

GIÁM ĐỊNH MỘT SỐ CHỦNG NẤM KÝ SINH RỆP SÁP HẠI CÀ PHÊ BẰNG PHƯƠNG PHÁP DNA

Identification of on some Fungal Strains Parasitic on Coffee Scale Insect by DNA

Phạm Văn Nhạ^{1,3}, Hồ Thị Thu Giang², Phạm Thị Vượng³,
Đông Thị Thanh³, Trần Thị Tuyết³, Đặng Thanh Thúy³, Phạm Duy Trọng³

¹ Nghiên cứu sinh Khoa Nông học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

² Khoa Nông học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

³ Viện Bảo vệ thực vật

Địa chỉ email tác giả liên hệ: nhanipp@yahoo.com.

Ngày gửi bài: 10.08.2011; Ngày chấp nhận: 26.10.2011

TÓM TẮT

Trong số 23 chủng nấm ký sinh trên rệp sáp hại cà phê chúng tôi đã thu thập và phân lập từ năm 2009 đến nay, có 8 chủng khó giám định đến loài bằng phương pháp hình thái học, nên chúng tôi sử dụng phương pháp giải trình tự gene và so sánh với ngân hàng gene thông qua giao diện tìm kiếm BLAST nucleotide-nucleotide đặt tại National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Mỹ để giám định. Kết quả cho thấy 8 mẫu này thuộc 6 loài khác nhau, trong đó: hai mẫu BR2 và BR5 là loài *Beauveria bassiana*; hai mẫu MR4 và MR7 là loài *Metarhizium anisopliae*; mẫu BR12 là loài *Cephalosporium lanoso-niveum*, mẫu BR7 là loài *Cordyceps nutans*, mẫu BR15 là loài *Toxicocladosporium* sp., BR16 là loài *Paecilomyces cicadae*

Từ khóa: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, nấm ký sinh, rệp sáp.

SUMMARY

Since 2009 up to date, we collected and isolated 23 strains of mycopathogens from coffee scale insects, among them 8 strains were difficult to identify by morphology. Thus, we applied method of DNA sequencing and compared with the GeneBank by BLAST nucleotide-nucleotide from the National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA for identification. The results revealed that these 8 strains belong to 6 species as follow: BR2 and BR5 are *Beauveria bassiana*; MR4 and MR7 are *Metarhizium anisopliae*; BR12 is *Cephalosporium lanoso-niveum*; BR7 is *Cordyceps nutans*; BR15 is *Toxicocladosporium* sp.; and BR16 is *Paecilomyces cicadae*.

Key words: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, Mycopathogen, scale insect

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ năm 2009 đến nay, Viện Bảo vệ thực vật đã thu thập và phân lập được 23 chủng nấm ký sinh trên rệp sáp hại cà phê, đây là những nguồn vật liệu quý để phục vụ cho công tác nghiên cứu sản xuất chế phẩm để phòng trừ rệp sáp trên đồng

ruộng, tuy nhiên, có một số chủng nấm rất khó giám định đến loài bằng hình thái học. Trên thế giới, hiện nay đã có một số nước giải trình tự gene của nấm ký sinh côn trùng và đăng ký trong ngân hàng gene của thế giới đặt tại Mỹ (Driver và Milner, 1998). Ở Việt Nam, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh đã xác định

16 mẫu nấm *Metarhizium anisopliae* và chia làm 2 nhóm Ma-VN1, Ma-VN2 đã được đăng ký trên ngân hàng dữ liệu GenBank (Võ Thị Thu Oanh và cs., 2009), tuy nhiên nhóm tác giả mới chỉ đi sâu nghiên cứu 1 loài nấm côn trùng. Giám định loài bằng so sánh trình tự gene đảm bảo độ chính xác cao và cho kết quả đồng nhất ở mọi pha sinh trưởng của nấm (Lawrence, 1997). Chính vì thế, nghiên cứu này sử dụng phương pháp giải trình tự gene và so sánh với ngân hàng gene để giám định đến loài nhằm đảm bảo độ chính xác cao cho công tác phân loại.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Tách chiết ADN

Vi sinh vật được nuôi cấy trên môi trường Sabouraud. Lấy 1 vòng que cấy khuẩn ty vào ống eppendorf vô trùng, thêm 500 µl 2 × SSC (sodium chloride and sodium citrate) vào mỗi ống. Lắc đều và giữ ở 99°C trong 10 phút. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 2 phút. Hút bỏ phần dịch và tiến hành rửa tế bào 1 lần bằng nước cất vô trùng. Thêm khoảng 100 µl hạt thủy tinh có đường kính 0,2 - 0,5 mm (Roth, Đức), 100 µl dung dịch phenol/chloroform (tỷ lệ 1:1) và 100 µl nước cất vô trùng. Lắc ở 1400 vòng/phút trong 10 phút trên máy Thermocomfort (Eppendorf, Đức) sau đó ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút. Lấy phần dịch trong phía trên có chứa ADN làm khuôn cho phản ứng PCR không kết tủa và rửa bằng ethanol (White & cs., 1991). ADN sau khi tách chiết được giữ ở -20°C.

2.2. Định tên vi sinh vật bằng giải trình tự

Phân đoạn rADN của vi sinh vật được khuếch đại bằng môi ITS1, ITS4:

ITS1 5' to 3':

TCCGTAGGTGAACCTGCGG

ITS4 5' to 3':

GGTCCGTGTTTCAAGACGG

Trên thiết bị GeneAmp PCRSystem 9700 (PE Applied Biosystem, Mỹ) với chương trình nhiệt được thiết lập với pha biến tính ở 94°C trong 2 phút kế tiếp là 35 chu kỳ nhiệt (94°C trong 30 giây, 52 °C trong 30 giây và 72 °C trong 1 phút). Quá trình khuếch đại được hoàn tất ở 72 °C trong 7 phút và sau đó sản phẩm PCR được bảo quản ở 10°C.

Sản phẩm PCR được tinh chiết hoặc thổi gel bằng QIAEX II (Qiagen, Đức) theo khuyến cáo của hãng. Trình tự ADN được đọc bằng phương pháp “dideoxy chain termination” với việc sử dụng kit AmpliTaq (Amersham) theo hướng dẫn của hãng. Máy đọc trình tự, model 377 của hãng Applied Biosystem được sử dụng. Các chuỗi ADN được so sánh với GeneBank thông qua giao diện tìm kiếm BLAST nucleotide-nucleotide đặt tại National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Mỹ. Các chuỗi liên quan được chuyển tải về sau đó xử lý bằng phần mềm BioEdit (Hall, 1999) và so sánh bằng ClustalX (Thompson & cs., 1997).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trong số 23 chủng nấm ký sinh trên rệp sáp cà phê đã phân lập, có 8 chủng với đặc điểm hình thái về khuẩn lạc, cành bào tử và bào tử khó giám định được đến loài, nên sử dụng công nghệ đọc trình tự DNA và so sánh với ngân hàng gene. Các chủng và môi sử dụng trong nghiên cứu và kết quả nghiên cứu sau khi giải mã trình tự gene từng chủng, so sánh độ tương đồng với các trình tự tham chiếu được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả định tên các mẫu nấm ký sinh trên rệp sáp hại cà phê

TT	Mẫu	Trình tự	Môi	Loài gần nhất	Trình tự tham chiếu	Độ tương đồng
1	BR2	VT589	ITS1	<i>Beauveria bassiana</i>	GQ249879	527/527 (100%)
2	BR5	VT590	ITS4	<i>Beauveria bassiana</i>	GQ249879	512/513 (99,8%)
3	BR12	VT591	ITS1	<i>Cephalosporium lanoso-niveum</i>	AJ292396	518/519 (99,8%)
4	BR7	VT592	ITS4	<i>Cordyceps nutans</i>	AF224274	541/541 (100%)
5	BR15	VT629-VT630	ITS1	<i>Toxicocladosporium</i> sp.	EU040243	243/255 (95,3%)
6	MR4	VT631-VT632	ITS4	<i>Metarhizium anisopliae</i>	FJ545308	552/552 (100%)
7	MR7	VT633-VT634	ITS1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	AF134150	474/475 (99,8%)
8	BR16	VT635-VT636	ITS4	<i>Paecilomyces cicadae</i>	AB085888	543/543 (100%)

Qua bảng 1 cho thấy, mẫu BR2 sau khi giải trình tự gen và so sánh với ngân hàng genbank có độ tương đồng 527/527 cặp nucleotide (đạt 100%) với loài *Beauveria bassiana*; mẫu BR5 có độ tương đồng 512/513 cặp nucleotide (đạt 99,8%) là loài *Beauveria bassiana*; mẫu BR12 là loài *Cephalosporium lanoso-niveum*, độ tương đồng 518/519 cặp nucleotide (đạt 99,8%); mẫu BR7 có độ tương đồng 541/541 cặp nucleotide với loài *Cordyceps nutans* (đạt 100%); *Toxicocladosporium* sp. là loài gần nhất với mẫu BR15 (độ tương đồng đạt 95,3%, 243/255 cặp nucleotide); mẫu MR4,

MR7 tương đồng 100% và 99,8 % với loài *Metarhizium anisopliae*; mẫu BR16 tương đồng 100% với loài *Paecilomyces cicadae* (đạt 543/543 cặp nucleotide).

Với kết quả giám định này chúng tôi thấy trên rệp sáp có 6 loài nấm bệnh ký sinh gây bệnh, với nguồn nấm ký sinh đa dạng này là nguồn vật liệu quan trọng cho việc nghiên cứu ứng dụng chúng trong sản xuất chế phẩm sinh học để phòng trừ rệp sáp hại cà phê. Đây là kết quả nghiên cứu đầu tiên về thành phần các loài nấm ký sinh trên rệp sáp hại cà phê tại Việt Nam.

Sơ đồ trình tự gene của các chủng nấm đã giám định như sau:

- BR2 (VT589)

TCCCTAACCTTCTGTGAACCTACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCCCG
GACGCGGACTGGACCAGCGGCCCGCCGGGACCTCAAACCTTTGTATTCCAGCATCTTC
TGAATACGCCGCAAGGCAAAACAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCT
CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCAGT
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGT
TCGAGCGTCATTTCAACCCTCGACCTCCCCTTGGGGAGGTCGGCGTTGGGGACCGGCAG
CACACCGCCGGCCCTGAAATGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCTGCGCAGTAA
TACAGCTCGCACCGGGACCCCGACGCGGCCACGCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAACGT
TGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAA

AGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAAAATT
GAAATCTGGCTCTCAGGGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGCGAGGTGCC

Beauveria bassiana

Tương đồng 527/527 (100%) với trình tự GenBank GQ249879

- BR5 (VT590)

CTAACCTTCTGTGAACCTACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCCCGGA
CGCGGACTGGACCAGCGGCCCGCCGGGACCTCAAACCTTGTATTCCAGCATCTTCTG
AATACGCCGCAAGGCAAAACAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCT
GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCAGTGA
ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTT
GAGCGTCATTTCAACCCTCGACCTCCCCTTGGGGAGGTCGGCGTTGGGGACCGGCAGC
ACACCGCCGGCCCTGAAATGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCAGCCTCTGCGCAGTAAT
ACAGCTCGCACCGGGACCCCGACGCGGCCACGCCGTAACACCCAACTTCTGAACGTT
GACCTCGAATCAGGTAGGACTACCcCGCTGAACTTAAGCATATCAA

Beauveria bassiana

Tương đồng 512/513 (99,8%) với trình tự GenBank GQ249879

- BR12 (VT591)

GTGAACCTACCTTTATGTTGCTTCGGCGGTCTCGCGCCGGGTTGCTCCCTTGGGGG
CTCCCGGGACCACGCTCCGCCGGAGACCAAAAACCTTTGATTTTTCGAAAGCAGTATT
ATTCTGAGTGGCCGAAAGGCAAAAAACAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCT
TGGTCTGCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATG
CCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAGCTCGTCTTCATTGACGAGATCGGTGTTGGG
ACCCGGCGAGCGGGGACTCTTGTCCCCTGCCGGCCCCGAAATTCAGTGGCGGCCCGTT
GCGGCGACCTCTGCGTAGTAACTTAACCTCGCACCGGTAACAGCATCGTGGCCACGCCG
TAAAACCCCCGACTTTTTTAAGGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTA
AGCATATCAATAAGCGGGA

Cephalosporium lanoso-niveum

Tương đồng 518/519 (99,8%) với trình tự GenBank AJ292396

- BR7 (VT592)

AAACCTTATGTGAACATAACCATGATGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCGGCGTCCG
GACGGCCTAGCGCCGCCCGCGGCCCGGATCCAGGCGGCCCGGAGACCACAAAACCT
ATTTTGTATCAGCAGTTTTTTCTGAATCCGCCGCAAGGCAAAACAAATGAATCAAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAG
CATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCGACTTCCCTTTGGGGAA
ATCGGCGTTGGGGACTGGCAGCATAACCGCCGGCCCCGAAATGGAGTGGCGGCCCGTCC
GCGGCGACCTCTGCGTAGTAATCCAACCTCGCACCGGAACCCCGACGTGGCCACGCCGT
AAAACACCCCACTTTCTGAACGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTA
AGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGT
GAAGCGGCAACAGCTC

Cordyceps nutans

Tương đồng 541/541 (100%) với trình tự GenBank AF224274

- BR15 (VT629-VT630)

CCGTCCTCCGTGACGGGCTGCTACCAACCCTTTGGTGGCCGACCGGATGCCTCCG
GGGCGACCCTGACCTTCGGGTTTTGGGGACCCCGGTGGACACCTAAACTCTGCGTAA
CTTTGTAGTCTGAGTAATAGATTAAATCAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTT
CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGCAATTGCAAAATTCAA
GTGAAATCATCGAAATCTTT

EU040243 *Toxicocladosporium irritans*

Identities = 243/255 (95%), Gaps = 7/255 (3%)

- MR4 (VT631-VT632)

CGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATCATACTTTAATTGTTGCTTCGGCGGG
ACTTCGCGCCCGCCGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGG
TTAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGA
ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT
GAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTACGC
CCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAG
CCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCAGTAGTAAAGCA
CTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAACCCCAACTTTTTATAGTTG
ACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
AAACCAACAGGGATTGCCCA

FJ545308 *Metarhizium anisopliae*

Identities = 552/552 (100%), Gaps = 0/552 (0%)

- MR7 (VT633-VT634)

ACTCCAACCCCTGTGAATCATACTTTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCC
GCCGGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAT
GAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT
GCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTACGCCCTCAAGTCC
CCTGTGGACTTTGTGTTGGGGATCGGCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAA
ATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCAGTAGTAAAGCACTCGCAACAGG
AGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAACCCCAACTTTTTATAGTTGACCCTCGAATC
AGG

AF134150 *Metarhizium anisopliae*

Identities = 474/475 (99%), Gaps = 1/475 (0%)

- BR16 (VT635-VT636)

ACTCCAACCCCTTCTGTGAACCTACCCATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCGT
CCGGACGGCCCTGCGCCGGCCCGCGACCTGGACCCAGGCGGCCGCGGAGACCACGCA
ACCCTGTATCCATCAGTCTCTCTGAATCCGCCGCAAGGCAACACAAATGAATCAAACTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTA

ATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAG
CATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCGACGTCCCCTGGGACGT
CGGCCTTGGGGACCGGCAGCACCCCGCCGGCCCTGAAATAGAGTGGCGGCCCGTCCGC
GGCGACCTCTGCGCAGTACAACCACTCGCACCCGGGAACCCGACGCGGCCCGCCGTGAA
ACCCCAACCTCTGAACGTTGACCTCGGATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCA
TATCAATAAGCGGAGG

AB085888 *Paecilomyces cicadae*

Identities = 543/543 (100%), Gaps = 0/543 (0%)

4. KẾT LUẬN

Định loại bằng phương pháp giải trình tự 8 mẫu khó giám định được bằng hình thái, kết quả cho thấy 8 mẫu này thuộc 6 loài khác nhau, trong đó: 2 mẫu BR2 và BR5 là loài *Beauveria bassiana*; 2 mẫu MR4 và MR7 là loài *Metarhizium anisopliae*; mẫu BR12 là loài *Cephalosporium lanosoniveum*, mẫu BR7 là loài *Cordyceps nutans*, mẫu BR15 là loài *Toxicocladosporium* sp., BR16 là loài *Paecilomyces cicadae*. Đặc biệt loài *Toxicocladosporium* sp. là loài lần đầu tiên công bố tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Võ Thị Thu Oanh, Lê Đình Đôn, Bùi Cách Tuyến (2009). So sánh trình tự vùng ITS-rDNA của nấm

Metarhizium anisopliae gây bệnh trên côn trùng phân lập ở một số tỉnh thành phía Nam Việt Nam. Tạp chí Nông nghiệp và PTNT, số 4/2009.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997). The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, Nucleic Acids Reseach 24: 4876-4882.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor (1991). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.

