

**ĐÁNH GIÁ THÀNH PHẦN MỘT SỐ NẤM BỆNH THUỘC GIỚI PHỤ Stramenopiles
TRONG ĐẤT TRỒNG TIÊU TẠI HUYỆN CỤ M'GAR TỈNH ĐẮK LẮK
TỪ DỮ LIỆU TRÌNH TỰ 18S rRNA METAGENOME**

**Identification of Composition of Some Fungal Pathogens of Stramenopiles
in Black Pepper Soils in Cq M'gar District of Đắk Lắk Province
Based on 18S rRNA Metagenome**

Phạm Thị Thúy Hoài^{1*}, Trần Đình Mẫn², Phạm Việt Cường¹,
Tôn Thất Hữu Đạt¹ và Nguyễn Văn Tụng³

Ngày nhận bài: 12.01.2019

Ngày chấp nhận: 22.02.2019

Abstract

Stramenopiles is one of the major line of eukaryotes with more than 25,000 identified species and including fungal genera that cause plant diseases such as *Phytophthora* and *Pythium*. In this study, diseased and disease-free pepper soil samples were used to assess the composition of Stramenopiles as well as the two plant pathogenic fungal genera *Phytophthora* and *Pythium* based on 18S rRNA HiSeq Illumina metagenome sequence data. The study results showed that there were differences in the composition and abundance of Stramenopiles between diseased and disease-free pepper soils. From the diseased pepper soil sample, we identified 29 species of Stramenopiles, while only 25 species of Stramenopiles were identified from non-diseased soil samples. The species of Stramenopiles in this study belonged to two classes Diatomea and Peronosporomycetes. Twenty species were detected in both diseased and non-diseased pepper soil samples, 9 species were found only in diseased soil samples and 5 species were only found in non-diseased soil samples. This study also showed that the proportion of pathogenic fungal genera in diseased pepper soil sample was higher than that of non-diseased pepper soil sample. Number of sequences of the genus *Phytophthora* and *Pythium* in diseased pepper soil sample accounted for 0.9% and 25% of Stramenopiles, respectively whereas the proportion of

-
1. Viện Nghiên cứu Khoa học Miền Trung – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
 2. Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
 3. Viện Nghiên cứu hệ gen – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

these two genera in non-diseased pepper soil sample only accounted for 0.8% and 5% of Stramenopiles, respectively.

Keywords: 18S rRNA metagenome; black pepper soil; *Pythium*, *Phytophthora*, black pepper disease, Stramenopiles.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Stramenopiles hoặc Heterokonts, trước đây được biết đến như Heterokonta là một trong những ngành sinh vật nhân thật với hơn 25.000 loài đã được xác định. Phần lớn các loài được tìm thấy trong giới phụ Stramenopile là tảo, từ tảo đa bào khổng lồ đến tảo đơn bào và sinh vật phù du. Ngoài ra, trong giới phụ Stramenopiles còn bao gồm hai chi nấm gây bệnh thực vật là *Phytophthora* và *Pythium*. Hai chi nấm này là một trong các tác nhân chính gây bệnh chết nhanh và chết chậm (Barat, 1952, G. 1. Robertson.1980; Randy C. Ploetz, 2004). Vì vậy, việc nghiên cứu tìm ra nấm bệnh nằm trong giới phụ Stramenopiles là rất cần thiết để có biện pháp phòng trừ bệnh hiệu quả.

Các nghiên cứu trước đây đã phân lập và xác định được rất nhiều vi sinh vật trong đất, tuy nhiên phần lớn các vi sinh vật không thể phát triển được trong môi trường phòng thí nghiệm và chỉ một tỷ lệ rất thấp vi sinh vật có thể được phát hiện bằng phương pháp nuôi cấy trong phòng thí nghiệm. Trong những năm gần đây, việc phát triển các công cụ mới như metagenomics cho phép các nhà nghiên cứu xác định được các vi sinh vật trực tiếp từ các mẫu môi trường không qua nuôi cấy. Phương pháp này cho phép phát hiện được vi sinh vật không nuôi cấy được hoặc chưa nuôi cấy được bằng phương pháp nuôi cấy truyền thống. Đã có nhiều nghiên cứu sử dụng phương pháp metagenomics trong nghiên cứu đa dạng vi sinh vật đất. Rolf Daniel, 2005 đã nghiên cứu metagenome của đất để xây dựng các thư viện DNA và phân tích sự đa dạng của các vi sinh vật đất cũng như nghiên cứu các chức năng của các cộng đồng vi sinh vật đất. Trong một nghiên cứu khác, Xu và cộng sự đã khảo sát các đặc tính phát sinh và phát triển chức năng của các cộng đồng vi sinh vật trong đất từ 33 mẫu metagenome tại 5 vùng đất khác nhau: đồng cỏ, đất rừng, sa mạc, vùng Bắc Cực, và trầm tích rừng ngập mặn (Xu và cs, 2014). Ngoài ra, Castaneda và Barbosa cũng đã sử dụng metagenomics để nghiên cứu đa dạng sinh học và chuyển hóa của cộng đồng vi khuẩn có trong rừng và đất trồng nho ở Chile. Kết

quả nghiên cứu cho thấy cả hai môi trường có thành phần vi khuẩn tương đối giống nhau. Các chi chiếm tỷ lệ lớn nhất trong hai môi trường sinh thái này là vi khuẩn *Candidatus solibacter*, *Bradyrhizobium* và nấm *Gibberella*. (Castaneda và Barbosa, 2017). Tại Việt Nam, Hoàng Quốc Khánh và Nguyễn Bích Ngọc (2013) đã ứng dụng kỹ thuật metagenomics để khảo sát sự đa dạng của gen laccase ở nấm trong mẫu đất rừng Nam Cát Tiên và kết quả đã kiểm chứng được sự có mặt của sinh vật sinh laccase trong mẫu đất nghiên cứu.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá thành phần của giới phụ Stramenopiles cũng như hai chi nấm gây bệnh *Phytophthora* và *Pythium* từ các mẫu đất trồng hồ tiêu bị bệnh và không bị bệnh dựa vào dữ liệu trình tự 18S rRNA HiSeq Illumina metagenome.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu: các mẫu đất thu thập từ các vườn hồ tiêu bị vàng lá, thối rễ và vườn không bị bệnh tại huyện Cư M'gar, tỉnh Đắk Lắk. Các mẫu đất được lấy ở độ sâu 5-30 cm, mỗi vườn lấy 10 điểm và trộn đều chia 4 phần theo đường chéo, chọn hai phần đối diện nhau để lấy mẫu trung bình, lượng mẫu là 1kg, cho mẫu đất vào túi polypropylen đã được khử trùng ghi đầy đủ địa điểm, ngày, tên người lấy mẫu và giữ ở 4°C, đem về phòng thí nghiệm để tách chiết DNA tổng số và bảo quản ở -20°C cho các nghiên cứu tiếp theo.

Phương pháp tách chiết DNA tổng số của hai mẫu đất lấy từ vườn tiêu bị bệnh và không bị bệnh: sử dụng bộ KIT tách chiết DNA metagenome từ đất (PowerMax® - Catalog No.12988-10) của công ty MO BIO Laboratories.

Phương pháp phân tích tin sinh học: Dữ liệu 18S rRNA metagenome của khu hệ vi sinh vật đất từ vùng trồng hồ tiêu bị bệnh và không bị bệnh được giải trình tự 2 chiều bằng thiết bị giải trình tự thế hệ mới Illumina HiSeq. Dữ liệu thô được lưu trữ dưới dạng file fastq. Chất lượng được trình tự được đánh giá bằng phần mềm FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Hai file fastq được ghép với nhau bằng phần mềm FLASH (Magoč, 2011).

Các đoạn trình tự kém chất lượng bị loại bỏ bằng phần mềm Qiime (Caporaso và cs, 2010). Dữ liệu sau khi tinh sạch se được chia thành các OTU bằng phần mềm Upase (Edgar, Robert, 2013). Trong đó, các đoạn trình tự giống nhau $\geq 97\%$ se được xếp vào một OTU. Các OTU được chú giải phân loài bằng phần mềm Mothur trên cơ sở dữ liệu SILVA (Quast và cs, 2013). Đối với tính xác thực của trình tự phân tích, dữ liệu thô se được hợp nhất và lọc để chuẩn hóa dữ liệu.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Đa dạng thành phần loài của giới phụ Stramenopiles từ các mẫu đất tiêu bị bệnh và đất tiêu không bị bệnh

Kết quả phân tích dữ liệu 18S rRNA metagenome từ hai mẫu đất trồng tiêu bị bệnh và không bị bệnh tỷ lệ vi sinh vật thuộc giới phụ

Stramenopiles giữa hai mẫu đất là khác nhau. Trong mẫu đất trồng tiêu bị bệnh, Stramenopiles chiếm 6% sinh vật tổng số, trong khi đó tỷ lệ Stramenopiles trong mẫu đất trồng tiêu không bị bệnh chiếm 4% sinh vật tổng số.

Kết quả phân tích cung cho thấy sự khác biệt giữa thành phần loài của giới phụ Stramenopiles giữa mẫu đất tiêu bị bệnh và đất tiêu không bị bệnh. Đã xác định được 29 loài được xác định thuộc giới phụ Stramenopiles từ mẫu đất vườn tiêu bị bệnh, trong khi đó chỉ có 25 loài thuộc giới phụ Stramenopiles được tìm thấy từ mẫu đất vườn tiêu không bị bệnh.

Trong đó, có 20 loài được tìm thấy trong cả hai mẫu đất (bảng 1), 9 loài chỉ được tìm thấy trong mẫu đất vườn tiêu bị bệnh và có 5 loài chỉ được tìm thấy trong mẫu đất vườn tiêu không bị bệnh (bảng 2).

Bảng 1. Thành phần và tỷ lệ các loài thuộc của giới phụ Stramenopiles xác định được trong hai mẫu đất tiêu bị bệnh (D1) và không bị bệnh (D2)

1	<i>Cyclotella meneghiniana</i>	0,000656667	0,000246
2	<i>Cyclotella choctawhatcheeana</i>	0,000656667	0,000738
3	<i>Skeletonema subsalsum</i>	0,000328333	0,028301
4	<i>Ditylum brightwellii</i>	0,000328333	0,000246
5	<i>Phytophthora nicotianae</i>	0,008531367	0,007629
6	<i>Pythium splendens</i>	0,2415031	0,013781
7	<i>Pythium monospermum</i>	0,001313333	0,000493
8	Unidentified	0,000164	0,016242
9	<i>Poterioochromonas malhamensis</i>	0,082196367	0,035684
10	<i>Ochromonadaceae environmental sample</i>	0,058407	0,022641
11	<i>Ochromonadaceae environmental sample</i>	0,042328667	0,028547
12	<i>Eustigmatos magnus</i>	0,000164	0,000493
13	Unculturedstramenopile	0,001148333	0,006399
14	<i>Diplophrys</i> sp. ATCC 50360	0,011648583	0,00566
15	<i>Caecitellus parvulus</i>	0,008859483	0,008613
16	<i>Stramenopile</i> sp. MAST-12KKTS_D3	0,00082	0,013535
17	<i>Adriamonas peritocrescens</i>	0,00082	0,015504
18	Unculturedeukaryote	0,08137605	0,103607
19	Unculturedeukaryote	0,001968783	0,000246
20	<i>Oikomonas</i> sp. SA-2.1	0,00344535	0,000246

Bảng 2. Thành phần và tỷ lệ các loài thuộc giới phụ Stramenopiles chỉ có trong mẫu đất tiêu bị bệnh hoặc mẫu đất tiêu không bị bệnh

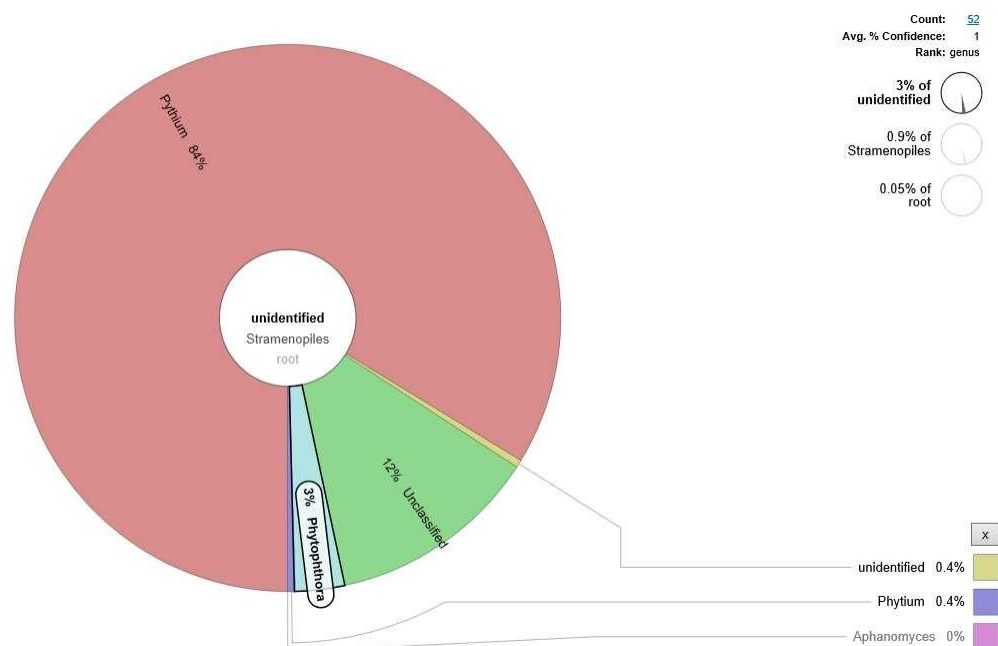
TT	Loài	[%]/tổng số Eukaryote	[%]/Stramenopiles tổng số
Các loài chỉ có trong mẫu đất tiêu bị bệnh			
1	<i>Lithodesmium undulatum</i>	0,00000984	0,000164
2	<i>Skeletonema menzellii</i>	0,00000984	0,000164
3	<i>Amphora montana</i>	0,000846573	0,01410955

TT	Loài	[%]/tổng số Eukaryote	[%]/Stramenopiles tổng số
4	<i>Pelagomonas calceolata</i>	0,0000591	0,000985
5	<i>Bicosoeca petiolata</i>	0,000442974	0,0073829
6	<i>Leukarachnion</i> sp. ATCC_PRA-24	0,000315004	0,005250067
7	<i>Uncultured marine eukaryote</i>	0,00000984	0,000164
8	<i>Uncultured eukaryote</i>	0,00012797	0,002132833
9	<i>Uncultured chrysophyte</i>	0,000196878	0,0032813
Các loài chỉ có trong mẫu đất tiêu không bị bệnh			
1	<i>Melosira varians</i>	0,000265785	0,006644625
2	<i>Oikomonas</i> sp. SA-2.1	0,00000984	0,000246
3	Spumella like flagellate JBC27	0,000108283	0,002707075
4	Spumella like flagellate JBNZ43	0,0000788	0,00197
5	<i>Chrysophyceae</i> sp. CCMP2296	0,0000492	0,00123

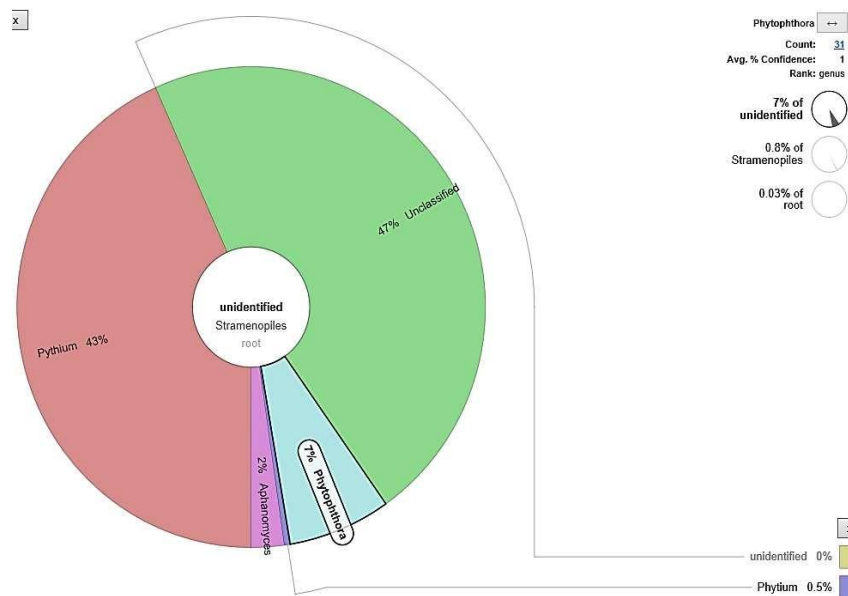
3.2 Một số chi nấm gây bệnh chính thuộc giới phụ Stramenopiles trong hai mẫu đất nghiên cứu

Hai chi nấm *Phytophthora* và *Pythium* là một trong các tác nhân chính gây bệnh chết nhanh và chết chậm cho cây trồng, vì vậy thành phần và sự phong phú của hai chi này

đã được phân tích trong nghiên cứu này. Trong mẫu đất trồng tiêu bị bệnh, chi *Phytophthora* chiếm 0,9% so với vi sinh vật tổng số ngành Stramenopiles, trong khi đó, trong mẫu đất vườn tiêu khỏe, chi *Phytophthora* chiếm thấp hơn nhẹ (0,8% so với vi sinh vật tổng số giới Stramenopiles).



Hình 1. Biểu đồ Krona biểu thị thành phần và tỷ lệ chi *Phytophthora* thuộc giới phụ Stramenopiles trong mẫu đất vườn tiêu bị bệnh (ô góc phải phía trên chỉ tỷ lệ % so với Stramenopiles tổng số, các ô phía dưới chỉ dẫn các thành phần khác có tỷ lệ thấp không chú dẫn được trên biểu đồ)

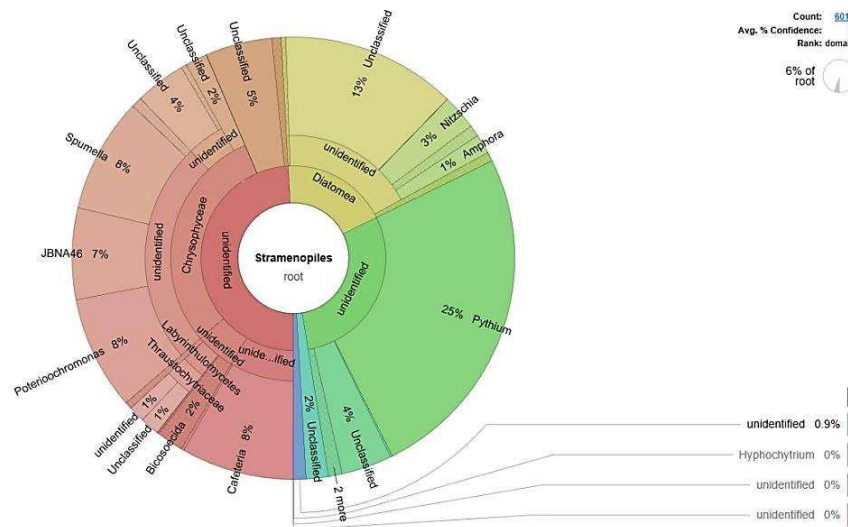


Hình 2. Biểu đồ Krona biểu thị thành phần và tỷ lệ chi **Phytophthora** thuộc giới phụ Stramenopiles trong mẫu đất vườn tiêu không bị bệnh.

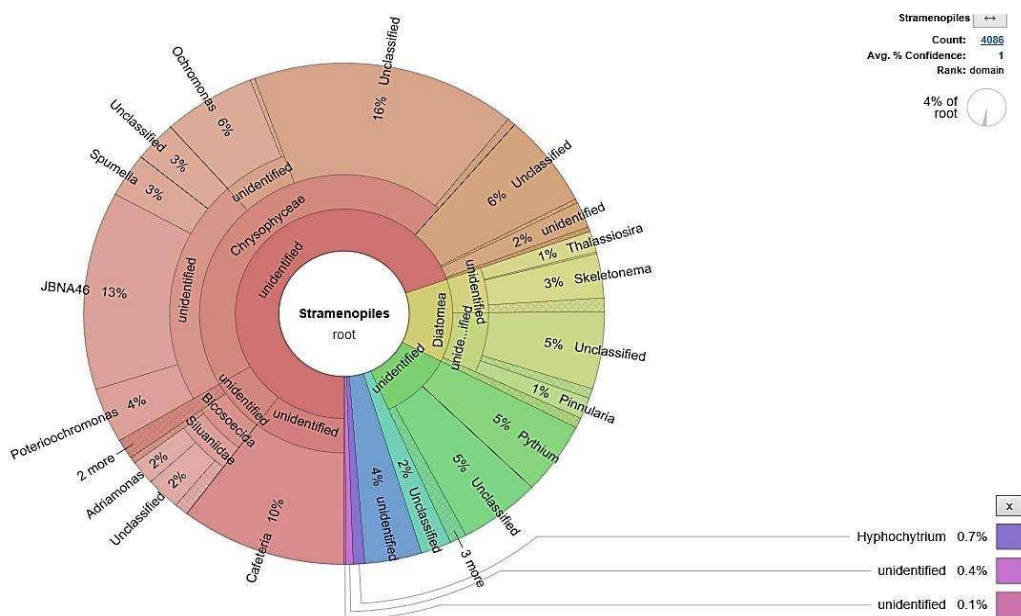
Trong số các chi được phát hiện trong giới Stramenopiles, chi *Pythium* chiếm số lượng lớn nhất. Chi *Pythium* chiếm 25% trong mẫu đất vườn tiêu bị bệnh vàng lá, thối rễ và 5% trong mẫu đất vườn tiêu không bị bệnh. Chi *Pythium* có 2 loài đã được phát hiện trong hai mẫu đất phân tích là *Pythium splendens* và *Pythium monospermum*. Số liệu phân tích cung cho thấy, trong mẫu đất vườn tiêu bị bệnh, *Pythium splendens* chiếm 99,4% và *Pythium*

monospermum chỉ chiếm 0,54%, trong khi đó ở mẫu đất vườn tiêu không bị bệnh, *Pythium splendens* chiếm 96,5% còn *Pythium monospermum* chiếm 3,5%.

So với Stramenopiles tổng số, loài nấm *P. Splendens* gây bệnh thối rễ thực vật chiếm tới 24% trong vườn tiêu bị bệnh vàng lá, thối rễ trong khi đó ở vườn tiêu khỏe nấm *P. Splendens* chỉ chiếm 1,3% so với tổng số Stramenopiles trong vườn này.



Hình 3. Biểu đồ Krona biểu thị thành phần và tỷ lệ vi sinh vật thuộc giới phụ Stramenopiles trong mẫu đất vườn tiêu bị bệnh.



Hình 4. Biểu đồ Krona biểu thị thành phần và tỷ lệ vi sinh vật thuộc giới phụ Stramenopiles trong mẫu đất vườn tiêu không bị bệnh.

Cả hai mẫu đất đều có các đối tượng gây bệnh hồ tiêu thuộc hai chi *Phytophthora* và *Pythium*. Hai chi này trong mẫu đất bị bệnh đều chiếm số lượng vượt trội so với trong mẫu đất tiêu vườn không bị bệnh.

Nấm *Phytophthora nicotianae* đều xuất hiện trong cả hai mẫu đất với tỷ lệ 0,9% và 0,8% lần lượt trong mẫu đất vườn tiêu bị bệnh và mẫu đất vườn tiêu không bị bệnh. Ký chủ của loài này rộng, bao gồm 255 chi từ 90 họ chủ yếu hại trên hồ tiêu, bông, cây có múi, cây cảnh, thuốc lá, hành tây, cà chua (Gallegly & Hong, 2008).

Trong chi nấm *Pythium*, *Pythium splendens* là nấm gây bệnh thối rễ, thối thân và củ, quả thực vật (Robertson.1980). Trong khi nấm *Pythium monospermum* là nấm có khả năng đối kháng với tuyến trùng và trứng của tuyến trùng; sợi nấm xuyên vào và phá hủy tuyến trùng. *Pythium* cũng được chứng minh là xuất hiện nhiều hơn trên đất có canh tác (Robertson.1980; Ploetz, 2004). Năm 2007, Ngô Vĩnh Viễn nghiên cứu nguyên nhân gây suy thoái vườn tiêu tại các huyện Cam lộ (Quảng Trị), Chư Sê (Gia Lai), Xuân Lộc (Đồng Nai), Phú Quốc (Kiên Giang) và xác định được nguyên nhân gây bệnh là do hai nhóm nấm *Phytophthora* và *Pythium*.

4. KẾT LUẬN

Từ dữ liệu trình tự gen 18S rRNA metagenome tách từ hai mẫu đất trồng hồ tiêu tại huyện Cư M'gar, tỉnh Đắk Lắk, bước đầu đã xác định được thành phần các loài trong giới Stramenopiles xuất hiện 2 lớp Diatomea và Peronosporomycetes (hay lớp Oomycota). Chi *Pythium* chiếm ưu thế trong giới Stramenopiles với 25% so với tổng số Stramenopiles trong mẫu đất vườn tiêu bị bệnh vàng lá, thối rễ và 5% so với tổng số Stramenopiles trong mẫu đất vườn tiêu không bị bệnh. Đặc biệt loài nấm *P. splendens* gây bệnh thối rễ thực vật chiếm tới 24% so với tổng số Stramenopiles trong vườn tiêu bị bệnh vàng lá, thối rễ trong khi đó ở vườn tiêu khỏe loài nấm này chỉ chiếm 1,3% so với tổng số Stramenopiles

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ bởi đề tài Độc lập cấp Nhà nước thuộc Chương trình Tây Nguyên 3: “Nghiên cứu hoàn thiện và chuyển giao công nghệ sản xuất sản phẩm sinh học POLYFA-TN3 góp phần cải tạo đất cho vùng Tây Nguyên”, mã số đề tài: TN3/C10 – VAST; chương trình đào tạo tiến sĩ của Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ngô Vĩnh Viễn, 2007. Báo cáo dịch hại trên hồ tiêu và biện pháp phòng trừ. Hội thảo sâu bệnh hại tiêu và biện pháp phòng trừ. Đắc Nông, tháng 7 năm 2007: 1-8.
2. Hoàng Quốc Khánh, Nguyễn Bích Ngọc, 2013. Ứng dụng kỹ thuật metagenomics để nhận diện gene mã hóa laccase của nấm Basidiomycetes trong mẫu đất rừng Nam Cát Tiên. *Tạp chí phát triển KH&CN*, Tập 16, Số T3: 60-74.
3. G. I. Robertson, 1980. The genus *Pythium* in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*. 18:1, 73-102, ISSN: 0028-825X.
4. Randy C. Ploetz, 2004. Influence of temperature on *Pythium splendens* – induced root disease on carambola, *Averrhoa carambola*. *Mycopathologia* 157: 225–231.
5. Gallegly, M. E. and Hong, C. 2008. *Phytophthora* – identifying species by morphology and DNA fingerprints. St. Paul, MN, USA: APS Press. 158 p.
6. Caporaso JG, et al, 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, 10.1038/nmeth.f.303.
7. Magoč, Tanja, and Steven L. Salzberg, 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27.21: 2957-2963.
8. Zhuofei Xu, Martin Asser Hansen, Lars H. Hansen, Samuel Jacquiod, Søren J. Sørensen, 2014. Bioinformatic Approaches Reveal Metagenomic Characterization of Soil Microbial Community. *PLoS ONE* 9(4): e93445.
9. Edgar, Robert C, 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods* 10.10: 996-998.
10. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO, 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.:* D590-D596.
11. Luis E. Castañeda and Olga Barbosa, 2017. Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil 2 microbial communities in Chilean vineyards and surrounding native forests. *PeerJ* 5:e3098

Phản biện: TS. Đặng Vũ Thị Thanh