International Rice Research Institute, 2013. *Standard evaluation system for rice (SES).* IRRI, June 2013, pp.44.

Milne I., Shaw P., Stephen G., Bayer M., Cardle L., Thomas W.T.B., Flavell A.J., and Marshall D., 2010. Flapjack-graphical genotype visualization. *Bioinformatics* 26: 3133-3134.

Peng B., Wang L., Fan C., Jiang G., Luo L., Li Y., He Y., 2014. Comparative mapping of chalkiness components in rice using five populations across two environments. *BMC Genetics*, 15: 49.

Zhou L.J., Zhai H.Q., Wan J.M., 2009. Curent status and strategies for improvement of rice grain chalkiness. *Yi Chuan*, 31(6): 563-572.

Application of molecular marker to select unchalking rice grains from backcross OM3673/TLR434//OM3673 population

Truong Anh Phuong, Pham Thi Kim Vang, Nguyen Thị Lang, Nguyen Thi Ngoc An

Abstract

The current study aimed to identify the unchalking genes-carrying rice lines *via* using molecular markers and GGT-map analysis for breeding program. The results showed that the utilized markers clearly revealed polymorphisms, and linked with the unchalking characteristics in the backcross populations of OM3673/TLR434//OM3673. Two molecular markers Indel 5 and RM21938 showed the similarity between the chalking and unchalking genotypes at a ratio of 45% on BC1F2 population and 70% on BC1F2 population, respectively. The study also selected four lines carrying unchalking genes on the locus in chromosome 7, these lines are homozygous according to the genome of parents (TLR434), those lines are BC2F3-14-1; BC2F3-30-10, BC2F3-50-80 and BC2F3-80-20-3. In conclusion, these rice lines will be used for the further study on the genotyping assessment based on genotyping by sequencing (GBS) for the development of new unchalking rice varieties in the future.

Keywords: Rice, chalkiness, molecular markers, polymorphism

Ngày nhận bài: 06/02/2021
Ngày phản biện: 15/02/2021
Người phản biện: PGS.TS. Lưu Minh Cúc
Ngày duyệt đăng: 26/02/2021

PHÂN TÍCH ĐA DẠNG DI TRUYỀN NHÓM *Bacillus subtilis* BẰNG PHƯƠNG PHÁP GIẢI TRÌNH TỰ ĐOẠN PROTEIN NGÓN TAY KẼM (ZINC FINGER PROTEIN) VÀ KỸ THUẬT PCR DÙNG MỒI THIẾT KẾ TRÊN CÁC CHUỖI LẶP (REP-PCR)

Bùi Thị Thanh Tịnh[1], Lê Lưu Phương Hạnh[1],
Nguyễn Hoàng Chi Mai[2], Trần Ngọc Phương Linh[3],
Lê Văn Hậu[1], Nguyễn Đăng Quân[1], Ngô Huỳnh Phương Thảo[1]

TÓM TẮT

Đa dạng di truyền của 49 chủng thuộc nhóm *Bacillus subtilis* phân lập ở An Giang và Cần Thơ được khảo sát bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen Zinc finger và phương pháp PCR dùng mồi thiết kế trên các chuỗi lặp (Repetitive element sequence-based PCR, rep-PCR). Cây phát sinh loài dựa trên trình tự đoạn gen Zinc finger cho thấy 49 chủng thuộc nhóm *B. subilis* được chia thành 02 nhóm chính (I và II) và tương đồng cao với các loài *B. velezensis* và *B. amyloliquefaciens, B. siamensis, B. subtilis, B. tequilensis*. Riêng chủng B1008 hoàn toàn tách biệt với các chủng khác và chỉ tương đồng 91,7% với chủng *B. velezensis WLYS23*. Trong khi đó, cây phân nhóm dựa trên rep-PCR với mồi BOX-A1R cho thấy 49 chủng này được chia làm 2 nhóm chính (A và B). Nhóm A phân thành các nhóm phụ (A1, A2) có kết quả giải trình tự tương đồng với các loài *B. velezensis* và *B. amyloliquefaciens, B. siamensis, B. subtilis.* Nhóm B (gồm 4 chủng) có kết quả giải trình tự thuộc 4 loài khác nhau và chủng B1008 nằm tách biệt với các chủng khác. Từ những kết quả trên cho thấy, phương pháp giải trình tự đoạn gen Zinc finger và phương pháp rep-PCR có sự tương đồng trong việc phân nhóm các chủng thuộc nhóm *B. subtilis*. Đây là những công cụ hữu ích để đánh giá mối quan hệ di truyền cũng như góp phần định danh các chủng *Bacillus* spp.

Từ khóa: *Bacillus subitilis,* đa dạng di truyền, rep-PCR, protein ngón tay kẽm, cây phân loài

[1] Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh; [2] Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP. Hồ Chí Minh
[3] Trường Đại học Tôn Đức Thắng TP. Hồ Chí Minh

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các nghiên cứu phát sinh loài *Bacillus* spp. dựa trên trình tự 16S rRNA đề xuất năm nhóm có liên quan chặt chẽ với nhau, gồm có nhóm *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. circulans* and *B. brevis*. Ngoài ra, nhóm *B. subtilis* có một phân nhóm là *B. pumilus* (Berkeley *et al.,* 2008).

Bacillus subtilis là loài vi khuẩn có lợi được nghiên cứu nhiều, có mặt khắp nơi trong tự nhiên và được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực công nghiệp và nông nghiệp (Rooney *et al.,* 2009). Loài này được mô tả lần đầu tiên bởi Christian Gottfried Ehrenberg vào năm 1835, người đặt tên cho nó là *Vibrio subtilhe* (Harwood *et al.,* 1989). Tuy nhiên, chi *Bacillus* được thiết lập bởi Ferdinand Cohn vào năm 1872, và *B. subtilis* được xác định là loài bởi Soule vào năm 1932 (Sella *et al.,* 2104). Loài này có 3 phân loài *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, subsp. *spizizenii* and subsp. *inaquosorum* (Rooney *et al.,* 2009). Cùng với *B. subtilis*, các loài có quan hệ gần gũi khác (*B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus, B. axarquiensis, B. licheniformis, B. malacitensis, B. mojavensis, B. pumilus, B. sonorensis, B. tequilensis, B. vallismortis* và *B. velezensis*) cũng được mô tả có sự tương đồng về di truyền cao và/hoặc tương đồng về sinh hóa. Những loài như vậy lần đầu tiên được gọi là «phổ *B. subtilis*" (Gordon *et al.,* 1973), về sau được nhóm lại thành "phức hợp các loài *B. subtilis*" (Rooney *et al.,* 2009), và bây giờ được phân nhóm thành "nhóm *B. subtilis*" (Jeyaram *et al.,* 2011).

Bên cạnh việc phân loại dựa trên trình tự gen 16S rRNA, các kỹ thuật phân tử cũng được sử dụng để định danh nhanh các loài. Phương pháp rep-PCR dựa trên trình tự các đoạn lặp lại là phương pháp thường xuyên để phân biệt các loài vi khuẩn phân tích sự phân bố của các trình tự lặp lại trong bộ gen của một số loài prokaryote (Versalovic *et al.,* 1991). Trong phương pháp thu thập dữ liệu rep-PCR (Versalovic *et al.,* 1991; Martin *et al.,* 1994; Versalovic *et al.,* 1994), việc sử dụng một mồi đơn nhằm khuếch đại các vùng lặp lại trải dài trên bộ gen của vi khuẩn sẽ tạo nên sản phẩm PCR với nhiều kích thước khác nhau, đặc trưng cho các chủng cùng loài hoặc dưới loài. Những vùng lặp lại này có thể được dùng để phân tích mối quan hệ di truyền giữa các chủng với nhau (Van Belkum *et al.,* 1998; Kim *et al.,* 2002). Gần đây phương pháp rep-PCR với mồi BOX-A1R đã giúp xác định những marker DNA chuyên biệt cho loài *B. anthracis* (Cherif *et al.,* 2002). Ngoài ra, Kim và cộng tác viên (2002) cũng đã sử dụng rep-PCR dựa trên mồi BOX-A1R để thiết lập mối quan hệ di truyền giữa 17 chủng của nhóm *B. cereus*.

Trong nghiên cứu này, đặc điểm di truyền của 49 chủng thuộc nhóm *B. subtilis* được khảo sát bằng cặp mồi đặc hiệu cho vùng gen Zinc finger và phương pháp rep-PCR trên mồi BOX-A1R.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn: Tổng cộng 49 chủng vi khuẩn của nhóm *B. subtilis* đã được xác định bằng PCR với cặp mồi Bsub5F và Bsub3R đặc hiệu cho nhóm *B. subtilis* (Wattiau *et al.,* 2001). Các chủng này được phân lập ở bùn đáy ao của các vùng Châu Thành, Châu Phú, Mỹ Hòa Hưng thuộc tỉnh An Giang và vùng Ô môn, Cồn Sơn, Phú Thứ thuộc tỉnh Cần Thơ trong khoảng thời gian từ tháng 01/2019 đến 06/2019 (Bảng 1). Tất cả các chủng vi khuẩn được lưu giữ ở tủ –80°C, tại phòng Công nghệ sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ sinh học TP. Hồ Chí Minh.

Bảng 1. Danh sách các chủng thuộc nhóm *B. subtilis* sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên chủng	Vùng phân lập
1 - 17	B460, B347, B168, B109, B403, B285, B474, B449, B437, B499, B579, B306, B479, B284, B523, B373, B397	Mỹ Hòa Hưng - An Giang
18 - 23	B642, B574, B599, B726, B560, B736	Châu Phú - An Giang
24 - 31	B117, B67, B210, B127, B120, B204, B46, B230,	Châu Thành - An Giang
32 - 44	B1068, B946, B1046, B919, B990, B1060, B979, B899, B1035, B900, B934 B912, B28	Cồn Sơn - Cần Thơ
45 - 46	B881, B995	Ô môn - Cần Thơ
47 - 49	B894, B1010, B1008	Phú Thứ - Cần Thơ

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân tích mối quan hệ di truyền bằng phương pháp giải trình tự với cặp mồi đặc hiệu

Bộ gen của 49 chủng thuộc nhóm *B. subtilis* được tách chiết bằng kit ly trích DNA (Thermo scientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chất lượng và nồng độ của DNA được kiểm tra bằng thiết bị Nanodrop 2000 (Thermo scientific, Mỹ) và sau đó được pha loãng đến nồng độ 50 ng/µL.

Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi F.Ba. seq (5'-GCAATCTCTAATACATC-3') và R.Ba. seq (3'-GTATCCATCAGCTGTTC-5') đặc hiệu cho trình tự gen Zinc finger với sản phẩm khuếch đại 822 bp. Thành phần phản ứng bao gồm 1X DreamTaq Mastermix (Thermo scientific, Mỹ), 50 ng DNA, 0.2 µM cặp mồi và nước vô trùng với tổng thể tích 20 µL. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy Mastercycler (Eppendorf, Đức) với chu trình nhiệt như sau: 1 chu kỳ 95^{o}C 5 phút; 35 chu kỳ 95^{o}C 30 giây, 41^{o}C 30 giây, 72^{o}C 30 giây, và 1 chu kỳ 72^{o}C 10 phút, sau đó giữ ở 10^{o}C (Lê Lưu Phương Hạnh và *ctv.*, 2015).

Sản phẩm PCR của 49 chủng này được điện di trên gel agarose 1% (Sigma, Mỹ) và được tinh sạch bằng Cycle Pure Kit (Omega, Mỹ). Sản phẩm tinh sạch được giải trình tự theo phương pháp Sanger. Kết quả giải trình tự của 49 chủng trên được phân tích trên phần mềm Snapgene 2.3.2 và so sánh với dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI để định danh các chủng đang khảo sát. Sau đó cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên trình tự của 49 chủng và các chủng tham khảo theo phương pháp Neighbor joining sử dụng phép toán Maximum Composite Likelihood, Gamma Distributed 4.00 với độ lặp lại 1.000 lần bằng phần mềm MEGA X.

2.2.2. Phương pháp phân tích mối quan hệ di truyền bằng phương pháp rep-PCR

Phản ứng rep-PCR trên 49 chủng *Bacillus* spp. được tiến hành với mồi BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic *et al.,* 1994) với các thành phần: 1X DreamTaq Mastermix (Thermo scientific, Mỹ), 30 ng DNA, 10 µM mồi và nước vô trùng với tổng thể tích 20 µL. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy Mastercycler (Eppendorf, Đức) với chu trình nhiệt như sau: 1 chu kỳ 94^{o}C 5 phút; 40 chu kỳ 94^{o}C 1 phút, 51^{o}C 1 phút, 72^{o}C 2 phút), và 1 chu kỳ 72^{o}C 7 phút, sau đó giữ ở 10^{o}C.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% trong thời gian 60 phút ở 80V, nhuộm với GelRed 3X (GeneOn, Đức) và được chụp bằng máy UVP Gel Doc It Imager (Analytikjena, Đức). Các dữ liệu Rep-PRC được lưu giữ ở dạng file TIF và so sánh và phân tích bằng phần mềm GelCompar II version 6.6 để phân nhóm các chủng trên.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Các nội dung nghiên cứu được thực hiện từ tháng 01/2019 đến tháng 12/2020 tại phòng thí nghiệm, Phòng Công nghệ sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ sinh học TP. Hồ Chí Mính.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân tích mối quan hệ di truyền bằng phương pháp giải trình tự với cặp mồi đặc hiệu

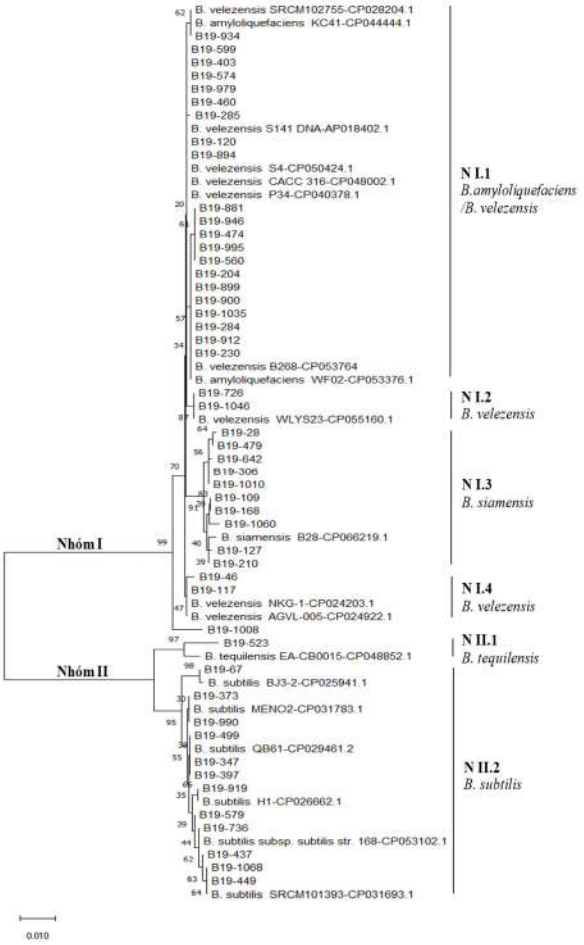
Đoạn gen khuếch đại vùng trình tự Zinc finger của 49 chủng thuộc nhóm *Bacillus subtilis* được sử dụng để dựng cây phát sinh loài có độ dài 649 nucleotide. Trình tự của 20 chủng tham khảo từ ngân hàng gen được xác định sau khi blast trình tự của 49 chủng này trên NCBI (Hình 1).

Kết quả phân tích cây phân loài của các chủng trên cho thấy, các chủng này phân thành hai nhóm lớn kí hiệu nhóm I và nhóm II với độ tương đồng từ 99 - 100%. Nhóm I chia thành 4 nhóm nhỏ trong đó I.1 gồm 21 chủng tương đồng với cả 2 loài, cả cụm từ này sẽ thành: với cả 2 loài *B. velezensis* và *B. amyloliquefaciens*. Các chủng trong nhóm I.1 chỉ sai khác nhau ở tối đa 4 nucleotide. Nhóm I.2 và I.4 gồm 4 chủng có mối quan hệ gần với loài *B. velezensis*, và nhóm I.3 gồm 10 chủng có mối liên hệ chặt chẽ với loài *B. siasimesis.* Các chủng trong nhóm I.3 này sai khác nhau tối đa 11 nucleotide. Chủng B1008 không thuộc nhóm nào trong 4 nhóm trên nhưng tương đồng cao nhất với chủng *B. velezensis WLYS23* (91,7%, thông thường sai khác hơn 3% thì có thể được xem là khác loài). Nhóm II được chia thành 2 nhóm nhỏ trong đó nhóm II.1 chỉ gồm 1 chủng có mối quan hệ gần với loài *B. tequilensis*, và nhóm II.2 gồm 12 chủng có mối quan hệ gần với loài *B. subitlis.* Các chủng thuộc nhóm II.2 cho thấy sự khác nhau lên tới 20 nucleotide. Kết quả sự sai khác giữa các nucleotide trong các nhóm I.1, I.3, II.2 được phân tích bằng align trình tự của 649 nucleotide của các chủng bằng phần mềm MEGA X (dữ liệu không trình bày ở đây).

Cây phân loại di truyền cho thấy trình tự vùng gen Zinc finger có thể được dùng để phân biệt 02 loài

B. velezensis, *B. amyloliquefaciens và B. siasimesis* với loài *Bacillus subtilis* và *B. tequilensis*. Ngoài ra, trình tự vùng gen Zinc finger có thể được dùng để phân biệt các nhóm đơn *B. siasimesis, Bacillus subtilis*, *B. tequilensis*. Trong khi phương pháp định danh bằng hình thái và giải trình tự đoạn 16S rRNA không thể phân biệt được chủng *Bacillus subtilis* và *B. tequilensis* (Gatson *et al.,* 2006). Tuy nhiên, phương pháp giải trình tự vùng gen Zinc finger cũng chưa thể phân biệt được hai chủng *B. velezensis* và *B. amyloliquefaciens*. Kết quả này cũng tương tự với Wang và cộng tác viên (2008), dựa trên phương pháp lai DNA-DNA khẳng định *B. velezensis* là tương đồng khác loài với *B. amyloliquefaciens*.

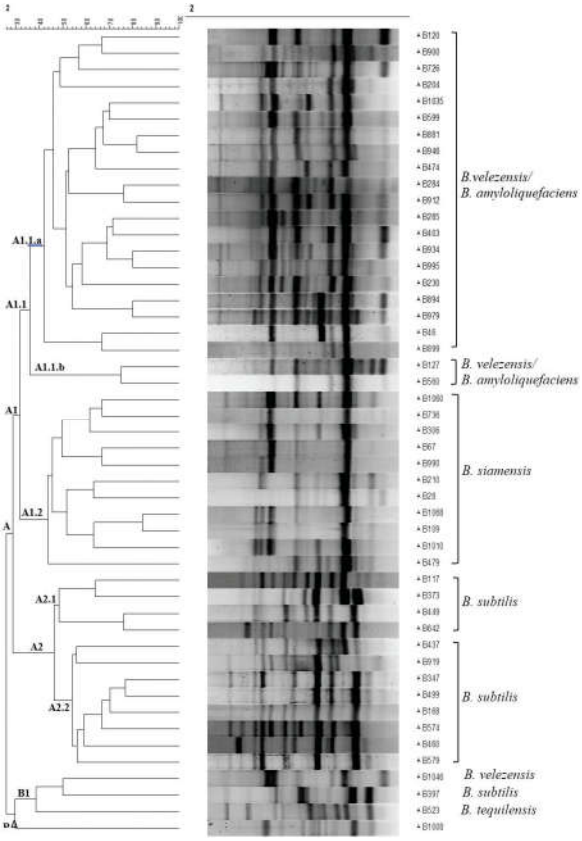
3.2. Phân tích đa dạng di truyền của nhóm *Bacillus subtilis*



Hình 1. Cây phát sinh loài của nhóm *Bacillus subtilis*

Ghi chú: Cây phân loài được xây dựng dựa trên kết quả giải trình tự vùng Zinc finger sử dụng phương pháp neighbor-joining, khoảng cách di truyền tính toán sử dụng mô hình Maximum Composite Likelihood. Các số tại các nút chỉ ra % sự xuất hiện ở cây 1000 bootstrapped.

Sự khác biệt di truyền của 49 chủng trong nhóm *B. subtilis* được xác định bằng phương pháp rep-PCR, dựa trên trình tự lặp lại của mồi BOX-A1R cho thấy 49 chủng được chia thành 2 nhóm chính (kí hiệu A, B). Nhóm A gồm 2 nhóm phụ (A.1 và A2), và nhóm A1 chia thành 2 nhóm nhỏ (A1.1 và A1.2). Nhóm A1.1 (gồm 22 chủng, chiếm 44,9%) có kết quả giải trình tự tương đồng với 2 loài *B. amyloliquefaciens* và *B. velezensis*. Nhóm A.1.2 (gồm 12 chủng, chiếm 24,5%) có kết quả giải trình tự tương đồng với *B. siammensis*. Nhóm A.2 (gồm 12 chủng, chiếm 24,5%) có kết quả giải trình tự tương đồng với *B. subtilis*. Nhóm B (gồm 4 chủng) có kết quả giải trình tự thuộc 4 loài khác nhau và chủng B1008 nằm tách biệt với các chủng khác có kết quả giải trình tự không thuộc nhóm *B. subtilis* (Hình 2). Hầu hết các chủng phân lập ở An Giang tập trung đều ở các nhóm (A và B). Tuy nhiên, các chủng phân lập ở Cần Thơ hầu hết tập trung ở nhóm A1 và nhóm B, và nhóm A2 chỉ có duy nhất 1 chủng B919 và nhóm này chủ yếu gồm các chủng tương đồng với *B. subtilis*. Kết quả này cho thấy, các chủng phân lập ở An Giang đa dạng hơn so với các chủng ở Cần Thơ.



Hình 2. Phân nhóm dựa trên dữ liệu thông tin rep-PCR với mồi BOX-1AR của 49 chủng thuộc nhóm *B. subtilis* sử dụng trong nghiên cứu

Tương tự như cây phân loài trên trình tự Zinc finger, kết quả phân tích cây phân nhóm bằng rep-PCR cho thấy rằng loài *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* và *B. siamensis* có mối quan hệ di truyền gần với nhau hơn, so với loài *B. subtilis* và *B. tequilensis* nằm tách biệt với các loài khác. Mặt khác, cũng cho thấy sự biến đổi và phân nhánh khá nhiều ở trong cùng một loài. Điều này cho thấy phương pháp rep-PCR có thể phân tích sự đa dạng trong cùng một loài tốt hơn phương pháp giải trình tự một gen đơn và góp phần đánh giá sự khác biệt di truyền của vi khuẩn ở nhiều phương diện khác nhau (vùng địa lý, quy trình nuôi thủy sản sử dụng probiotics tại trại …).

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Trên cơ sở phân tích trình tự của 49 chủng thuộc nhóm *B. subtilis* với cặp mồi đặc hiệu cho trình tự gen Zinc finger đã xác định 48/49 chủng thuộc các lòai *B. velezensis* và *B. amyloliquefaciens, B. siamensis, B. subtilis, B. tequilensis* và một chủng chưa xác định loài do khác biệt nhiều với các chủng tham khảo sử dụng trong nghiên cứu này. Phương pháp rep-PCR với mồi BOX-1AR có sự tương đồng trong sự phân nhóm *B. subtilis* so với trình tự gen Zinc finger và cũng cho thấy sự đa dạng di truyền rõ hơn giữa các chủng trong cùng nhóm *B. subtilis.*

Việc ứng dụng kỹ thuật rep-PCR có thể giúp sàng lọc các chủng trước khi định danh bằng phương pháp giải trình tự, từ đó góp phần tiết kiệm chi phí. Tuy nhiên, trình tự đoạn Zinc finger vẫn chưa phân biệt được hai loài *B. velezensis* và *B. amyloliquefaciens*. Do đó, việc giải trình tự thêm một số gen khác (*gyrA*, *rpoB, purH, polC, groEL*) là cần thiết để góp phần định danh chính xác hơn.

LỜI CẢM ƠN

Các kết quả nghiên cứu trong bài báo này đều thuộc nhiệm vụ khoa học công nghệ "Phân lập các chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng với vi khuẩn gây bệnh gan thận mủ và xuất huyết trên cá tra ở đồng bằng sông Cửu Long" do Sở Khoa học và Công nghệ TP. HCM cấp kinh phí.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Lê Lưu Phương Hạnh, Lê Văn Hậu, Nguyễn Quốc Bình, 2015. Phân lập, khảo sát một số chủng probiotic đối kháng với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* nhằm hỗ trợ hiệu quả bảo vệ của vaccine nhược độc phòng bệnh gan thận mủ trên cá tra. Báo cáo nghiệm thu đề tài cấp cơ sở. Trung tâm Công nghệ sinh học TP HCM: 15 trang.

Berkeley, R., Heyndrickx, M., Logan, N., De Vos, P., 2008. Applications and systematics of *Bacillus* and relatives. *Wiley-Blackwell*: 133 pp.

Cherif, A., Borin, S., Rizzi, A., Houzari, H., Boudabous, A. and Daffonchio, D., 2002. Characterization of a repetitive element polimorphism-polymerase chain reaction chromosomal marker that discriminates *Bacillus anthracis* from related species. *Journal of Applied Microbiology* 93: 456-462.

Gatson J.W., Benz B.F., Chandrasekaran C., Satomi M., Venkateswaran K., Hart M.E., 2006. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1475-1484.

Gordon, R.E.; Haynes, W.C., Pang, C.H.N., 1973. The Genus *Bacillus*. *Agriculture Handbook*, 427: 36-41.

Harwood, C.R., 1989. Introduction to the biotechnology of *Bacillus*. *In*: Harwood CR, ed. *Bacillus*. London: Springer: 1-4.

Jeyaram, K., Romi W., Singh, T.A., Adewumi, G.A., Basanti, K., Oguntoyinbo, F.A., 2011. Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with industrial importance. *Journal of Microbiological Methods*, 87: 161-164.

Kim, W., Hong, Y.P., Yoo, J.H., Lee, W.B., Choi, C.S. and Chung, S.I., 2002. Genetic relationships of *Bacillus anthracis* and closely related species based on variable-number tandem repeat analysis and BOX-PCR genomic fingerprinting. *FEMS Microbiology Letters* 207: 21-27.

Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R., Morrison, D.A., Boulnois, G.J. and Claverys, J.-P., 1994. A highly conserved repeat DNA element located in the chromosome of Streptococcus pneumoniae. *Nucleic Acids Research* 20: 3479-3483.

Rooney, A.P., Price, N.P.J., Ehrhardt, C., Swezey, J.L., Bannan, J.D., 2009. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 2429-2436.

Sella, S.R.B.R., Vandenberghe, L.P.S., Soccol, C.R., 2014. *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications - a review. *Crit Rev Biotechnol, Early Online*: 1-13.

Van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L. and Verbrugh, H., 1998. Short-sequence repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 275-293.

Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19: 6823-6831.

Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J., and Lupski, J.R., 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5: 25-40.

Wang L.T., Lee F.L., Tai C.J., Kuo H.P., 2008. Bacillus velezensis is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 671-675.

Wattiau, P., Renard, M.E., Ledent, P., Debois, V., Blackman, G., Agathos, S.N., 2001. A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring of wastewater biotreatmentre. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 816-819.

Genetic diversity analysis of *Bacillus subtilis* group by sequencing of Zinc finger protein and rep-PCR method

Bui Thi Thanh Tinh, Le Luu Phuong Hanh,
Nguyen Hoang Chi Mai, Tran Ngoc Phuong Linh,
Le Van Hau, Nguyen Dang Quan, Ngo Huynh Phuong Thao

Abstract

Genetic diversity of 49 strains of *Bacillus subtilis* group isolated from An Giang and Can Tho were analyzed using Zinc finger gene sequencing and Repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR) method. Phylogenetic tree analysis based on Zinc finger sequences of 49 isolates showed that these strains are similar to *B. velezensis* and *B. amyloliquefaciens, B. siamensis, B. subtilis, B. tequilensis*. Particularly B1008 completely separated from other isolates and had the similarity of 91.7% with strain *B. velezensis WLYS23*. Cluster analysis based on rep-PCR profiles generated by BOXA1R showed that these 49 isolates from An Giang and Can Tho were analyzed using Zinc finger gene sequencing and were divided into two main groups (A and B). Group A was classified into two subgroups (A1, A2), which were highly similar to *B. velezensis* and *B. amyloliquefaciens*, *B. siamensis*, *B. subtilis* based on Zinc finger sequences. Group B (including 4 strains) had Zinc finger sequences similar to different *Bacillus* species and strain B1008 was separated from other isolates. From these results, the Zinc finger sequencing method and rep-PCR were consistent on grouping the isolates belonging to *B. subtilis* group. They are useful tools to investigate genetic relationships and species determination of *Bacillus* spp. isolates.

Keywords: *Bacillus subitilis,* genetic diversity, rep-PCR, Zinc finger sequences, phylogentic tree

Ngày nhận bài: 04/02/2021
Ngày phản biện: 19/02/2021
Người phản biện: PGS. TS. Khuất Hữu Trung
Ngày duyệt đăng: 26/02/2021

NHẬN DIỆN CHỈ THỊ PHÂN TỬ LIÊN KẾT VỚI GEN KHÁNG BỆNH KHẢM LÁ TRONG CÁC GIỐNG KHOAI MÌ Ở MIỀN NAM VIỆT NAM

Nguyễn Thị Kim Thoa[1], Huỳnh Nguyễn Minh Nghĩa[1],
Nguyễn Thị Thanh Thảo[1], Dương Hoa Xô[1], Nguyễn Xuân Dũng[1]

TÓM TẮT

Bệnh khảm lá khoai mì (CMD) hiện đang gây hại nghiêm trọng trên các giống khoai mì ở Việt Nam. Gen kháng bệnh đã được nghiên cứu và ứng dụng cho việc phát triển giống khoai mì kháng bệnh trên thế giới, tuy nhiên hiện vẫn chưa được áp dụng ở Việt Nam. Nghiên cứu này xác định sự hiện diện của các chỉ thị liên kết với gen kháng CMD (SSRY28, SSRY106, NS158, NS169, NS198 và RME-1) trong các giống khoai mì ở miền Nam Việt Nam bằng kỹ thuật PCR. Phản ứng PCR được thiết lập với từng chỉ thị trước khi áp dụng cho việc nhận diện. Kết quả cho thấy đã thiết lập được phản ứng PCR cho việc nhận diện các chỉ thị. Trong 72 mẫu giống khoai mì được kiểm tra, có 21 mẫu mang 6 chỉ thị, 32 mẫu mang 5 chỉ thị, 19 mẫu mang 4 chỉ thị, và 1 mẫu mang 3 chỉ thị. Các mẫu khoai mì được kiểm tra khác biệt so với mẫu đối chứng (kháng bệnh) ở 3 chỉ thị (NS158, NS169 và RME-1) cho thấy 3 chỉ thị này có thể có vai trò quan trọng đối với khả năng kháng bệnh khảm lá của các mẫu giống khoai mì ở Việt Nam.

Từ khóa: Khoai mì, bệnh khảm lá, chỉ thị phân tử, gen kháng bệnh khảm lá

[1] Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh