

- 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 biotreatment. *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 subtilis*, genetic diversity, rep-PCR, Zinc finger sequences, phylogenetic 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<sup>1</sup>, Huỳnh Nguyễn Minh Nghĩa<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thanh Thảo<sup>1</sup>, Dương Hoa Xô<sup>1</sup>, Nguyễn Xuân Dũng<sup>1</sup>

### 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

<sup>1</sup>Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh khảm lá khoai mì là một trong những dịch hại gây tổn thất nghiêm trọng đối với ngành sản xuất khoai mì trên thế giới. Trước đây, bệnh chỉ gây hại chủ yếu ở các nước châu Phi và hai nước thuộc khu vực châu Á, đó là Ấn Độ và Sri Lanka (Alabi *et al.*, 2011). Tuy nhiên, đến tháng 5/2015, bệnh đã được phát hiện ở Campuchia và nhanh chóng lan truyền sang Việt Nam (Cục Bảo vệ thực vật, 2018). Hiện nay, bệnh đã xuất hiện và gây hại trên nhiều vùng trồng khoai mì ở Việt Nam, bao gồm Tây Ninh, Bình Dương, Bà Rịa - Vũng Tàu, Đồng Nai, Đắk Lắk, Bình Phước, Bình Thuận, Ninh Thuận và Thành phố Hồ Chí Minh.

Tác nhân gây bệnh khảm lá khoai mì được xác định là các virus thuộc chi *Begomovirus*, họ *Germiniviridae* (Pita *et al.*, 2001). Hiện tại có 11 loài virus gây bệnh khảm lá khoai mì đã được mô tả trên thế giới, bao gồm 9 loài ở châu Phi (*African cassava mosaic virus* - ACMV, *African cassava mosaic Burkina Faso virus* (ACMBFV), *Cassava mosaic Madagascar virus* (CMMGV), *East African cassava mosaic virus* - EACMV, *East African cassava mosaic Cameroon virus* - EACMCV, *East African cassava mosaic Kenya virus* - EACMKV, *East African cassava mosaic Malawi virus* - EACMMV, *East African cassava mosaic Zanzibar virus* - EACMZV, *South African cassava mosaic* - SACMV) và hai loài ở tiểu lục địa Ấn Độ (*Indian cassava mosaic virus* - ICMV, *Sri Lankan cassava mosaic virus* - SLCMV) (Fongdong, 2017). Ngoài các loài này, một chủng virus mới có tên là EACMV-UG (*East African cassava mosaic virus* - Uganda) cũng đã ghi nhận. Chủng virus này được tạo ra từ sự tái tổ hợp tự nhiên giữa hai loài ACMV và EACMMV và xuất hiện trong đại dịch khảm lá khoai mì xảy ra ở Uganda vào những năm 1990 (Deng *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1997).

Chủng virus hiện đang gây hại trên khoai mì ở Việt Nam đã được xác định là *Sri Lanka Cassava Mosaic Virus*, là một trong hai virus phân bố ở Châu Á (Viện Bảo vệ thực vật, 2018). Bất chấp các nỗ lực được thực hiện nhằm kiểm soát bệnh, đến nay bệnh khảm lá vẫn đang tiếp tục lây lan và gây hại nghiêm trọng trên các vùng trồng khoai mì ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Nghiên cứu phát triển giống khoai mì có khả năng kháng virus được xem là một giải pháp then chốt cho vấn đề kiểm soát bệnh. Giống

kháng có thể được phát triển bằng công nghệ gen (công nghệ RNAi, công nghệ chỉnh sửa gen) hay sử dụng nguồn gen kháng tự nhiên. Trong đó, sử dụng nguồn gen kháng tự nhiên được xem là giải pháp triển vọng nhất.

Đã có nhiều nghiên cứu được thực hiện để tìm ra các chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng CMD trên thế giới. Akano và cộng tác viên (2002) đã xác định được hai chỉ thị liên kết với gen kháng bệnh khảm lá (CMD), bao gồm một chỉ thị SSR (SSRY28) và một chỉ thị AFLP (GY1) nằm ở khoảng cách 9 và 8 cM tương ứng so với locus gen. Sau đó, nhiều chỉ thị khác liên kết với gen kháng bệnh khảm lá cũng đã được phát hiện và sử dụng trong các nghiên cứu khác nhau, bao gồm bốn chỉ thị SSR: NS158, NS169 (Okogbenin *et al.*, 2007), NS198 (Okogbenin *et al.*, 2012), SSRY106 (Lokko *et al.*, 2005); một chỉ thị SCAR: RME-1 (Okogbenin *et al.*, 2007); và hai chỉ thị SNP: S5214 30911 (Rabbi *et al.*, 2014a), S5214 780931 (Rabbi *et al.*, 2014b). Trong đó, các chỉ thị SSRY28, SSRY106, NS158, NS169, NS198 và RME-1 đã được sử dụng trong nghiên cứu phát triển giống khoai mì kháng bệnh khảm lá (Okobening *et al.*, 2012).

Ở Việt Nam, hiện vẫn chưa tìm thấy các công bố liên quan đến chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng CMD, trong khi tình trạng nhiễm bệnh này trên khoai mì vẫn đang diễn ra và nhu cầu phát triển giống khoai mì kháng bệnh đang rất cấp bách. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định các chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng CMD trong các giống khoai mì phục vụ cho việc chọn lọc các giống khoai mì có khả năng kháng bệnh khảm lá ở Việt Nam.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu lá khoai mì kháng bệnh khảm lá được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Nông nghiệp Hưng Lộc.

- Mẫu lá khoai mì thu thập từ các vùng trồng khoai mì ở các tỉnh phía Nam Việt Nam (Bảng 1).

- Trình tự mỗi (chỉ thị) tương ứng cho các chỉ thị phân tử (tham khảo từ các bài báo công bố trên cây khoai mì) sử dụng trong nghiên cứu (Bảng 2) được tổng hợp và cung cấp bởi công ty Integrated ADN Technologies (Mỹ).

**Bảng 1.** Thông tin các mẫu khoai mì thu thập từ các tỉnh phía Nam Việt Nam

STT	Mẫu	Số lượng	Địa điểm
1	ĐL 01 - 37	37	Huyện Ea Hleo, tỉnh Đắk Lắk
2	VT 01 - 13	13	Xã Láng Dài, huyện Đất Đỏ, tỉnh Bà Rịa Vũng Tàu
3	VT 14 - 21	8	Xã Đá Bạc, huyện Châu Đức, tỉnh Bà Rịa Vũng Tàu
4	VT 22- 25	4	Xã Long Tân, huyện Đất Đỏ, tỉnh Bà Rịa Vũng Tàu
5	BT 01 - 04	4	Xã Trà Tân, huyện Đức Linh, tỉnh Bình Thuận
6	BT 05 - 08	4	Xã Đức Tài, huyện Đức Linh, tỉnh Bình Thuận
7	LA 01 - 03	3	Xã Mỹ Lạc, huyện Thủ Thừa, tỉnh Long An
8	Đối chứng kháng bệnh	1	Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Nông nghiệp Hưng Lộc

**Bảng 2.** Trình tự các mối ISSR được sử dụng trong nghiên cứu

Tên chỉ thị	Loại chỉ thị	Trình tự	Sản phẩm (bp)	Nhiệt độ Tm (°C)	Tham khảo
SSRY28	SSR	F:TTGACATGAGTGATATTTTCTTGAG R:GCTGCGTGCAAACTAAAAT	180	55	Akano <i>et al.</i> , 2002
SSRY106	SSR	F:GGAAACTGCTTGCACAAAGA R:CAGCAAGACCATCACCAGTTT	270	58	Lokko <i>et al.</i> , 2005
NS158	SSR	F:GTGCGAAATGGAAATCAATG R:TGAAATAGTGATACATGCAAAAGGA	166	55	Okogbenin <i>et al.</i> , 2007
NS169	SSR	F:GTGCGAAATGGAAATCAATG R:GCCTTCTCAGCATATGGAGC	319	55	Okogbenin <i>et al.</i> , 2007
RME-1	SCAR	F:ATGTTAATGTAATGAAAGAGC R:AGAAGAGGGTAGGAGTTATGT	700, 740	50	Okogbenin <i>et al.</i> , 2007
NS198	SSR	F:TGCAGCATATCAGGCATTTTC R:TGGAAGCATGCATCAAATGT	196	55	Okogbenin <i>et al.</i> , 2012

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Tách chiết ADN

Các mẫu lá khoai mì sau khi thu thập được tách chiết ADN tổng số bằng phương pháp CTAB (Healey *et al.*, 2014). ADN thu được sau tách chiết được kiểm tra độ tinh sạch (đo nồng độ bằng máy quang phổ Nanodrop) và chất lượng (điện di trên gel agarose 1%), sau đó pha loãng đến nồng độ 50 ng/μL và bảo quản ở -20°C để sử dụng cho phản ứng PCR.

### 2.2.2. Thiết lập phản ứng PCR nhận diện chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng

Thực hiện phản ứng PCR với ADN tách chiết từ lá của mẫu khoai mì kháng bệnh khảm lá với 6 chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng (Bảng 2), trong đó mỗi chỉ thị sẽ được sử dụng cho một phản ứng. Phản ứng PCR được thực hiện với thể tích 25 μL bao gồm: 10,5 μL H<sub>2</sub>O; 12,5 μL PCR master mix (DreamTaq ADN polymerase, 2X DreamTaq Green buffer,

0,1 mM mỗi loại (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) và 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 μL mỗi (10 pmol), 1 μL ADN khuôn (50 ng/μL). Chương trình nhiệt được thiết lập với 1 chu kỳ 95°C/10 phút; 35 chu kỳ (95°C/30 giây, Ta/45 giây, 72°C/45 giây); và 1 chu kỳ 72°C/10 phút, trong đó, Ta là nhiệt độ gắn kết cho từng chỉ thị. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose (1,5%), sau đó nhuộm với ethidium bromide (0,4 μg/mL) và quan sát sự xuất hiện của các băng ADN trên máy chụp gel (Geldoc).

### 2.2.3. Kiểm tra sự hiện diện của chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng trong các giống khoai mì thu thập

Kết quả PCR được kiểm tra và phân tích sự hiện diện của chỉ thị liên kết với gen kháng dựa trên sự phù hợp về vị trí và kích thước của các băng ADN thu được so với sản phẩm ADN đã được công bố liên quan đến chỉ thị được nghiên cứu.

### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ 06/2019 - 06/2020 tại Phòng Công nghệ sinh học Thực vật, Trung tâm Công nghệ sinh học thành phố Hồ Chí Minh.

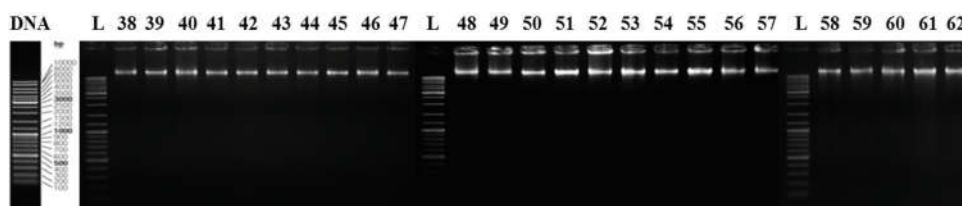
## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Tách chiết ADN

Kết quả tách chiết mẫu lá khoai mì cho thấy ADN tổng số thu được từ các nhóm mẫu có nồng độ trung bình dao động trong khoảng từ 420,0 - 887,88 ng/μL. Tỷ lệ OD<sub>260/280</sub> của các mẫu dao động trong khoảng từ 1,78 đến 1,84 (Bảng 3). ADN có nồng độ tương đối cao, ít bị đứt gãy và lẫn tạp chất (Hình 1). Điều này cho thấy ADN thu được đủ điều kiện để thực hiện phản ứng PCR.

**Bảng 3.** Kết quả tách chiết ADN tổng số từ lá khoai mì

STT	Mẫu	Nồng độ ADN trung bình (ng/μL)	OD <sub>260/280</sub> trung bình
1	ĐL 01 - 37	636,36	1,80
2	VT 01 - 13	573,81	1,80
3	VT14 - 21	661,46	1,81
4	VT22 - 25	808,40	1,79
5	BT 01 - 04	887,88	1,78
6	BT 05 - 08	705,35	1,78
7	LA 01- 03	420,87	1,84
8	Đối chứng kháng bệnh	506,3	1,83

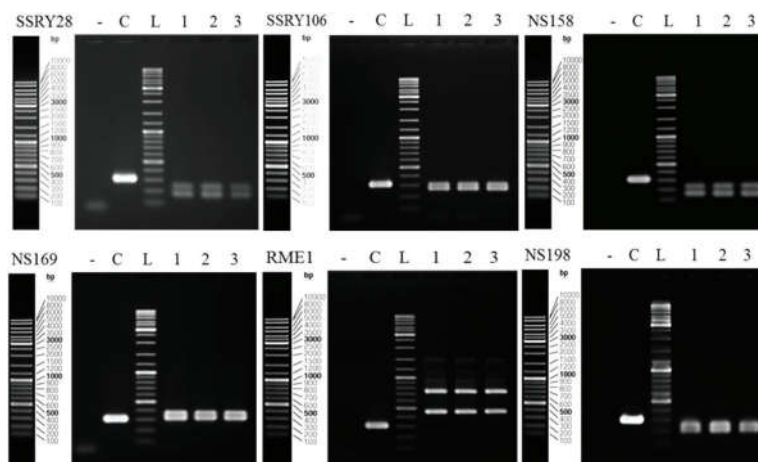


**Hình 1.** Kết quả điện di ADN tổng số tách chiết từ mẫu khoai mì thu thập tại Vũng Tàu  
L: thang ADN chuẩn; 38 - 62: mẫu ADN tách chiết từ lá khoai mì

### 3.2. Thiết lập phản ứng PCR nhận diện chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng

Các phản ứng PCR nhận diện chỉ thị liên kết với gen kháng được thiết lập trên ADN của mẫu khoai mì kháng bệnh đều thu được bằng ADN có kích thước phù hợp với sản phẩm đã được công bố cho các chỉ thị SSRY28 (Akano *et al.*, 2002), SSRY106 (Lokko *et al.*, 2005), NS158, NS169, RME-1 (Okogbenin

*et al.*, 2007) và NS198 (Okogbenin *et al.*, 2012) (Bảng 4, Hình 2). Việc thu được các sản phẩm phù hợp với những kết quả nghiên cứu đã được công bố cho thấy phản ứng PCR được thiết lập trong nghiên cứu này có khả năng nhận diện các chỉ thị liên kết với gen kháng; do đó có thể sử dụng cho mục đích kiểm tra sự hiện diện của các chỉ thị này ở các mẫu khoai mì thu thập.



**Hình 2.** Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại ADN lá khoai mì với các môi tương ứng cho các chỉ thị SSRY28, SSRY106, NS158, NS169, RME-1, NS198.  
(-): chứng âm; (C): môi control; (L): thang ADN; 1,2,3: chứng dương.

**Bảng 4.** Sản phẩm thu được từ phản ứng PCR khuếch đại ADN lá khoai mì với các môi trường ứng cho các chỉ thị

Tên chỉ thị	Sản phẩm thu được (bp)	Sản phẩm đã công bố (bp)
SSRY28	180, 250	180
SSRY106	270, 320	270
NS158	166, 250	166
NS169	319, 400	319
RME-1	450, 740	700, 740
NS198	196, 280	196

### 3.3. Kiểm tra sự hiện diện của các chỉ thị liên kết với gen kháng trong các mẫu khoai mì

Kết quả kiểm tra sự hiện diện của 6 chỉ thị (SSRY28, SSRY106, NS158, NS169, RME1 và NS198) liên kết với gen kháng bệnh khảm lá trên 74 mẫu khoai mì (bao gồm mẫu đối chứng kháng bệnh) cho thấy tất cả các mẫu kiểm tra đều có mang ít nhất 3 chỉ thị. Trong đó, có 21 mẫu (28,77%) mang 6 chỉ thị, 32 mẫu (43,84%) mang 5 chỉ thị, 19 mẫu (26,03%) mang 4 chỉ thị, và 1 mẫu (1,37%) mang 3 chỉ thị (Bảng 5).

**Bảng 5.** Kết quả kiểm tra gen kháng bằng chỉ thị phân tử

Mẫu	Chỉ thị liên kết gen kháng						(*)
	NS158	NS169	NS198	SSRY28	SSRY106	RME-1	
ĐL-01	+	+	+	+	+		5
ĐL-02			+	+	+	+	4
ĐL-03			+	+	+	+	4
ĐL-04			+	+	+	+	4
ĐL-05	+	+	+	+	+		5
ĐL-06			+	+	+	+	4
ĐL-07	+	+	+	+	+		5
ĐL-08			+	+	+	+	4
ĐL-09			+	+	+		3
ĐL-10			+	+	+	+	4
ĐL-11	+	+	+	+	+		5
ĐL-12			+	+	+	+	4
ĐL-13			+	+	+	+	4
ĐL-14			+	+	+	+	4
ĐL-15			+	+	+	+	4
ĐL-16			+	+	+	+	4
ĐL-17	+	+	+	+	+	+	6
ĐL-18	+	+	+	+	+	+	6
ĐL-19	+	+	+	+	+	+	6
ĐL-20	+	+	+	+	+	+	6
ĐL-21	+	+	+	+	+	+	6
ĐL-22	+	+	+	+	+	+	6
ĐL-23	+	+	+	+	+	+	6
ĐL-24	+	+	+	+	+	+	6
ĐL-25	+	+	+	+	+	+	6
ĐL-26	+		+	+	+	+	5
ĐL-27	+	+	+	+	+	+	6
ĐL-28	+		+	+	+	+	4
ĐL-29	+		+	+	+	+	4
ĐL-30			+	+	+	+	4
ĐL-31	+	+	+	+	+	+	6
ĐL-32	+		+	+	+	+	5

**Bảng 5.** Kết quả kiểm tra gen kháng bằng chỉ thị phân tử (Tiếp)

Mẫu	Chỉ thị liên kết gen kháng						(*)
	NS158	NS169	NS198	SSRY28	SSRY106	RME-1	
ĐL-33	+	+	+	+	+	+	6
ĐL-34	+	+	+	+	+	+	6
ĐL-35	+		+	+	+	+	5
ĐL-36	+		+	+	+	+	5
ĐL-37	+		+	+	+	+	5
VT-01	+	+	+	+	+		5
VT-02	+	+	+	+	+		5
VT-03	+	+	+	+	+		5
VT-04	+	+	+	+	+		5
VT-05	+	+	+	+	+		5
VT-06	+	+	+	+	+		5
VT-07	+	+	+	+	+		5
VT-08	+	+	+	+	+		5
VT-09	+	+	+	+	+		5
VT-10	+	+	+	+	+		5
VT-11	+	+	+	+	+		5
VT-12	+	+	+	+	+		5
VT-13	+	+	+	+	+		5
VT-14	+	+	+	+	+		5
VT-15	+	+	+	+	+		5
VT-16	+	+	+	+	+		5
VT-17	+	+	+	+	+		5
VT-18	+	+	+	+	+		5
VT-19	+	+	+	+	+		5
VT-20	+	+	+	+	+	+	6
VT-21	+	+	+	+	+	+	6
VT-22	+	+	+	+	+	+	6
VT-23	+	+	+	+	+	+	6
VT-24	+	+	+	+	+	+	6
VT-25	+	+	+	+	+		5
BT-01		+	+	+	+		4
BT-02		+	+	+	+	+	5
BT-03	+		+	+	+	+	5
BT-04	+		+	+	+	+	5
BT-05		+	+	+	+		4
BT-06		+	+	+	+		4
BT-07		+	+	+	+		4
BT-08		+	+	+	+		4
LA-01	+	+	+	+	+	+	6
LA-02	+	+	+	+	+	+	6
LA-03	+	+	+	+	+	+	6
ĐCKB	+	+	+	+	+	+	6
(**)	54	51	73	73	73	44	

Ghi chú: (+): Có sự xuất hiện băng ADN mục tiêu; (\*): Số chỉ thị có băng ADN phù hợp với mẫu; (\*\*): Số mẫu có băng ADN phù hợp với một chỉ thị.

Kết quả kiểm tra cũng cho thấy tất cả các mẫu khoai mì thu thập đều có sự hiện diện của 3 chỉ thị (NS198, SSR28, SSRY106) tương tự mẫu đối chứng kháng bệnh. Sự khác biệt giữa các mẫu khoai mì thu thập so với mẫu đối chứng kháng bệnh chỉ xuất hiện ở trường hợp của 3 chỉ thị NS158, NS169 và RME-1. Điều này cho thấy bộ 3 chỉ thị NS158, NS169 và RME-1 có vai trò rất quan trọng trong việc xác định khả năng kháng bệnh khảm lá của giống khoai mì. Kết quả này cũng gợi ý về khả năng chỉ cần sử dụng 3 chỉ thị này cho việc nhận diện các giống khoai mì có khả năng kháng bệnh ở Việt Nam.

#### IV. KẾT LUẬN

Đã thiết lập được phản ứng PCR nhận diện được 6 chỉ thị SSRY28, SSRY106, NS158, NS169, RME-1 và NS198 liên kết với gen kháng bệnh khảm lá khoai mì. Kết quả kiểm tra trên 74 mẫu khoai mì cho thấy tất cả các mẫu kiểm tra đều có mang từ 3 đến 6 chỉ thị. Trong đó, 3 chỉ thị (NS158, NS169 và RME-1) có sự hiện diện khác giữa các mẫu khoai mì thu thập so với mẫu đối chứng kháng bệnh. Điều này cho thấy bộ 3 chỉ thị này có vai trò rất quan trọng trong việc xác định khả năng kháng bệnh khảm lá của giống khoai mì.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

**Cục Bảo vệ thực vật**, 2018. Báo cáo tình hình bệnh khảm lá sắn và công tác chỉ đạo phòng chống dịch. Hội nghị Giải pháp phòng, chống bệnh khảm lá khoai mì. *Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*: 1-11.

**Viện Bảo vệ thực vật**, 2018. Một số nghiên cứu về bệnh virus khảm lá sắn và giải pháp phòng trừ. Hội nghị Giải pháp phòng, chống bệnh khảm lá khoai mì. *Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*: 35-61.

**Akano A.O., Dixon A.G.O., Mba C., Barrera E., Fegene M.**, 2002. Genetic mapping of dominant gene conferring resistance to cassava mosaic disease. *Theor Appl Genet*, 105: 521-525.

**Alabi, O.J., Kumar P.L., and Naidu R.A.**, 2011. Cassava mosaic disease: A curse to food security in Sub-Saharan Africa. *APSnet Features*: 1-16.

**Deng D., Otim-Nape W.G., Sangare A., Ogwal S., Beachy R. N. and Fauquet C.M.**, 1997. Presence of a new virus closely related to *East African cassava mosaic geminivirus*, associated with cassava mosaic outbreak in Uganda. *African Journal of Root and Tuber Crops*, 2: 23-28.

**Fondong**, 2017. The search for resistance to *Cassava mosaic geminiviruses*: How much we have accomplished, and what lies ahead. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1-19.

**Healey A., Furtado A., Cooper T., and Henry R.J.**, 2014. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods*, 10: 1-8.

**Lokko Y., Danquah E.Y., Offei S.K., Dixon A.G.O., Gedil M.A.**, 2005. Molecular markers associated with a new source of resistance to the cassava mosaic disease. *Afr. J. Biotechnol*, 4: 873-881.

**Okogbenin E., Egesi C.N., Olasanmi B., Ogundapo O., Kahya S., Hurtado P., Marin J., Akinbo O., Mba C., Gomez H., de Vicente C., Baiyeri S., Uguru M., Ewa F., and Fegene M.**, 2012. Molecular marker analysis and validation of resistance to cassava mosaic disease in elite cassava genotypes in Nigeria. *Crop Sci.*, 52: 2576-2586.

**Okogbenin E., Porto M.C.M., Egesi, C., Mba C., Espinosa E., Santos L.G., Ospina C., Marín J., Barrera E., Gutiérrez J., Ekanayake I., Iglesias C., Fegene M.**, 2007. Marker-assisted introgression of resistance to cassava mosaic disease into Latin American germplasm for the genetic improvement of cassava in Africa. *Crop Sci.*, 47: 1895-1904.

**Pita J.S., Fondong V.N., Sangare A., Otim-Nape G.W., Ogwal S., Fauquet C.M.**, 2001. Recombination, pseudo recombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *J. Gen. Virol*, 82: 655-665.

**Rabbi I.Y., Hamblin, M.T., Gedil M., Kulakow P., Ferguson M., Ikpan A.S., Ly D., Jannink J-L.**, 2014a. Genetic mapping using genotyping-by-sequencing in the clonally-propagated cassava. *Crop Sci.*, 54: 1384-1396.

**Rabbi I.Y., Hamblin M.T., Kumar P.L., Gedil M.A., Ikpan A.S., Jannink J., Kulakow P. A.**, 2014b. High-resolution mapping of resistance to *cassava mosaic geminiviruses* in cassava using genotyping-by-sequencing and its implications for breeding. *Virus Res*, 186: 87-96.

**Zhou X., Liu Y., Calvert L., Munoz C., Otim-Nape G.W., Robinson D.J., Harrison B.D.**, 1997. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *J. Gen. Virol.* 78: 2101-2111.

## Identification of molecular markers linked to mosaic disease-resistant genes in cassava varieties in Southern Vietnam

Nguyen Thi Kim Thoa, Huynh Nguyen Minh Nghia,  
Nguyen Thi Thanh Thao, Duong Hoa Xo, Nguyen Xuan Dung

### Abstract

Cassava mosaic disease (CMD) is currently causing serious damage on cassava in Vietnam. CMD resistant genes have been investigated and applied to develop CMD resistant cassava varieties over the world but have not yet been applied in Vietnam. This study aimed to identify the present of the molecular markers linked to CMD resistant gene (SSRY106, NS158, NS169, NS198 and RME-1) in cassava varieties in Southern Vietnam by using PCR. PCR reaction was established to each marker before applying for identification. The results showed that the PCR reaction was established for identifying the markers. Of the 72 tested samples of cassava varieties, there were 21 samples with six markers, 32 samples with five markers, 19 samples with four markers and one sample with three markers. The tested cassava samples differed from the control (with CMD resistance) in three markers (NS158, NS169 and RME-1) suggesting that those markers may play an important role in CMD resistance of cassava varieties in Vietnam.

**Keywords:** Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), cassava mosaic disease, molecular marker, CMD resistant gene

Ngày nhận bài: 02/02/2021

Ngày phản biện: 15/02/2021

Người phản biện: TS. Trần Danh Sử

Ngày duyệt đăng: 26/02/2021

## PHÂN TÍCH TÍNH BẢO THỦ TRONG CẤU TRÚC VÀ KHAI THÁC DỮ LIỆU BIỂU HIỆN CỦA HỌ GEN MÃ HÓA TIỂU PHẦN YA CỦA NHÂN TỐ PHIÊN MÃ NF-Y Ở CÂY RAU DẼN

Lê Thị Ngọc Quỳnh<sup>1</sup>, Chu Đức Hà<sup>2</sup>

### TÓM TẮT

NF-Y đóng vai trò là nhân tố phiên mã quan trọng trong quá trình sinh lý và phát triển của thực vật. Tuy nhiên, thông tin về tiểu phần YA cấu trúc nên NF-Y ở cây rau dền (*Amaranthus hypochondriacus*) vẫn chưa được làm sáng tỏ. Kết quả đã xác định tổng số 6 thành viên trong họ YA ở *A. hypochondriacus*. Phân tích cấu trúc cho thấy họ YA có kích thước dao động từ 230 đến 337 axit amin, tương ứng với trọng lượng từ 25,3 đến 36,7 kDa. Giá trị điểm đẳng điện của YA ở rau dền nằm trong khoảng từ axit yếu (5,96) đến bazơ (9,67), có ái lực trung bình với nước từ -0,679 đến -0,938 và cư trú trong nhân tế bào. Sơ đồ hình cây cho thấy hầu hết YA có sự tương đồng về cấu trúc vùng bảo thủ, với ba vùng chức năng riêng biệt. Đánh giá mức độ biểu hiện chỉ ra 5 gen *AHYPO\_014525-RA*, *AHYPO\_002745-RA*, *AHYPO\_003114-RA*, *AHYPO\_002483-RA* và *AHYPO\_009600-RA* có biểu hiện mạnh ở cả hoa, hạt trưởng thành và chồi. Các kết quả nghiên cứu góp phần định hướng được ứng viên tiềm năng cho các gen NF-YA trong sinh trưởng và phát triển ở cây rau dền.

**Từ khóa:** Rau dền, họ gen mã hóa tiểu phần YA, nhân tố phiên mã NF-Y, biểu hiện gen

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Yếu tố nhân - Y (Nuclear factor - Y, NF-Y) là một nhóm nhân tố phiên mã quan trọng tham gia điều hòa nhiều quá trình sinh lý và giúp cho cây trồng đáp ứng với các điều kiện bất lợi phi sinh học. Nhóm NF-Y có cấu trúc gồm ba tiểu phần riêng biệt, YA, YB và YC, và được mã hóa bởi họ đa gen. Trong đó, các thành viên trong họ gen YA và YB đã được chứng minh đóng vai trò thiết yếu trong cơ chế đáp ứng bất lợi phi sinh học ở loài thực vật một và hai lá mầm (Zanetti *et al.*, 2017).

Đến nay, nhóm NF-Y đã được xác định và chú giải trên các đối tượng thực vật khác nhau, như MeNF-Y trên sắn (*Manihot esculenta*) (Chu Đức Hà và *ctv.*, 2017), CaNF-Y ở đậu gà (*Cicer arietinum*) (Chu *et al.*, 2018), CsNF-Y trên trà (*Camellia sinensis*) (Wang *et al.*, 2019) và PpNF-Y trên đào (*Prunus persica*) (Li *et al.*, 2019). Tuy nhiên, nghiên cứu về họ NF-Y trên rau dền (*Amaranthus hypochondriacus*), một loại cây rau chứa nhiều hợp chất thứ cấp quan trọng, hàm lượng protein trong hạt cao (Sunil *et al.*, 2014)

<sup>1</sup> Bộ môn Công nghệ Sinh học, Khoa Hóa và Môi trường, Đại học Thủy lợi

<sup>2</sup> Khoa Công nghệ Nông nghiệp, Đại học Công nghệ, Đại học Quốc Gia Hà Nội