**

Trình tự 16S rRNA của phytoplasma nhóm 16SrII-A gây hại trên cây sắn tại Việt Nam trong nghiên cứu này được chỉ rõ bằng mũi tên. Giá trị bootstrap (%) với 1.000 lần lặp lại được chỉ rõ ở gốc các nhánh. Tên viết tắt và mã truy cập trên Ngân hàng Gen được chỉ rõ ở bảng 2.

*A. laidlawii* được đưa vào làm đối chứng. Thanh bar thể hiện khoảng cách di truyền.

Kết quả phân tích phả hệ cho thấy, phytoplasma gây hại trên cây sắn tại Việt Nam (T7-DN, T11-QNg, T18-TN và T19-BRVT) nằm cùng một nhánh so với nhiều loài phytoplasma khác cũng thuộc nhóm 16SrII cùng với phytoplasma gây hại trên cây sắn tại Trung Quốc (JQ957931) và trên cây lạc tại Đài Loan (L33765) đều thuộc nhóm 16SrII-A. Hiện nay trên thế giới mới chỉ phát hiện thấy phytoplasma thuộc các nhóm 16SrI, 16SrII và 16SrIII gây hại trên cây sắn *Manihot esculenta* Crantz tại nhiều vùng trồng sắn trên thế giới. Kết quả nghiên cứu trước đó cho biết, ở Việt Nam đã phát hiện được phytoplasma thuộc nhóm 16SrI (Trịnh Xuân Hoat và cs., 2012; Alvarez et al., 2013) gây hại trên cây sắn bị bệnh chổi rồng. Phytoplasma nhóm 16SrII gây hại trên cây sắn cũng đã được công bố tại Thái Lan, Trung Quốc, Uganda. Hai nhóm phytoplasma khác nhau gây hại trên cùng một loại cây trồng đã được phát hiện tại nhiều nơi trên thế giới như phytoplasma gây bệnh hóa gỗ hại cà chua gồm hỗn hợp hai loài thuộc nhóm 16SrI và 16SrXII-A ở Hy Lạp (Vellios and Liolopoulou, 2007), phytoplasma khác nhau thuộc nhóm 16SrXI và 16SrXII gây hại

trên cây mía (*Saccharum officinarum*) bị bệnh chổi cò ở Ấn Độ (Nasare et al., 2007), phytoplasma thuộc nhóm 16SrI-A/B và 16SrXII-A cũng gây hại trên cây khoai tây ở Nga (Girsova et al., 2008), phytoplasma thuộc nhóm 16SrIV gây hại trên mẫu cây nhân giống Tiêu da bò bị bệnh chổi rồng thu thập tại phía Nam Việt Nam (Thuy et al., 2012).

**4. KẾT LUẬN**

Bằng kỹ thuật PCR, giải trình tự và phân tích đa hình (RFLP) mô phỏng trên phần mềm máy tính sử dụng chương trình PhyClassifier, nghiên cứu này đã phát hiện ra phytoplasma thuộc nhóm 16SrII, nhóm phụ A gây hại trên cây sắn bị nhiễm bệnh chổi rồng.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Alvarez, E., Mejia J.F., Llano G.A., Loke J.B., Calari A., Duduk B. and Bertaccini A., 2009. Characterization of a phytoplasma associated with frog skin disease in cassava. *Plant Diseases*, 93: 1139-1145.
2. Alvarez, E., Pardo, J.M., Mejia J.F., Bertaccini A., Thanh N.D., Hoat T.X., 2013. Detection and identification of 'Candidatus Phytoplasma asteris' related phytoplasmas associated with a witches' broom disease of cassava in Vietnam. *Phytopathogenic Mollicutes*, 3(2): 77-81.
3. Arocha, Y., Echodu R., Talengera D., Muhangi J., Rockefeller E., Asher O., Nakacwa R., Serugga R., Gumisirza G, Tripathi J., Kabuye D., Otipa M., Lukanda K. and Boa E., 2008. Occurrence of 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia' (16SrII group) in cassava and four other species in Uganda. *New Disease Reports*, 17: 28.
4. Davis, R.I., Arocha Y., Jones P. and Malay A., 2005. First report of the association of phytoplasmas with plant diseases in the territory of Wallis and Futuna. *Australasian Plant Pathology*, 34: 417-418.
5. Doyle, J.J. and Doyle J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
6. Flores, D., Isolda C.H., Maria C.C. and Ivan P.B., 2013. Molecular identification of a 16SrIII-B phytoplasma associated with cassava witches' broom disease. *European Journal of Plant Pathology*, 137(2): 237-242.
7. Girsova, N., Bottner K.D., Mozhaeva K.A., Kastalyeva T.B., Owens R.A. and Lee I-M., 2008. Molecular detection and identification of group 16SrI and 16SrXII phytoplasmas associated with diseased

potatoes in Russia. *Plant Disease*, 92(4): 654-661.

8. Gundersen, D.E. and Lee I-M., 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 114-151.

9. Lozano, J.C., 1992. Overview of integrated control of cassava diseases *Fitopatologia Brasileira*, 17: 18-22.

10. Nasare, K., Yada A., Singh A.K., Shivasharanappa K.B., Nerkar Y.S. and Reddy V.S., 2007. Molecular and symptom analysis reveal the presence of new phytoplasmas associated with sugarcane grassy shoot disease in India, *Plant Disease*, 91: 1413 - 1418.

11. Nguyễn Khê, *Báo Nông nghiệp Việt Nam*, 2011. Giải pháp trị bệnh chổi rồng hại sắn. *Trong mục: Khuyến Nông*, số 64, ra ngày 31/3/2011.

12. Trịnh Xuân Hoạt, Nguyễn Đức Thành, Ngô Gia Bôn, Mai Văn Quân và Vũ Duy Hiện, 2012. Phát hiện và xác định phytoplasma liên quan đến bệnh chổi rồng hại sắn tại một số tỉnh phía nam Việt Nam. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 2: 10-14.

13. Thuy, T.D.N., Paltrinieri S., Mejia J.F., Hoat X.T. and Bertaccini A., 2012. Detection and identification of phytoplasmas associated with longan witches' broom in Vietnam. *Phytopathogenic Mollicutes*, 2(1): 23-27.

14. Vellios, E. and Liolopoulou F., 2007. Detection and characterization of phytoplasmas infecting tomato plants in Greece. *Bulletin of Insectology*, 60(2) 157-158

15. Wei, W., Davis R.E., Lee I-M and Zhao Y., 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 1855-1867

16. Zhao, Y., Wei W., Lee I-M, Shao J., Suo X. and Davis R.E., 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 2582-2593.

**Phản biện:** PGS.TS. Phạm Xuân Hội

## ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG CHỐNG CHỊU BỆNH HÉO XANH VI KHUẨN *Ralstonia solanacearum* Smith TẬP ĐOÀN GIỐNG LẠC BẰNG LÂY NHIỄM NHÂN TẠO KẾT HỢP CHỈ THỊ PHÂN TỬ SSR

Evaluation of Resistance Ability to Bacterial Wilt *Ralstonia solanacearum* Smith of Groundnut Collection by Artificial Inoculation in Combination with SSR Markers

Nguyễn Văn Việt<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Vân<sup>2</sup>, Lê Thị Bích Thủy<sup>3</sup>, Hà Viết Cường<sup>5</sup>, Nguyễn Mạnh Hùng<sup>2</sup>,  
Nguyễn Văn Thắng<sup>5</sup>, Ngô Văn Ngôn<sup>4</sup>, Nguyễn Xuân Thu<sup>5</sup>, Ngô Thị Thùy Linh<sup>3</sup>

Ngày nhận bài: 2.3.2015

Ngày chấp nhận: 14.4.2015

### Abstract

To determine the materials sources for breeding groundnut varieties resistant to bacterial wilt, artificial inoculation in combination with molecular markers were used.

The result on evaluation of resistance ability to bacterial wilt of 63 lines/varieties of peanut germplasm by artificial inoculation showed that, there were 3.2% of highly resistant, 11.1% resistant, 34.9% moderate resistant, 30.1% moderate susceptible, 15.9% susceptible and 4.8% highly susceptible lines/varieties.

1. Viện KHNN Việt Nam;
2. Viện Bảo vệ thực vật;
3. Viện Công nghệ sinh học
4. Sở Nông nghiệp và PTNT Hà Nội;
5. Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm;
6. Học Viện Nông nghiệp Việt Nam