

ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GEN 28S - rRNA CỦA LOÀI NẤM LIÊN QUAN ĐẾN BỆNH THỐI QUẢ VẢI TẠI LỤC NGẠN - BẮC GIANG

Nguyễn Thị Thu Hiền¹, Trịnh Đình Khả²

¹ Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên

² Trường Đại học Khoa học Thái Nguyên

Từ khóa: Bệnh thối quả vải, đặc điểm hình thái, *Fusarium graminearum*, Gen 28S - rRNA, *Litchi chinensis* Sonn

Keywords: Fruit rot disease of litchi, morphological characteristics, *Fusarium graminearum*, 28S - rRNA gene, *Litchi chinensis* Sonn

TÓM TẮT

Cây vải (*Litchi chinensis* Sonn.) là cây ăn quả đặc sản có giá trị dinh dưỡng cao, với hương vị thơm ngon, nhiều chất bổ, được người tiêu dùng ưa chuộng. Tuy nhiên, quả vải có thể bị nhiễm một số loại nấm bệnh. Nghiên cứu này nhằm xác định chính xác loài nấm gây hư hỏng quả vải Lục Ngạn - Bắc Giang. Chủng nấm ký hiệu LNT1.1 đã được phân lập từ quả vải và xác định bằng một số đặc điểm hình thái, sinh học và phân tích trình tự nucleotide 28S - rRNA. Kết quả phân tích trình tự đã chỉ ra rằng trình tự phân đoạn gen 28S rRNA của chủng LNT1.1 có kích thước 606 bp và có độ tương đồng cao với một số đại diện của chi nấm *Fusarium* (92,8 - 100%). Trong đó, trình tự gen tương đồng cao nhất với loài *Fusarium graminearum* PH - 1 (Mã số XR_893061). Trình tự phân đoạn gen 28S rRNA của chủng này đã được đăng ký trên GenBank với mã số KU521339 và được đặt tên là *Fusarium graminearum* LNT1.1.

Morphological characteristics and sequence analysis of 28s - rRNA gene of fungal species associated with the rot disease of litchi fruit in Luc Ngan - Bac Giang

Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) a specialty fruit, has an appealing natural red color, high nutritional value, and pleasant flavour. However, litchi fruit can infect some pathogenic fungi. This study aimed Isolation and identification of pathogenic fungi associated with litchi fruit rot disease in Luc Ngan - Bac Giang. The fungal strain, designated as LNT1.1 was isolated from litchi fruit and identified by some morphological characteristics and analysed by 28S - rRNA sequence nucleotide. The sequencing analysis result has showed that sequence of 28S rRNA gene of the LNT1.1 strain has 606 bp and high homology to those of some representatives of the fungi genus *Fusarium* (92.8 - 100%). Among them, it has the highest homology with that of *Fusarium graminearum* strain PH - 1 (Accession number XR_893061). The sequence of 28S rRNA gene fragment of LNT1.1 strain was deposited in GenBank with accession number KU521339 and was named *Fusarium graminearum* LNT1.1.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây vải (*Litchi chinensis* Sonn.) thuộc họ Bồ hòn (Sapindaceae), là loại cây ăn quả thân gỗ có nguồn gốc nhiệt đới. Hiện nay, cây vải được trồng khá phổ biến ở nước ta và tập trung chủ yếu ở Lục Ngạn (Bắc Giang) và Thanh Hà (Hải Dương). Trong đó, vải thiều Lục Ngạn nổi tiếng về chất lượng: quả to, hạt nhỏ, cùi dày, độ ngọt cao,... Tuy nhiên, vải là một trong những loại quả có thời gian bảo quản ngắn, tồn thất sau thu hoạch cao (Zhang D. L., Quantick P. C., 1997). Quả vải bị nhiễm bệnh là vấn đề nghiêm trọng làm giảm giá trị thương mại. Trong đó thối quả do nấm là bệnh khá phổ biến. Theo nghiên cứu của Jiang và đồng tác giả (2001) một trong những nguyên nhân gây thối quả là do nấm *Peronophythora litchi*. Nghiên cứu khác cho thấy một số loài trong chi nấm *Fusarium* và *Colletotrichum* gây thối quả trên cây vải (McMillan R.T., 1994).

Những năm gần đây, tại vùng vải thiều Lục Ngạn đã ghi nhận quả vải bị thối với số lượng lớn, ảnh hưởng trực tiếp đến phẩm chất và chất lượng quả vải. Chẩn đoán, giám định ban đầu cho thấy, bệnh thối trên quả vải chủ yếu là do nấm gây ra. Để hạn chế cũng như tránh sự bùng phát dịch bệnh, cần phải tiến hành thu thập các mẫu bệnh để nghiên cứu tìm ra loại nấm gây bệnh làm cơ sở để đưa ra các biện pháp phòng trừ dịch bệnh. Hiện nay, để phân loại chủng nấm người ta có thể dựa vào những đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hóa và phân loại phân tử. Trong đó, phân loại học phân tử dựa vào trình tự nucleotide của gen mã hóa rRNA đang là một công cụ hữu hiệu trong phân loại và bổ sung cho quá trình phân loại bằng các đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hóa.

Gen 28S rRNA là gen mã hóa đặc trưng cho rRNA của tiểu phần lớn ribosome của các chủng nấm. Vùng trình tự D1, D2 ở phần đầu của gen 28S rRNA có độ bảo tồn cao, do đó trình tự vùng này thường được dùng trong phân loại phân tử (Hinrikson H. P. *et al.*,

2005). Cặp môi NL1, NL4 được thiết kế dựa trên trình tự vùng D1, D2 để nhận một phần của gen 28S rRNA đã được nhiều tác giả sử dụng trong nghiên cứu phân loại học phân tử các chủng nấm thuộc chi *Fusarium* và các chi nấm khác (Hennequin C. *et al.*, 1999; Hinrikson H. P. *et al.*, 2005; White T. J. *et al.*, 1990). Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả phân tích đặc điểm hình thái và phân tích trình tự gen 28S - rRNA để xác định chủng nấm *Fusarium graminearum* phân lập trên quả vải bị thối của cây vải thiều Lục Ngạn - Bắc Giang.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Quả vải biểu hiện triệu chứng thối được thu thập tại Lục Ngạn - Bắc Giang vào vụ vải năm 2015 - 2016. Mẫu được giữ trong túi plastic vô trùng có khóa zip miệng túi, bảo quản ở nhiệt độ thường và mang về phòng thí nghiệm bảo quản trong ngăn mát tủ lạnh.

2.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường PGA phân lập: 200g/l khoai tây chiết lấy dịch, 20g/l glucose, 20g/l agar.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp phân lập chủng nấm

Mẫu quả vải nhiễm bệnh được thu thập, bảo quản riêng rẽ, dựa vào mô vỏ quả bị mốc trắng để sử dụng làm nguyên liệu phân lập ban đầu. Quả vải được khử trùng 3 lần bằng ethanol 70% và rửa bằng nước cất khử trùng để loại bỏ vi sinh vật nhiễm tạp. Sau đó dùng dao khử trùng cắt các mô vỏ bị nhiễm nấm thành các miếng nhỏ đặt vào đĩa môi trường PGA và nuôi cấy ở 30°C, dùng phương pháp cấy chuyển nhiều lần đến khi thu được chủng nấm thuần. Chủng nấm thuần được bảo quản trong môi trường PGA thạch nghiêng, 3 tháng cấy chuyển một lần.

2.3.2. Nghiên cứu đặc điểm hình thái chủng nấm

Chủng nấm trên quả vải phân lập được, đem nuôi cấy ở 30°C, 200 vòng/phút. Sau đó, được cấy trên đĩa thạch quan sát đặc điểm khuẩn lạc và khả năng sinh sắc tố. Cắm lamên nghiêng 45°C trên đĩa thạch môi trường PGA đã cấy nấm để hệ sợi nấm phát triển bám trên lamên. Sau đó, tiến hành quan sát hệ sợi nấm và bào tử trên kính hiển vi quang học chụp hình Labomed - Mỹ ở độ phóng đại 400 - 1000 lần. Các đặc điểm hình thái được so sánh với khóa phân loại *Fusarium* theo tài liệu Bùi Xuân Đồng (Bùi Xuân Đồng, 2004).

2.3.3. Tách chiết DNA tổng số

Chủng nấm được nuôi cấy trong môi trường PGA dịch thể, sau 3 ngày thu sinh khối tế bào. Sinh khối tế bào nấm được nghiền nhanh trong ni tơ lỏng thành dạng bột mịn. Mẫu được chuyển vào tube 2ml, bổ sung 1ml dung dịch phá tế bào (CTAB 2% (w/v); NaCl 1,4M; 2-mecaptoethanol 0,2% (v/v); EDTA 20mm; Tris - HCl 100mm; pH 8,0) và 50µl protease K (200 mg/ml) trong 3h ở 56°C, thỉnh thoảng đảo nhẹ. Sau đó, mẫu được bổ sung 200µl dung dịch 5M potassium acetate ù 10 phút trong đá. Sau khi ly tâm 10 phút ở 4°C với 10.000 vòng/phút, dịch nổi chứa DNA tiếp tục được chiết bằng chloroform: isoamyl alcohol (24:1) để loại protein. Sau đó, DNA được rửa bằng 100% isopropanol theo tỷ lệ thể tích 1:1. DNA được hòa trong đệm TE pH 8,0; điện di kiểm tra chất lượng DNA và bảo quản ở -20°C (Trịnh Đình Khả *et al.*, 2007).

2.3.4. Phân tích trình tự gen 28S - rRNA

Cặp mồi NL1 (5' - GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG - 3') và NL4 (5' - GGT CCG TGT TTC AAG ACG G - 3') được sử dụng để nhân phân đoạn gen 28S rRNA có kích thước

khoảng hơn 600 bp của chủng nấm. Hỗn hợp phản ứng gồm 1,5µl (50 ng) DNA khuôn; 1µl (10 pmol) mồi mỗi loại; 2µl MgCl₂ 25mM; 2 µl dNTP 2,5mM; 0,25µl *Taq* polymerase 5U; 2,5µl đệm PCR 10x; nước cất khử ion đến 25µl. PCR được tiến hành theo chu trình: 95°C/5 phút, 30 chu kỳ (95°C/1 phút, 50°C/1 phút, 72°C/1 phút), 72°C/10 phút.

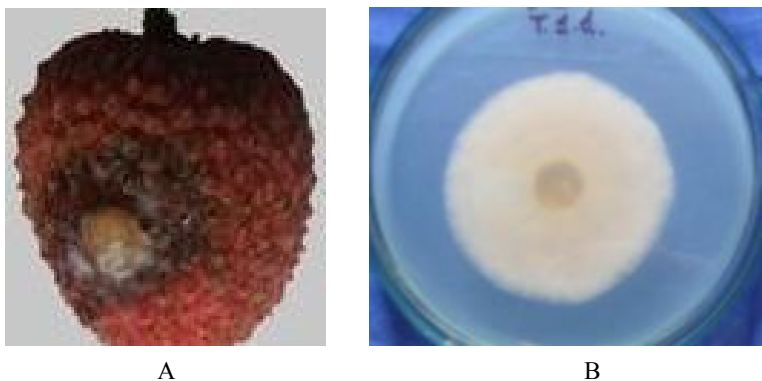
Sản phẩm PCR được lai vào vector pJET 1.2/blunt bằng T4 ligase theo kit của hãng Fermentas. Sản phẩm lai được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng DH10B và chọn lọc trên môi trường LB có bổ sung ampicillin nuôi cấy ở 37°C qua đêm. DNA plasmid được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp của Sambrook và Russell (Sambrook J., Russell D. W., 2001).

Trình tự gen 28S rRNA được đọc trên hệ thống giải trình tự động bởi công ty Macrogen - Hàn Quốc. Trình tự nucleotide được xử lý và phân tích bằng phần mềm Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) để xác định hệ số tương đồng và phần mềm DNASTAR (Wincosin, USA) để xây dựng cây phân loại.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập chủng nấm gây bệnh trên quả vải Lục Ngạn

Tiến hành nghiên cứu thực địa tại các xã trồng vải của huyện Lục Ngạn chúng tôi nhận thấy quả vải bị bệnh không bị rụng, xuất hiện một số đặc điểm gồm vỏ quả thâm đen, vỏ quả có thể bị nứt hoặc không, chảy nước, trên vùng nhiễm bệnh xuất hiện những sợi nấm màu trắng (hình 1A). Sau khi tiến hành lấy mẫu, chúng tôi sử dụng môi trường PGA để phân lập theo phương pháp như mô tả. Kết quả đã phân lập và thuần khiết được chủng nấm ký hiệu LNT1.1 từ những mẫu bệnh quả vải.

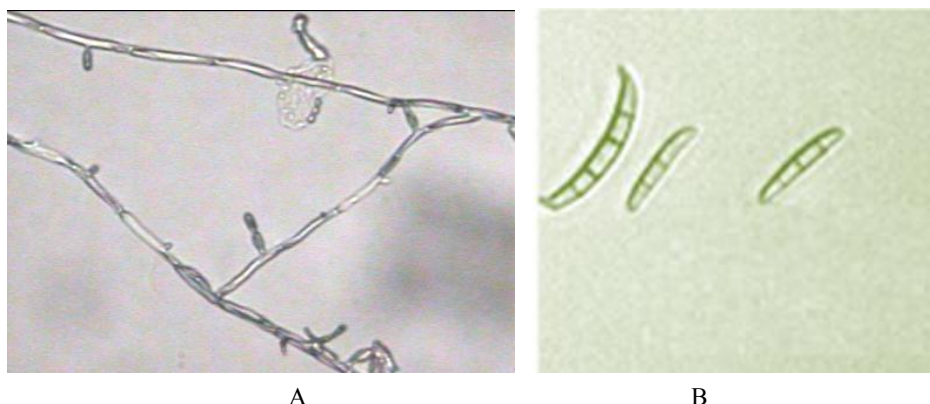


Hình 1. Mẫu quả vải bị bệnh (A) và khuẩn lạc chủng nấm LNT1.1 (B)

3.2. Nghiên cứu đặc điểm hình thái của chủng nấm gây bệnh trên quả vải Lục Ngạn

Chủng LNT1.1 được nuôi cấy trên đĩa thạch môi trường PGA ở điều kiện 28°C để quan sát đặc điểm hình thái. Kết quả quan sát cho thấy chủng nấm LNT1.1 có hệ sợi màu trắng, mịn, khuẩn lạc nấm hình tròn đường kính lớn hơn 2,5mm sau 7 ngày nuôi cấy, có khả năng sinh sắc tố hơi hồng (hình 1B). Quan sát dưới kính hiển vi quang học cho thấy sợi nấm phân

nhánh nhiều, có vách ngăn, bào tử lớn có 3 - 4 vách ngang, kích thước khoảng 2,9 - 4,0 × 26,0 - 41,0µm, không có bào tử nhỏ. Bào tử trần lớn có cùng hình dạng, có mặt lưng và mặt bụng, ngăn đỉnh của bào tử trần lớn thon nhỏ dần (hình 2). So sánh với đặc điểm khóa phân loại nấm *Fusarium* theo tài liệu của Bùi Xuân Đông năm 2004 cho thấy, chủng LNT1.1 có nhiều đặc điểm giống với một số loài trong chi nấm *Fusarium*.



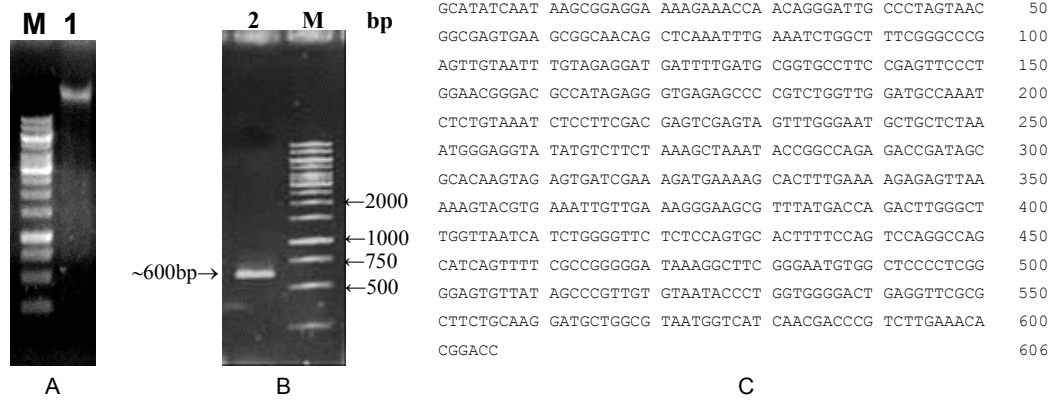
Hình 2. Hệ sợi và bào tử chủng nấm LNT1.1

A: Hệ sợi; B: Bào tử

3.3. Phân tích trình tự gen 28S - rRNA của chủng LNT1.1

DNA tổng số của chủng LNT1.1 được tách chiết theo phương pháp đã mô tả. Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy DNA không bị đứt gãy, có thể dùng cho các nghiên cứu về nhân dòng gen (hình 3A).

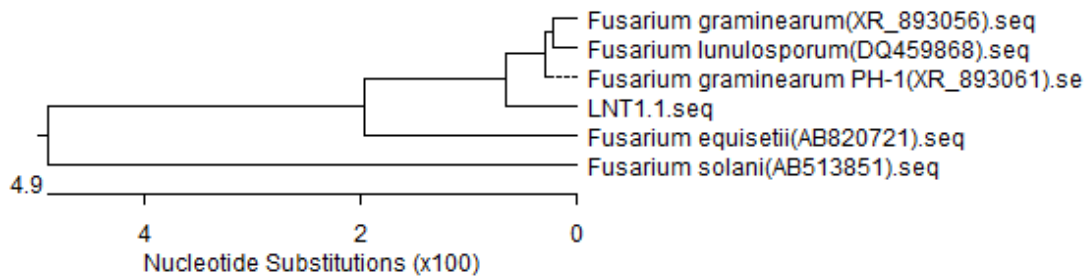
Sử dụng cặp môi NL1 và NL4 tiến hành nhân gen 28S - rRNA đã khuếch đại được sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước khoảng 600 bp (hình 3B). Sản phẩm PCR đã được chèn vào vector pJet 1.2 để tách dòng, tinh sạch và đọc trình tự nucleotide. Kết quả đọc trình tự cho thấy phân đoạn gen 28S - rRNA của chủng nấm LNT1.1 có kích thước 606 bp (hình 3C).



Hình 3. Hình ảnh điện di DNA tổng số (A); sản phẩm PCR (B) và trình tự gen 28S - rRNA (C)
 M - Marker 1kb (Fermentas); 1: DNA tổng số; 2: sản phẩm PCR

Sử dụng phần mềm Blast so sánh với các trình tự gen của nấm đã công bố trên GenBank, cho thấy trình tự phân đoạn gen 28S - rRNA của chủng nấm LNT1.1 có độ tương đồng cao so với trình tự gen của một số chủng nấm thuộc chi *Fusarium* với mức độ tương đồng 92,8 - 100%. Trong đó, tương đồng cao nhất với chủng *Fusarium graminearum* PH - 01 (mã số

XR_893061). Sử dụng phần mềm DNASTAR phân tích so sánh trình tự gen 28S - rRNA của chủng LNT1.1 với các trình tự trên GenBank mang mã số XR_893061, XR_893056, DQ459868, AB820721 và AB513851 đã được cây phân loại chủng nấm LNT1.1 so với một số loài trong chi *Fusarium* (hình 4).



Hình 4. Cây phân loại chủng nấm LNT1.1 dựa vào trình tự gen 28S - rRNA

Kết hợp với phân tích so sánh đặc điểm hình thái, chúng tôi xác định chủng nấm LNT1.1 là *Fusarium graminearum* và được đặt tên là *Fusarium graminearum* LNT1.1. Trình tự đoạn gen 28S - rRNA của chủng *Fusarium graminearum* LNT1.1 đã được đăng ký trên GenBank với mã số KU521339 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KU521339.1>). Bệnh thối quả trên cây vải thường do một số loài nấm trong chi *Peronophythora*, *Fusarium* và *Colletotrichum* gây ra (Jiang Y. M. et al., 2001; McMillan R.T., 1994). Loài

nấm *Fusarium graminearum* là một trong những loài nấm gây bệnh ở thực vật. Do đó, kết quả nghiên cứu thu được phù hợp với các dẫn liệu về tác nhân gây bệnh thối quả vải đã công bố trên thế giới.

Nấm *Fusarium graminearum* có khả năng sinh độc tố trichothecene và độc tố zearalenone. Những nghiên cứu đã công bố cho thấy, độc tố trichothecene là một loại mycotoxin gây nôn mửa, ỉa chảy, tổn thương tế bào ở tủy xương, tuyến giáp trạng, giảm bạch cầu. Độc tố

zearalenone là một loại mycotoxin có tác dụng xấu đến đồng hóa ở động vật, gây phù nề bộ phận sinh dục của lợn cái, làm teo buồng trứng, gây xảy thai (Bùi Xuân Đồng, 2004). Vì vậy, chúng tôi khuyến cáo người tiêu dùng không ăn những quả vải đã bị nhiễm nấm *Fusarium graminearum* kể cả khi quả mới bị nhiễm nấm ở vỏ ngoài để tránh ngộ độc nấm và tránh những ảnh hưởng xấu của các độc tố do nấm *Fusarium graminearum* tạo ra đến sức khỏe con người.

IV. KẾT LUẬN

Đã phân lập được chủng nấm LNT1.1 từ mẫu quả vải thối trên cây vải thiều ở Lục Ngạn - Bắc Giang. Chủng LNT1.1 được xác định là loài *Fusarium graminearum* bằng so sánh đặc điểm hình thái và phân tích trình tự gen 28S - rRNA. Trình tự gen 28S - rRNA đã được đăng ký trên GenBank với mã số KU521339 và chủng nấm LNT1.1 được đặt tên là *Fusarium graminearum* LNT1.1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Xuân Đồng, 2004. Nguyên lý phòng chống nấm mốc và mycotoxin. Nxb Khoa học và Kỹ thuật. 184 trang.
2. Trịnh Đình Khả, Quyền Đình Thi và Nguyễn Sỹ Lê Thanh, 2007. Tuyển chọn và nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Penicillium* sp. DTQ - HK1. Tạp chí Công nghệ Sinh học, 5: 355 - 362.
3. Hennequin C., Abachin E., Symoens F., Lavarde V., Reboux G., Nolard N. and Berche P., 1999. Identification of *Fusarium* species involved in Human infections by 28S rRNA gene sequencing. J. Clin. Microbiol., 37: 3586-3589.
4. Hinrikson H. P., Hurst S. F., Lott T. J., Warnock D. W. and Morrison C. J., 2005. Assessment of ribosomal large - subunit D1 - D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. J. Clin. Microbiol., 45: 2092-2103.
5. Jiang Y. M., Zhu X. R. and Li Y. B., 2001. Postharvest control of litchi fruit rot by *Bacillus subtilis*. Food Science and Technology, 34: 430 - 436.
6. McMillan R.T., 1994. Diseases Of *Litchi Chinensis* In South Florida. Proc. Fla. State Hort Soc. 107: 360 - 362.
7. Sambrook J. and Russell D. W., 2001. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
8. Zhang D. L. and Quantick P. C., 1997. Effect of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn) fruit. Postharvest Biology and Technology, 12(2): 195 - 202.
9. White T. J., Bruns T., Lee S. and Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., editors. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego, Calif: Academic Press, Inc: 315-322.

Email tác giả chính: khatd@tnus.edu.vn

Ngày nhận bài: 01/12/2017

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 25/12/2017

Ngày duyệt đăng: 28/12/2017