

ĐẶC ĐIỂM TRÌNH TỰ VÙNG GENE *hrpW*, *pthA* CỦA VI KHUẨN *Xanthomonas axonopodis* GÂY BỆNH LOÉT TRÊN CÂY CHANH

Nguyễn Thị Mỹ Lệ^{1,2*}, Nguyễn Thị Ngọc Loan², Trần Thị Lệ Minh², Võ Thị Thu Oanh², Nguyễn Vũ Phong^{2*}

¹ Trường Đại Học Công Nghiệp Thực Phẩm, Thành phố Hồ Chí Minh

² Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Bệnh loét do vi khuẩn là một trong những bệnh hại nghiêm trọng trên những vùng trồng chanh hiện nay. Bệnh làm giảm năng suất và chất lượng thương phẩm quả. Từ các mẫu bệnh loét trên cây chanh, vi khuẩn được phân lập, đánh giá đặc điểm sinh hóa và khả năng gây bệnh. Vùng 16S rRNA và hai vùng gene *hrpW*, *pthA* được giải trình tự để định danh và xem xét đặc điểm di truyền. Kết quả phân tích xác định vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* là tác nhân gây bệnh. Trong 56 dòng vi khuẩn phân lập có 9 dòng vi khuẩn gây bệnh loét đặc trưng sau 7 đến 9 ngày ủ. Trình tự vùng gene *hrpW* với kích thước khoảng 561 bp tương đồng 100% với các dòng *X. axonopodis* đã được công bố trên ngân hàng gene. Ở vùng trình tự gene *pthA*, ngoại trừ dòng vi khuẩn THKC4, trình tự vùng gene *pthA* với kích thước 198 bp của 8 dòng vi khuẩn còn lại có sự khác biệt ở nucleotide thứ 181 so với trình tự các dòng *Xanthomonas* gây bệnh loét trên cây chanh ở Argentina, Đài Loan và Trung Quốc. Đây là báo cáo đầu tiên về việc so sánh cặp gene *pthA* và *hrpW* trên vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* gây bệnh loét trên cây chanh ở Việt Nam.

Từ khóa: Bệnh loét, *Xanthomonas axonopodis*, cây chanh, gene *pthA*, gene *hrpW*.

MỞ ĐẦU

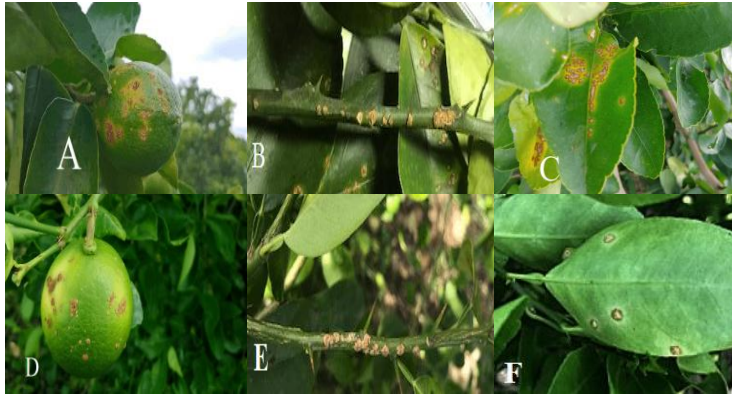
Bệnh loét do vi khuẩn gây ra trên cây có múi được phát hiện đầu tiên vào năm 1910 ở vùng biên giới Georgia–Florida, Mỹ và đã được ghi nhận có mặt trên 30 nước, khắp các châu lục trên thế giới (Sharma *et al.*, 2009). Ở Việt Nam, bệnh loét trên cây có múi được báo cáo đầu tiên bởi Whittle (1992). Hiện nay, bệnh phổ biến trên tất cả các giống cây có múi như cam, chanh, bưởi, quýt,... ở các vùng trồng trên khắp cả nước. Cây chanh được trồng nhiều ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), chiếm gần 60% tổng diện tích chanh cả nước và Long An là tỉnh sản xuất chanh lớn nhất ĐBSCL, chiếm 30% tổng diện tích chanh toàn vùng. Bệnh loét trên chanh phát triển nhanh và lan rộng vào mùa mưa, rất khó kiểm soát và ảnh hưởng nhiều đến giá trị thương phẩm quả. Có ba dạng bệnh loét do các biến thể của vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* gây ra gồm dạng loét A, B và C. Dạng loét A có nguồn gốc từ châu Á, là dạng bệnh phân bố rộng khắp và gây thiệt hại kinh tế nhất (Das, 2003). Hai dạng còn lại được tìm thấy ở Nam Mỹ. Sự tương tác giữa vi khuẩn gây bệnh và ký chủ thực vật phụ thuộc vào hệ thống protein. Bộ gene của chủng *X. axonopodis* pv. *citri* (Xac) 306 phân lập ở Brazil đã được giải trình tự vào năm 2002 (da Silva *et al.*, 2002). Vi khuẩn Xac sử dụng hệ thống tiết loại III (T3SS) để chuyển các yếu tố độc lực như gene *pthA* vào tế bào chủ. Hệ thống T3SS được mã hóa bởi một nhóm 25 gene và hầu hết được định vị thành một cụm *hrp* (hypersensitive reaction and pathogenicity). Cụm gene *hrp* của Xac là một phần của khu vực đảo có tính gây bệnh nằm trên nhiễm sắc thể chính, trải dài hơn 23 kb và chứa vùng có hàm lượng G + C khác biệt so với những vùng còn lại trong hệ gene vi khuẩn. Cụm gene *hrp* còn mang các yếu tố di truyền có tính di động. Trên các loài *Xanthomonas* người ta xác định được các loại *hrp* gen gồm *hrpG*, *hrpA*, *hrpB*, *hrcV*, *hrpB1*, *hrpD6*, *hrpB2*, *hrcU*, *hrcW*, *hrpB4*, *hrcN* và các gene này nằm thành cụm. Trong khi đó, trên Xac gene *hrpW* không nằm trong cụm *hrp* cùng với các gene còn lại (Alergria *et al.*, 2004). Gene *pthA* là thành viên của họ gene *avrBs3* và là một trong những protein độc lực quan trọng được tìm thấy ở Xac. Gene *pthA* mang nhiều trình tự lặp lại giống nhau có kích thước 102 bp ở vùng trung tâm, sở hữu tín hiệu định vị trong nhân, được chuyển vào tế bào ký chủ thông qua hệ thống T3SS và nhắm vào nhân, kích hoạt sự biểu hiện của gene *upa20*, làm tăng sinh tế bào quá mức, tạo ra vết thương hoại tử (triệu chứng loét) (Yang, Gabriel, 1995). Gene *pthA* gây triệu chứng loét trên tất cả các cây có múi trong khi đó lại kích ứng miễn dịch trên các thực vật khác, do đó *pthA* là yếu tố quyết định tính đặc hiệu của Xac đối với cây có múi. Khi loại bỏ gene *pthA* sẽ loại bỏ khả năng gây loét trên Xac (Cubero, Graham, 2002). Mặc dù bệnh loét có nhiều dạng nhưng dấu hiệu bệnh là như nhau. Ban đầu, vết bệnh là những chấm tròn có đường kính trên dưới 1mm, màu trong vàng, sưng ướm. Khi vết bệnh già rần lại nổi gờ giống như ghê, loét, sần sùi (Das, 2003). Việc định danh, xác định chính xác phân loại vi khuẩn để có giải pháp quản lý bệnh tốt là điều rất cần thiết. Tuy nhiên, nếu chỉ dựa vào đặc điểm hình thái, các đặc điểm sinh hóa hay biểu hiện bệnh thì rất khó có thể xác định chính xác dạng vi khuẩn gây bệnh. Do đó, trong nghiên cứu này, vùng gene 16S rRNA, *hrpW* và *pthA* của các dòng vi khuẩn gây bệnh loét trên cây chanh ở Long An được giải trình tự phục vụ định danh.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thu mẫu và phân lập vi khuẩn

Tổng cộng 75 mẫu lá, cành và quả chanh không hạt (*Citrus latifolia*) và chanh ta (*Citrus aurantifolia*) có các biểu hiện bệnh loét, vết bệnh gồ ghề có màu vàng hoặc nâu, xung quanh vết bệnh có một quầng vàng rõ rệt trên bề mặt lá, cành và quả (Hình 1) được thu tại 36 vườn khác nhau thuộc 3 huyện Bến Lức, Đức Huệ và Thạnh Hóa, tỉnh Long An. Các mẫu phân lập được mã hóa theo địa điểm thu mẫu và được viết tắt bằng chữ cái đầu, tên ký chủ, bộ phận cây bị bệnh, số thứ tự mẫu.

Vi khuẩn được phân lập theo phương pháp được mô tả bởi Lelliot và Stead (1987). Phần tiếp giáp giữa mô khỏe và mô bệnh được thu và khử trùng bề mặt. Cắt nhỏ mẫu ngâm trong dung dịch PBS (Phosphate Buffer Saline) từ 10 đến 20 phút ở nhiệt độ phòng. Cây trang 100µl dịch trên môi trường NA (Nutrient agar), ủ ở 28°C từ 48 đến 72 giờ, chọn những khuẩn lạc tiêu biểu cấy chuyển đến khi thu dòng thuần.



Hình 1. Mẫu bệnh loét thu thập tại vườn

A, B, C: Mẫu bệnh loét trên quả, cành, lá chanh không hạt; D, E, F: Mẫu bệnh loét trên quả, cành, lá chanh có hạt.

Kiểm tra hình thái và đặc tính sinh hóa các vi khuẩn phân lập

Vi khuẩn *Xanthomonas* có đặc điểm tiêu biểu được thu nhận là khuẩn lạc tròn, nhô, nhẵn bóng, bìa nguyên, nhầy, màu vàng nhạt trên môi trường NA sau 48 giờ ủ ở 28°C. Các dòng vi khuẩn phân lập được xác định đặc tính sinh hóa theo mô tả của Schaad và đồng tác giả (2006), EPPO (2005) gồm nhuộm Gram, hình dạng tế bào, catalase, oxidase, thủy phân gelatin, casein, tinh bột, tween 80, urea.

Kiểm tra khả năng gây bệnh của vi khuẩn theo quy tắc Koch

Các dòng vi khuẩn phân lập được tăng sinh trong môi trường Nutrient-broth (NB) ở 28°C, trong 24 giờ, sau đó kiểm tra khả năng gây bệnh theo phương pháp mô tả bởi Tung và Kuo (2000). Lá, cành và quả chanh không hạt và chanh giấy sạch bệnh được rửa sạch, khử trùng bề mặt bằng cồn 70%. Dùng bông thấm nước cất vô trùng quấn xung quanh đầu cuống lá, đầu cuống trái và hai đầu cành chanh giúp giữ ẩm cho mẫu. Dùng kim ghim côn trùng số 0 để tạo vết thương trên mẫu. Nhỏ 20 µL dịch vi khuẩn (khoảng 10⁸ CFU/mL) đã chuẩn bị lên vùng vết thương, mẫu đối chứng được nhỏ bằng nước cất vô trùng. Mỗi nghiệm thức tương ứng với một dòng phân lập và được thực hiện với 3 lần lặp lại. Theo dõi sự xuất hiện triệu chứng bệnh loét của vi khuẩn trên các mẫu lây bệnh nhân tạo trong điều kiện phòng thí nghiệm, vết bệnh được chụp dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) và so sánh với vết bệnh ban đầu.

Tách chiết DNA tổng số và PCR khuếch đại DNA

Các dòng vi khuẩn phân lập được nuôi cấy trong môi trường Nutrient-broth (NB) ở 28°C, lắc 120 - 150 vòng/phút trong 48 giờ. DNA tổng số được chiết xuất bằng Gene JET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific - Mỹ). Kiểm tra DNA bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1.0% (Bioline). Vùng 16S rRNA dài 1500 bp được khuếch đại bằng phản ứng PCR theo phương pháp của Lane (1991) với hai primer 27F (5' – AGA TTT GAT CCT GGC TCA G - 3') và 1492R (5' – GGT TAC CTT GTT ACG ACT T - 3'). Vùng gene *hrpW* dài 561 bp được khuếch đại theo phương pháp của Park và đồng tác giả (2006) với hai primer XacF (5' – GTC GCA ATA CGA TTG GAA C – 3') và XacR (XacR 5' – GGA GGC ATT GTC GAA GGA A – 3'). Trình tự primer sử dụng khuếch đại vùng gene *pthA* gồm J-pth1 (5' – CTT CAA CTC AAA CGC CGG AC – 3') và J-pth2 (5' – CAT CGC GCT GTT CGG GAG – 3') theo Cubero và Graham, 2002. Thể tích phản ứng là 25 µL chứa mỗi primer 0.5 µL, 1 µL DNA khuôn và MyTaq Mix 2X (Bioline) 12.5 µL, nước cất vô trùng 11 µL. Phản ứng PCR được thực hiện theo chu kỳ nhiệt gồm 95°C trong 3 phút, 35 chu kỳ với 95°C 15 giây, Ta 30 giây, 72°C 45 giây và 72°C trong 7 phút. Sản phẩm

PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose (Bioline) 1.5 % và quan sát kết quả dưới tia UV. Giải trình tự 2 chiều được thực hiện bởi công ty 1st BASE (Singapore).

Phân tích trình tự

Trình tự được hiệu chỉnh thủ công nhờ phần mềm BioEdit 7.0.9.0 và so sánh với các trình tự trên Ngân hàng gene (Genbank). Cây phả hệ xây dựng theo phương pháp Neighbour-joining với khoảng cách di truyền giữa các chuỗi được xác định dựa trên mô hình thay thế Kimura tham số, giá trị thống kê bootstrap (%) với 1.000 lần lặp lại trong phần mềm MEGA 10.

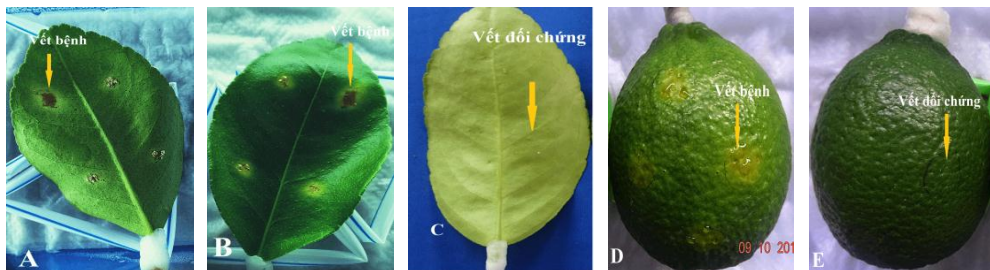
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và nhận diện các dòng vi khuẩn *Xanthomonas*

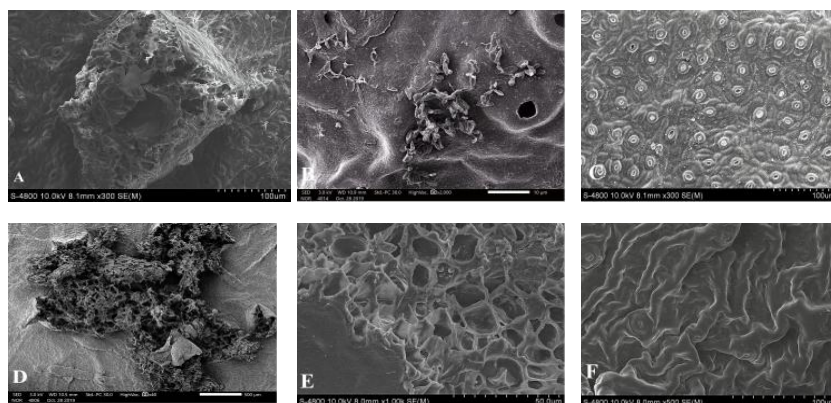
Từ 75 mẫu bệnh thu thập, các khuẩn lạc có đặc điểm tròn, màu vàng nhạt, nhô, bóng nhầy, bìa nguyên được phân lập. Các dòng vi khuẩn tiếp tục được sàng lọc dựa vào phản ứng dương tính với thử nghiệm catalase, thủy phân casein, tinh bột, tween 80, gelatin và âm tính với thử nghiệm oxidase, urea. Kết quả, có 25 dòng vi khuẩn phân lập từ Bến Lức, 31 dòng vi khuẩn phân lập từ Thạnh Hóa và Đức Huệ đều có 7 đặc điểm là Gram âm (-), oxidase âm tính (-), catalase dương tính (+), có khả năng thủy phân casein, tinh bột, tween 80, hóa lỏng gelatin, không có khả năng thủy phân urea. Kết hợp giữa đặc điểm hình thái và đặc điểm sinh hóa, có thể kết luận 56 dòng vi khuẩn được phân lập ở Long An là *Xanthomonas axonopodis* tương tự kết quả công bố của Das (2003), Bharadwaj và đồng tác giả (2014), Mubeen và đồng tác giả (2015).

Khả năng gây bệnh của các mẫu phân lập

Khả năng gây bệnh của 56 dòng vi khuẩn phân lập được đánh giá bệnh bằng phương pháp tạo vết thương. Kết quả cho thấy, các mẫu chủng bệnh đều có biểu hiện bệnh loét nhưng mức độ và thời gian biểu hiện bệnh khác nhau. Trong đó, các mẫu được chủng bởi 18 dòng vi khuẩn (BLKQ1; BLKC3; BLKL1; DHHL2; DHHQ2; DHKQ4; THKQ1; THKL1; THK4; BLHQ4; BLHC3; BKHL3; DHH2; DHK1; DHC4; THHL3; THHC3 và THHQ2) có biểu hiện bệnh loét điển hình, rõ và thời gian biểu hiện sớm từ 7 đến 20 ngày ủ. Tám dòng vi khuẩn (BLKQ1, BLKC3, BLKL1, DHHL2, DHHQ2, DHKQ4, THKQ1, THKL1) thể hiện độc lực cao, các mẫu chủng bệnh có biểu hiện bệnh loét điển hình, rõ nét chỉ sau 7 đến 9 ngày ủ: hình thành mô sẹo kết tinh màu trắng tại vết thương, xung quanh có vùng sưng nước màu nâu sậm, quầng vàng rõ trên lá và quả trong vòng 7 đến 9 ngày ủ (Hình 2). Qua hình ảnh chụp SEM, sau 4 đến 5 ngày ủ, tại vị trí tiêm vi khuẩn và các lỗ khí khổng xung quanh có vi khuẩn xâm nhập vào và mật số vi khuẩn tăng dần lên (Hình 3B). Sau 7 đến 9 ngày ủ, các tổn thương già đi, chuyển từ màu nâu nhạt sang nâu, bên ngoài có quầng vàng rõ (Hình 2A, B, D). Kích thước vết bệnh to dần, hình thành vết loét xộp, phồng nhô lên khỏi mặt lá, quả, cành (Hình 3A, D). Vi khuẩn được bảo vệ bên trong vết loét với mạng lưới polysaccharide ngoại bào do chính vi khuẩn tiết ra (Hình 3E). Kết quả chụp SEM của nghiên cứu này tương tự mô tả của Graham và đồng tác giả (2004). Theo nhóm nghiên cứu, vi khuẩn *X. axonopodis* xâm nhập vào mô thực vật thông qua lỗ khí khổng. Các tế bào nhô lên sau 5 ngày ủ và sau 9 ngày ủ, vết loét hình thành rõ, rần hoặc xộp. Kết quả này cho thấy, 8 dòng vi khuẩn phân lập trong nghiên cứu này có độc lực mạnh hơn so với chủng *Xac1* trong nghiên cứu của Abhang và đồng tác giả (2015). Trong nghiên cứu này, khả năng gây bệnh của 7 dòng vi khuẩn *Xac* phân lập trên lá chanh được đánh giá bằng phương pháp gây vết thương. Trong đó, dòng *Xac1* có độc lực mạnh nhất tạo vùng sưng ướt và phát triển đầy đủ các triệu chứng bệnh trong 10 đến 15 ngày. Các dòng *Xac4*, *Xac5*, *Xac6* có độc lực yếu và các dòng *Xac2*, *Xac3*, *Xac7* có độc lực trung bình.



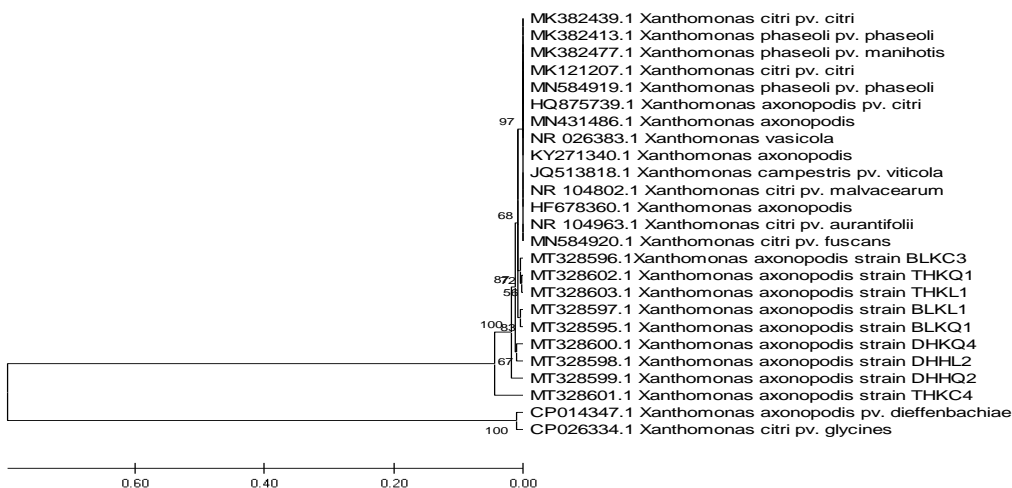
Hình 2. Triệu chứng bệnh loét trên lá, cành và quả chanh sau khi chủng vi khuẩn
A: Mặt dưới lá; B: Mặt trên lá; C: Mẫu lá đối chứng; D: Mẫu quả chủng vi khuẩn; E: Mẫu quả đối chứng.



Hình 3. Hình ảnh chụp SEM vết loét trên lá và quả chanh không hạt
A, B: Lá chùng vi khuẩn; C: Lá đối chứng; D, E: Quả chùng vi khuẩn; F: Quả đối chứng.

Định danh dựa vào trình tự vùng 16S rRNA

Mười tám dòng vi khuẩn phân lập gây bệnh loét sớm, điển hình được chọn để trích ly DNA, khuếch đại vùng 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR. Kết quả PCR tạo sản phẩm rõ nét với kích thước khoảng 1.500 bp. Kết quả Blast so sánh mức độ tương đồng của trình tự nghiên cứu với trình tự các dòng vi khuẩn lưu trữ trên ngân hàng gene cho thấy độ tương đồng từ 80% đến 99% với *X. citri*. Trình tự vùng 16S rRNA của 9 dòng vi khuẩn phân lập đã được đăng ký trên Ngân hàng gene mã số từ MT328595-MT328603.

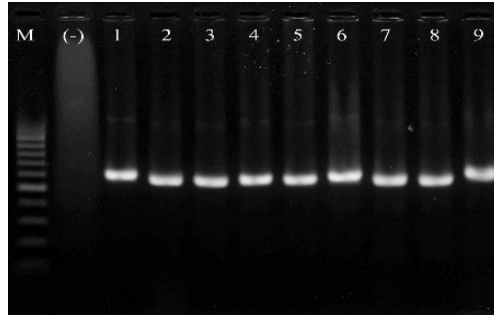


Hình 4. Cây phân loài xây dựng bằng phương pháp neighbour-joining, so sánh trình tự vùng gene 16S rRNA của 9 chủng vi khuẩn gây bệnh loét trên cây chanh tại Long An với 16 vùng 16S rRNA của vi khuẩn *Xanthomonas* khác nhau từ Ngân hàng gene

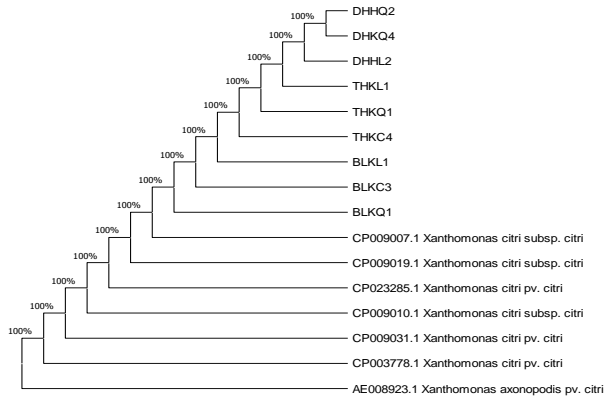
Kết quả phân tích dựa vào trình tự vùng 16S rRNA ở hình 4 cho thấy, 9 dòng vi khuẩn phân lập cùng nhóm loài với *X. citri* có nguồn gốc từ Mỹ (NR104802; NR104963), Bỉ (MN584920), Trung Quốc (MK121207), New Zealand (MK382439) và *X. axonopodis* có nguồn gốc từ Thái Lan (HQ875739), Trung Quốc (MN431486), Brazil (KY271340), Pakistan (HF678360).

Đặc điểm trình tự nucleotide vùng gene *hrpW*

Mười tám dòng vi khuẩn phân lập có kết quả giải trình tự 16S rRNA tiếp tục được khuếch đại vùng gene *hrpW* sử dụng cặp primer XacF và XacR. Kết quả PCR cho thấy, chỉ có 9 trong 18 dòng vi khuẩn phân lập có sản phẩm đoạn gene *hrpW* (Hình 5). Trình tự đoạn gene *hrpW* 561 bp của 9 dòng vi khuẩn được so sánh với nhau và so sánh với các loài *Xanthomonas* gây bệnh loét trên cây chanh và cây có múi lấy từ ngân hàng gene thế giới. Kết quả so trình tự trên Mega 10 cho thấy, 9 dòng vi khuẩn phân lập không có sự sai khác về các vị trí nucleotide với các mẫu trên thế giới (Mỹ: CP009007.1; CP009019.1; CP023285.1; CP009010.1; CP009031.1; CP003778.1 và Brazil: AE008923.1). Dựa trên cây phát sinh loài vùng gene *hrpW*, 9 dòng vi khuẩn phân lập là *X. axonopodis*, cùng nhóm với các vi khuẩn *X. axonopodis* phân lập ở Brazil và *X. citri* ở Mỹ và có mức tương đồng di truyền lên đến 100% (Hình 6).



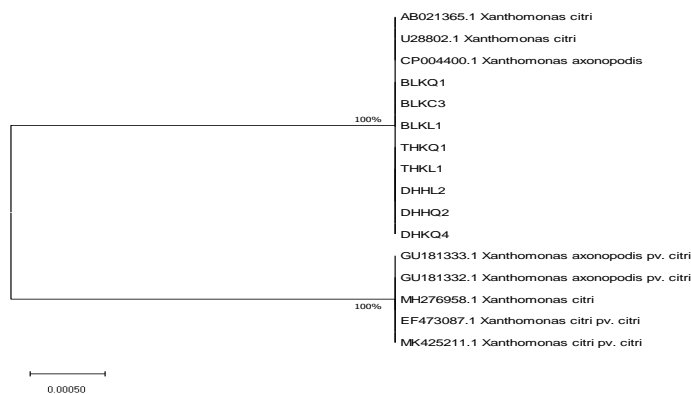
Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng gene *hrpW* của 9 dòng vi khuẩn phân lập. M: thang chuẩn 100 bp; (-): đối chứng âm; Lane 1-9 (A): BLKQ1, BLKC3, BLKL1, DHHL2, DHHQ2, DHKQ4, THKQ1, THKL1, THKC4



Hình 6. Phân nhóm di truyền 9 dòng vi khuẩn nghiên cứu dựa trên trình tự gene *hrpW*, xây dựng theo phương pháp Maximum Composite Likelihood. Phần trăm giá trị bootstrap từ 1000 lần lặp lại được chỉ trên các nhánh

Đặc điểm trình tự nucleotide vùng gene *pthA*

Chín dòng vi khuẩn phân lập có đoạn gene *hrpW* được tiếp tục khảo sát vùng gene *pthA*. Kết quả PCR cho thấy 8 trong 9 dòng vi khuẩn phân lập tạo sản phẩm có kích thước khoảng 198 bp khi phân tích trên gel agarose 1.5%. Riêng dòng THKC4 phân lập từ Thanh Hóa, Long An không tạo sản phẩm trong khi vẫn tạo vết bệnh với quầng vàng, bìa sũng ướt khi chủng bệnh nhân tạo.



Hình 7. Phân nhóm di truyền 9 dòng vi khuẩn nghiên cứu dựa trên trình tự gene *pthA*, xây dựng theo phương pháp Maximum Composite Likelihood. Phần trăm giá trị bootstrap từ 1000 lần lặp lại được chỉ trên các nhánh

Kết quả so dòng cho thấy, 8 dòng vi khuẩn phân lập ở Long An có 1 điểm sai khác C-T ở vị trí nucleotide thứ 181 so với loài *X. citri* ở Argentina (MK425211.1), Đài Loan (GU181333.1; GU181332.1), Mỹ (EF473087.1) và Trung Quốc (MH276958.1) nhưng giống hoàn toàn với *X. citri* ở Trung Quốc (U28802.1), Nhật Bản (AB021365.1) và *X. axonopodis* ở Trung Quốc (CP004400.1). Tuy nhiên, dựa trên cơ sở tiến hóa của vùng gene *pthA*, 8 dòng vi khuẩn phân lập trên cây chanh ở Long An và các dòng *Xanthomonas* gây bệnh loét trên cây có múi trên thế giới nằm cùng một nhóm và có quan hệ di truyền rất gần gũi, mức tương đồng lên đến 100% (Hình 7).

KẾT LUẬN

Dựa vào đặc điểm hình thái, sinh hóa, khả năng gây bệnh, trình tự gene 16S rRNA, *hrpW* và *pthA*, nghiên cứu này đã xác định được vi khuẩn gây bệnh loét trên cây chanh không hạt và chanh ta ở 3 huyện Bến Lức, Thạnh Hóa và Đức Huệ, Long An là *Xanthomonas axonopodis* dạng A. Kết quả nghiên cứu này sẽ làm nền tảng cho việc nghiên cứu các giải pháp để kiểm soát bệnh loét trên cây chanh và các cây trồng khác có cùng tác nhân gây hại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abhang PB, Totawar MV, Kadam R (2015). Biochemical characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* for identification of citrus canker disease. *J Basic Sci* 10:30-33.
- Alegria MC, Docena C, Khater L, Ramos CHI, da Silva ACR, Farah CS 2004. New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri*. *J Bacteriol* 186: 6186-6197.
- Bhardwaj N, Upadhyay V and Nagar M (2014). Biochemical characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causal agent of citrus canker. *The Bioscan* 9(1): 429-431.
- Cubero J and Graham JH (2002). Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Appl Environ Microbiol* 68:1257-1264.
- da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LM, do Amaral AM, Bertolini MC, Camargo LE, Camarotte G, Cannavan F, et al (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417: 459-463.
- Das AK (2003). Citrus canker – a review. *J Appl Hort* 5: 52-60.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) (2005). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. OEPP/EPPO Bulletin 35: 289-294.
- Graham JH, Gottwald TR, Cubero J and Achor DS (2004). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors effecting successful eradication of citrus canker. *Mol Plant Pathol* 5(1): 1-15.
- Lane DJ (1991). 16S/23S rRNA sequencing. 115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.
- Lelliott RA and Stead DE (1987). *Methods for the diagnosis of bacterial disease of plants*. Blackwell Scientific Publishers, Oxford, UK. p. 215.
- Mubeen M, Arshad HMI, Iftikhar YR, Irfan UM and Bilqees I (2015). Biochemical characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: a gram negative bacterium causing citrus canker. *Inter J Sci and Nature* 6(2): 151-154.
- Park DS, Hyun JW, Park YJ, Kim J (2006). Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on *hrpW* gene sequences. *Microbiol Res* 161(2): 145-149.
- Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, Sechler A, Agarkova I, Stormberg PE, Stormberg VK, Vidaver AK (2006). Emended classification of *Xanthomonad* pathogens on citrus. *Syst Appl Microbiol* 29: 690-695.
- Tung SY, Kuo TT (2000). Isolation and characterization of mutants of the citrus canker pathogene *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* that induce a distinct pattern of disease. *Can J Bot* 78: 1002-1009.
- Whittle AM (1992). Diseases and pests of citrus in Vietnam. *FAO Plant Protection Bulletin* 40: 75-81.
- Yang YN and Gabriel DW (1995). *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. *Mol Plant Microbe Interact* 8:627-631.

CHARACTERISTICS OF *hrpW* AND *pthA* GENES OF *Xanthomonas axonopodis* CAUSED CANKER DISEASE IN LIME TREE

Nguyen Thi My Le^{1,2*}, Nguyen Thi Ngoc Loan², Vo Thi Thu Oanh², Tran Thi Le Minh², Nguyen Vu Phong²

¹ Ho Chi Minh City University of Food Industry

² Nong Lam University - Ho Chi Minh City

SUMMARY

Canker disease is a serious disease wherever lime growing areas, cause reducing fruit quality, and yield. In this study, pathogenic bacteria of lime tree canker were isolated, tested their pathogenicity, and identified base on the biochemical characteristic and also 16S rRNA sequence. The results showed that canker disease of lime tree caused by *Xanthomonas axonopodis*. Among 56 isolates, 9 isolates showed highly virulence after 7 to 9 days of incubation. The sequence of *hrpW* gene with size of 561 bp is similar 100% to *Xanthomonas axonopodis* species that have been published in Genbank. The sequence of *pthA* gene of 8 isolates with size of 198 bp had same mutation at the 181th bp compared to *Xanthomonas* species causing lime tree canker in Argentina, Taiwan, and China. This is the first report on comparing the pair of *pthA* and *hrpW* genes of *Xanthomonas axonopodis* causing canker disease in the lime tree in Vietnam.

Keywords: Canker disease, *Xanthomonas axonopodis*, lime tree, *pthA* gene, *hrpW* gene.

* Author for correspondence: lentm@hufi.edu.vn; nvphong@hcmuaf.edu.vn