PHÂN LẬP VÀ NHẬN DIỆN VI KHUẨN GÂY BỆNH BẠC LÁ LÚA (*XANTHOMONAS ORYZAE* PV *ORYZAE*) BẰNG KỸ THUẬT PCR ĐA THÀNH PHẦN

Nguyễn Thị Liên[1], Trần Thị Xuân Mai[1] và Nguyễn Thị Pha[1]

ABTRACT

Bacterial leaf blight of rice, caused by Xanthomonas oryzae pv. oryzae, is a harmful disease of rice plants that decreases the yield and the quality of rice in the planting areas. Today, there is not yet specific method to control this disease. In this study, seventy bacterial strains were isolated from samples collected in some provinces in Mekong Delta of Vietnam. Multiplex PCR technique (with two specific primer pairs) was used to identify isolated strains (XOR-F: 5'- GCATGACGTCATCGTCCTGT-3', XOR-R2: 5'-CTCGGAGCTATATGCCGTGC-3' and XOO290F: 5'-GCGCACCGAGTATTCCTA-3', XOO290R: 5'-CTTCGCCGGTCCAGATGA-3'). The pair of primers XOR-F was designed to amplify a 470bp fragment from all strains Xanthomonas oryzae pv. oryzae. The pair of primers XO290R-F was designed to amplify a 290bp fragment based on rhs gene family of Xanthomonas oryzae pv. oryzae because these genes are structurally diverse. Five strains were identified, they are: OM66-1, OM98, OM98-1, TL6 and AG11. Especially, one of them contains rhs gene – a new pathogenic gene with high toxicity. When being used for artificial infection on rice leaf, all identified strains released toxic causing disease mark with different diameters after three weeks (OM66-1: 6.78, OM98:10.33, OM98-1:4.22, TL6:6.28 và AG11:6.78(cm)).

Keywords: Isolation, multiplex PCR, specific primer, Xanthomonas oryzae pv. oryzae

Title: Isolation and identification of bacteria caught bacterial leaf blight (Xanthomonas oryzae pv. oryzae) by Multiplex PCR technique

TÓM TẮT

Bệnh bạc lá lúa (bacterial leaf blight) do vi khuẩn Xanthomonas oryzae pv. oryzae gây ra và là đối tượng gây hại nghiêm trọng đối với cây lúa làm giảm năng suất và chất lượng sản phẩm của những vùng trồng lúa. Hiện nay vẫn chưa có biện pháp đặc trị nào có thể khống chế được căn bệnh này. Trong phạm vi nghiên cứu của đề tài, 70 dòng vi khuẩn thuần chủng đã được phân lập với các nguồn gốc xuất xứ thu mẫu tại một số tỉnh thuộc khu vực Đồng bằng sông Cửu Long. Sử dụng kỹ thuật PCR đa thành phần để nhận diện các dòng vi khuẩn phân lập được với 2 cặp mồi chuyên biệt (XOR-F: 5'-GCATGACGTCATCGTCCTGT-3' và XOR-R2: 5'-CTCGGAGCTATATGCCGTGC-3' và (XOO290F: 5'-GCGCACCGAGTATTCCTA-3' và XOO290R: 5'-CTTCGCCGGTCCAGATGA-3'). Cặp mồi XOR-F được thiết kế chuyên biệt để khuếch đại đoạn gen có kích thước khoảng 470bp có mặt ở tất cả các dòng vi khuẩn Xanthomonas oryzae pv. oryzae. Cặp mồi XO290R-F được thiết kế để khuếch đại đoạn gen có kích thước khoảng 290bp - dựa trên gen rhs của Xanthomonas oryzae pv. oryzae. Năm dòng vi khuẩn được nhận diện là: OM66-1, OM98, OM98-1, TL6 và AG11. Đặc biệt một trong số năm dòng được nhận diện có chứa gen rhs – một gen gây bệnh có độc tính cao mới được phát hiện có trong Xanthomonas oryzae pv. oryzae. Các dòng vi khuẩn được nhận diện đều thể hiện khả năng gây bệnh của chúng khi được lây nhiễm trở lại trên cây lúa với các mức độ gây bệnh khác nhau. Mức độ gây bệnh được thể hiện qua

[1] Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

chiều dài vết bệnh trên lá lúa đo được sau khi lây nhiễm khoảng ba tuần (OM66-1: 6.78, OM98:10.33, OM98-1:4.22, TL6:6.28 và AG11:6.78(cm)).

Từ khóa: Phân lập, PCR đa thành phần, mồi chuyên biệt, Xanthomonas oryzae pv. oryzae

1 GIỚI THIỆU

Bệnh bạc lá lúa - hay còn gọi là bệnh cháy bìa lá lúa (Bacterial leaf blight) do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* gây ra là một trong những bệnh hại phổ biến trong các nước trồng lúa. Ở Việt Nam, công tác chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá chưa được coi trọng có thể do khả năng lây lan thành dịch không cao như các bệnh dịch hại khác như rầy nâu, đạo ôn. Tuy nhiên, những bằng chứng cụ thể đã cho thấy dịch bệnh này không hề thua kém những dịch hại khác. Một số nước trong khu vực, bệnh bạc lá lúa đã gây hại nghiêm trọng cho ngành trồng lúa và đã làm giảm năng suất tới 50% (Khush *et al*., 1989), thậm chí có thể lên tới 80% (Singh *et al*., 1977). Một trong những hướng mang lại hiệu quả cao cho nông dân, cho môi trường là sử dụng giống kháng bệnh. Hiện tại đã có 25 gen kháng bệnh bạc lá đã được công bố (Kinoshita, 1995; Zhang *et al*., 1997, Lin *et al*., 1998). Một số gen kháng bệnh bạc lá đã được tìm thấy trong các giống lúa địa phương ở Việt Nam và các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long như: Xa-2 được tìm thấy trên giống lúa Tẻ Tép, Xa-5 có ở giống lúa Ba Túc, Giòng Đôi, Koi Bo Teng; xa-13 có ở giống Cà Đung, Ba Túc, Thơm Lùn, Vệ Phích, Nếp Hoa Vàng, Nàng Sớm (Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu, 2001), hoặc như Xa-21 có ở lúa hoang *Oryzae longistaminata* (Khush *et al*., 1990). Vấn đề ở chỗ để chuyển được những gen này sang các giống lúa cao sản bằng các phương pháp lai tạo truyền thống không có định hướng thì mất rất nhiều thời gian và hiệu quả chọn lọc thấp, thậm chí có thể không thực hiện được khi gen kháng cần chuyển có trong lúa hoang. Ngoài ra, để đưa những giống lúa kháng bệnh bạc lá vào những vùng nông nghiệp khác nhau thì chúng phải có khả năng kháng được chủng vi khuẩn chính, đồng thời để tồn tại được lâu giống lúa đó phải kháng được nhiều chủng vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* khác nữa.

Một đặc điểm cơ bản của vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* là chủng có khả năng đột biến tạo thành một quần thể rộng gồm nhiều nhóm chủng. Mỗi vùng sản xuất có thể có nhiều chủng vi khuẩn gây bệnh có độc tính khác nhau. Việc xác định chính xác nguồn bệnh làm vật liệu cho công tác chọn tạo giống hoặc có thể khống chế được dịch bệnh bạc lá lúa là rất cần thiết. Do vậy, chúng tôi đã tiến hành thu thập, phân lập và xác định nguồn bệnh bạc lá bằng kỹ thuật PCR để làm vật liệu cho những nghiên cứu sâu hơn về vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương pháp thu thập, xử lý mẫu và phân lập các dòng vi khuẩn

Mẫu bệnh bạc lá lúa được thu thập trên các ruộng lúa ở những địa điểm khác nhau được đem về phân lập vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* trên môi trường chuyên biệt Wakimoto (Wakimoto, 1995).

Đầu tiên lau mẫu lá lúa bị bệnh bằng cồn 96^{o}, ngâm mẫu lá lúa bệnh trong Hydrogen peroxide (H_2O_2) 3% khoảng 3 – 5 phút rồi rửa lại bằng nước cất vô trùng. Cắt những phần lá lúa bị bệnh thành những mảnh nhỏ có kích thước từ 1 – 2 cm và cho vào cối sứ và nghiền nát bằng chày sứ. Thêm vào phần lá đã nghiền trong cối khoảng 2 ml nước cất khử trùng. Hút phần dịch nghiền cho vào tube 1.5 ml và để yên khoảng 5 – 10 phút cho lắng bớt phần cặn. Hút khoảng 50µl phần dịch trong nhỏ lên đĩa petri chứa sẵn môi trường Wakimoto (có thể pha loãng mẫu 10^{-2} – 10^{-5} nếu cần). Dùng que trải bằng thủy tinh trải phần dịch này khắp mặt môi trường trong đĩa petri. Đem ủ mẫu ở nhiệt độ 28^{o}C từ 1 – 2 ngày. Sau khi xuất hiện những khuẩn lạc rời, chọn các khuẩn lạc có hình dạng tròn, nhẵn bóng, lồi lên, kích thước khoảng 1 – 2 mm, màu vàng chanh, là đặc trưng khuẩn lạc của vi khuẩn *Xanthomonnas oryzae* để cấy chuyền sang môi trường Wakimoto Modified đặc. Sau vài lần cấy chuyền trên môi trường Wakimoto Modified đặc, chọn các khuẩn lạc rời và nằm trên đường cấy đem quan sát dưới kính hiển vi. Khi thấy vi khuẩn đã ròng thì cấy chuyển sang ống nghiệm chứa môi trường đặc tương ứng để trữ ở điều kiện 4^{o}C và được xem như một dòng (isolate). Quan sát và mô tả đặc điểm của các dạng khuẩn lạc phát triển trên môi trường Wakimoto Modified đặc và quan sát hình dạng và sự chuyển động của tế bào vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* được phân lập dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 400 lần.

Nếu trữ giống trong Glycerol và để ở điều kiện nhiệt độ thấp hơn (-20^{o}C) thì có thể để được lâu hơn.

2.2 Nhận diện các dòng vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* bằng kỹ thuật PCR đa thành phần

Vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* sau khi tách ròng được nuôi tăng sinh trong môi trường lỏng Wakimoto Modified khoảng 16 tiếng. Tiến hành ly trích DNA và thực hiện kỹ thuật PCR để nhận diện vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* với 2 cặp mồi đặc hiệu với trình tự như trong bảng 1:

Bảng 1: Các cặp mồi sử dụng trong thí nghiệm

Trình tự mồi	Kích thước đoạn khuếch đại (bp)	Gen mục tiêu	Tác giả
XOR-F: 5'-GCATGACGTCAT CGTCCTGT–3' XOR-R2: 5'-CTCGGAGCTATA TGCCGTGC–3'	470	16S-rDNA	Adachi and Oku, 2000
XOO290F: 5'-GCGCACCGAGTATTCCTA–3' XOO290R: 5'-CTTCGCCGGTCCAGATGA–3'	290	*Rhs*	Cho *et al*., 2011

Với cặp mồi thứ nhất (XOR-F và XOR-R2) sẽ khuếch đại một trình tự gen có kích thước là 470bp nằm trong vùng 16S – 23S rDNA (Adachi and Oku, 2000). Còn với cặp mồi thứ hai (XOO290F và XOO290R) sẽ khuếch đại một trình tự gen nằm ở vị trí 125169 đến 125458 (trình tự nucleotide của gen *rhs* đã được xác định trong GenBank với mã số: Accession number NC_006834, gi|58579623:124816-125631) (Cho *et al*., 2011) và sản phẩm PCR thu được có kích thước khoảng 290bp.

Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel Agarose 1.5% bằng bộ điện di một chiều của Bio-Rad.

2.3 Khảo sát khả năng gây bệnh của các dòng vi khuẩn được nhận diện

Trồng lúa trong các chậu đất trong nhà lưới cho tới khi lúa bước vào giai đoạn nhảy chồi đẻ nhánh thì bắt đầu tiến hành lây nhiễm (giống lúa trồng làm thí nghiệm là giống Jasmin 85). Nuôi các dòng vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* đã được nhận diện bằng kỹ thuật PCR cho tăng sinh mật số trong môi trường Wakimoto Modified lỏng. Đem dịch vi khuẩn này pha loãng với nồng độ khoảng $10^7 – 10^8$ tb/ml và lây nhiễm trên cây lúa đã được trồng ở trên bằng cách lấy kéo inox nhúng vào dịch vi khuẩn và cắt ngang một đầu của lá lúa. Sau khoảng 3 tuần đo chiều dài vết bệnh trên lá lúa đã được lây nhiễm vi khuẩn. Mỗi dòng vi khuẩn được lây nhiễm trên 3 cây lúa khác nhau ở các thời điểm khác nhau, mỗi cây lây nhiễm trên 2 lá lúa.

Lưu ý: Mỗi dòng vi khuẩn phải dùng riêng một cây kéo. Mỗi dòng vi khuẩn được bố trí độc lập trên 1 cây khác nhau, tuyệt đối không bố trí các dòng vi khuẩn khác nhau trên cùng một cây.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập Vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*

Từ các mẫu lá lúa bị bệnh bạc lá được thu tại các địa điểm khác nhau đã phân lập được 70 dòng vi khuẩn thuần chủng. Các dòng vi khuẩn được đặt tên theo nguyên tắc nguồn gốc xuất xứ nơi thu mẫu và thứ tự từ nhỏ đến lớn. Các dòng này đều có đặc điểm về khuẩn lạc và hình dạng tế bào đặc trưng của vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae.* Trong đó có 51 dòng ở thành phố Cần Thơ (47 dòng từ quận Ô Môn, và 4 dòng ở Thới Lai, huyện Cờ Đỏ); 15 dòng ở huyện Châu Thành, tỉnh An Giang; 4 dòng ở huyện Cầu Ngang, tỉnh Trà Vinh. Đặc điểm về khuẩn lạc và hình dạng tế bào được mô tả trong bảng 2

Bảng 2: Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của các dòng vi khuẩn được phân lập

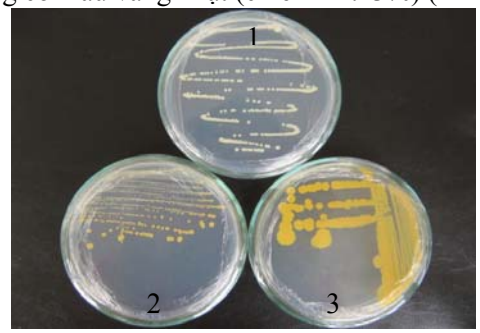
STT	Dòng	Đặc điểm khuẩn lạc				Đặc điểm tế bào		
		Hình dạng	Dạng bìa	Độ nổi	Màu sắc (Vàng)	Hình dạng	Khả năng chuyển động	Gram
1	OM1	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	+	_
2	OM10	Tròn	Nguyên	Mô	Vừa	Que ngắn	+++	_
3	OM14	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	+++	_
4	OM15	Tròn	Nguyên	Mô	Nhạt	Que ngắn	+++	_
5	OM17	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que dài	+++	_
6	OM18	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que dài	+++	_
7	OM19	Tròn	Nguyên	Lài	Vừa	Que ngắn	+++	_
8	OM20	Tròn	Nguyên	Mô	Nhạt	Que ngắn	+++	_
9	OM20-2	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	++	_

10	OM20-3	Tròn	Nguyên	Mô	Vừa	Que ngắn	++	_
11	OM21	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	++	_
12	OM22	Tròn	Nguyên	Mô	Vừa	Que ngắn	+++	_
13	OM23A	Tròn	Nguyên	Lài	Đậm	Que dài	++	_
14	OM23B	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	++	_
15	OM23C	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	++	_
16	OM43	Tròn	Nguyên	Mô	Vừa	Que dài	++	_
17	OM45	Tròn	Nguyên	Mô	Vừa	Que ngắn	+	_
18	OM47	Tròn	Nguyên	Mô	Vừa	Que ngắn	++	_
19	OM48	Tròn	Nguyên	Mô	Vừa	Que ngắn	++	_
20	OM49	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	+	_
21	OM50	Tròn	Nguyên	Mô	Vừa	Que ngắn	+++	_
22	OM51	Tròn	Nguyên	Lài	Đậm	Que ngắn	+	_
23	OM52	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	++	_
24	OM54	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	++	_
25	OM55	Tròn	Nguyên	Mô	Vừa	Que ngắn	++	_
26	OM57	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	+++	_
27	OM58	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	++	_
28	OM59	Tròn	Nguyên	Lài	Đậm	Que ngắn	+++	_
29	OM61	Tròn	Nguyên	Mô	Nhạt	Que ngắn	+++	_
30	OM62	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	++	_
31	OM63	Tròn	Nguyên	Mô	Nhạt	Que ngắn	+	_
32	OM64	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	+++	_
33	OM66	Tròn	Nguyên	Mô	Vừa	Que ngắn	+	_
34	OM67	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	++	_
35	OM68	Tròn	Nguyên	Mô	Vừa	Que ngắn	++	_
36	OM98	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	++	_
37	OM98-1	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que dài	++	_
38	OM108	Tròn	Nguyên	Mô	Nhạt	Que ngắn	+	_
39	OM112	Tròn	Nguyên	Lài	Vừa	Que ngắn	+	_
40	OM114	Tròn	Nguyên	Lài	Nhạt	Que dài	+	_
41	OM116	Tròn	Nguyên	Lài	Nhạt	Que ngắn	+++	_
42	OM119	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	++	_
43	OM120	Tròn	Nguyên	Mô	Nhạt	Que ngắn	+	_
44	OM123	Tròn	Nguyên	Mô	Nhạt	Que ngắn	+	_
45	OM146	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	++	_
46	OM152	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que dài	++	_
47	OM159	Tròn	Nguyên	Mô	Nhạt	Que ngắn	+	_
48	AG1	Tròn	Nguyên	Mô	Vừa	Que ngắn	+	_

49	AG2	Tròn	Nguyên	Mô	Nhạt	Que ngắn	++	_
50	AG3	Tròn	Nguyên	Mô	Vừa	Que ngắn	+	_
51	AG4	Tròn	Nguyên	Mô	Vừa	Que ngắn	++	_
52	AG5	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que dài	+	_
53	AG9	Tròn	Nguyên	Lài	Đậm	Que ngắn	+	_
54	AG11	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	+++	_
55	AG13	Tròn	Nguyên	Mô	Vừa	Que ngắn	++	_
56	AG18	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	++	_
57	AG19	Tròn	Nguyên	Mô	Nhạt	Que ngắn	+	_
58	AG24	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que dài	+	_
59	AG24-1	Tròn	Nguyên	Mô	Vừa	Que ngắn	+++	_
60	AG29	Tròn	Nguyên	Mô	Nhạt	Que ngắn	++	_
61	AG30	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	++	_
62	AG31	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que dài	++	_
63	TV1	Tròn	Nguyên	Mô	Vừa	Que ngắn	+	_
64	TV3	Tròn	Nguyên	Mô	Nhạt	Que ngắn	+	_
65	TV4	Tròn	Nguyên	Lài	Vừa	Que ngắn	+++	_
66	TV6	Tròn	Nguyên	Mô	Vừa	Que dài	+	_
67	TL6	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	+++	_
68	TL14	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	++	_
69	TL15	Tròn	Nguyên	Mô	Đậm	Que ngắn	++	_
70	TL17	Tròn	Nguyên	Mô	Nhạt	Que ngắn	+	_

Chú thích: Khả năng chuyển động: + chuyển động yếu
++ chuyển động vừa
+++ chuyển động mạnh

Về đặc điểm khuẩn lạc: Tất cả các dòng vi khuẩn phân lập được đều có hình dạng tròn, bìa nguyên (chiếm 100%) trong đó có 61 dòng có độ nổi là mô (chiếm 87.14%), 9 dòng có độ nổi lài (chiếm 12.86%). Màu sắc khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn phân lập được đều có màu vàng nhưng có sự khác nhau về độ đậm – nhạt. Có 34 dòng có màu vàng đậm (chiếm 48.57%), 21 dòng có màu vàng vừa phải (chiếm 30%) và 15 dòng có màu vàng nhạt (chiếm 21.43%) (Hình 1).



Hình 1: Màu sắc của các khuẩn lạc vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*

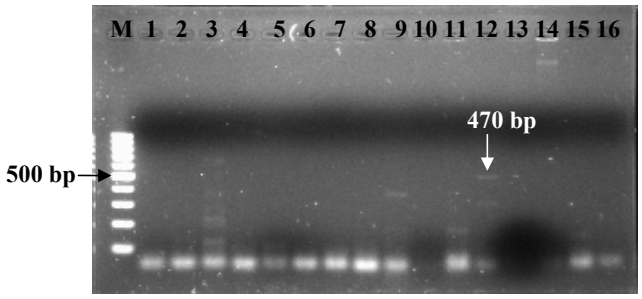
Chú thích: 1: màu vàng nhạt; 2: màu vàng vừa phải; 3: màu vàng đậm

Về đặc điểm tế bào và khả năng chuyển động: Toàn bộ 70 dòng vi khuẩn phân lập được đều là Gram âm (chiếm 100%), có khả năng chuyển động và đều là hình que trong đó có 11 dòng là que dài (chiếm 15.71%) và 59 dòng là que ngắn (chiếm 84.29%).

Đặc biệt là trong cùng một vết bệnh có tồn tại nhiều hơn một isolate có đặc điểm khác nhau về hình dạng và màu sắc khuẩn lạc. Rất có thể đó là các chủng hoàn toàn khác nhau về đặc điểm di truyền khi đem phân tích đa dạng ở mức độ phân tử DNA. Kết quả này cũng phù hợp với nhận định của một số tác giả khác (Tập san Bảo vệ thực vật, 2008) (http://cis.ppd.gov.vn/?module=article&id=14) (Ngày 10/12/2011).

3.2 Kết quả nhận diện vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* bằng kỹ thuật PCR đa thành phần

DNA của các dòng vi khuẩn vừa được trích đem pha loãng ở cùng một nồng độ là khoảng 75ng/µl rồi chạy PCR với hai cặp mồi đặc hiệu (XOR-F và XOR-R2; XOO290-F và XOO290-R). Sản phẩm PCR được thể hiện trên gel agarose 1.5% như trong hình 2, 3 và 4.

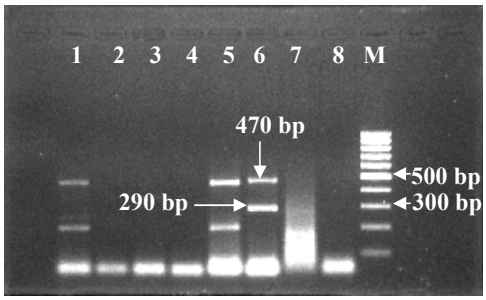


Hình 2: Phổ điện di kiểm tra sản phẩm PCR (1)

Chú thích: M: Thang chuẩn 100bp của Fermentas; 1: Dòng vi khuẩn OM1; 2: Dòng vi khuẩn OM2; 3: Dòng vi khuẩn OM3; 4: Dòng vi khuẩn OM4; 5: Dòng vi khuẩn OM5; 6: Dòng vi khuẩn OM6; 7: Dòng vi khuẩn OM7; 8: Dòng vi khuẩn OM8; 9: Dòng vi khuẩn OM9; 10: Dòng vi khuẩn OM10; 11: Dòng vi khuẩn OM 146; 12: Dòng vi khuẩn TL6; 13: Dòng vi khuẩn TL14; 14: Dòng vi khuẩn TL15; 15: Dòng vi khuẩn TL17; 16: Đối chứng âm

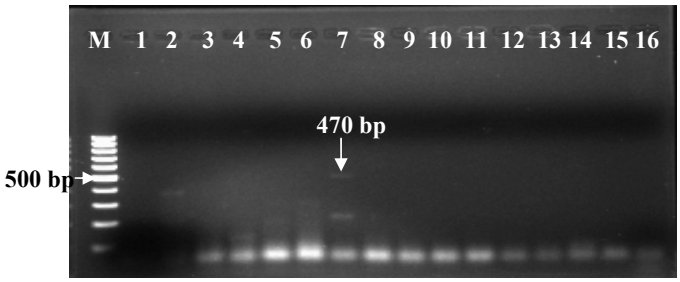
Kết quả ở hình 2 cho thấy giếng 12 có một vùng DNA được khuếch đại với band có kích thước khoảng 470bp từ cặp mồi XOR-R2 và XOR-F, đó là sản phẩm khuếch đại từ mẫu DNA của dòng vi khuẩn TL6.

Khi phân tích sản phẩm PCR từ hình 3 cho thấy có 3 giếng là 1, 5, 6 cùng cho band có kích thước khoảng 470bp, riêng giếng 6 cho đồng thời 2 band là 470bp và 290bp (sản phẩm khuếch đại từ cặp mồi XO290-R và XO290-F). Ba giếng này là sản phẩm được khuếch đại từ mẫu DNA của 3 dòng vi khuẩn lần lượt là OM66, OM98 và OM 98 -1



Hình 3: Phổ điện di kiểm tra sản phẩm PCR (2)

Chú thích: M : Thang chuẩn DNA 100bp của Fermentas; 1: Dòng vi khuẩn OM66-1; 2: Dòng vi khuẩn TV1; 3: Dòng vi khuẩn TV3; 4: Dòng vi khuẩn TV4; 5: Dòng vi khuẩn OM98; 6: Dòng vi khuẩn OM98-1; 7: Dòng vi khuẩn TV6; 8: Đối chứng âm



Hình 4: **Phổ điện di kiểm tra sản phẩm PCR (3)**

Chú thích: M:Thang chuẩn 100bp của Fermentas; 1: Dòng vi khuẩn AG1; 2: Dòng vi khuẩn AG2; 3: Dòng vi khuẩn AG3; 4: Dòng vi khuẩn AG4; 5: Dòng vi khuẩn AG5; Dòng vi khuẩn AG9; 7: Dòng vi khuẩn AG11; 8: Dòng vi khuẩn AG13; 9: Dòng vi khuẩn AG18; 10: Dòng vi khuẩn AG19; 11: Dòng vi khuẩn AG24; 12: Dòng vi khuẩn AG24-1; 13: Dòng vi khuẩn AG29; 14: Dòng vi khuẩn AG30; 15: Dòng vi khuẩn AG31; 16: Đối chứng âm

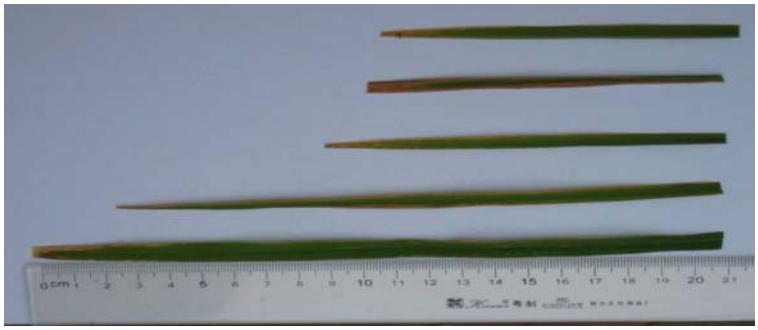
Kết quả ở hình 4 cho thấy giếng 7 thể hiện 1 band có kích thước khoảng 470bp – đây là sản phẩm khuếch đại từ mẫu DNA của dòng vi khuẩn AG11 và cặp mồi XOR-R2 và XOR-F.

Theo tác giả Adachi và Oku (2000), vùng trình tự nucleotide nằm giữa đoạn 16S - 23S rDNA có kích thước khoảng 580bp có ở tất cả các loài Xanthomonas như: *X. oryzae* pv. *oryzae; X. campestris* pv. *alfalfae; X. campestris* pv. *campestris; X. campestris* pv. *cannabis; X. campestris* pv. *vitians; X. campetris* pv. *citri; X. campestris* pv. *cucurbitae; X. campestris* pv. *pisi; X. campestris* pv. *pruni,* với mức độ nhận diện khoảng 95%. Vì vậy cặp mồi XOR-R2 và XOR-F được thiết kế chuyên biệt cho các dòng *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. Với cặp mồi XOR này ngoại trừ *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* có sản phẩm khuếch đại là 470bp, tất cả các dòng Xanthomonas còn lại đều không có sản phẩm.

Còn theo tác giả Cho và các cộng sự (2011), họ gen *rhs* lần đầu được phát hiện ở *Escherichia coli*, tuy nhiên chức năng của chúng cũng chưa rõ ràng. Trong nghiên cứu của ông và các cộng sự về họ gen *rhs* trên một số loài vi khuẩn và nấm; trong đó họ đã sử dụng cặp primer XOO290-R và XOO290-F nhằm xác định tính đặc hiệu của nó đối với các gen *rhs*.

3.3 Khả năng gây bệnh của các dòng vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* được nhận diện

Sau 3 tuần lây nhiễm, toàn bộ các lá được cắt đều có biểu hiện những triệu chứng của bệnh bạc lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* gây nên (Hình 5). Các lá có biểu hiện vết bệnh được đem đo và ghi nhận. Số liệu được thể hiện cho thấy dòng vi khuẩn OM98 có độc tố gây bệnh mạnh nhất trong 5 dòng với chiều dài vết bệnh trung bình là 10.33 cm. Ngược lại, dòng vi khuẩn OM98-1 có độc tố gây bệnh thấp nhất trong 5 dòng với chiều dài vết bệnh trung bình là 4.22 cm. Ba dòng vi khuẩn còn lại là OM66-1, AG11 và TL6 có mức độ độc tính gây bệnh tương đương nhau với chiều dài vết bệnh trung bình lần lượt là: 6.78, 6.28 và 6.78 cm.



Hình 5: Vết bệnh trên các lá lúa sau 3 tuần được lây nhiễm nhân tạo

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

Phân lập được 70 dòng vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* thuần chủng trong đó có 5 dòng được nhận diện bằng kỹ thuật PCR đa thành phần.

4.2 Đề nghị

Đề nghị thu mẫu và phân lập thêm các dòng vi khuẩn ở một số địa phương khác để xác định tính đa dạng di truyền của nguồn bệnh bằng các phương pháp sinh học phân tử.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Adachi Naoto and Takashi Oku, 2000. "PCR-Mediated detection of *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* by amplification of the 16S – 23S rDNA spacer region sequence".

Khush G.S and Ogawa, 1989. "Major gen for restance to bacterial blight in rice". P. 177-192.

Kinoshita T., 1995. "Report of commmitee on gene symbolization, nomenclature and linkage group". Rice Genet Newls 12: 9-115.

Lin X., C. Wang and G. Wen, 1998. " Progess in map-based cloning of *Xa-22(1)*, a new gene for bacterial blight resistance in rice". Paper presented at Plant and Animal genome, San Diego, CA, USA, Jan 18-22.

Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu, 2001. "Molecular marker linked to salt tolerant in rice". Visiting scientist. IRRI.

Singh G.P., M.K. Srivastava, R.M Singh and R.V. Singh, 1977. "Variation in quantilative and qualitative losses caused by bacterial blight rice varieties". Indian phytopathol. 30: 180-185.

Tập san bảo vệ thực vật, 2008. (http://cis.ppd.gov.vn/?module=article&id=14) (Ngày 10/12/2011).

Zhang Z., N. Naqvi and S. Sim, 1997. "Fine mapping of blast and bactirial leaf blight resistance genes introgressed from wild species *Oryzae minuta*. " Abtract presented at the general meeting of the International Program on Rice Biotechnology". Malacca, Malaysia, Sep 15-19, p. 278.

Wakimoto S., 1995. "Studies on multiplication of OP1 phage (*Xanthomonas oryzae* bacteriophage) growth experiment under various conditions". Sci. Bull. Fac. Agric. Kyushu 15: 151-160.