

PHÂN TÍCH ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ CHŨNG GIỐNG VI KHUẨN NỘI SINH TRONG RỄ CÂY KHOAI TÂY

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF SOME ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM POTATO ROOTS

*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†*

Ngày tòa soạn nhận được bài báo: 03/03/2022

Ngày nhận kết quả phản biện đánh giá: 09/2022

Ngày bài báo được duyệt đăng: 29/09/2022

Tóm tắt: 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh trong rễ cây khoai tây đã được đánh giá đa dạng di truyền bằng 10 chỉ thị RAPD và 6 chỉ thị ISSR. Hai chỉ thị phát hiện được tổng số 159 locus (107 locus với chỉ thị RAPD và 52 locus với chỉ thị ISSR) với tỷ lệ locus đa hình khá cao (trung bình 85,0% đối với chỉ thị RAPD và 86,2% đối với chỉ thị ISSR). Trung bình chỉ số PIC của 10 môi RAPD là 0,35 và của 6 môi ISSR là 0,38 chứng tỏ khả năng phát hiện đa hình các chỉ thị là cao. Hệ số tương đồng của 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh dao động từ 0,36-0,76. Trong đó, chủng giống V_2 và V_12 có hệ số tương đồng thấp nhất (0,36), và chủng giống V_2 và V_6 có hệ số tương đồng cao nhất (0,76). Ở hệ số tương đồng di truyền trung bình là 0,573, 14 chủng giống vi khuẩn được phân thành 4 nhánh di truyền chính. Kết quả trên chứng tỏ 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh nghiên cứu có sự đa dạng di truyền rất lớn.

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

Abstract: The genetic diversity of the fourteen endophytic bacteria isolates from potato roots was evaluated by 10 RAPD and 6 ISSR markers. Both markers detected a total of 159 loci (107 loci with RAPD and 52 loci with ISSR), among them, 85.0% amplified loci by RAPD and 86.2% amplified loci with ISSR were polymorphic. With an average PIC value of 0.35 for RAPD and 0.38 for ISSR, the ability of detecting the genetic diversity of RAPD and ISSR markers was high. The genetic diversity of 14 isolates varied from 0.36 – 0.76. Among isolates, V_2 and V_12 had the lowest genetic similarity (0.36) while V_2 and V_6 showed the highest genetic similarity (0.76). A dendrogram obtained by using UPGMA cluster analysis was generated by NTSYS 2.1. With the genetic similarity at 0.573, 14 isolates were separated into 4 distinct clusters. These results indicate the fourteen endophytic bacteria are diverse in genetics.

Keywords: endophytic bacteria, genetic diversity, molecular marker, ISSR, RAPD,

* Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm – Trường Đại học Mở Hà Nội

† Khoa Công nghệ sinh học - Học viện Nông nghiệp Việt Nam

I. Đặt vấn đề

Khoai tây (*Solanum tuberosum*), thuộc họ Cà (*Solanaceae*) là cây trồng lấy củ ngắn ngày được trồng rất phổ biến trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Với giá trị dinh dưỡng và kinh tế cao, khoai tây là một trong bốn cây lương thực quan trọng xếp sau lúa, lúa mì, ngô.

Việc trồng khoai tây ở Việt Nam đang được chú trọng cả về sản lượng và chất lượng cũng như chủng loại để phục vụ nhu cầu ăn tươi cũng như chế biến (Nguyễn Xuân Trường và cộng sự., 2019). Chính vì vậy, người ta tiến hành nhiều nghiên cứu nhằm tăng khả năng sinh trưởng, phát triển cho cây khoai tây trong đó có việc sử dụng các vi sinh vật có ích cho cây trồng. Trong hệ rễ của thực vật nói chung và cây khoai tây nói riêng có nhiều vi sinh vật nội sinh và chính những vi sinh vật này góp phần quan trọng vào sự sinh trưởng và phát triển của cây. Để tìm hiểu và đánh giá được sự đa dạng của hệ vi sinh vật nội sinh trong cây trồng người ta thường sử dụng các chỉ thị phân tử.

Hiện nay, các chỉ thị phân tử như RAPD, ISSR, SSR... được sử dụng khá phổ biến để đánh giá đa dạng di truyền giúp bảo tồn và phát triển nguồn gen (De Souza et al., 2017, Liu và cộng sự, 2017). Chỉ thị phân tử RAPD và ISSR được sử dụng rộng rãi trong đánh giá đa dạng di truyền bởi các ưu điểm như: nhanh chóng, đơn giản, hiệu quả, yêu cầu lượng DNA nhỏ, tính đa hình cao. Như vậy, việc nghiên cứu, đánh giá sự đa dạng di truyền của hệ vi sinh vật nội sinh trong cây khoai tây sẽ góp phần đánh giá được nguồn gen vi sinh vật rất có tiềm năng ứng dụng này. Nghiên cứu này sẽ là cơ sở phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo về tác động của vi sinh vật nội sinh đối với cây khoai tây như kích thích sinh trưởng, cố định đạm,

phân giải lân và con đường chuyển hóa các hợp chất thứ cấp.

II. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu

Các mẫu vi khuẩn nội sinh được tách từ rễ của các cây khoai tây Solara được trồng tại Trung tâm bảo tồn và phát triển nguồn gen cây trồng – Học viện Nông nghiệp Việt Nam, Trâu Quỳ, Gia Lâm, Hà Nội. DNA của các chủng giống vi khuẩn được tách chiết theo quy trình của Masoomi-Aladizgeh và cộng sự có cải tiến (Masoomi-Aladizgeh et al., 2016). Hàm lượng và độ nguyên vẹn của các mẫu DNA sau khi tách chiết được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên agarose 1,0% và trên máy đo quang phổ.

Sử dụng bộ kit 2x PCR MyTaq™ Mix, Bioneer cho phản ứng PCR tiêu chuẩn.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Đánh giá đa dạng di truyền của các chủng vi sinh vật nội sinh bằng chỉ thị phân tử RAPD và ISSR:

Thành phần của phản ứng PCR như trong bảng 1.

Bảng 1. Thành phần của phản ứng PCR

STT	Thành phần	Thể tích
1	Đệm 2x PCR Mastermix Solution MyTaq™	5,0
2	Môi RAPD (10 μM)	1,0
3	DNA khuôn (5ng/	4,0
	Tổng thể tích	10,0

Các môi RAPD, ISSR có trình tự và nhiệt độ gắn môi như trên bảng 3 và bảng 5. Các môi UBC được thiết kế bởi trường đại học British Columbia (University of British Columbia), Canada, môi RAPD được thiết kế bởi Operon Tech. Inc. Alameda, CA, USA. Phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt sau: biến tính: 95°C, 5 phút; 40 chu kỳ/(95°C trong 20 giây; nhiệt

độ gắn môi phù hợp trong 30 giây (bảng 3 và 5); 72⁰C trong 90 giây); 72⁰C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được nhuộm với RedSafeTM Nucleic Acid Staining Solution (20000X), chạy điện di trên gel agarose 1% có sử dụng đệm TAE 1X.

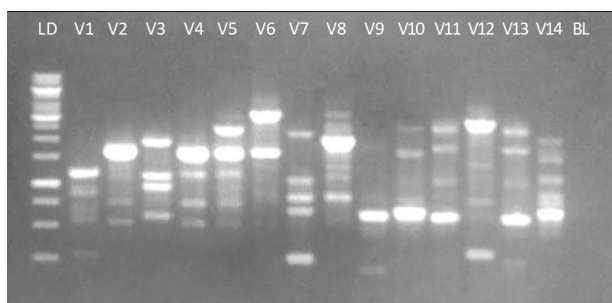
Các băng vạch sản phẩm PCR sáng rõ và ổn định được ghi điểm 1, không có băng vạch ghi điểm 0. Sử dụng Hệ số tương đồng Sokal and Michener (1958) và phương pháp phân nhóm UPGMA trong NTSYS 2.1 để xác định mối quan hệ di truyền. Chỉ số đa hình PIC (Polymorphic Information content) của mỗi locus RAPD được tính theo công thức $PIC(i) = 1 - \sum P_{ij}^2$ (Sokal and Michener, 1958; Botstein et al., 1980). Chỉ số sai khác giữa các cặp môi Rp (resolving power) được tính theo công thức $R_p = \sum I_b$ trong đó I_b : giá trị đại diện cho thông tin của đoạn. $I_b = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$, p là tỷ lệ các mẫu xuất hiện băng vạch (Prevost and Wilkinson, 1999).

III. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số

DNA tách chiết được cần đảm bảo tinh sạch và nguyên vẹn để thực hiện các bước tiếp theo trong quá trình nghiên cứu. DNA tổng số của 14 chủng vi khuẩn được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 1% cũng như đo quang phổ. Kết quả đo quang phổ được thể hiện trên bảng 2.

3.2. Phân tích đa dạng di truyền bằng chỉ thị RAPD



Hình 1. Sự đa hình của các chủng giống vi khuẩn nội sinh trong cây khoai tây nhân bản bởi môi RAPD OPB17. LD: thang chuẩn, V1 – V14: các chủng giống vi khuẩn nội sinh, BL: đối chứng trắng.

Kết quả trên bảng 2 cho thấy các mẫu DNA tách chiết được có nồng độ và độ tinh sạch khá cao và đáp ứng tốt yêu cầu sử dụng làm mạch khuôn cho phản ứng PCR.

Bảng 2. Hàm lượng và độ tinh sạch các mẫu DNA tổng số

Stt	Mẫu giống vi khuẩn	Nồng độ (ng/ml)	OD _{260/280}
1	V_1	731	2,06
2	V_2	331	1,66
3	V_3	260	1,99
4	V_4	197	2,08
5	V_5	329	2,09
6	V_6	237	2,08
7	V_7	336	2,09
8	V_8	567	1,91
9	V_9	347	2,01
10	V_10	725	1,97
11	V_11	653	2,16
12	V_12	262	2,08
13	V_13	383	2,10
14	V_14	571	2,08

Bên cạnh việc đo quang phổ để định lượng và xác định mức độ tinh sạch, chúng tôi chạy điện di để kiểm tra mức độ nguyên vẹn của DNA tổng số. Kết quả cho thấy: DNA tổng số có băng vạch rất sáng rõ, kích thước lớn (lớn hơn thang chuẩn 10kb). Từ các kết quả đo quang phổ lần chạy điện di cho phép chúng tôi kết luận: các mẫu DNA tách chiết được đáp ứng tốt cho mục đích sử dụng làm DNA khuôn cho chỉ thị ISSR và RAPD.

Bảng 3. Khả năng phát hiện đa hình của 15 môi RAPD

STT	Tên môi	Trình tự môi	Nhiệt độ gắn môi (°C)	Tổng số locus phát hiện được	Số locus đa hình	Tỷ lệ đa hình của các locus (%)	Chỉ số đa hình PIC của môi	Chỉ số sai khác giữa các cặp môi (Rp)
1	OPA-01	CAGGCCCTTC	34	11	9	81,8	0,34	5,14
2	OPB-04	GGACTGGAGT	32	10	10	100,0	0,43	7,00
3	OPB-17	AGGGAACGAG	32	11	11	100,0	0,40	7,00
4	OPC-01	TTCGAGCCAG	32	11	10	90,9	0,35	6,29
5	OPC-08	TGGACCGGTG	34	11	10	90,9	0,34	6,00
6	OPC-13	AAGCCTCGTC	32	10	7	70,0	0,26	3,71
7	OPC-15	GACGGATCAG	32	11	11	100,0	0,39	7,29
8	OPD-01	ACCGCGAAGG	34	12	9	75,0	0,33	6,14
9	OPD-02	GGACCCAACC	34	12	8	66,7	0,25	5,57
10	OPR-09	TGAGCACGAG	32	8	6	75,0	0,37	5,43
Tổng				107	91			
Trung bình/môi				10,7	9,1	85,0	0,35	

Nghiên cứu đã thực hiện khảo sát 24 môi RAPD để phân tích đa dạng di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn phân lập được. Sau khi chạy điện di sản phẩm PCR, kết quả cho thấy có 10 môi cho sản phẩm PCR đa hình rõ ràng và đạt tiêu chuẩn (Hình 1).

Kết quả trên bảng 3 cho thấy tổng số locus phát hiện được của 10 môi RAPD là 107. Mỗi môi RAPD nhân bản được 8 – 12 locus/môi, trung bình đạt 10,7 locus/môi. Môi OPD-01 và OPD-02 phát hiện được số locus nhiều nhất là 12. Môi OPR-09 phát hiện được số locus ít nhất là 8.

Tổng số locus đa hình phát hiện được của tất cả các môi là 91, trung bình 9,1 locus đa hình/môi. Nhìn chung, tỷ lệ locus đa hình của 14 chủng giống vi khuẩn là rất cao, dao động trong khoảng 66,7% đến 100%, trung bình là 85,0%. Các môi OPA-03, OPB-04, OPB-17, OPC-15, cho tỷ lệ locus đa hình là 100%. Môi OPD-02 cho tỷ lệ locus đa hình thấp nhất là 66,7%.

Kết quả trên bảng 3 cho thấy chỉ số đa hình PIC biến động từ 0,25 đến 0,43. OPD-02 là môi có chỉ số PIC thấp nhất (0,25) còn OPB-04 là môi có chỉ số PIC cao nhất (0,43). Chỉ số đa hình PIC trung bình của 10 môi RAPD là 0,346, do đó có

thể kết luận là mức độ phát hiện đa hình của 10 môi RAPD là tương đối cao.

Chỉ số sai khác giữa các cặp môi (Rp) chỉ ra sự tương quan giữa các kiểu gen với chỉ thị phân tử DNA, chỉ số Rp càng cao chứng tỏ chỉ thị đó hiệu quả trong việc phân nhóm kiểu gen (Prevost and Wilkinson, 1999). Chỉ số Rp trung bình của 10 môi RAPD là 5,957. Môi OPC-13 có chỉ số Rp thấp nhất là 3,71 trong khi đó môi OPC-15 có chỉ số Rp cao nhất là 7,29.

Từ hình ảnh điện di của 10 môi RAPD, tiến hành lập ma trận nhị phân trong Excel. Sử dụng phương pháp UPGMA trong phần mềm NTSYS 2.1 để phân tích đa dạng di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh thu thập được. Kết quả được thể hiện ở bảng 4 và hình 2.

Trung bình hệ số tương đồng di truyền khi so sánh giữa các cặp là: 0,575

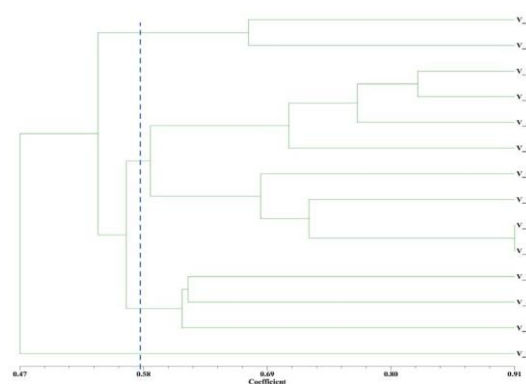
Hệ số tương đồng di truyền phản ánh mối quan hệ đa dạng di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn nghiên cứu. Hai chủng giống vi khuẩn càng gần nhau về thông tin di truyền thì hệ số tương đồng giữa chúng càng lớn và ngược lại, hai mẫu có hệ số tương đồng di truyền càng thấp thì mối quan hệ di truyền giữa chúng lại càng xa.

Bảng 4. Hệ số tương đồng di truyền của các chủng giống vi khuẩn dựa trên chỉ thị RAPD

	V_1	V_2	V_3	V_4	V_5	V_6	V_7	V_8	V_9	V_10	V_11	V_12	V_13	V_14
V_1	1													
V_2	0.48	1												
V_3	0.46	0.41	1											
V_4	0.48	0.83	0.41	1										
V_5	0.57	0.74	0.41	0.8	1									
V_6	0.52	0.72	0.43	0.72	0.7	1								
V_7	0.6	0.55	0.45	0.53	0.58	0.53	1							
V_8	0.52	0.5	0.57	0.5	0.57	0.61	0.62	1						
V_9	0.63	0.63	0.46	0.63	0.65	0.61	0.6	0.54	1					
V_10	0.55	0.49	0.45	0.53	0.62	0.6	0.67	0.6	0.62	1				
V_11	0.54	0.52	0.48	0.57	0.65	0.57	0.6	0.59	0.74	0.75	1			
V_12	0.67	0.48	0.5	0.48	0.54	0.54	0.58	0.61	0.57	0.53	0.54	1		
V_13	0.52	0.52	0.54	0.59	0.63	0.57	0.58	0.57	0.7	0.71	0.91	0.57	1	
V_14	0.5	0.57	0.52	0.65	0.61	0.57	0.62	0.61	0.46	0.6	0.5	0.5	0.48	1

Kết quả trên bảng 4 thể hiện hệ số tương đồng di truyền của từng cặp mẫu. Kết quả cho thấy, hệ số tương đồng của 14 chủng giống vi khuẩn biến động từ 0,41 – 0,91. Trong đó, hai cặp chủng giống V_11 và V_13 có hệ số tương đồng cao nhất là 0,91 trong khi đó, cặp mẫu V_3 và V_4 cũng như cặp mẫu giống V_3 và V_5 có hệ số tương đồng thấp nhất là 0,41. Nhiều công trình công bố đã sử dụng chỉ thị RAPD để đánh giá sự đa dạng di truyền của các chủng giống vi sinh vật nội sinh thực vật. De Souza và cộng sự., (2017) đã sử dụng chỉ thị RAPD để phân tích đa dạng di truyền của 88 chủng *Bacillus* phân lập được (De Souza et al., 2017). Liu và cộng sự, (2017) đã phân lập và đánh giá đa dạng di truyền của 10 chủng giống vi sinh vật nội sinh trong lúa mì, lúa và ngô bằng chỉ thị RAPD (Liu et al., 2017). Bhadania và cộng sự (2014) cũng tiến hành phân tích đa dạng di truyền của 10 chủng giống vi sinh vật nội sinh bằng 12 chỉ thị RAPD và nhận thấy các môi OPA-13, OPA-16, OPB-11, OPC-04, OPD-07, OPF-09, OPJ-06, OPM-12 và OPP-13 cho tỷ lệ đa hình đạt 100% (Bhadania et al., 2014). Kết quả này cũng khá tương đồng

với kết quả nghiên cứu của chúng tôi khi một số môi RAPD (OPB-04, OPB-17, OPC-15) cũng cho tỷ lệ đa hình đạt 100%. Hệ số tương đồng di truyền được sử dụng cho phân nhóm UPGMA để xác định mối quan hệ di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh. Kết quả được thể hiện trên Hình 2.



Hình 2: Sơ đồ mức độ tương đồng di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn dựa vào chỉ thị RAPD

Dựa vào hình 2, ở hệ số tương đồng di truyền 0,575, 14 chủng giống vi khuẩn được phân thành 4 nhóm chính. Trong đó, nhóm 1 có 2 mẫu là V_1 và V_12, nhóm 2 có 8 mẫu là V_2, V_4, V_5, V_6, V_9, V_10, V_11, V_13, nhóm 3 có 3 mẫu là V_7, V_8, V_14 và nhóm 4 có 1 mẫu là V_3.

3.3. Phân tích đa dạng di truyền bằng chỉ thị ISSR

Kết quả trên bảng 5 cho thấy tổng số locus phát hiện được của 6 môi là 52 locus. Mỗi môi ISSR nhân bản được 6 đến 12 locus/môi. Mỗi ISSR1 phát hiện được số locus nhiều nhất là 12 locus, trong khi đó, môi UBC-809 chỉ phát hiện được 6 locus.

Tổng số locus đa hình phát hiện được của tất cả các môi là 45, trung bình 7,5 locus đa hình/môi. Nhìn chung, tỷ lệ locus đa hình của 14 chủng giống vi khuẩn

này khá cao, dao động trong khoảng 75% đến 100%, trung bình là 86,25%. Các môi ISSR1 và UBC-809 có tỷ lệ các locus đa hình đạt 100%. Môi UBC-808 và UBC-840 có tỷ lệ đa hình thấp nhất là 75%.

Các môi có chỉ số đa hình PIC biến động từ 0,31 đến 0,4. Môi ISSR-01 và UBC-834 là môi có chỉ số PIC cao nhất (0,4), UBC-826 là môi có chỉ số PIC thấp nhất (0,31). Chỉ số đa hình PIC trung bình của 6 môi ISSR là 0,38, do đó có thể kết luận là mức độ phát hiện đa hình của 15 môi ISSR là khá cao.

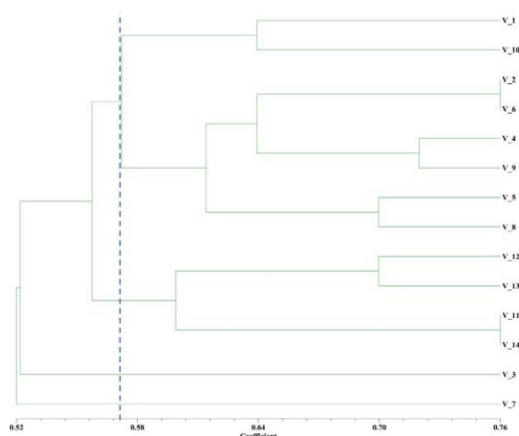
Bảng 5. Khả năng phát hiện đa hình của 6 môi ISSR

STT	Tên môi	Trình tự môi	Tm (°C)	Tổng số locus phát hiện được	Số locus đa hình	Tỷ lệ đa hình của các locus (%)	Chỉ số đa hình PIC của môi	Chỉ số sai khác giữa các cặp môi (Rp)
1	UBC-808	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	51,6	8	6	75	0,40	8,43
2	UBC-809	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	51,6	6	6	100	0,39	6,00
3	UBC-826	ACACACACACACACACYA	51,6	10	8	80	0,39	3,86
4	UBC-834	TGTGTGTGTGTGTGTGRT	51,6	8	7	87,5	0,31	5,43
5	UBC-840	ATGATGATGATGATGATG	47	8	6	75	0,40	6,57
6	ISSR1	ACACACACACACACT	51,6	12	12	100	0,36	5,71
	Tổng			52	45			
	Trung bình			8,66	7,5	86,2	0,38	6,00

Chỉ số Rp trung bình của 6 môi ISSR là 6,00. Chỉ số Rp cao nhất là 8,43 của môi ISSR-01 và thấp nhất là 3,86 của môi UBC-809.

Bảng 6. Hệ số tương đồng di truyền của các chủng giống vi khuẩn dựa trên chỉ thị ISSR

	V_1	V_2	V_3	V_4	V_5	V_6	V_7	V_8	V_9	V_10	V_11	V_12	V_13	V_14
V_1	1													
V_2	0.50	1												
V_3	0.54	0.56	1											
V_4	0.56	0.74	0.54	1										
V_5	0.66	0.56	0.52	0.54	1									
V_6	0.66	0.76	0.52	0.66	0.72	1								
V_7	0.48	0.54	0.50	0.60	0.50	0.58	1							
V_8	0.60	0.58	0.54	0.56	0.70	0.70	0.64	1						
V_9	0.60	0.54	0.50	0.72	0.62	0.62	0.56	0.64	1					
V_10	0.64	0.50	0.54	0.52	0.58	0.66	0.52	0.48	0.56	1				
V_11	0.60	0.62	0.54	0.52	0.58	0.58	0.40	0.56	0.64	0.60	1			
V_12	0.54	0.36	0.48	0.42	0.44	0.40	0.46	0.54	0.58	0.42	0.54	1		
V_13	0.60	0.58	0.50	0.56	0.58	0.66	0.56	0.56	0.68	0.52	0.72	0.70	1	
V_14	0.52	0.62	0.50	0.52	0.62	0.62	0.44	0.64	0.56	0.64	0.76	0.54	0.60	1



Hình 3. Sơ đồ mức độ tương đồng di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn dựa vào chỉ thị ISSR

Dựa vào sơ đồ trên hình 3 ta thấy: ở hệ số tương đồng di truyền 0,571, 14 chủng giống vi khuẩn được phân thành 4 nhóm. Trong đó, nhóm 1 có 8 mẫu là V_1 và V_10, V_2, V_6, V_4, V_9, V_5, V_8, nhóm 2 có 4 mẫu là V_12, V_13, V_11, V_14, nhóm 3 có 1 mẫu là V_3 và nhóm 4 có 1 mẫu là V_7.

Tương tự như chỉ thị RAPD, chỉ thị ISSR cũng là một chỉ thị đa locus nhưng có một số ưu điểm hơn so với chỉ thị RAPD. Chính vì vậy, khá nhiều công trình công bố đã sử dụng chỉ thị này trong phân tích đa dạng di truyền các quần thể vi sinh vật nội sinh trong thực vật. Lyra và cộng sự (2013) tiến hành phân tích đa dạng di truyền của 22 chủng vi khuẩn cố định đạm với 4 chỉ thị ISSR (UBC 808, UBC 809, UBC 810 và UBC 812). Kết quả cho thấy 22 chủng được phân tách thành 5 nhóm khác nhau. Kết quả trên chứng tỏ sự đa dạng di truyền rất cao của 22 chủng vi khuẩn phân lập được (Lyra et al., 2013). Rodrigues và cộng sự (2004) sử dụng chỉ thị ISSR để xác định mối quan hệ di truyền của 18 chủng nấm nội sinh thuộc loài *Guignardia mangiferae* từ các cây trồng khác nhau và nhận thấy 18 chủng nấm được tách thành ba nhóm chính

(Rodrigues et al., 2004). Grünig và cộng sự., (2001) cũng tiến hành phân tích đa dạng di truyền của 14 chủng nấm nội sinh thuộc loài *Phialocephala fortinii*. Kết quả cho thấy 85 trong số 92 locus nhân bản được là các locus đa hình (chiếm 92,4%). Công trình cũng khẳng định chỉ thị ISSR là một công cụ rất hữu hiệu trong đánh giá đa dạng di truyền (Grünig et al., 2001). So với công trình của Grünig và cộng sự., (2001) thì tỷ lệ locus đa hình của nghiên cứu của chúng tôi tuy thấp hơn nhưng vẫn rất cao và đạt tới 86,2%. Như vậy, việc lựa chọn chỉ thị ISSR cho phân tích đa dạng di truyền các chủng giống vi khuẩn nội sinh trong cây khoai tây là rất phù hợp.

Kết quả cho thấy có sự khác biệt về mức độ tương đồng di truyền cũng như sơ đồ tương đồng di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn dựa vào chỉ thị RAPD và chỉ thị ISSR (Bảng 4 vs Bảng 6, Hình 1 vs Hình 3). Sự khác biệt về mức độ tương đồng di truyền cũng như sơ đồ tương đồng di truyền khi các chủng giống được phân tích bởi chỉ thị RAPD và ISSR cho thấy hai nhóm chỉ thị phát hiện sự đa hình theo nguyên lý khác nhau và/hoặc nhân bản vào các vùng DNA mục tiêu nằm trên các vùng khác nhau của bộ gen (Lalhrui et al., 2009). Mỗi tương quan thấp hay sự khác biệt về kết quả phân tích đa dạng di truyền giữa hai chỉ thị ISSR và RAPD đã được mô tả ở blackgram (*Vigna mungo* (L.) Hepper) (Souframanien and Gopalakrishna, 2004), cây bồ công anh (*Lactuca indica* L.) (Pham et al., 2022), cây bát giác liên (*Dysosma tonkinense*) (Pham et al., 2021), và cây *Triticum aestivum* (Khaled et al., 2015).

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

Từ các kết quả phân tích trên cho thấy chỉ thị RAPD và ISSR khi phân tích

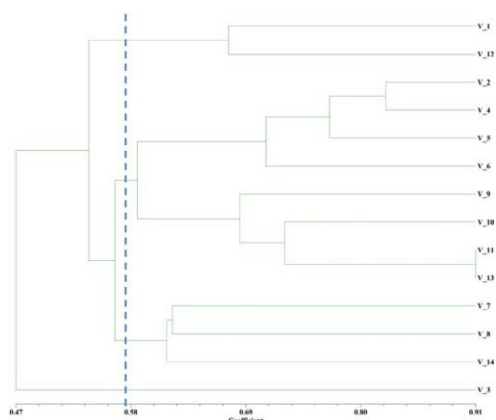
độc lập nhau đã xác định được sự đa hình của các chủng giống vi sinh vật nghiên cứu. Thêm vào đó, sơ đồ mức độ tương đồng di truyền dựa trên chỉ thị RAPD và ISSR là tương đối tương đồng. Mặc dù vậy, việc xác định hệ số tương đồng di truyền sẽ chính xác hơn nhiều khi số locus phát hiện được trong cùng một phân tích càng lớn. Chính vì vậy, người ta thường kết hợp kết quả phân tích của cả hai chỉ thị RAPD và ISSR với nhau để có kết quả phân tích có tính thuyết phục cao hơn so với phân tích riêng rẽ (Souframanien and

Gopalakrishna, 2004). Kết quả phân tích hệ số tương đồng di truyền của các chủng giống vi sinh vật dựa trên chỉ thị RAPD và ISSR được thể hiện trên Bảng 7.

Kết quả trên bảng 7 thể hiện hệ số di truyền giữa các cặp mẫu. Kết quả cho thấy, hệ số tương đồng của 14 chủng giống vi khuẩn biến động từ 0,44 – 0,85, trung bình hệ số tương đồng di truyền khi so sánh giữa các cặp là: 0,573. Trong đó, cặp mẫu V_2 và V_12 có hệ số tương đồng thấp nhất là 0,44 trong khi đó, cặp mẫu V_11 và V_13 có hệ số tương đồng cao nhất là 0,85.

Bảng 7. Hệ số tương đồng di truyền của các chủng giống vi khuẩn dựa trên chỉ thị RAPD và ISSR

	V_1	V_2	V_3	V_4	V_5	V_6	V_7	V_8	V_9	V_10	V_11	V_12	V_13	V_14
V_1	1													
V_2	0.49	1												
V_3	0.49	0.46	1											
V_4	0.51	0.8	0.46	1										
V_5	0.6	0.68	0.45	0.71	1									
V_6	0.57	0.73	0.46	0.7	0.7	1								
V_7	0.56	0.55	0.46	0.56	0.55	0.55	1							
V_8	0.55	0.53	0.56	0.52	0.61	0.64	0.63	1						
V_9	0.62	0.6	0.47	0.66	0.64	0.61	0.58	0.58	1					
V_10	0.58	0.49	0.48	0.53	0.61	0.62	0.62	0.56	0.6	1				
V_11	0.56	0.56	0.5	0.55	0.63	0.57	0.53	0.58	0.7	0.7	1			
V_12	0.63	0.44	0.49	0.46	0.51	0.49	0.54	0.58	0.57	0.49	0.54	1		
V_13	0.55	0.54	0.53	0.58	0.61	0.6	0.57	0.56	0.69	0.64	0.85	0.61	1	
V_14	0.51	0.58	0.51	0.61	0.61	0.58	0.56	0.62	0.49	0.61	0.59	0.51	0.52	1



Hình 4. Sơ đồ mức độ tương đồng di truyền của 14 chủng giống vi sinh vật dựa vào chỉ thị RAPD và ISSR

Kết quả phân tích sơ đồ mức độ tương đồng di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn dựa vào chỉ thị RAPD và ISSR trên hình 4 ta thấy: ở hệ số tương đồng di truyền 0,573, 14 chủng giống vi khuẩn lại được phân thành 4 nhánh di truyền chính. Trong đó, nhóm 1 có 2 mẫu là V_1 và V_12, nhóm 2 có 8 mẫu là V_2, V_4, V_5, V_6, V_14, V_9, V_10, V_11, V_13, nhóm 3 có 3 mẫu bao gồm V_7, V_8, V_14 và nhóm 4 có 1 mẫu là V_3. Như vậy, sơ đồ tương đồng di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh trong cây khoai tây khi phân tích bằng kết hợp giữa hai chỉ thị cho kết quả tương đồng với chỉ thị RAPD.

Sự kết hợp hai chỉ thị RAPD và ISSR đã được sử dụng phổ biến vì cả hai chỉ thị đều cung cấp thông tin rất hữu ích cho việc phân loại và đánh giá đa dạng di truyền (Karuppanapandian et al., 2010; Tripathi et al., 2012). Trong nghiên cứu này, để xác định mối quan hệ di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh, chúng tôi đã sử dụng kết hợp cả chỉ thị RAPD và ISSR do sự kết hợp cả hai chỉ thị sẽ có tính

đại diện và tin cậy hơn (Souframanien and Gopalakrishna, 2004).

Để có thể đưa ra kết luận về sự hiệu quả của các chỉ thị RAPD và ISSR trong phân tích đa dạng di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn, chúng tôi xác định sự tương quan giữa các ma trận Sokal-Michener bằng cách sử dụng kiểm định Mantel (tương quan Pearson) của các chỉ thị. Kết quả phân tích tương quan được thể hiện trên bảng 8.

Bảng 8. Hệ số tương quan giữa các cặp ma trận

Cặp ma trận Sokal-Michener	Hệ số tương quan giữa các ma trận (r)	p-value (two-tailed)	Alpha
RAPD vs. ISSR	0,715	<0,0001	0,05
ISSR vs. (RAPD + ISSR)	0,864	<0,0001	0,05
RAPD vs. (RAPD + ISSR)	0,969	<0,0001	0,05

Kết quả trên bảng 8 cho thấy: hệ số tương quan (r) giữa hai ma trận ISSR và RAPD là 0,715 ($p < 0,0001$). Kết quả này cho thấy có sự tương quan ở mức khá giữa hai ma trận. Hệ số tương quan giữa ma trận ISSR và ma trận kết hợp giữa hai chỉ thị RAPD và ISSR (RAPD + ISSR) cho kết quả mối tương quan khá cao ($r = 0,864$, $p < 0,0001$), trong khi đó hệ số tương quan giữa ma trận RAPD và (RAPD + ISSR) là rất cao ($r = 0,969$, $p < 0,0001$). Kết quả trên cho thấy, giữa hai chỉ thị thì chỉ thị RAPD có hiệu quả tốt hơn so với chỉ thị ISSR trong phân tích đa dạng di truyền của 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh phân lập được.

IV. Kết luận

14 chủng giống vi khuẩn nội sinh trong cây khoai tây đã được đánh giá đa dạng di truyền bằng 10 chỉ thị RAPD và 6 chỉ thị ISSR. Hai chỉ thị phát hiện được tổng số 159 locus (107 locus với chỉ thị RAPD và 52 locus với chỉ thị ISSR) với tỷ lệ locus đa hình khá cao (trung bình 85,0% đối với chỉ thị RAPD và 86,2% đối với chỉ thị ISSR). Trung bình chỉ số PIC của 10 môi RAPD là 0,35 và của 6 môi ISSR là 0,38 chứng tỏ khả năng phát hiện đa hình các chỉ thị là

cao. Hệ số tương đồng của 14 chủng giống vi khuẩn dao động từ 0,36-0,76. Trong đó, chủng giống V_2 và V_12 có hệ số tương đồng thấp nhất (0,36), và chủng giống V_2 và V_6 có hệ số tương đồng cao nhất (0,76). Ở hệ số tương đồng di truyền trung bình là 0,573, 14 chủng giống vi khuẩn được phân thành 4 nhánh di truyền chính. Kết quả trên chứng tỏ 14 chủng giống vi khuẩn nội sinh nghiên cứu có sự đa dạng di truyền cao.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài MHN2021-01.17.

Tài liệu tham khảo:

- [1]. 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
- [2]. 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: 314-331
- [3]. De Souza J, Santos A, Monteiro F, Batista M, Santos P, Carvalho Ferreira L, Correa E (2017) Genetic diversity and population densities of endophytic *Bacillus* spp. In yam plants. Bragantia 76

- [4]. Galván MZ, Bornet B, Balatti PA, Branchard M (2003) Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica* 132: 297-301
- [5]. Grünig CR, Sieber TN, Holdenrieder O (2001) Characterisation of dark septate endophytic fungi (DSE) using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. *Mycological Research* 105: 24-32
- [6]. Karuppanapandian T, Wang H, Karuppudurai T, Rajendhran J, Kwon M, Jang C, Kim S, Manoharan K, Kim W (2010) Efficiency of RAPD and ISSR markers in assessing genetic diversity and relationships in black gram (*Vigna mungo* L. Hepper) varieties. *Canadian Journal of Plant Science* 90: 443-452
- [7]. Khaled AGA, Motawea MH, Said AA (2015) Identification of ISSR and RAPD markers linked to yield traits in bread wheat under normal and drought conditions. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 13: 243-252
- [8]. Lalhruaitluanga H, Prasad MNV (2009) Comparative results of RAPD and ISSR markers for genetic diversity assessment in *Melocanna baccifera* Roxb. growing in Mizoram State of India. *African Journal of Biotechnology* 8: 6053-6062
- [9]. Liu H, Zhang L, Meng A, Zhang J, Xie M, Qin Y, Faulk DC, Zhang B, Yang S, Qiu L (2017) Isolation and molecular identification of endophytic diazotrophs from seeds and stems of three cereal crops. *PLOS ONE* 12: e0187383
- [10]. Lyra MCCPd, Santos DC, Mondragon-Jacobo C, Silva MLRBd, Mergulhão ACES, Martínez-Romero E (2013) Isolation and molecular characterization of endophytic bacteria associated with forage cactus (*Opuntia* spp.). In, Ed 995. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium, pp 99-108
- [11]. Farhad Masoomi-Aladizgeh, Leila Jabbari, Reza Khayam Nekouei, Ali Aalami (2019) A Simple and Rapid System for DNA and RNA Isolation from Diverse Plants Using Handmade Kit, 17 June 2019, Protocol (Version 2) available at Protocol Exchange [<https://doi.org/10.21203/rs.2.1347/v2>].
- [12]. Nguyễn Xuân Trường, Lương Văn Hưng, Vi Quốc Hiền, Phạm Văn Tuấn, Vũ Tiên Dũng, Đỗ Thị Mai (2019) Kết quả tuyển chọn và khảo nghiệm giống khoai tây mới 'Bliss' cho chế biến chip. *Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Chuyên đề Sinh học phục vụ phát triển nông nghiệp công nghệ cao*: 130-138.
- [13]. Phạm NK, Phip Thi Ninh, Huyen Thanh Phạm, Nga Quynh Nguyen, Nga Hang Do, Son Truong Dinh (2021) High genetic diversity of *Dyosoma tonkinense* revealed by ISSR and RAPD markers. *Asian Journal of Plant Sciences* 20: 637-647
- [14]. Phạm TTT, Tran HTT, Cao BP, Ninh PT, Do HN, Dinh ST (2022) High genetic diversity of 16 Indian lettuce (*Lactuca indica* L.) accessions from Vietnam. *Pak J Biol Sci* 25: 201-209
- [10] Prevost A, Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 107-112
- [15]. Rodrigues KF, Sieber TN, Grünig CR, Holdenrieder O (2004) Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 sequences. *Mycol Res* 108: 45-52
- [16]. Sokal RR, Michener CD (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull* 28: 1409-1438
- [17]. Souframanien J, Gopalakrishna T (2004) A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1687-1693
- [18]. Tripathi N, Chouhan DS, Saini N, Tiwari S (2012) Assessment of genetic variations among highly endangered medicinal plant *Bacopa monnieri* (L.) from Central India using RAPD and ISSR analysis. *3 Biotech* 2: 327-336

Địa chỉ tác giả: Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm – Trường Đại học Mở Hà Nội
Email: hongvancnsh@hou.edu.vn

