



XÁC ĐỊNH MẦM BỆNH GÂY THỐI ĐỒNG TIỀN TRÊN KHOAI LANG TÍM NHẬT TẠI HUYỆN BÌNH TÂN, VĨNH LONG

Trần Thị Bích Thảo, Hồ Nhã Tuấn và Nguyễn Đắc Khoa

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

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 04/03/2017

Ngày nhận bài sửa: 05/07/2017

Ngày duyệt đăng: 31/10/2017

Title:

Identification of the pathogen causing tuber rot of sweet potato in Bình Tân, Vĩnh Long of Vietnam

Từ khóa:

16S rRNA, định danh, khoai lang tím, *Klebsiella variicola*, *rpoB*, thối đồng tiền

Keywords:

16S rRNA, identification, *Klebsiella variicola*, *rpoB*, sweet potato, tuber rot

ABSTRACT

Tuber rot (“thối đồng tiền” in Vietnamese) is currently present in sweet potato fields of Bình Tân, Vĩnh Long of Vietnam. The aim of this study is to identify the pathogen which will serve as a basis to find effective control methods for the disease. A total of 32 bacterial isolates were obtained from 18 diseased samples. These samples were collected from 3 major sweet potato cultivation communes of Bình Tân, Vĩnh Long, i.e. Thành Đông, Thành Trung and Tân Thành. Using the Koch’s postulates, five isolates including BT5, BT14, BT15, BT19 and BT30 showed typical symptoms of the disease as observed under field conditions. Indeed, the yellowish brown lesions were observed which were circular, hollow and necrotic. The pathogen was identified as *Klebsiella variicola* through its morphological and biochemical characteristics combined with sequencing of the 16S rRNA and *rpoB* genes. Analyses of the sequences of these genes helped distinguish the bacterium from other *Klebsiella* sp.

TÓM TẮT

Bệnh thối đồng tiền đang gây hại khoai lang tím Nhật tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long. Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định tên mầm bệnh để làm tiền đề nghiên cứu biện pháp phòng trị hiệu quả bệnh ngoài đồng. Tổng số 32 chủng vi khuẩn đã được phân lập từ 18 mẫu bệnh thu thập ở 3 xã Thành Đông, Thành Trung và Tân Thành (huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long). Sau khi thực hiện quy trình Koch, 5 chủng vi khuẩn BT5, BT14, BT15, BT19, BT30 gây vết bệnh thối đồng tiền giống triệu chứng quan sát ngoài đồng. Vết bệnh có hình tròn, lõm, bị hoại tử trên bề mặt củ và có màu vàng nâu. Mầm bệnh được xác định là vi khuẩn *Klebsiella variicola* thông qua đặc điểm hình thái, sinh hóa và kỹ thuật sinh học phân tử. Việc phân tích trình tự gen 16S rRNA (liên quan đến quá trình phát sinh loài) và gen *rpoB* (có trình tự chuyển biệt cho mỗi loài thuộc chi *Klebsiella*) giúp phân biệt được vi khuẩn *K. variicola* với các loài *Klebsiella* khác, cung cấp đủ cơ sở để xác định tên mầm bệnh.

Trích dẫn: Trần Thị Bích Thảo, Hồ Nhã Tuấn và Nguyễn Đắc Khoa, 2017. Xác định mầm bệnh gây thối đồng tiền trên khoai lang tím Nhật tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 52b: 56-63.

1 GIỚI THIỆU

Khoai lang (*Ipomoea batatas*) là cây lương thực phổ biến đứng thứ bảy trên thế giới (Kays *et al.*,

2005), có sản lượng đứng thứ tư sau lúa, bắp và lúa mì (Ukpabi, 2009; Calvo *et al.*, 2010). Ở Việt Nam, khoai lang là cây lương thực truyền thống đứng thứ ba sau lúa, bắp và đứng thứ hai về giá trị

kinh tế sau khoai tây (Vu *et al.*, 2000). Khoai lang có giá trị dinh dưỡng cao, chứa hàm lượng lớn các chất β -carotene, carbohydrate, protein, vitamin và các chất chống oxy hóa như anthocyanin (Lebot, 2000). Ngoài ra, khoai lang có thời gian sinh trưởng ngắn và khả năng thích ứng rộng nên được trồng khắp mọi miền đất nước. Tại Đồng bằng sông Cửu Long, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long là vùng chuyên canh trồng khoai lớn với các giống khoai như khoai dương ngọc, khoai bí đường, khoai sữa, đặc biệt là khoai lang tím Nhật (Trung tâm xúc tiến thương mại Vĩnh Long, 2015).

Quá trình canh tác khoai gặp nhiều yếu tố bất lợi trong đó có mầm bệnh. Đặc biệt bệnh thối đồng tiền trên khoai lang tím ở huyện Bình Tân trong nhiều năm qua đã gây thiệt hại nghiêm trọng đến chất lượng thương phẩm củ. Bệnh gây hại nặng nhất vào giai đoạn phát triển củ. Tuy nhiên, tác nhân gây bệnh cho đến nay vẫn chưa được xác định. Bên cạnh đó, các kiến thức về mầm bệnh còn hạn chế dẫn đến việc xây dựng các biện pháp phòng trị gặp rất nhiều khó khăn. Do đó, việc xác định mầm bệnh thối đồng tiền trên khoai lang tím Nhật là rất cần thiết, để tìm ra những biện pháp phòng trị bệnh theo hướng sinh học, mang lại hiệu quả cao mà không ảnh hưởng đến môi trường.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thí nghiệm được thực hiện từ tháng 8 năm 2016 đến tháng 12 năm 2016 tại phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử và nhà lưới của Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ, Sinh học Trường Đại học Cần Thơ.

2.1 Thu thập mẫu bệnh thối đồng tiền trên khoai lang tím Nhật

Mẫu bệnh được thu thập tại 3 xã trồng khoai lang tím trọng điểm là Thành Đông, Thành Trung và Tân Thành tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long từ tháng 8 đến tháng 10 năm 2016 ở các ruộng khoai đang thu hoạch. Biểu hiện thối đồng tiền là những vết tròn, lõm bị hoại tử trên bề mặt củ, có màu vàng nâu hoặc màu đồng thau. Mẫu bệnh được gói lại bằng giấy báo và cho vào túi nylon, ghi tên địa điểm, ngày thu mẫu và đem về phòng thí nghiệm để phân lập mầm bệnh.

2.2 Phân lập mầm bệnh

Phương pháp phân lập mầm bệnh được thực hiện dựa theo mô tả của Burgess và *ctv.* (2008). Củ bệnh được rửa cẩn thận dưới vòi nước máy trong 10 phút để loại bỏ đất và bụi bẩn. Sau đó, cắt mẫu bệnh thành từng mảnh nhỏ (3-5 mm) ở phần ranh giữa mô khỏe và mô bệnh. Mẫu cắt được khử trùng bằng cồn ethanol 70% trong 5 giây, rồi rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần và để khô trên giấy thấm vô

trùng. Tác nhân gây bệnh có thể là nấm hoặc vi khuẩn nên mẫu bệnh được tiến hành phân lập trên hai môi trường potato dextrose agar (PDA) (đối với mầm bệnh nấm) và nutrient agar (NA) (đối với mầm bệnh vi khuẩn).

2.2.1 Đối với mầm bệnh nấm

Đặt mẫu cắt lên môi trường PDA tại vị trí giữa đĩa. Thành phần môi trường gồm 250 g khoai tây, 20 g dextrose, 20 g agar và nước cất vừa đủ 1 lít (Shurtleff and Averre, 1997). Sau đó, ủ đĩa ở nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 48 giờ. Khi xuất hiện các tơ nấm xung quanh mẫu bệnh, tiến hành cấy truyền sang môi trường PDA cho đến khi mẫu nấm thuần. Mẫu cấy rỗng sẽ được trữ trong ống thạch nghiêng chứa môi trường PDA ở nhiệt độ 4°C dùng làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm sau.

2.2.2 Đối với mầm bệnh vi khuẩn

Dùng micropipette hút 100 μL nước cất vô trùng nhỏ lên lame đã khử trùng bằng cồn rồi đặt mẫu cắt lên miếng lame và dùng cán que cấy nghiền nhuyễn. Trãi đều 30 μL dịch vi khuẩn trên bề mặt môi trường NA bằng que tam giác đến khi bề mặt môi trường khô hoàn toàn. Thành phần môi trường gồm 5 g peptone, 3 g beef extract, 5 g NaCl, 20 g agar và nước cất vừa đủ 1 lít, pH 6,8 (Shivaji *et al.*, 2006). Sau 48 giờ ủ đĩa ở nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$, các khuẩn lạc rời có hình thái khác nhau (hình dạng, kích thước, độ nổi, dạng bia và màu sắc) được chọn để cấy truyền sang môi trường NA cho đến khi rỗng bằng phương pháp cấy vạch trên bề mặt đĩa thạch. Mẫu cấy rỗng sẽ được trữ trong ống thạch nghiêng chứa môi trường NA ở nhiệt độ 4°C dùng làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm sau.

2.3 Xác định mầm bệnh thối đồng tiền trên khoai lang tím Nhật theo quy trình Koch

Quá trình phân lập mầm bệnh không thu được bất kỳ chủng nấm nào trên cả 2 loại môi trường. Vì thế, tác nhân gây bệnh thối đồng tiền trên khoai lang tím có thể liên quan đến vi khuẩn.

Huyền phù các chủng vi khuẩn được chuẩn bị bằng cách hòa tan khuẩn lạc nuôi cấy trên NA trong 48 giờ ở nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$ với nước cất vô trùng. Huyền phù vi khuẩn được điều chỉnh về mật số 10^8 CFU/mL bằng phương pháp đo độ hấp thụ quang phổ (OD) ở bước sóng 600 nm tương ứng với giá trị 0,13 A.

Phương pháp chủng bệnh nhân tạo được thực hiện dựa theo mô tả của Umunna và Anselem (2014). Củ khoai lang tím Nhật sạch bệnh được thu từ các ruộng khoai đang thu hoạch tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long. Sau đó, củ khoai được rửa dưới vòi nước máy trong 10 phút để loại bỏ đất và bụi

bản. Tiếp theo, bề mặt củ được khử trùng bằng cách ngâm vào cồn 70% trong 2 phút và rửa lại 2 lần bằng nước cất vô trùng. Dùng kim tiêm có đường kính 0,508 mm đã được khử trùng tạo vết thương trên bề mặt củ sâu khoảng 2 - 3 mm. Dùng micropipette bơm 50 μ L huyền phù vi khuẩn vào vị trí đã tạo vết thương. Sau đó, củ được ủ ở nhiệt độ $30 \pm 2^\circ\text{C}$ và theo dõi biểu hiện bệnh trong 21 ngày. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Mẫu đối chứng được xử lý bằng nước cất vô trùng.

Quan sát, ghi nhận và so sánh các vết bệnh biểu hiện trên các củ khoai lang tím Nhật được chủng bệnh với vết bệnh ngoài đồng. Các chủng vi khuẩn gây vết bệnh giống với vết bệnh thu thập ngoài đồng sẽ được tiến hành định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử giải trình tự gen 16S rRNA và *rpoB* kết hợp với khảo sát đặc điểm hình thái và sinh hóa dựa theo hệ thống phân loại Bergey (Holt *et al.*, 1994).

2.4 Định danh mầm bệnh

2.4.1 Định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử

a. Giải trình tự gen 16S rRNA của vi khuẩn

DNA của các chủng vi khuẩn được ly trích dựa theo quy trình được mô tả bởi Sambrook *et al.* (1989). Đoạn gen 16S rRNA được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi tổng 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTC-3') và 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3') (Weisburg *et al.*, 1991). Thể tích và thành phần các chất tham gia trong 25 μ L gồm Buffer 10X (2,5 μ L), dNTPs (0,8 mM), MgCl_2 (2 mM), DMSO 1%, mồi 27F (10 pmol/L), mồi 1492R (10 pmol/L), *Taq* polymerase (1,25 U), DNA (2,5 ng) và H_2O (thể tích vừa đủ). Phản ứng khuếch đại PCR bắt đầu ở 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ (95°C trong 1 phút, 53°C trong 30 giây và 72°C trong 90 giây). Giai đoạn kéo dài ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1,5% với hiệu điện thế 50V trong 30 phút. Nếu kết quả sản phẩm PCR cho băng 1.500 bp thì phần sản phẩm còn lại sẽ được giải trình tự tại Chi nhánh Công ty TNHH-MTV Sinh Hóa Phù Sa (Bình Minh - Vĩnh Long). Trình tự gen 16S rRNA của vi khuẩn được so sánh với các trình tự đã công bố trên ngân hàng dữ liệu GenBank của NCBI bằng công cụ Blastn. Mức độ tương đồng giữa hai trình tự được dùng làm cơ sở để xác định tên mầm bệnh.

b. Giải trình tự gen *rpoB* của vi khuẩn

Đoạn gen *rpoB* được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi VIC3 (5'-GGCGAAATGGCWGAGAACCA -3') và VIC2 (5'-GAGTCTTCGAAGTTGTAACC -3')

(Diancourt *et al.*, 2005). Thể tích và thành phần các chất tham gia trong 50 μ L gồm Buffer 5X, dNTPs (10 mM), MgCl_2 (25 mM), mồi VIC3 (50 μ M), mồi VIC2 (50 μ M), *Taq* polymerase (5U/ μ L), DNA, glycerol 5% và H_2O (thể tích vừa đủ). Phản ứng khuếch đại PCR bắt đầu ở 94°C trong 5 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ (94°C trong 30 giây, 50°C trong 40 giây và 72°C trong 60 giây). Giai đoạn kéo dài ở 72°C trong 5 phút (He *et al.*, 2016). Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1,5% với hiệu điện thế 50V trong 30 phút. Nếu kết quả sản phẩm PCR cho băng 1.000 bp thì phần sản phẩm còn lại sẽ được giải trình tự tại Chi nhánh Công ty TNHH-MTV Sinh Hóa Phù Sa (Bình Minh - Vĩnh Long). Trình tự gen *rpoB* của vi khuẩn được sử dụng để xây dựng cây phả hệ theo phương pháp Neighbor joining sử dụng phép toán Jukes-Cantor model với độ lặp lại 2.000 lần bằng phần mềm MEGA 6.06 (He *et al.*, 2016).

2.4.2 Khảo sát đặc điểm hình thái, sinh hóa

Các khảo sát sinh hóa cần thiết để khẳng định kết quả định danh gồm nhuộm Gram, khảo sát khả năng di động, khả năng lên men các loại đường D-adonitol, L-arabinose và D-glucose. Phương pháp nhuộm Gram được thực hiện dựa theo mô tả của Benson (2002). Khảo sát khả năng di động được thực hiện trong môi trường NA (0,3% agar) theo mô tả của Trüper và Schleifer (2006). Khảo sát khả năng lên men các loại đường được thực hiện bằng cách nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường gồm 10 g peptone, 5 g NaCl, 1 g beef extract, 0,018 g bromothymol blue, nước cất vừa đủ 1 L, pH 7,1 và 1 g đường cần khảo sát (MacFaddin, 2000).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thu thập và phân lập mầm bệnh thối đồng tiền trên khoai lang tím Nhật

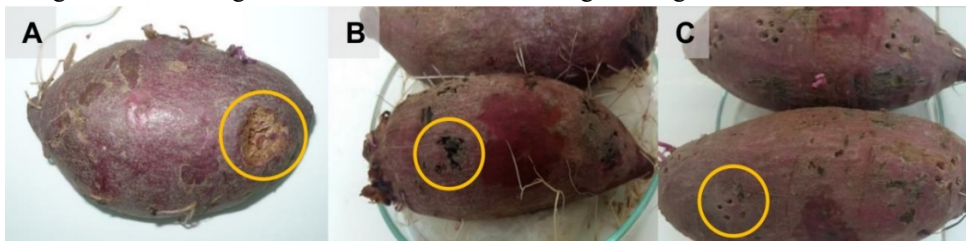
Tổng số 32 chủng vi khuẩn được phân lập từ 18 mẫu bệnh thối đồng tiền thu thập tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long (14 chủng từ xã Tân Thành, 10 chủng từ xã Thành Trung và 8 chủng từ xã Thành Đông). Số lượng các chủng vi khuẩn có khuẩn lạc màu vàng và trắng là chủ yếu. Các khuẩn lạc hình tròn, bề mặt ướt và có màu trắng đục chiếm tỷ lệ nhiều nhất (50%) và phân bố đều khắp ba xã nên có khả năng đây là những chủng vi khuẩn gây bệnh.

3.2 Quy trình Koch

Để thực hiện quy trình Koch, các chủng vi khuẩn được chủng bệnh nhân tạo trên củ khoai lang tím Nhật trong điều kiện phòng thí nghiệm dựa theo phương pháp của Umunna và Anselem (2014). Sau khi ủ ở nhiệt độ $30 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 21 ngày, 9 chủng trong 32 chủng vi khuẩn có biểu

hiện gây thối củ. Tuy nhiên, 4 chủng có vết bệnh trên bề mặt củ không giống với triệu chứng điển hình của bệnh thối đồng tiền. Đây có thể là các chủng vi khuẩn cơ hội, sống hoại sinh xâm nhập và phát triển cùng với mầm bệnh gây thối đồng tiền. Trong 5 chủng còn lại, 2 chủng BT19 và BT30 cho

vết bệnh giống hoàn toàn (vết lõm tại vị trí tiêm và lan ra tạo thành những vết gần tròn, màu vàng nâu) và 3 chủng BT5, BT14 và BT15 cho vết bệnh có biểu hiện gần giống (vết lõm ít lan rộng và màu sắc vết bệnh sậm hơn) (Hình 1) với vết bệnh thối đồng tiền ngoài đồng.



Hình 1: Vết bệnh do hai chủng BT19 và BT14 gây ra khi chủng bệnh nhân tạo trong điều kiện phòng thí nghiệm sau 3 tuần

(A) vết bệnh do chủng BT19 gây ra; (B) vết bệnh do BT14 gây ra; (C) mẫu đối chứng

Sự khác biệt giữa triệu chứng bệnh trong điều kiện phòng thí nghiệm và ngoài đồng ở ba chủng BT5, BT14 và BT15 có thể do độc tính của ba chủng này so với hai chủng BT19 và BT30 dễ chịu tác động dưới sự thay đổi của điều kiện môi trường. Ngoài ra, sự khác nhau về thành phần dinh dưỡng trong khoai lang tím khi đang trong giai đoạn tạo củ và lúc trưởng thành cũng ảnh hưởng đến sự biểu hiện bệnh của các chủng vi khuẩn. Vì

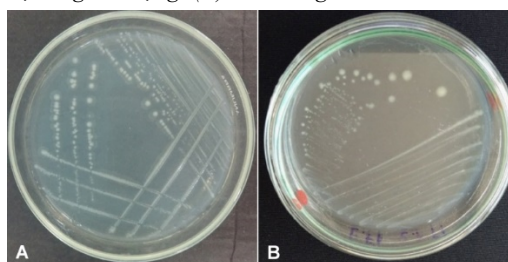
thế, cả ba chủng BT5, BT14 và BT15 được tiếp tục khảo sát khả năng gây bệnh ở điều kiện nhà lưới để kiểm tra khả năng gây bệnh của ba chủng này. Kết quả chủng bệnh nhân tạo trong điều kiện nhà lưới cho thấy cả ba chủng BT5, BT14 và BT15 cho vết bệnh giống với bệnh thối đồng tiền ngoài đồng (các vết lõm vào tại vị trí tiêm và lan ra tạo thành những vết gần tròn, bên trong vết bệnh có màu vàng nâu đặc trưng) (Hình 2).



Hình 2: Vết bệnh do chủng BT14 gây ra ở nhà lưới sau 3 tuần chủng bệnh và vết bệnh ngoài ruộng

(A) vết bệnh do chủng BT14 gây ra; (B) vết bệnh ngoài ruộng; (C) đối chứng

Cả 5 chủng này được tiến hành tái phân lập từ mẫu củ khoai đã được chủng bệnh. Kết quả quan sát khuẩn lạc tròn, bề mặt trơn ướt, nổi và có màu trắng đục đặc trưng trên môi trường NA (Hình 3), hoàn toàn giống với khuẩn lạc của vi khuẩn đã chủng bệnh ban đầu trong quy trình Koch, dễ dàng phân biệt với các chủng vi khuẩn tạp nhiễm trên mẫu bệnh trong quá trình tái phân lập. Như vậy, sau khi thực hiện quy trình Koch trong điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới, 5 chủng vi khuẩn BT19, BT30, BT5, BT14 và BT15 được xác định là tác nhân gây bệnh thối đồng tiền trên khoai lang tím Nhật tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long. Chúng phân bố ở cả 3 địa điểm thu mẫu bệnh, cụ thể 2 chủng BT19 và BT30 từ xã Tân Thành, chủng BT5 từ xã Thành Đông và 2 chủng BT14 và BT15 từ xã Thành Trung. Chủng vi khuẩn BT14 được chọn đại diện để thực hiện định danh.



Hình 3: Hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn BT14

Được phân lập từ mẫu bệnh thối đồng tiền thu thập tại xã Thành Trung, huyện Bình Tân, Vĩnh Long (A) và khi được tái phân lập (B) trên môi trường dinh dưỡng agar từ mẫu củ khoai lang tím bệnh thối đồng tiền

3.3 Định danh vi khuẩn gây bệnh thối đồng tiền

Tác nhân gây bệnh thối đồng tiền được định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử (giải trình tự

gen 16S rRNA). DNA của chủng vi khuẩn BT14 được ly trích và khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi tổng 27F/1492R (Weisburg *et al.*, 1991). Sản phẩm PCR cho băng rõ và không có sản phẩm phụ khi điện di trên gel agarose 1,5%. Kích thước sản phẩm khoảng 1.500 bp phù hợp kết quả nghiên cứu của Weisburg *et al.* (1991) và cho thấy chất lượng sản phẩm PCR đạt yêu cầu.

Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của chủng BT14 có độ dài 1.111 bp. Sau khi so sánh với các trình tự trên cơ sở dữ liệu GenBank của NCBI bằng công cụ Blastn, trình tự gen 16S rRNA của hai loài vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* và *K. variicola* có độ tương đồng cao nhất (98%) với trình tự gen 16S rRNA của chủng BT14 (Hình 4).

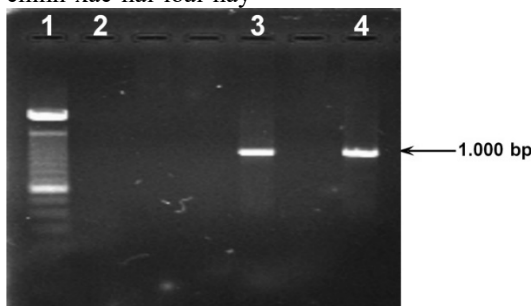
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Uncultured <i>Klebsiella</i> sp. clone L04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1755	1755	91%	0.0	98%	GU938596.1
<i>Klebsiella</i> sp. strain SZ166 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	91%	0.0	98%	KU986703.1
<i>Klebsiella variicola</i> strain RCB1013 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	91%	0.0	98%	KT261225.1
<i>Klebsiella variicola</i> strain ICBR183 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	91%	0.0	98%	KR558704.1
<i>Klebsiella</i> sp. H1(2014) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	91%	0.0	98%	KJ195333.1
<i>Klebsiella variicola</i> strain CPB S30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	91%	0.0	98%	KF770986.1
<i>Klebsiella</i> sp. B-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	91%	0.0	98%	KF411348.1
<i>Klebsiella variicola</i> strain XF16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	91%	0.0	98%	KC853308.1
<i>Klebsiella variicola</i> strain XF13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	91%	0.0	98%	KC853306.1
<i>Klebsiella variicola</i> strain JM12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	91%	0.0	98%	KC853294.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain K5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1748	1748	91%	0.0	98%	KX346257.1
<i>Klebsiella variicola</i> strain DSM 15958, complete genome	1748	13884	91%	0.0	98%	CP010523.2

Hình 4: Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng BT14 trên cơ sở dữ liệu GenBank của NCBI bằng công cụ Blastn (ngày 20/11/2016)

Trước đây, hai loài *K. pneumoniae* và *K. variicola* có thể được phân biệt bằng khả năng lên men đường D-adonitol. Trong đó, *K. pneumoniae* có khả năng lên men đường D-adonitol còn *K. variicola* thì không có khả năng này (Rosenblueth *et al.*, 2004). Tuy nhiên, trong nghiên cứu của He *et al.* (2016), chỉ có phương pháp phân tích cây phả hệ gen *rpoB* mới phân biệt được hai loài này. Gen *rpoB* mã hóa cho tiểu đơn vị β -RNA polymerase được sử dụng như một công cụ định danh vi khuẩn và phân tích cây phả hệ (Drancourt and Raoult, 2005). Do đó, để phân biệt chính xác hai loài này

cần thực hiện kết hợp khảo sát sinh hóa khả năng lên men đường D-adonitol với phân tích cây phả hệ gen *rpoB*.

DNA của chủng BT14 được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi VIC2 và VIC3 (Diancourt *et al.*, 2005). Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% với hiệu điện thế 50V cho băng rõ và không có sản phẩm phụ. Kích thước sản phẩm khoảng 1.000 bp (Hình 5) phù hợp kết quả nghiên cứu của Diancourt *et al.* (2005) và cho thấy chất lượng sản phẩm PCR đạt yêu cầu.



Hình 5: Kết quả điện di sản phẩm PCR của chủng BT14 bằng cặp mồi VIC3 và VIC2 (Diancourt *et al.*, 2005) trên gel agarose 1,5%

Ký hiệu sản phẩm PCR ở mỗi giếng (1) Thang chuẩn 100 bp+; (2) nước cất không chứa DNA; (3) và (4) chủng BT14

Kết quả giải trình tự gen *rpoB* của chủng BT14 được sử dụng để xây dựng cây phả hệ theo phương pháp Neighbor joining sử dụng phép toán Jukes-Cantor model với độ lặp lại 2.000 lần bằng phần

mềm MEGA 6.06. Các trình tự gen *rpoB* tham khảo từ nghiên cứu của He *et al.* (2016) được lấy từ cơ sở dữ liệu Genbank của NCBI (Hình 6). Trình tự gen *rpoB* của chủng *Agrobacterium*

tumefaciens NCIMB 4034 (EU812066.1) được sử dụng làm nhóm đối chứng.

Kết quả phân tích cây phả hệ dựa trên gen *rpoB* của chủng BT14 và các chủng thuộc hai loài *K. pneumoniae* và *K. variicola* cho thấy các chủng

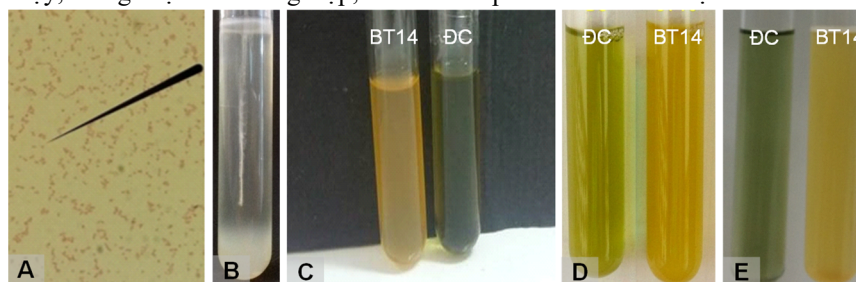
này được chia làm 2 nhóm lớn khác biệt rõ rệt với chỉ số bootstrap là 100%. Nhóm 1 gồm các chủng vi khuẩn thuộc loài *K. pneumoniae*, nhóm 2 gồm các chủng thuộc loài *K. variicola* và chủng BT14. Vì vậy, chủng BT14 là loài *Klebsiella variicola*.



Hình 6: Cây phả hệ được xây dựng dựa trên trình tự gen *rpoB* của chủng BT14 và các chủng thuộc hai loài *Klebsiella pneumoniae* và *K. variicola* theo phương pháp Neighbor joining sử dụng phép toán Jukes-Cantor model với độ lặp lại 2.000 lần bằng phần mềm MEGA 6.06. Mã số của các chủng từ cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI) được ghi trong ngoặc đơn

Theo Rosenblueth *et al.* (2004), *K. variicola* không có khả năng lên men đường D-adonitol. Tuy nhiên, kết quả khảo sát khả năng lên men đường D-adonitol với chất chỉ thị màu bromothymol blue sau 24 giờ nuôi cấy chủng BT14 cho thấy môi trường chuyển từ xanh lá sang vàng chứng tỏ chủng này sử dụng đường D-adonitol sinh ra acid làm giảm pH môi trường (Hình 7C). Bên cạnh đó, trong nhiều nghiên cứu cho thấy một số loài *K. pneumoniae* không có khả năng lên men đường D-adonitol và một số loài *K. variicola* lại có khả năng này (Brisse *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2006; Winn *et al.*, 2006). Vì vậy, trong một số trường hợp, nếu

chỉ dựa vào khả năng lên men đường D-adonitol thì có thể dẫn đến việc xác định nhầm lẫn tên giữa vi khuẩn *K. pneumoniae* và *K. variicola*. Một số chủng thuộc loài *K. pneumoniae* có khả năng gây bệnh trên người, dẫn đến những lo ngại không đáng có (Liam *et al.*, 2001; Paganin *et al.*, 2004). Do đó, việc phân biệt hai vi khuẩn *K. pneumoniae* và *K. variicola* cần cơ sở vững chắc trước khi kết luận. Trong trường hợp này, khi đã đi sâu phân tích đến trình tự gen 16S rRNA (liên quan đến quá trình phát sinh loài) và gen *rpoB* (có trình tự chuyên biệt cho mỗi loài thuộc chi *Klebsiella*) thì có thể cung cấp đủ cơ sở để xác định tên mầm bệnh.



Hình 7: Hình thái và đặc tính sinh hóa của chủng BT14

(A) Phản ứng nhuộm Gram và hình thái của chủng BT14 dưới kính hiển vi quang học (1.000 X); (B) Chủng BT14 không có khả năng di động chỉ phát triển xung quanh đường cấy trong môi trường dinh dưỡng 0,3% agar sau 48 giờ; Phản ứng dương tính (làm đổi màu môi trường từ xanh lá cây sang vàng) của chủng BT14 trong khảo sát lên men đường D-adonitol (C); D-glucose (D); L-arabinose (E) sau 48 giờ nuôi cấy

Trong các phương pháp định danh vi khuẩn hiện nay, giải trình tự gen 16S rRNA là phương

pháp được sử dụng phổ biến do gen này hiện diện ở hầu hết các vi khuẩn, có chức năng không thay

đổi theo thời gian nên được sử dụng làm thước đo của sự tiến hóa. Tuy nhiên, quá trình định danh vi khuẩn dựa vào độ tương đồng trình tự gen 16S rRNA chỉ cho kết quả định danh chính xác đến mức độ trên loài, như trường hợp định danh chủng vi khuẩn CT-78 đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh cháy bìa lá lúa. Trình tự gen 16S rRNA của chủng CT-78 có độ tương đồng với loài *Serratia nematodiphila* thấp hơn so với loài *S. marcescens* nhưng khảo sát đặc điểm sinh lý và sinh hóa cho thấy CT-78 là loài *S. nematodiphila* (Khoa *et al.*, 2016). Vì thế, giải trình tự gen 16S rRNA chỉ là bước đầu để định danh vi khuẩn, giúp quá trình định danh được rút ngắn và ít tốn công nhưng cần phải kết hợp với khảo sát đặc điểm hình thái và sinh hóa để có kết quả định danh chính xác.

Trong nghiên cứu này, trình tự gen 16S rRNA chủng BT14 có độ tương đồng 98% với trình tự gen 16S rRNA của 2 loài vi khuẩn *K. pneumoniae* và *K. variicola* và chỉ có thể phân biệt thông qua phương pháp phân tích cây phả hệ gen *rpoB* (He *et al.*, 2016). Bên cạnh đó, nhằm thêm phần khẳng định kết quả định danh mầm bệnh, khảo sát sinh hóa đặc trưng và cơ bản của chi *Klebsiella* đã được thực hiện như nhuộm Gram, kiểm tra khả năng di động, khả năng lên men đường L-arabinose và D-glucose cho thấy chủng vi khuẩn BT14 là vi khuẩn Gram âm, hình que, không có khả năng di động và có khả năng lên men đường L-arabinose và D-glucose (Hình 7A-B, 7D-E).

Klebsiella variicola được mô tả là một loài mới được tách ra từ *K. pneumoniae* (Rosenblueth *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2006; He *et al.*, 2016). Giống như các loài khác của chi *Klebsiella*, *K. variicola* là vi khuẩn Gram âm, hình que, không di động, thuộc họ Enterobacteriaceae (Janda and Abbott, 2006; Abbott, 2007). *K. variicola* chủ yếu được tìm thấy trong thực vật như chuối, gạo, mía và ngô (Rosenblueth *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2006). Chúng có khả năng cố định đạm (Rosenblueth *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2015). Tuy nhiên, trong một nghiên cứu gần đây, *K. variicola* đã được báo cáo là mầm bệnh gây thối mềm trên chuối ở Trung Quốc (Fan *et al.*, 2016). Vì vậy, khi sử dụng loài *K. variicola* để cố định đạm cho cây trồng cần phải nghiên cứu và tìm hiểu về khả năng gây bệnh của loài này trước khi ứng dụng vào thực tiễn sản xuất.

4 KẾT LUẬN

Từ 18 mẫu bệnh thối đồng tiền trên khoai lang tím Nhật thu thập ở huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long, 32 chủng vi khuẩn đã được phân lập. Trong đó, 2 chủng BT19 và BT30 cho triệu chứng điển hình và 3 chủng BT5, BT14 và BT15 cho triệu

chứng không điển hình của bệnh thối đồng tiền khi chủng bệnh trong điều kiện phòng thí nghiệm để thực hiện quy trình Koch. Trong điều kiện nhà lưới, 3 chủng BT5, BT14 và BT15 đều cho các vết bệnh giống với triệu chứng thối đồng tiền ngoài ruộng. Kết quả này cho thấy cả 5 chủng trên đều được xác định là tác nhân gây bệnh thối đồng tiền. Mầm bệnh được xác định là vi khuẩn *Klebsiella variicola* bằng kỹ thuật sinh học phân tử (giải trình tự gen 16S rRNA và *rpoB*) kết hợp khảo sát đặc điểm hình thái và sinh hóa.

Kết quả này tạo tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo để phòng trị sinh học bệnh thối đồng tiền trên khoai lang tím Nhật một cách hiệu quả và bền vững, giúp nâng cao năng suất và chất lượng khoai lang tím Nhật, góp phần nâng cao thu nhập và chất lượng cuộc sống của nông dân huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abbott, S.L., 2007. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Plesiomonas*, and other Enterobacteriaceae. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Jørgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*, 9th edition. ASM Press. Washington, DC, USA, pp. 698-711.
- Alves, M.S., Dias, R.C., de Castro, A.C., Riley, L.W., Moreira, B.M., 2006. Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(10): 3640-3646.
- Benson, H.J., 2002. *Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology*, 8th edition. McGraw-Hill. Boston, MA, USA, 478 pages.
- Brisse, S., van Himbergen, T., Kusters, K., Verhoef, J., 2004. Development of a rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. *Clinical Microbiology and Infection*. 10(10): 942-945.
- Burgess, L.W., Knight, T.E., Tesoriero, L., Phan, H.T., 2008. *Diagnostic manual for plant diseases in Vietnam*. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia, 210 pages.
- Calvo, P., Ormeño-Orrillo, E., Martinez-Romero, E., Zúñiga, D., 2010. Characterisation of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from Andean soils of Peru and their potential PGPR characteristics. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41(4): 899-906.
- Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P.A.D., Brisse, S., 2005. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(8): 4178-4182.
- Drancourt, M., Raoult, D., 2005. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(9): 4311-4315.

- Fan, H.C., Zeng, L., Yang, P.W., Guo, Z.X., Bai, T.T., 2016. First report of banana soft rot caused by *Klebsiella variicola* in China. *Plant Disease*. 100(2): 517.
- He, Y., Guo, X., Xiang, S., Li, J., Li, X., Xiang, H., He, J., Chen, D., Chen, J., 2016. Comparative analyses of phenotypic methods and 16S rRNA, *khe*, *rpoB* genes sequencing for identification of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Microbiology*. 109(7): 1029-1040.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.T., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins. Baltimore, MD, USA, 787 pages.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2006. The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. In: Janda, J.M., Abbott, S.L. (Eds.). *The Enterobacteria*, 2nd edition. ASM Press. Washington, DC, USA, pp. 115-129.
- Kays, S.J., Wang, Y., McLaurin, W.J., 2005. Chemical and geographical assessment of the sweetness of the cultivated sweetpotato clones of the world. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 130(4): 591-597.
- Khoa, N.Đ., Giau, N.Đ.N., Tuan, T.Q., 2016. Effects of *Serratia nematodiphila* CT-78 on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control*. 103: 1-10.
- Lebot, V., 2000. Sweet potato. In: Bradshaw, J.E. (Eds.). *Root and Tuber Crops. Handbook of Plant Breeding*. Springer. New York, NY, USA, pp. 95-127.
- Liam, C.K., Lim, K.H., Wong, C.M., 2001. Community-acquired pneumonia in patients requiring hospitalization. *Respirology*. 6(3): 259-264.
- Lin, L., Wei, C., Chen, M., Wang, H., Li, Y., Li, Y., Yang, L., An, Q., 2015. Complete genome sequence of endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E. *Standards in Genomic Sciences*. 10: 1-22.
- MacFaddin, J.F., 2000. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, 3rd edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA, USA, 912 pages.
- Paganin, F., Lilienthal, F., Bourdin, A., Lugagne, N., Tixier, F., Genin, R., Yvin, J.L., 2004. Severe community-acquired pneumonia: assessment of microbial aetiology as mortality factor. *European Respiratory Journal*. 24(5): 779-785.
- Rosenblueth, M., Martínez, L., Silva, J., Martínez-Romero, E., 2004. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Systematic and Applied Microbiology*. 27(1): 27-35.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, NY, USA, 1626 pages.
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G.S.N., Dutt, C.B.S., Wainwright, M., Narlikar, J.V., Bhargava, P.M., 2006. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 1465-1473.
- Shurtleff, M.C., Averre III, C.W., 1997. *The Plant Disease Clinic and Field Diagnosis of Abiotic Diseases*. APS Press. St Paul, MN, USA, 245 pages.
- Trần Kim Thoa, 2015. *Phân lập, định danh và khảo sát khả năng phòng trừ bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn đối kháng trong đất hai tỉnh Tiền Giang và Sóc Trăng. Luận văn Thạc sĩ. Trường Đại học Cần Thơ.*
- Trung tâm xúc tiến thương mại Vĩnh Long, 2015. Khoai lang Bình Tân, ngày truy cập 9/6/2016. Địa chỉ: <http://xttm.vinhlong.gov.vn/web/guest/khoai-lang-binh-tan>.
- Trüper, H.G., Schleifer, K.H., 2006. Prokaryote characterization and identification. In: Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.). *The Prokaryotes*. Springer. New York, NY, USA, pp. 58-79.
- Ukpabi, U.J., 2009. Root and tubers in Nigeria as sources of industrial raw materials. In: Onwualu, P.A., Obasi, S.C., Ukpabi, U.J. (Eds.). *Nigeria Agro Raw Materials Development Some Industrial Crops and Salient Issues*. RMDRC Publications. Abuja, Nigeria, pp. 1-19.
- Umunna, O.E., Anselem, A.B., 2014. Control of postharvest rot of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) tuber in vitro and in vivo. *Journal of Agriculture and Sustainability*. 6(1): 50-68.
- Vu, D.H., Loc, D.T., Ho, T.V., Kim, H., 2000. Sweet potato in the postrice areas of Vietnam. In: Rasco Jr., E.T., Amante, V.d.R. (Eds.). *Sweet Potato in Tropical Asia*. Philippine Council for Agriculture, Forestry, and Natural Resources Research and Development. Los Baños, Laguna, The Philippines, pp. 189-220.
- Wei, C.Y., Lin, L., Luo, L.J., Xing, Y.X., Hu, C.J., Yang, L.T., Li, Y.R., An, Q., 2014. Endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E promotes sugarcane growth. *Biology and Fertility of Soils*. 50(4): 657-666.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173(2): 697-703.
- Winn, W.C., Allen, S.D., Janda, W.M., Koneman, E.W., Procop, G., Schreckenberger, P.C., Woods, G.L., 2006. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA, USA, 1736 pages.