

PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ CHỦNG GIỐNG VI KHUẨN NỘI SINH TRONG CÂY KHOAI TÂY BẰNG CHỈ THỊ RAPD VÀ ISSR

Đào Thị Hồng Vân¹, Nguyễn Đắc Tiến²,
Vương Thị Thiết², Nguyễn Thị Ngọc Anh¹, Đinh Trường Sơn^{2,*}

TÓM TẮT

Đã phân lập và khảo sát ảnh hưởng của việc lây nhiễm 35 chủng giống vi sinh vật nội sinh phân lập từ rễ cây khoai tây lên sự nảy mầm của hạt rau cải, từ đó lựa chọn được 14 chủng giống vi sinh vật phục vụ phân tích sự đa dạng di truyền với 15 chỉ thị RAPD và 13 ISSR. Hai nhóm chỉ thị đã nhận bản được tổng số 323 locus, trong đó tỷ lệ các locus đa hình trung bình đạt 97,98% đối với chỉ thị RAPD và 98,56% đối với chỉ thị ISSR. 28 chỉ thị đã nhận bản được 1.969 sản phẩm PCR. 14 chủng giống vi sinh vật phân lập được có sự đa dạng di truyền dao động từ 0,34 - 0,96. Tại giá trị trung bình của hệ số tương đồng di truyền là 0,57; 14 chủng giống vi sinh vật có thể được phân thành 3 nhóm chính. Như vậy, sự đa dạng di truyền của 14 chủng giống vi sinh vật phân lập được là rất cao. Các chủng giống vi khuẩn có thể được sử dụng cho các nghiên cứu thử nghiệm trên cây khoai tây trong điều kiện *in vitro* cũng như ngoài nhà lưới hoặc đồng ruộng.

Từ khóa: *Vi khuẩn nội sinh, chỉ thị phân tử, ISSR, RAPD, đa dạng di truyền.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Khoai tây là loài cây nông nghiệp ngắn ngày, có vai trò chính trong việc đảm bảo an ninh lương thực toàn cầu. Ở Việt Nam, khoai tây được trồng khá rộng rãi vào vụ đông ở miền Bắc và đóng vai trò làm thực phẩm là chủ yếu [1]. Bên cạnh yêu cầu về chất lượng thì người trồng khoai tây luôn mong muốn có được năng suất cao. Cho nên việc sử dụng phân bón vô cơ và hữu cơ khi trồng khoai tây là khá phổ biến. Việc sử dụng phân bón vô cơ và hữu cơ trong trồng trọt nếu không hợp lý sẽ không những làm giảm hiệu quả kinh tế, gây lãng phí mà còn làm ảnh hưởng tới sức khỏe của đất. Chính vì vậy, nhiều biện pháp canh tác nhằm phát triển nông nghiệp bền vững đã và đang được triển khai nghiên cứu, áp dụng, trong đó có sử dụng vi sinh vật có lợi cho cây trồng [2, 3].

Hệ vi sinh vật nội sinh trong cây khoai tây nói riêng và thực vật nói chung có vai trò quan trọng

trong toàn bộ quá trình sinh trưởng, phát triển của cây trồng. Chính vì vậy, việc phân lập, nghiên cứu, đánh giá đa dạng di truyền nhóm vi sinh vật nội cộng sinh trong cây khoai tây có thể góp phần đưa ra các giải pháp trồng trọt tốt hơn [2, 3].

Trong các nhóm chỉ thị phân tử, chỉ thị RAPD và ISSR được sử dụng khá phổ biến để đánh giá đa dạng di truyền do có nhiều ưu điểm như đơn giản, hiệu quả, yêu cầu lượng ADN nhỏ, tính đa hình cao, dễ dàng triển khai [4 - 8]. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, lựa chọn và khảo sát sự đa dạng di truyền của các chủng giống vi sinh vật nội sinh trong cây khoai tây nhằm cung cấp thông tin cũng như làm cơ sở cho công tác đánh giá ảnh hưởng của các chủng giống lên cây khoai tây.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng: Các chủng giống vi sinh vật nội sinh phân lập được từ rễ cây khoai tây không bị dập nát được thu thập từ cây khoai tây trồng trên đồng ruộng.

Rễ khoai tây sau khi được thu từ đồng ruộng được rửa sạch dưới vòi nước chảy rồi được tráng với cồn 70% trong khoảng 30 giây và được khử

¹ Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Mở Hà Nội

² Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Email: dtson@vnua.edu.vn

trùng bằng dung dịch NaDCC có bổ sung một vài giọt Tween trong 20 phút. Sau khi khử trùng, mẫu được tráng lại 3 lần bằng nước cất vô trùng. ở lần tráng cuối cùng, lấy 1 ml nước tráng và cấy lên môi trường LB đặc, nuôi sau 48 giờ, mẫu nào không có VSV mọc lên sẽ được sử dụng cho phân lập. Rễ cây được nghiền trên đĩa petri thủy tinh, sử dụng một giọt dịch nghiền nhỏ để cấy lên môi trường LB đặc. Các khuẩn lạc được cấy rìa sang đĩa môi trường LB đặc, làm thuần rồi giữ giống [9, 10].

Các chủng giống vi sinh vật được nuôi qua đêm trong môi trường LB lỏng đến OD₆₀₀ đạt trong khoảng 0,8 - 1,2. Dịch nuôi cấy được ly tâm 3.000 g trong hai phút để thu sinh khối tế bào vi khuẩn và pha loãng với nước cất vô trùng đến giá trị OD₆₀₀ là 0,01. Hạt giống được ngâm trong 10 ml dịch khuẩn có mật độ OD₆₀₀ = 0,01 để toàn bộ bề mặt hạt giống tiếp xúc với dịch pha loãng vi sinh vật. Hạt giống và dung dịch vi khuẩn nội sinh tiếp tục được chuyển lên bề mặt giấy thấm ẩm trong đĩa petri đã được hấp khử trùng. Công thức đối chứng là công thức sử dụng nước cất vô trùng để ngâm hạt giống.

ADN của các chủng giống vi khuẩn nội sinh được tách chiết theo quy trình có cải tiến [11]. ADN sau đó được pha loãng tới nồng độ 5 ng/μl để sử dụng trong phản ứng PCR với các môi RAPD và ISSR. Phản ứng PCR có sử dụng bộ kit 2x PCR MyTaq™ Mix, Bioline. Thành phần của phản ứng PCR bao gồm: Đệm PCR Mastermix Solution MyTaq™, môi RAPD hoặc ISSR và ADN khuôn (20 ng/phản ứng PCR có thể tích 10 μl).

Thông tin cụ thể về trình tự, nhiệt độ gắn mỗi của các môi RAPD và ISSR được mô tả ở bảng 3 và 4. Mỗi UBC được thiết kế bởi Trường Đại học British Columbia (University of British Columbia), Canada. Mỗi RAPD được thiết kế bởi Operon Tech. Inc. Alameda, CA, USA. Phản ứng PCR được thực hiện theo các bước sau: Biến tính: 95°C trong 5 phút; lặp lại 35 chu kỳ sau: 95°C trong 20 giây, nhiệt độ gắn mỗi phù hợp (Bảng 3 và 4) trong 30 giây; 72°C trong 90 giây; 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được nhuộm với RedSafe™ Nucleic

Acid Staining Solution (20000X) và chạy điện di với gel agarose 1%.

Ma trận nhị phân được thiết lập bằng cách ghi điểm 1 đối với các băng vạch sáng rõ và ổn định và ghi điểm 0 nếu không có băng vạch. Sử dụng hệ số tương đồng của Sokal và Michener (1958) [12] và phần mềm NTSYSpc 2.1 để xác định hệ số tương đồng cũng như sơ đồ tương đồng di truyền giữa các chủng giống vi sinh vật.

Chỉ số PIC (polymorphism information content) là chỉ số đa hình di truyền [13]. $PIC(i) = 1 - p_i^2 - q_i^2$, trong đó: i là thứ tự locus được tính, p_i là tần suất băng xuất hiện của locus, q_i là tần suất băng không xuất hiện.

Chỉ số Rp (Resolving power) là chỉ số sai khác của mỗi cặp môi và được tính theo công thức: $R_p = \sum I_b$, trong đó $I_b = 1 - |2 \times (0,5 - p)|$ với p là tần số xuất hiện băng của locus [14].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và khảo sát ảnh hưởng của một số chủng giống vi sinh vật nội sinh trong cây khoai tây tới giai đoạn nảy mầm của cây rau cải

Rễ cây sau khi được xác định là sạch vi sinh vật trên bề mặt (đĩa cấy nước tráng lại lần thứ 3 không lên khuẩn lạc) được quan sát và ghi nhận sơ bộ về kiểu hình. Kết quả quan sát cho thấy, khuẩn lạc của các chủng giống vi sinh vật phân lập được khá đa dạng về hình thái, màu sắc như: Hình tròn, hình bầu dục, màu vàng, màu trắng có viền bao quanh, màu trắng không có viền bao quanh... Kết quả trên chứng tỏ sự đa dạng về hình thái của các chủng giống vi sinh vật đã được phân lập.

Sau khi làm thuần, 35 chủng giống vi sinh vật có sự khác biệt về mặt hình thái được lựa chọn và tiến hành khảo sát nhanh ảnh hưởng của chúng tới giai đoạn nảy mầm của hạt rau cải. Mục tiêu của thí nghiệm này là lựa chọn được các chủng giống có sự khác biệt, đa dạng nhất có thể để đánh giá đa dạng di truyền cũng như thử nghiệm tác động kích thích sinh trưởng. Thí nghiệm có công thức đồng lây nhiễm với nước cất vô trùng làm đối chứng âm. Sau 5 ngày lây nhiễm, đã thu được kết quả ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của vi sinh vật nội sinh tới tỷ lệ nảy mầm, chiều cao cây và khối lượng tươi cây rau cải (5 ngày sau gieo hạt)

STT	Ký hiệu chủng	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Chiều cao cây (cm)	Khối lượng tươi (mg)
1	Iso1	100	3,9	↑322,8
2	Iso2	100	4,0	↓232,6
3	Iso3	100	3,9	→252,5
4	Iso4	100	4,0	→261,6
5	Iso5	100	3,8	→290,1
6	Iso6	100	4,0	↑297,3
7	Iso7	100	3,7	→290,8
8	Iso8	100	3,9	↓243,3
9	Iso9	100	3,9	→267,0
10	Iso10	100	4,0	↑317,4
11	Iso11	100	4,0	↑323,6
12	Iso12	100	4,0	→265,9
13	Iso13	100	4,1	→293,8
14	Iso14	100	3,9	→289,3
15	Iso15	100	3,7	↑308,0
16	Iso16	100	3,8	→278,5
17	Iso17	100	4,0	→265,6
18	Iso18	100	4,0	↑338,0
19	Iso19	100	3,9	→267,6
20	Iso20	100	3,8	↓243,8
21	Iso21	100	3,9	↓231,3
22	Iso22	100	3,8	↓246,9
23	Iso23	100	3,9	↑320,0
24	Iso24	100	3,8	↓239,2
25	Iso25	100	3,9	↑331,2
26	Iso26	100	4,0	→257,7
27	Iso27	100	4,0	↓249,4
28	Iso28	100	4,2	↑296,6
29	Iso29	100	4,1	→254,9
30	Iso30	100	4,0	↑329,7
31	Iso31	100	4,2	↓230,1
32	Iso32	100	4,0	→290,1
33	Iso33	100	4,0	→294,4
34	Iso34	100	3,8	↑307,6
35	Iso35	100	4,1	↓210,0
Đối chứng (nước cất vô trùng)		100	4,0	→288,8

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, các công thức đều có tỷ lệ nảy mầm đạt 100% và chiều cao cây cũng không có sự khác biệt nhiều với công thức đối chứng. Điều đó chứng tỏ việc đồng nuôi cấy với các chủng giống vi sinh vật nội sinh mặc dù được tách từ rễ cây khoai tây nhưng đã không ảnh hưởng tới tỷ lệ nảy mầm cũng như chiều cao của cây rau cải. Tuy nhiên, khi quan sát hình thái lại thấy có sự khác biệt về hình dạng thân và màu sắc lá giữa các công thức thử nghiệm đồng nuôi cấy với các chủng giống khác nhau. Sự khác biệt được thể hiện rõ nhất ở chỉ tiêu khối lượng tươi. Chính vì vậy, dựa trên chỉ tiêu này, đã phân loại tác động của các chủng giống vi sinh vật theo 3 nhóm: (1) tác động không rõ ràng (→), (2) tốt hơn (↑) và (3) kém hơn (↓) so với đối chứng không lây nhiễm. Dựa trên kết quả phân loại trên, đã lựa chọn 14 chủng giống vi sinh vật bao gồm 5 chủng giống có tác động không rõ ràng (Iso3, Iso4, Iso9, Iso12, Iso16), 4 chủng giống có tác động làm giảm khối lượng tươi (Iso20, Iso21, Iso27, Iso31) và 5 chủng giống VSV có tác động làm tăng khối lượng tươi (Iso1, Iso11, Iso18, Iso23, Iso25).

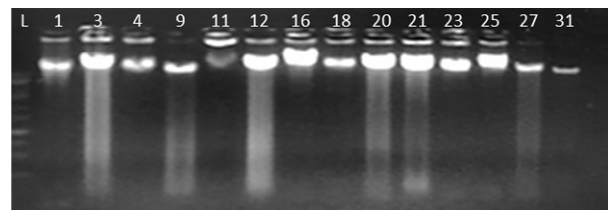
Đã có nhiều nghiên cứu về tác động có lợi của các chủng vi sinh vật tới sự nảy mầm của hạt giống. Lê Thị Xà và cs (2020) [15] đã khảo sát khả năng kích thích nảy mầm của tám chủng vi khuẩn có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA trên hạt rau muống cho thấy, có 5 chủng vi khuẩn có tác dụng làm tăng tỷ lệ nảy mầm và không có chủng nào ức chế nảy mầm. Khi phân lập và thử nghiệm 13 chủng vi sinh vật phân lập từ đất trồng lúa vùng đồng bằng sông Cửu Long cho thấy, cả 13 chủng đều có tác dụng kích thích sự nảy mầm của hạt lúa giống IR50404 [16]. Kết quả khảo sát 80 chủng vi khuẩn nội sinh thuộc loài *Herbaspirillum seropedicae* phân lập từ cây lúa, lúa miến và ngô cho thấy, có 19 chủng có tác dụng làm tăng khối lượng tươi của cây lúa từ mức trung bình đến cao [17]. Nghiên cứu này đã phân lập và thử nghiệm tác động của 35 chủng giống vi sinh vật nội sinh trong rễ khoai tây và cũng cho kết quả là không có chủng giống nào ức chế sự nảy mầm của hạt rau cải. Mặc dù vậy, tác động của các chủng giống nghiên cứu lên khối lượng tươi là có sự khác biệt

rõ ràng, trong đó có cả các chủng giống có tác dụng làm giảm khối lượng tươi.

3.2. Phân tích đa dạng di truyền của 14 chủng giống vi sinh vật nội sinh trong cây khoai tây bằng chỉ thị RAPD và ISSR

Bảng 2. Chất lượng ADN tổng số của 14 chủng giống vi sinh vật

STT	Chủng giống vi sinh vật nội sinh	Nồng độ (ng/μl)	OD _{260/280}
1	Iso1	593	1,77
2	Iso3	378	1,72
3	Iso4	156	1,56
4	Iso9	403	1,62
5	Iso11	180	1,51
6	Iso12	977	1,76
7	Iso16	365	1,83
8	Iso18	205	1,59
9	Iso20	909	1,81
10	Iso21	793	1,73
11	Iso23	530	1,63
12	Iso25	654	1,77
13	Iso27	313	1,77
14	Iso31	87	1,87



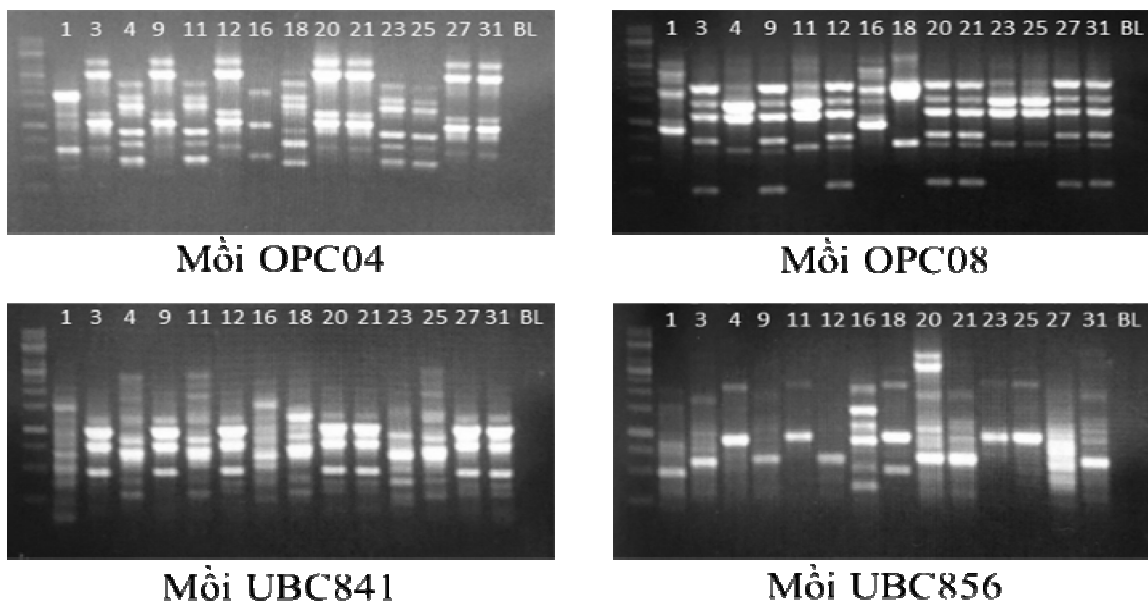
Hình 1. Kết quả điện di ADN tổng số

Công đoạn đầu tiên đóng vai trò quan trọng để phân tích được sự đa dạng di truyền chính là tách chiết được axit nucleic để làm vật liệu cho các phản ứng PCR. ADN tổng số của 14 chủng giống vi sinh vật được tách chiết dựa theo quy trình công bố trước đó [11]. ADN tổng số được kiểm tra bằng đo quang phổ (Bảng 2) và điện di trên gel agarose 1% (Hình 1). Kết quả điện di cho thấy, 14 chủng ADN tách chiết mặc dù có bị đứt gãy nhưng vẫn có băng vạch kích thước lớn (trên 10 kb) rất sáng rõ. Do vậy, ADN tách chiết được là phù hợp cho làm

ADN khuôn trong phản ứng PCR với các môi ISSR và RAPD.

3.2.1. Phân tích đa dạng di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh trong cây khoai tây bằng chỉ thị RAPD

Nghiên cứu đã khảo sát 24 môi RAPD và lựa chọn được 15 môi có sản phẩm băng vạch đa hình, rõ ràng. Minh họa về sản phẩm PCR của một số môi RAPD và ISSR được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Kết quả chạy điện di sản phẩm PCR của môi RAPD (OPC04, OPC08) và môi ISSR (UBC841, UBC856)

Ghi chú: Các số trên hình là các chủng giống vi sinh vật nghiên cứu, BL: đối chứng trắng

Kết quả phân tích sự đa hình của 14 chủng giống vi sinh vật nội sinh trong cây khoai tây được thể hiện ở bảng 3 cho thấy, 15 chỉ thị RAPD đã nhân bản được 1.038 sản phẩm PCR, trung bình 69,20 sản phẩm PCR/môi. 15 môi RAPD đã nhân bản được 170 locus, trung bình 11,33 locus/môi, đa số các locus nhân bản được là locus đa hình và tỷ lệ locus đa hình trung bình đạt 97,98%. Với số lượng locus nhân bản được cũng như tỷ lệ locus đa

hình là rất cao nên có thể thấy các môi RAPD sử dụng có khả năng phân biệt đa hình rất tốt. Điều này cũng thể hiện rất rõ ràng trên chỉ số đa hình PIC của mỗi khi chỉ số này đạt trung bình là 0,38. Bên cạnh đó, chỉ số sai khác giữa các cặp môi (Rp) cũng đạt khá cao, trong đó môi OPD02 có chỉ số Rp là 11,29. Môi OPR12 cho chỉ số Rp là thấp nhất và đạt 4,57.

Bảng 3. Hiệu quả phân tích đa dạng di truyền của các môi RAPD trên 14 chủng giống vi sinh vật nội sinh

Tên môi	Trình tự môi	Nhiệt độ gắn môi (°C)	Tổng số locus	Tỷ lệ locus đa hình (%)	Tổng số băng nhân bản được	Số băng/mẫu	Chỉ số PIC	Chỉ số Rp
OPC03	GGGGGTCTTT	32,0	8	100,0	40	2,9	0,44	5,71
OPN01	CTCACGTTGG	32,0	10	90,0	90	6,4	0,41	6,29
OPR09	TGAGCACGAG	32,0	10	100,0	56	4,0	0,35	6,57
OPC01	TTCGAGCCAG	32,0	15	93,3	86	6,1	0,43	10,57
OPC04	CCGCATCTAC	32,0	13	100,0	82	5,9	0,39	8,29

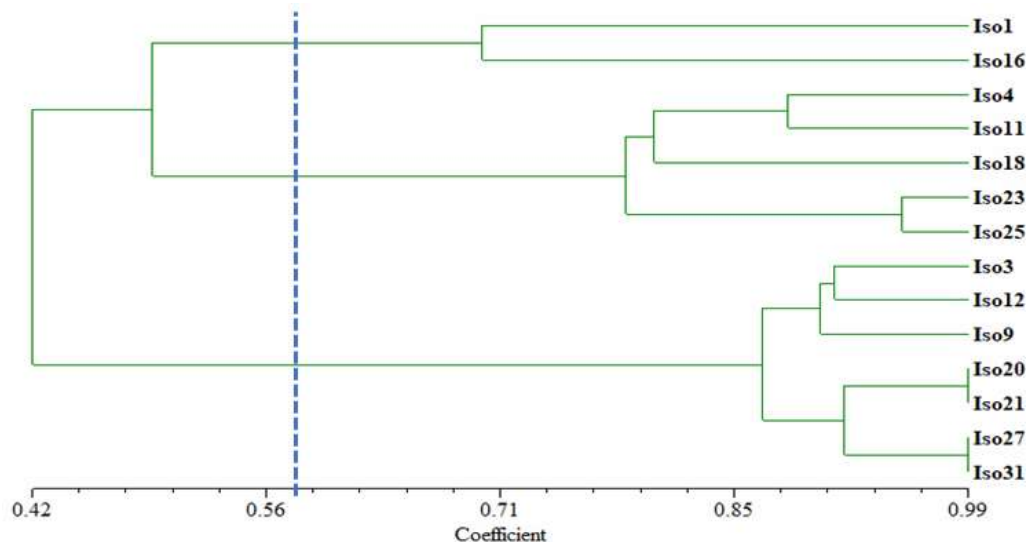
OPC13	AAGCCTCGTC	32,0	12	100,0	93	6,6	0,41	8,43
OPC15	GACGGATCAG	32,0	10	100,0	66	4,7	0,33	5,43
OPB05	TGCGCCCTTC	34,0	10	100,0	53	3,8	0,42	7,29
OPC08	TGGACCGGTG	34,0	11	100,0	76	5,4	0,33	5,71
OPB03	CATCCCCCTG	34,0	10	100,0	62	4,4	0,38	5,71
OPD01	ACCGCGAAGG	34,0	13	92,3	53	3,8	0,36	6,43
OPD02	GGACCCAACC	34,0	17	94,1	98	7,0	0,42	11,29
OPS10	ACCGTTCCAG	32,0	11	100,0	81	5,8	0,42	7,71
OPR12	ACAGGTGCGT	32,0	10	100,0	61	4,4	0,32	4,57
OPS08	TTCAGGGTGG	32,0	10	100,0	41	2,9	0,35	5,57
Tổng số			170		1038			
Trung bình/mỗi			11,33	97,98	69,20	4,94	0,38	

Ghi chú: Chỉ số Rp: Chỉ số sai khác giữa các cặp môi. Chỉ số PIC: chỉ số đa hình PIC của môi.

Sơ đồ tương đồng di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh dựa trên kết quả so sánh hệ số tương đồng di truyền được phân tích bằng chỉ thị RAPD được trình bày trên hình 3.

Kết quả cho thấy, các chủng giống vi sinh vật phân lập được có mức độ đa dạng di truyền rất cao. Tại giá trị trung bình hệ số tương đồng di

truyền là 0,58, 14 chủng giống vi khuẩn được phân thành 3 nhóm chính, trong đó nhóm I chỉ có 2 chủng giống (Iso1 và Iso16), nhóm II có 5 chủng giống và nhóm III có 7 chủng giống. Các chủng giống Iso20 và Iso21, Iso27 và Iso31 là có hệ số tương đồng cao nhất, chúng tỏ có quan hệ gần gũi với nhau (Hình 3).



Hình 3. Quan hệ di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh trong cây khoai tây được phân tích bằng chỉ thị RAPD

Ghi chú: Nét đứt thể hiện giá trị trung bình của hệ số tương đồng di truyền

Sự đa dạng di truyền của 29 chủng vi khuẩn nội sinh phân lập từ thân cây mía khỏe mạnh trồng ở Cuba được phân tích bằng chỉ thị Two Primers-Random Amplified Polymorphic DNA fingerprinting

(TP-RAPD) cho thấy, các quần thể vi khuẩn nội sinh bên trong cây mía là khá đa dạng [18]. Trong nghiên cứu này, rất nhiều môi RAPD cho tỷ lệ locus đa hình đạt 100% (Bảng 3). Kết quả của

ngghiên cứu này khá tương đồng với kết quả nghiên cứu của Bhadania và cs (2014) [19] khi sử dụng các chỉ thị RAPD để phân tích đa dạng di truyền của 10 chủng giống vi sinh vật nội sinh cũng thu được kết quả là rất nhiều mỗi RAPD cho tỷ lệ đa hình đạt 100%.

3.2.2. Phân tích đa dạng di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh trong cây khoai tây bằng chỉ thị ISSR

Nghiên cứu đã khảo sát 37 chỉ thị ISSR và lựa chọn được 13 mỗi có sản phẩm PCR có sự đa hình rõ ràng. Kết quả phân tích được thể hiện trên bảng 4 cho thấy: 13 chỉ thị ISSR nhân bản được tổng số 153 locus, trung bình đạt 11,77 locus/mỗi. Đa số các mỗi có tỷ lệ locus đa hình đạt 100%, trung bình

đạt 98,56%. Chỉ có 2 mỗi có tỷ lệ locus đa hình không đạt 100% là mỗi UBC836 và mỗi UBC864 có tỷ lệ đạt lần lượt là 93,8 và 87,5. Chỉ số đa hình PIC của các mỗi đạt trung bình là 0,4; trong đó mỗi UBC864 cho hệ số PIC thấp nhất nhưng vẫn đạt 0,30, mỗi UBC873 cho hệ số PIC cao nhất và đạt 0,43. Thêm vào đó, chỉ số Rp dao động từ 2,86 (ISSR4) đến 12,14 (UBC835). Như vậy, các mỗi có năng lực phát hiện đa hình rất cao. Ở một nghiên cứu tương tự, sự đa dạng di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh phân lập từ rễ cây khoai tây được đánh giá bằng 10 chỉ thị RAPD và 6 chỉ thị ISSR cũng cho chỉ số PIC đạt giá trị trung bình là 0,35 và 0,38 tương ứng [20].

Bảng 4. Hiệu quả phân tích đa dạng di truyền của các mỗi ISSR trên 14 chủng giống vi sinh vật nội sinh

Tên mỗi	Trình tự mỗi	Nhiệt độ gắn mỗi (°C)	Tổng số locus	Tỷ lệ locus đa hình (%)	Tổng số băng nhân bản được	Số băng/mẫu	Chỉ số PIC	Chỉ số Rp
UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	51,6	16	93,8	84	6,0	0,42	10,86
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	51,6	10	100,0	71	5,1	0,39	6,29
UBC855	ACACACACACACACACYT	51,6	12	100,0	76	5,4	0,42	8,14
UBC856	ACACACACACACACACYA	51,6	14	100,0	67	4,8	0,42	8,86
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52,4	18	100,0	91	6,5	0,38	10,71
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	53,9	17	100,0	100	7,1	0,43	12,14
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	53,9	15	100,0	96	6,9	0,41	10,00
UBC848	CACACACACACACACARG	53,9	10	100,0	43	3,1	0,36	5,71
UBC864	ATGATGATGATGATGATG	47,0	8	87,5	64	4,6	0,30	3,57
UBC873	GACAGACAGACAGACA	48,2	11	100,0	83	5,9	0,43	7,86
ISSR4	ACACACACACACACACT	50,0	5	100,0	45	2,4	0,36	2,86
UBC860	TGTGTGTGTGTGTGTGRA	51,6	9	100,0	60	3,9	0,43	6,57
UBC858	TGTGTGTGTGTGTGTGRT	51,6	8	100,0	51	3,1	0,39	5,14
Tổng số			153		931			
Trung bình/mỗi			11,77	98,56	71,62	4,98	0,40	

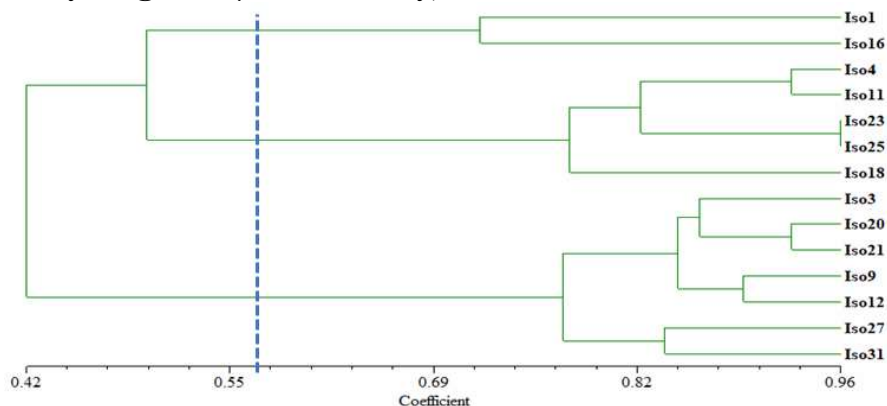
Ghi chú: R có thể là A hoặc G; B có thể là C hoặc G hoặc T; D có thể là A hoặc G hoặc T; H có thể là A hoặc C hoặc T và V có thể là A hoặc C hoặc G. Chỉ số Rp: Chỉ số sai khác giữa các cặp mỗi. Chỉ số PIC: chỉ số đa hình PIC của mỗi.

Kết quả xác định sơ đồ tương đồng di truyền bằng chỉ thị ISSR cho thấy, tại giá trị trung bình hệ số tương đồng di truyền là 0,57, 14 chủng giống vi

khuẩn được phân thành 3 nhóm chính với các thành viên trong các nhóm cũng giống như kết quả phân tích bởi chỉ thị RAPD (Hình 4). Nghiên

cứu của Đào Thị Hồng Vân và cs (2022) [20] về đa dạng di truyền của các chủng giống vi sinh vật nội sinh trên cây khoai tây bằng chỉ thị ISSR cho thấy,

hệ số tương đồng của 14 chủng giống vi khuẩn biến động từ 0,36 - 0,76.



Hình 4. Quan hệ di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh trong cây khoai tây được phân tích bằng chỉ thị ISSR

Ghi chú: Nét đứt thể hiện giá trị trung bình của hệ số tương đồng di truyền

3.2.3. Phân tích đa dạng di truyền dựa trên 2 chỉ thị RAPD và ISSR

Các kết quả trên cho thấy, hai nhóm chỉ thị RAPD và ISSR đã xác định được sự tương đồng di truyền của các chủng giống vi sinh vật phân lập được. Sự xếp nhóm ở các sơ đồ tương đồng di truyền khi phân tích bởi chỉ thị RAPD và ISSR là

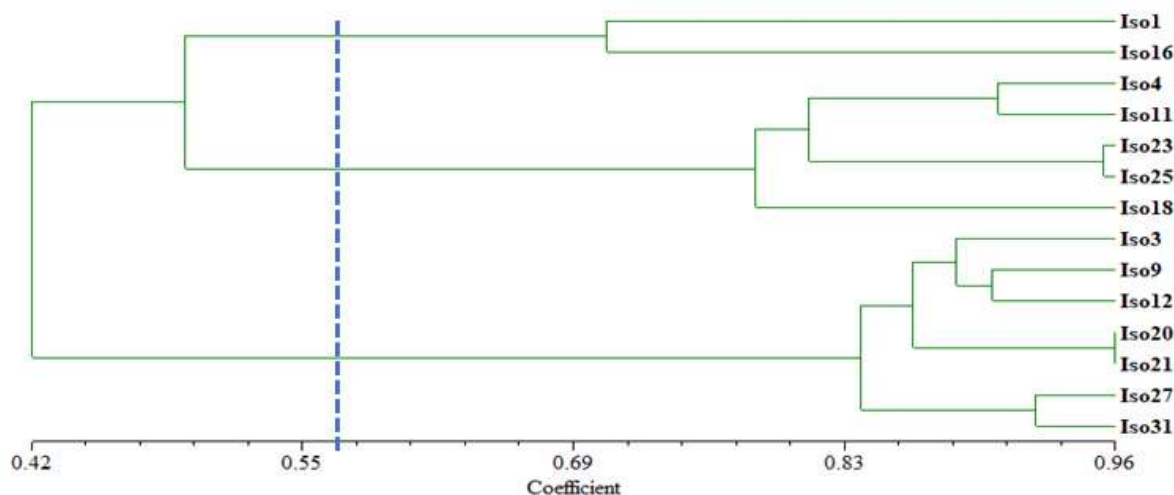
giống nhau chứng tỏ sự thống nhất giữa hai chỉ thị. Mặc dù vậy, hệ số tương đồng di truyền sẽ được phân tích một cách chính xác hơn khi số locus trong cùng một phân tích lớn hơn. Do đó, việc kết hợp cả hai chỉ thị RAPD và ISSR trong cùng một ma trận phân tích sẽ có tính thuyết phục cao hơn so với phân tích độc lập nhau.

Bảng 5. Hệ số tương đồng di truyền của 14 chủng giống vi sinh vật nội sinh được phân tích bởi hai chỉ thị RAPD và ISSR

	Iso1	Iso3	Iso4	Iso9	Iso11	Iso12	Iso16	Iso18	Iso20	Iso21	Iso23	Iso25	Iso27	Iso31
Iso1	1,00													
Iso3	0,46	1,00												
Iso4	0,49	0,41	1,00											
Iso9	0,46	0,88	0,41	1,00										
Iso11	0,51	0,41	0,90	0,40	1,00									
Iso12	0,48	0,89	0,41	0,90	0,42	1,00								
Iso16	0,71	0,42	0,50	0,45	0,54	0,43	1,00							
Iso18	0,45	0,40	0,79	0,39	0,81	0,42	0,47	1,00						
Iso20	0,47	0,87	0,39	0,85	0,38	0,87	0,43	0,38	1,00					
Iso21	0,48	0,86	0,41	0,85	0,40	0,86	0,45	0,39	0,96	1,00				
Iso23	0,51	0,41	0,80	0,41	0,81	0,43	0,48	0,76	0,37	0,37	1,00			
Iso25	0,50	0,38	0,80	0,39	0,81	0,40	0,49	0,76	0,34	0,35	0,96	1,00		
Iso27	0,49	0,81	0,44	0,80	0,43	0,82	0,44	0,45	0,85	0,85	0,41	0,40	1,00	
Iso31	0,49	0,83	0,41	0,81	0,41	0,82	0,42	0,41	0,88	0,87	0,40	0,39	0,92	1,00

Kết quả trên bảng 5 thể hiện hệ số tương đồng của 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh biến động từ 0,34 (Iso20 vs. Iso25) đến 0,96 (Iso23 vs. Iso25). Tại giá trị trung bình của hệ số tương đồng di truyền là 0,57, khi phân tích bằng kết hợp hai chỉ

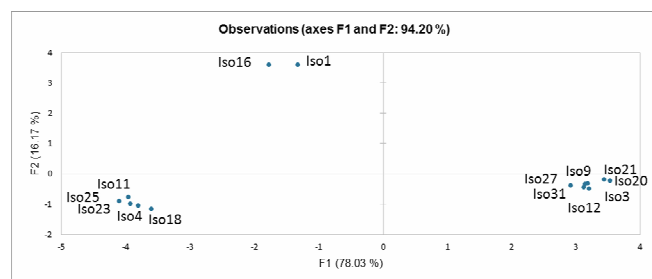
thị, 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh cũng phân thành 3 nhóm với số chủng giống thành viên trong các nhóm là giống với chỉ thị RAPD và ISSR khi phân tích riêng rẽ (Hình 5).



Hình 5. Quan hệ di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh trong cây khoai tây được phân tích bằng kết hợp cả hai chỉ thị RAPD và ISSR (C)

Ghi chú: Nét đứt thể hiện giá trị trung bình của hệ số tương đồng di truyền

Nghiên cứu của Đào Thị Hồng Vân và cs (2022) [20] về sự đa dạng di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh cũng được phân lập từ rễ khoai tây cho hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,36 - 0,76. Như vậy, rõ ràng là các chủng giống vi sinh vật trong nghiên cứu này có mức độ đa dạng thấp hơn.



Hình 6. Phân tích thành phần chính của 14 chủng giống vi sinh vật khi kết hợp hai chỉ thị RAPD và ISSR

Bên cạnh việc sử dụng phần mềm NTSYS để xây dựng sơ đồ tương đồng di truyền, qua đó thấy được mối quan hệ giữa các chủng giống vi sinh vật một cách trực quan thì phân tích thành phần chính (principal component analysis - PCA) cũng là một hình thức biểu diễn số liệu rất trực quan và tổng thể hơn, dễ dàng hình dung. Kết quả phân tích

PCA sử dụng hệ số tương đồng di truyền được xác định bởi chỉ thị RAPD và ISSR được thể hiện trên hình 6.

Đồ thị biểu diễn kết quả PCA có hai thành phần chính đầu tiên có giá trị 78,03% và 16,17% (tổng số 94,2%) (Hình 6). So sánh với kết quả trên hình 5 cho thấy, 14 chủng giống vi sinh vật cũng được tách thành 3 nhóm rất rõ ràng với khoảng cách rất xa nhau khi được phân tích thành phần chính. Kết quả phân tích PCA thêm một lần nữa xác nhận sự đa dạng di truyền ở mức rất cao của 14 chủng giống vi sinh vật nội sinh phân lập được.

4. KẾT LUẬN

Đã phân lập và khảo sát ảnh hưởng của 35 chủng giống vi sinh vật nội sinh trong rễ cây khoai tây lên sự nảy mầm của hạt rau cải, từ đó làm cơ sở để lựa chọn 14 chủng giống vi sinh vật phục vụ phân tích sự đa dạng di truyền bằng chỉ thị RAPD và ISSR. Kết quả phân tích cho thấy, sự đa dạng di truyền của 14 chủng giống vi sinh vật phân lập được là rất cao, dao động từ 0,34 - 0,96. Tại giá trị trung bình của hệ số tương đồng di truyền là 0,57, 14 chủng giống vi sinh vật được phân thành 3 nhóm chính trong đó nhóm I có 2 chủng giống

bao gồm Iso1 và Iso16, nhóm II có 5 chủng giống (Iso4, Iso11, Iso18, Iso23, Iso25) và nhóm III có 7 chủng giống (Iso3, Iso12, Iso9, Iso20, Iso21, Iso27, Iso31). Các chủng giống vi khuẩn có thể được sử dụng cho các nghiên cứu thử nghiệm tác động của chúng trên cây khoai tây trong điều kiện *in vitro* cũng như ngoài nhà lưới hoặc đồng ruộng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Xuân Trường, Lương Văn Hưng, Vi Quốc Hiền, Phạm Văn Tuấn, Vũ Tiến Dũng, Đỗ Thị Mai (2019). Kết quả tuyển chọn và khảo nghiệm giống khoai tây mới 'Bliss' cho chế biến chip. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Chuyên đề Sinh học phục vụ phát triển nông nghiệp công nghệ cao*, 130 - 138.
2. Mukherjee A, Bhowmick S, Yadav S, Rashid MM, Chouhan GK, Vaishya JK, *et al.* (2021). Re-vitalizing of endophytic microbes for soil health management and plant protection. *3 Biotech*, 11 (9): 399.
3. Xavier M, Bosch A, Karp S, Soccol C. (2021). Endophytic bacteria: a possible path towards a sustainable agriculture. *Biotechnology Research and Innovation*; 5: e2021008.
4. Kesawat MS, Das Kumar B. (2009). Molecular markers: It's application in crop improvement. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 12 (4): 169 - 81.
5. Nadeem MA, Nawaz MA, Shahid MQ, Doğan Y, Comertpay G, Yıldız M, *et al.* (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32 (2): 261 - 85.
6. Wu YJ, Chen Y, Wang J, Zhu CX, Xu BL. (2006). RAPD analysis of jasmine rice-specific genomic structure. *Genome*, 49 (6): 716 - 9.
7. Mazumder SR, Hoque H, Sinha B, Chowdhury WR, Hasan MN, Prodhan SH. (2020). Genetic variability analysis of partially salt tolerant local and inbred rice (*Oryza sativa* L.) through molecular markers. *Heliyon*, 6 (8): e04333.
8. Zakiyah NM, Handoyo T, Kim K-M. (2019). Genetic diversity analysis of indonesian aromatic rice varieties (*Oryza sativa* L.) using RAPD. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 22 (1): 55 - 63.
9. Hoang HL, Naruto F, Daisuke K, Minoru T, Yoichi T. (2003). Isolation of endophytic bacteria from *Solanum* sp. and their antibacterial activity against plant pathogenic bacteria. *Agricultural Bioresource Sciences*, 48 (1-2): 21 - 8.
10. Dao VHT, Do KP, Nguyen HV, Nguyen CM, Thi Tran DT, Thanh Dang TT, *et al.* (2023). Identification and evaluation of the growth promotion of endophytic bacteria on *in vitro* potato plants. *Pak J Biol Sci*, 26 (7): 371 - 9.
11. Masoomi-Aladizgeh F, Jabbari L, Nekouei RK, Aalami A. (2016). A simple and rapid system for DNA and RNA isolation from diverse plants using handmade kit. *Protocol Exchange*. doi: 10.21203/rs.2.1347/v2.
12. Sokal, R.R. and Michener, C.D. (1958) A statistical methods for evaluating relationships. *University of Kansas Science Bulletin*, 38, 1409-1448.
13. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32 (3): 314 - 31.
14. Prevost A, Wilkinson MJ. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98 (1): 107 - 12.
15. Lê Thị Xã, Đỗ Thành Luân, Nguyễn Khởi Nghĩa (2020). Khảo sát khả năng kích thích nảy mầm và sinh trưởng rau muống của một số dòng vi khuẩn cố định đạm và tổng hợp IAA. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Khoa học đất*, 56: 37 - 46.
16. Nguyễn Thị Phong Lan, Võ Thị Thu Ngân, Trần Hà Anh, Võ Thị Dạ Thảo, Trần Thị Kiều, Nguyễn Thị Xuân Mai (2015). Hiệu quả của các chủng vi sinh vật vùng rễ trong phòng trừ bệnh đạo ôn ở điều kiện nhà lưới. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 5 (59): 127 - 36.

17. Baldani VLD, Baldani JJ, Döbereiner J. (2000). Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biology and Fertility of Soils*, 30: 485 - 91.
18. Velazquez E, Rojas M, Lorite MJ, Rivas R, Zurdo-Pineiro JL, Heydrich M, *et al.* (2008). Genetic diversity of endophytic bacteria which could be found in the apoplastic sap of the medullary parenchyma of the stem of healthy sugarcane plants. *J Basic Microbiol*, 48 (2): 118 - 24.
19. Bhadania R, Parkhia A, Gajera H. (2014). Molecular characterization of endophytic bacteria isolated from root of different field crops. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*, 27: 1 - 6.
20. Đào Thị Hồng Vân, Đinh Thị Thu Lê, Đỗ Phương Khanh, Phạm Thị Dinh, Nguyễn Mai Chi, Trần Thị Mai, Trần Đình Thích, Đinh Trường Sơn (2022). Phân tích đa dạng di truyền của một số chủng giống vi khuẩn nội sinh trong rễ cây khoai tây. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Mở Hà Nội*, 95: 56 - 65.

ISOLATION AND EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY OF SOME ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM POTATO USING RAPD AND ISSR MARKERS

Dao Thi Hong Van¹, Nguyen Dac Tien²,

Vuong Thi Thiet², Nguyen Thi Ngoc Anh¹, Dinh Truong Son²

¹ *Institute of Biotechnology and Food Technology, Hanoi Open University*

² *Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture*

Summary

This study successfully isolated and investigated the effects of inoculation of 35 endophytic bacteria isolated from potato roots on the germination of *Brassica integrifolia*, from which 14 isolates were selected for genetic diversity analysis with 15 RAPD and 13 ISSR markers. The two groups of markers have amplified a total of 323 loci, in which the average rate of polymorphic loci reached 97.98% for the RAPD marker and 98.56% for the ISSR marker. 28 markers amplified 1.969 PCR products. The 14 isolated isolates had genetic diversity ranging from 0.34 - 0.96. At the genetic similarity coefficient of 0.57, the 14 microbial varieties were grouped into 3 main groups. It is concluded that the genetic diversity of the 14 isolated isolates is very high. The evaluated isolates can be used to study the effects of the inoculation on the performance of potato plants under *in vitro* conditions as well as in greenhouses or in the field.

Keywords: *Endophytic bacteria, genetic diversity, molecular marker, ISSR, RAPD.*

Người phản biện: PGS.TS. Lê Đức Thảo

Ngày nhận bài: 17/11/2023

Ngày thông qua phản biện: 5/12/2023

Ngày duyệt đăng: 15/12/2023