

XÁC ĐỊNH NẤM *ARCOPIBUS AUREUS* VÀ *CHAETOMIUM GLOBOSUM* BẰNG GIẢI TRÌNH TỰ VÙNG GEN β -TUBULIN

Nguyễn Đức Thành¹, Nguyễn Thế Quyết¹,
Hà Viết Cường² và Phạm Xuân Hội¹

TÓM TẮT

Các loài nấm *Chaetomium* được nghiên cứu sử dụng như một tác nhân sinh học phòng trừ tác nhân gây bệnh cây. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định nấm *Chaetomium* từ các mẫu đất thu thập, mẫu đất được thu thập từ đất trồng cây sấu riêng tại tỉnh Tiền Giang và Vĩnh Long trong năm 2017. Các loài nấm *Chaetomium* được phân lập bằng kỹ thuật bẫy đất với các mảnh giấy lọc và được định danh tên loài bằng kỹ thuật truyền thống, sinh học phân tử. Kết quả cho thấy quả thể nấm xuất hiện trên môi trường PDA sau khoảng 20 ngày nuôi cấy, hình cầu méo, màu vàng nhạt, màu xám. Phản ứng PCR đã nhận được đoạn gen β -tubulin của nấm với kích thước khoảng 700 bp. Phân tích phả hệ đã xác định được loài *Arcopilus aureus* thuộc chi *Arcopilus* và loài *Chaetomium globosum* thuộc chi *Chaetomium*. Trong đó, nấm *Ar. aureus* là loài lần đầu tiên được ghi nhận từ đất trồng trọt ở Việt Nam.

Từ khóa: *Arcopilus*, *Chaetomium*, sấu riêng, đất, gen β -tubulin

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đồng bằng sông Cửu Long là vựa trái cây của cả nước, trong đó, cây sấu riêng (*Durio zibethinus* Murr.) là một trong những loại trái cây mang lại hiệu quả kinh tế cao, được trồng quy mô lớn ở các tỉnh Tiền Giang, Vĩnh Long... Tuy nhiên, ngành sản xuất cây sấu riêng đang gặp nhiều trở ngại, một trong những nguyên nhân là do dịch bệnh hại cây trồng gây ra, ảnh hưởng của xâm nhập mặn ngày càng diễn biến phức tạp. Hiện nay, việc nghiên cứu sử dụng vi sinh vật như một tác nhân sinh học trong sản xuất sấu riêng là điều cần thiết, giúp phục vụ canh tác theo hướng bền vững, an toàn.

Nấm thuộc chi *Chaetomium*, họ *Chaetomiaceae* là một trong những loại nấm túi hoại sinh lớn nhất với trên 400 loài đã được mô tả (von Arx *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 2016a). Các loài nấm *Chaetomium* được nghiên cứu sử dụng như một tác nhân sinh học phòng trừ tác nhân gây bệnh cây. Vì trình tự phần đầu 5' của gen β -tubulin (tub2) đã được chứng tỏ hiệu quả hơn trình tự gen ITS (vùng liên gen) nhằm phân biệt các nấm *Chaetomium* ở mức loài (Wang *et al.*, 2016b) nên trong nghiên cứu này, cặp môi T1/T2 (O'Donnell and Cigelnik, 1997) đã được sử dụng để nhân đoạn khoảng 700 bp đầu 5' của gen β -tubulin.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nấm đối kháng phân lập từ đất trồng cây sấu riêng. Môi trường WA (water agar), môi trường PDA (potato dextrose agar). Hóa chất dùng trong kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) có nguồn gốc từ Wako (Nhật Bản), Macrogen (Hàn Quốc).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu mẫu, phân lập nấm

a) Phương pháp thu mẫu

Tổng số có 10 mẫu đất trồng cây sấu riêng được thu thập ở độ sâu tầng đất 15 - 20 cm, với lượng 500 g đất/mẫu được đựng trong hộp nhựa có nắp, dán nhãn ghi thông tin mẫu.

b) Phương pháp phân lập nấm

Các mẫu đất được phơi khô và nghiền nhỏ, sau đó đất nghiền được cho vào đĩa petri loại đường kính 90 mm với lượng khoảng 2/3 đĩa. Đất được làm ẩm bằng nước cất vô trùng. Các mảnh giấy lọc vô trùng, kích thước khoảng 1 x 1 cm được đặt trên bề mặt đất trong đĩa petri. Khi quả thể xuất hiện thì chuyển lên môi trường WA có bổ sung ampicillin (100 mg/l), sau đó tiếp tục cấy truyền lên môi trường PDA.

2.2.2. Phương pháp xác định danh tính nấm bằng kỹ thuật truyền thống

Nấm thuộc chi *Chaetomium* được phân loại dựa vào đặc điểm hình thái theo khóa phân loại của von Arx và cộng tác viên (1986), Soyong và Quimio (1989).

2.2.3. Phương pháp xác định danh tính nấm bằng PCR và giải trình tự

a) Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của nấm được chiết bằng phương pháp CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) theo tài liệu mô tả của Doyle & Doyle (1987). DNA tổng số được hòa trong 50 μ l đệm TE và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp; ² Học viện Nông nghiệp Việt Nam

b) Phản ứng PCR

Sử dụng cặp môi T1/T2 (O'Donnell & Cigelnik, 1997) để nhân gen β -tubulin. Cho vào mỗi ống PCR loại 0,5 ml với tổng thể tích phản ứng là 25 μ l, trong đó có chứa 2,5 μ l đệm PCR; 0,5 μ l DNA tổng số; 0,5 μ l dNTPs; 1 μ l mỗi loại mỗi và 0,2 μ l Taq polymerase. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%.

c) Tinh sạch sản phẩm PCR và giải trình tự

Sản phẩm PCR được tinh sạch dùng PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Giải trình tự trực tiếp với bộ mỗi dùng trong phản ứng PCR, gửi đọc trình tự tại hãng Macrogen (Hàn Quốc).

d) Phân tích trình tự sản phẩm PCR

Dựa vào các trình tự thu được, tìm kiếm cơ sở dữ liệu trên Ngân hàng Gen dùng phần mềm trực tuyến BLAST tại NCBI (the National Center for Biotechnology Information, Hoa Kỳ). Quan hệ phả hệ của các mẫu nấm được phân tích với đại diện của 14 mẫu nấm chuẩn (type species) của 8 loài và đối chứng là loài *Achaetomium strumarium*. Phương pháp phân tích trình tự và phả hệ được thực hiện với các phần mềm BioEdit 7.0 (Hall, 1999), ClustalW2 (McWilliam *et al.*, 2013) và MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

Bảng 1. Một số loài nội dùng trong phân tích phả hệ vùng gen β -tubulin

| Loài nấm | Mẫu phân lập | Mã truy cập Ngân hàng Gen | Nguồn gốc phân lập | Quốc gia |
|-------------------------------|--------------|---------------------------|-----------------------------|------------|
| <i>Arcopilus aureus</i> | CBS 153.52 | KX976924 | Không rõ | Hoa Kỳ |
| <i>Ar. aureus</i> | CBS 538.73 | KX976925 | Phân động vật | Đông Phi |
| <i>Ar. cupreus</i> | CBS 560.80 | KX976926 | Phân động vật | Canada |
| <i>Ch. afropilosum</i> | CBS 145.38 | KT214751 | Không rõ | Không rõ |
| <i>Ch. ascotrichoides</i> | CBS 113.83 | KC109770 | <i>Gossypium humitectum</i> | Argentina |
| <i>Ch. ascotrichoides</i> | CBS 110.83 | KC109771 | Đất | Israel |
| <i>Ch. citrinum</i> | CBS 693.82 | KT214764 | Đất | Nhật Bản |
| <i>Ch. elatum</i> | CBS 910.70 | KC109775 | <i>Ammophila arenaris</i> | Đức |
| <i>Ch. elatum</i> | CBS 374.66 | KC109776 | Tàn dư thực vật | Hoa Kỳ |
| <i>Ch. fimeti</i> | CBS 139034 | KT214736 | Đất | Đức |
| <i>Ch. globosporum</i> | CBS 108.83 | KC109768 | <i>Triticum aestivum</i> | Ấn Độ |
| <i>Ch. globosum</i> | CBS 160.62 | KT214742 | Phân chuồng | Đức |
| <i>Ch. globosum</i> | CBS 132.30 | KC109773 | Đất | Hoa Kỳ |
| <i>Ch. globosum</i> | CBS 164.62 | JN256190 | Không rõ | Ba Lan |
| <i>Achaetomium strumarium</i> | CBS 333.67 | AY681238 | Đất | Trung Quốc |

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Tổng số 10 mẫu được thu thập tại một số vùng trồng cây sấu riêng ở Tiền Giang và Vĩnh Long trong năm 2017. Thí nghiệm trong phòng được thực hiện tại Bộ môn Công nghệ vi sinh, Viện Di truyền Nông nghiệp và Trung tâm Nghiên cứu Bệnh cây nhiệt đới, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập nấm

Các mẫu đất được thu thập tại một số vùng trồng cây sấu riêng ở Tiền Giang và Vĩnh Long trong năm 2017. Nấm được phân lập từ đất bằng kỹ thuật đặt bẫy dùng giấy lọc. Kết quả thí nghiệm cho thấy, sau

khoảng 2 - 3 tuần, quả thể nấm *Chaetomium* xuất hiện trên bề mặt các bẫy giấy, các quả thể mọc tách biệt nhau, lông bám nhiều, có màu vàng nhạt (mẫu VL-SR01), xanh xám (mẫu TG-SR01) (hình không đưa ra).

3.2. Kết quả xác định danh tính nấm

3.2.1. Xác định danh tính nấm bằng kỹ thuật truyền thống

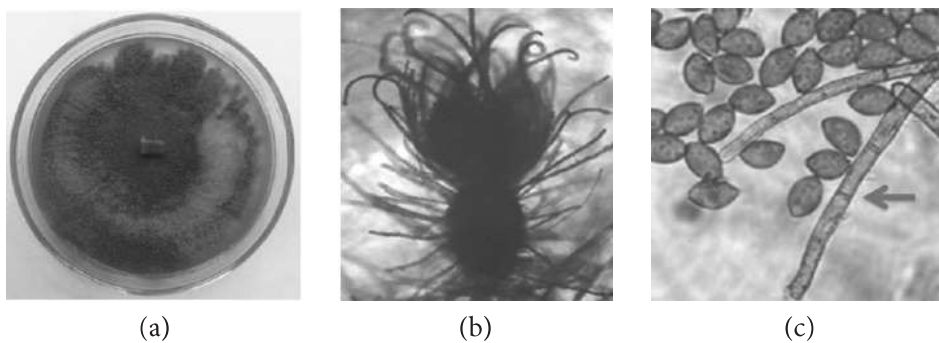
Các mẫu nấm VL-SR01 và TG-SR01 được nuôi cấy trên môi trường PDA để theo dõi một số đặc điểm hình thái, dựa vào khóa phân loại theo tài liệu của von Arx và cộng tác viên (1986), Soyton và Quimio (1989). Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Một số đặc điểm hình thái của mẫu nấm VL-SR01 và TG-SR01

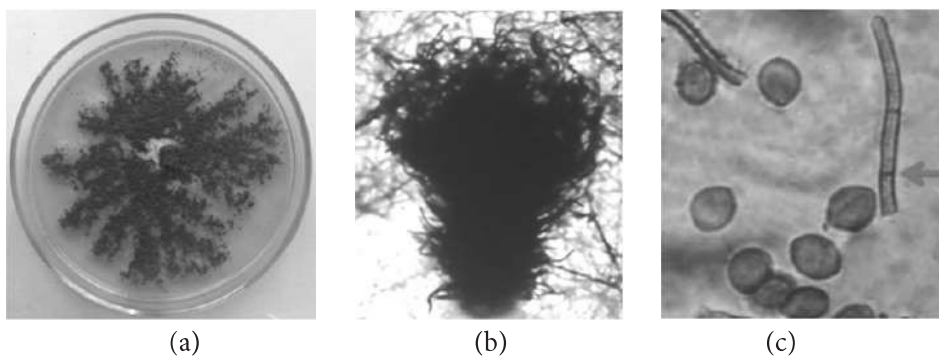
| TT | Chỉ tiêu theo dõi | Mẫu VL-SR01 | Mẫu TG-SR01 |
|----|---|--|---|
| 1 | Tản nấm | Mọc đều, dạng tròn đồng tâm. Sinh tiết sắc tố màu von Arx vàng nhạt-màu đỏ nhạt trên môi trường PDA | Mọc đều, dạng tròn đồng tâm. Không sinh tiết sắc tố trên môi trường PDA |
| 2 | Quả thể (ascomata) | Nổi trên bề mặt, có lỗ mở, hình cầu méo, màu vàng nhạt | Nổi trên bề mặt, gân hình cầu méo, màu xanh xám |
| 3 | Lông bám phần đầu quả thể (<i>terminal hairs</i>) | Cong lại với đỉnh cong xoắn về phía trong, có vách ngăn ngang | Dạng lượn sóng, xù xì, có vách ngăn ngang |
| 4 | Lông bám phần bên quả thể (<i>lateral hairs</i>) | Mềm mại, có đỉnh cong về phía trong, có vách ngăn ngang | Ngắn hơn so với lông bám phần đầu quả thể, hơi lượn sóng, có vách ngăn ngang |
| 5 | Túi (ascus) | Dạng bình, bên trong có chứa 8 bào tử túi | Dạng hình chùy, bên trong có chứa 8 bào tử túi |
| 6 | Bào tử túi (<i>ascospores</i>) | Hình thoi-hình quả thận. Ban đầu có màu trong suốt, sau chuyển sang màu nâu nhạt khi thành thực. Có 1 lỗ mầm | Hình quả chanh. Ban đầu có màu trong suốt, sau chuyển sang màu nâu nhạt khi thành thực. Có 1 lỗ mầm |

Các mẫu nấm VL-SR01 và TG-SR01 sau 10 ngày nuôi cấy có đường kính tản nấm là lớn nhất (đĩa petri 90 mm), quả thể xuất hiện trên đĩa nuôi cấy sau khoảng 20 ngày. Dựa vào khóa phân loại của von Arx và cộng tác viên (1986), Soyong và Quimio (1989), mẫu nấm VL-SR01 (Hình 1) được định danh là loài *Chaetomium aureus* Chivers thuộc chi *Chaetomium*. Mẫu nấm TG-SR01 (Hình 2) được định danh là loài *Chaetomium globosum* Kunze thuộc chi *Chaetomium*.

Ở Việt Nam, Lê Thị Ánh Hồng và cộng tác viên (2005) dựa vào đặc điểm hình thái đã định danh được 4 loài gồm *Ch. cupreum*, *Ch. globosum*, *Ch. mollicellum* và *Ch. cuniculorum* thuộc chi *Chaetomium* trên các mẫu đất trồng lúa, ngô, đậu tương, nhãn và cà phê. Tác giả Thiệp và Soyong (2015) dựa vào đặc điểm hình thái đã định danh thêm được 3 loài gồm *Ch. cochliodes*, *Ch. bostrychodes* và *Ch. gracile* được tìm thấy trên đất trồng chè, cà phê và cao su.



Hình 1. Một số đặc điểm hình thái của mẫu nấm VL-SR01 trên môi trường PDA
(a) Tản nấm, (b) Quả thể, (c) Sợi nấm có vách ngăn (mũi tên) và bào tử túi



Hình 2. Một số đặc điểm hình thái của mẫu nấm TG-SR01 trên môi trường PDA
(a) Tản nấm, (b) Quả thể, (c) Sợi nấm có vách ngăn (mũi tên) và bào tử túi

3.2.2. Xác định danh tính nấm bằng PCR và giải trình tự

Mẫu phân lập VL-SR01 và TG-SR01 được tiếp tục xác định danh tính bằng PCR, sử dụng cặp mồi T1 và T2 để nhân vùng gen tub2 của nấm. Kết quả thí nghiệm điện di sản phẩm PCR cho thấy, các mẫu nấm tạo băng sản phẩm với kích thước xấp xỉ khoảng 700 bp (hình không đưa ra). Tiếp theo, sản phẩm PCR từ các mẫu nấm này được tinh chiết

từ gel agarose dùng kit tách chiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất và giải trình tự vùng gen tub2. Kết quả giải trình tự cho thấy, các mẫu nấm đều có chất lượng giải trình tự tốt, vạch băng rõ nét, kích thước trình tự đọc được là 505 nts (mẫu TG-SR01) và 673 nts (mẫu VL-SR01). Sử dụng các trình tự thu được của các mẫu nấm để tìm kiếm các chuỗi tương đồng trên Ngân hàng Gen bằng phần mềm trực tuyến BLAST. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

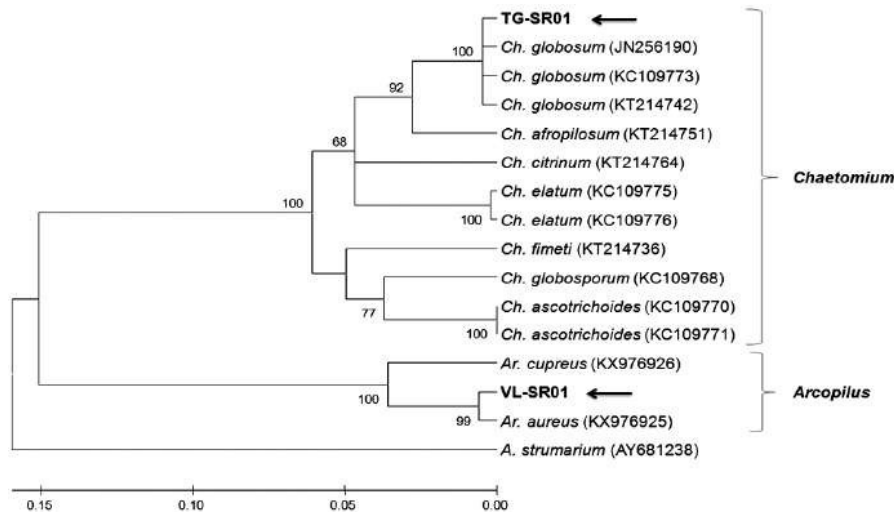
Bảng 3. Kết quả tìm kiếm các trình tự gần gũi trên Ngân hàng Gen

| TT | Mẫu nấm | Tên loài gần gũi nhất | Mã truy cập | Phần trăm đoạn so sánh (%) | Mức đồng nhất trình tự (%) |
|----|---------|-----------------------|-------------|----------------------------|----------------------------|
| 1 | VL-SR01 | Arcopilus aureus | KX976925 | 100 | 99 |
| | | Arcopilus aureus | KX976924 | 100 | 99 |
| 2 | TG-SR01 | Chaetomium globosum | KY355135 | 100 | 99 |
| | | Chaetomium globosum | JF772447 | 100 | 99 |

Kết quả tìm kiếm các chuỗi tương đồng trên Ngân hàng Gen cho thấy, trình tự của mẫu nấm VL-SR01 và TG-SR01 đều là các chuỗi mã hoá vùng gen tub2 của nấm thuộc họ *Chaetomiaceae*. Trong đó, trình tự của mẫu nấm VL-SR01 có mức đồng nhất trình tự 99% so với các mẫu nấm *Arcopilus aureus*. Trình tự của mẫu nấm TG-SR01

có mức đồng nhất trình tự 99% so với các mẫu nấm *Chaetomium globosum*.

Phân tích phả hệ dựa trên trình tự nucleotide vùng gen tub2 của mẫu nấm VL-SR01 và TG-SR01 trong nghiên cứu này được phân tích với mẫu chuẩn (type species) của 9 loài, đối chứng là nấm *A. strumarium* (Bảng 1). Kết quả được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Phân tích phả hệ dựa trên trình tự vùng 5' của gen tub2 của nấm *Chaetomiaceae*. Cây phả hệ được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-joining. Mã truy cập Ngân hàng Gen đặt trong dấu ngoặc đơn. Giá trị ở các nốt là giá trị thống kê bootstrap dưới dạng % (1.000 lần lặp).

Kết quả phân tích phả hệ cho thấy, mẫu nấm VL-SR01 nằm cùng nhánh với loài *Arcopilus aureus* thuộc chi *Arcopilus*. Mẫu nấm TG-SR01 nằm cùng nhánh với loài *Chaetomium globosum* Kunze thuộc chi *Chaetomium*.

Hiện nay, đối với các loài thuộc chi *Chaetomium*, xác định danh tính nấm chỉ dựa vào hình thái là chưa đủ, vùng gen tub2 đã được chứng tỏ hiệu

quả hơn trình tự gen ITS nhằm phân biệt các nấm *Chaetomium* ở mức loài (Wang *et al.*, 2016b). Dựa trên phân tích đa gen, Wang và cộng tác viên (2016a) xếp 5 loài gồm *Ch. aureum*, *Ch. cupreum*, *Ch. fusiforme*, *Ch. flavigenum* và *Ch. turgidopilosum* thuộc chi *Chaetomium* thành một chi mới là *Arcopilus*, họ *Chaetomiaceae* và 5 loài trên được được đổi tên lần lượt là *Ar. aureus*, *Ar. cupreus*,

Ar. fusiformis, *Ar. flavigenus* và *Ch. turgidopilosus*. Như vậy, trong nghiên cứu này sử dụng kỹ thuật truyền thống kết hợp với giải trình tự gen tub2 đã định danh được hai loài gồm *Ar. aureus* và *Ch. globosum*.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Từ mẫu đất trồng cây sầu riêng thu thập ở hai tỉnh Tiền Giang và Vĩnh Long đã phân lập, định danh được tên hai loài nấm thuộc họ *Chaetomiaceae* gồm: i) *Arcopilus aureus* thuộc chi *Arcopilus*; ii) *Chaetomium globosum* Kunze thuộc chi *Chaetomium*. Nấm *Ar. aureus* có tản nấm mọc đều, dạng tròn đồng tâm, sinh tiết sắc tố màu vàng nhạt - màu đỏ nhạt trên môi trường PDA. Nấm *Ch. globosum* có tản nấm mọc đều, dạng tròn đồng tâm, không sinh tiết sắc tố trên môi trường PDA.

4.2. Đề nghị

Đánh giá khả năng chịu muối NaCl, hoạt tính sinh học của nấm *Ar. aureus* và *Ch. globosum* trong các thí nghiệm tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Lê Thị Ánh Hồng, Nguyễn Thanh Hà, Nguyễn Thị Hằng Phương, Nguyễn Thị Thanh Nga, Nguyễn Thế Quyết, Nhữ Viết Cường, Nguyễn Thuý Mùi và Kasem Soyong, 2005. Nghiên cứu ứng dụng nấm *Chaetomium* spp. trong sản xuất các chế phẩm vi sinh bảo vệ thực vật phòng chống các bệnh nấm hại. *Báo cáo tổng kết khoa học kỹ thuật*. Đề tài cấp Nhà nước, 111 tr.

Doyle, J.J. and Doyle J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.

McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., and Lopez, R. 2013. Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, 41(W1): W597-W600.

O'Donnell, K. and Cigelnik, E., 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7(1): 103-116.

Soyong, K. and Quimio, T. H., 1989. A taxonomic study on the Philippine species of *Chaetomium*. *The Philippine Agriculturist*, 72(1): 59-72.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725-2729.

Thiep, N.V. and Soyong, K., 2015. *Chaetomium* spp. as biocontrol potential to control tea and coffee pathogens in Vietnam. *International Journal of Agricultural Technology*, 11(6): 1381-1392.

Von Arx, J. A., Guarro J. and Figueras M. J., 1986. Ascomycete genus *Chaetomium*. *Beih. Nova Hedwigia*, 84: 1-162.

Wang, X. W., Houbraken, J., Groenewald, J. Z., Meijer, M., Andersen, B., Nielsen, K. F. and Samson, R. A., 2016a. Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and chaetomium-like fungi from indoor environments. *Studies in Mycology*, 84: 145-224.

Wang, X. W., Lombard, L., Groenewald, J. Z., Li, J., Videira, S. I. R., Samson, R. A. and Crous, P. W. 2016b. Phylogenetic reassessment of the *Chaetomium globosum* species complex. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 36: 83-133.

Identification of *Arcopilus aureus* and *Chaetomium globosum* isolated from soil by sequencing β -tubulin gene

Nguyen Duc Thanh, Nguyen The Quyet, Ha Viet Cuong and Pham Xuan Hoi

Abstract

Chaetomium species have been studied as a biological agent against plant pathogens. This study was conducted to identify *Chaetomium* species from soil samples. The samples were collected from durian crop cultivation soil in Tien Giang and Vinh Long provinces in 2017. All *Chaetomium* species were isolated by soil baiting technique with small pieces of filter paper and were identified by traditional and molecular techniques. The results showed that *Chaetomium* ascomata appeared on the PDA medium after about 20 days of culture with spherical shape, light yellow or gray color. Polymerase chain reaction amplification of the β -tubulin gene from tested species was performed successfully with primer pair T1 and T2, with a size of about 700 base pairs. *Arcopilus aureus* and *Chaetomium globosum* species were identified based on the morphological characteristics and phylogenetic analysis. *Ar. aureus* was firstly recorded from cultivation soil in Vietnam.

Keywords: *Arcopilus*, *Chaetomium*, durian, soil, β -tubulin gene

Ngày nhận bài: 4/12/2017

Ngày phản biện: 19/12/2017

Người phản biện: TS. Bùi Thị Ngọc Lan

Ngày duyệt đăng: 19/1/2018