

XÁC ĐỊNH DANH TÍNH NẤM *Chaetomium cupreum* và *Chaetomium globosum* TRÊN ĐẤT TRỒNG CÂY ĂN QUẢ CÓ MÚI TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM

Nguyễn Thế Quyết^{1*}, Kasem Soyotong², Hà Viết Cường³

¹ *Nghiên cứu sinh Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

² *Học viện Công nghệ King Mongkut Ladkrabang, Bangkok, Thái Lan*

³ *Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

Email*: quyetatq@gmail.com

Ngày gửi bài: 25.09.2017

Ngày chấp nhận: 13.11.2017

TÓM TẮT

Ở Việt Nam, cây ăn quả có múi được trồng phổ biến vì đem lại lợi ích kinh tế cho các hộ nông dân và giải quyết được nhiều việc làm. Nấm *Chaetomium* được sử dụng phòng chống bệnh hại cây trồng. Nghiên cứu này đã được tiến hành để xác định nấm *Chaetomium* từ các mẫu đất thu thập trồng cây có múi ở miền Bắc Việt Nam. Nấm *Chaetomium* được phân lập bằng kỹ thuật đặt bẫy giấy. Kết quả đã xác định được 2 loài gồm *Chaetomium cupreum* và *Chaetomium globosum* dựa vào đặc điểm hình thái và phân tích phân tử vùng liên gen. Nghiên cứu sâu hơn sẽ được tiến hành như thuốc trừ nấm sinh học và thử nghiệm trong điều kiện *in vitro*.

Từ khoá: Cây ăn quả có múi, *Chaetomium cupreum*, *Chaetomium globosum*, nấm đất.

Identification of *Chaetomium* Species Isolated from Citrus Cultivated Soils in Northern Vietnam

ABSTRACT

In Vietnam, citrus is one of the major fruit commodities and citrus farming brings about economic benefit for farmers and creates employment opportunities. *Chaetomium* was used as biological control agents against several pathogens causing plant disease. The research was conducted to identify the local strains of *Chaetomium* species from citrus cultivated soil samples collected in northern Vietnam. *Chaetomium* species were isolated by soil baiting technique. Based on morphological characteristics and molecular analysis of internal transcribed space gene, two species, *Chaetomium cupreum* and *Chaetomium globosum* were identified. Further research would formulate as biological fungicide and test *in vitro* conditions.

Keywords: Citrus, *Chaetomium cupreum*, *Chaetomium globosum*, soil fungi.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây ăn quả có múi (cam, quýt, chanh, bưởi, v.v...) là nhóm cây quan trọng trong sản xuất nông nghiệp ở nước ta. Các loại quả có múi không chỉ là hàng hóa đáp ứng cho tiêu thụ nội địa mà còn là mặt hàng xuất khẩu có giá trị kinh tế cao, đem lại lợi nhuận cho các hộ nông dân đồng thời tạo ra nhiều cơ hội việc làm. Tuy nhiên, ở các vùng trồng cây ăn quả có múi sử

dụng nhiều phân bón vô cơ, sử dụng thuốc hoá học liên tục trong nhiều năm liền, hiện nay đang bị nhiều loại bệnh gây hại, đặc biệt là bệnh do nấm *Phytophthora* spp. gây ra. Đây là một trong những bệnh hại quan trọng, tàn phá nặng nề cây ăn quả có múi trên thế giới và được coi là một trong những nhân tố trở ngại chính để phát triển ngành sản xuất này (Timmer *et al.*, 1991). Do loại nấm này có nguồn gốc từ đất nên việc phòng chống thường gặp nhiều khó

khẩn. Hiện nay, sử dụng vi sinh vật đối kháng có nguồn gốc từ đất đang là một biện pháp đầy tiềm năng nhằm kiểm soát nhóm tác nhân gây bệnh này.

Trong số các loài nấm đối kháng có tiềm năng lớn ứng dụng trong phòng chống bệnh cây là nấm thuộc chi *Chaetomium*. Đây là loại nấm túi hoại sinh lớn nhất với trên 300 loài đã được mô tả (von Arx *et al.*, 1986). Một số nấm thuộc chi *Chaetomium*, chủ yếu là 2 loài *C. globosum*, *C. cupreum* đã được chứng minh có hoạt tính ức chế nhiều loài nấm gây bệnh cây như *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Venturia inaequalis*, *Pyricularia oryzae*, *Botrytis cinera*, *Phomopsis*, *Colletotrichum* spp.,... (Soytong *et al.*, 2001; Aggarwall *et al.*, 2015), trong đó có các loài *Phytophthora* spp. hại cây ăn quả có múi (Kean *et al.*, 2010; Hung *et al.*, 2015).

Nấm đối kháng thuộc chi *Chaetomium* không những có tác dụng phòng chống bệnh hại cây trồng mà còn được sử dụng để tăng cường độ màu mỡ cho đất, kích thích cây trồng sinh trưởng phát triển và hấp thụ dinh dưỡng, tăng cường hệ sinh thái bền vững trong hệ thống nông nghiệp. Tại Việt Nam, đã có một số nghiên cứu sử dụng vi sinh vật đối kháng phòng trừ bệnh cây, một nghiên cứu sử dụng nấm thuộc chi *Chaetomium* trong phòng chống bệnh cây (Lê Thị Ánh Hồng và cs., 2005; Thiep & Soytong, 2015). Tuy nhiên, vẫn chưa có các công bố khoa học về xác định danh tính nấm thuộc chi *Chaetomium* ở nước ta. Bài báo này cung cấp thông tin chính xác tên loài nấm thuộc chi *Chaetomium* được thu thập trên vùng đất trồng cây ăn quả có múi dựa vào mô tả đặc điểm hình thái và định danh bằng kỹ thuật phân tử.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Nấm đối kháng phân lập từ đất trồng cây ăn quả có múi (gồm cây cam và bưởi) được thu thập trong năm 2012. Môi trường WA (water agar), môi trường PDA (potato dextrose agar): Khoai tây (200 g), dextrose (20 g), agar (15 g) và nước cất (1.000 ml). Các môi trường đều được

hấp vô trùng ở điều kiện áp suất 1,4 atm ở điều kiện nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút.

Hóa chất dùng trong kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction): 10xTaq buffer, dNTPs, Taq polymerase (5U/ml),... có nguồn gốc từ Đức, Nhật Bản.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thu thập, phân lập nấm

a) Thu mẫu

Các mẫu đất 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. Các mẫu được thu thập tại một số vùng trồng cây ăn quả có múi (cam, bưởi) ở 6 tỉnh gồm Bắc Giang, Hà Nội, Hà Giang, Hòa Bình, Hưng Yên và Tuyên Quang trong năm 2012.

b) Phân lập nấm

Nấm được phân lập từ đất bằng kỹ thuật đặt bẫy dùng giấy lọc. 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. Các đĩa đất được ủ trong tủ định ôn ở điều kiện 28°C và hàng ngày kiểm tra sự hình thành quả thể trên bẫy giấy. Khi quả thể xuất hiện thì chuyển lên môi trường WA có bổ sung kháng sinh ampicillin (100 mg/l) và streptomycin (100 mg/l), sau đó, tiếp tục cấy truyền lên môi trường PDA để làm thuần.

Các thí nghiệm trong phòng được thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu Bệnh cây nhiệt đới, Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

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

a) Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của nấm (được nuôi cấy trên môi trường PDA) được chiết bằng phương pháp CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) theo tài liệu mô tả của Doyle & Doyle (1987). DNA tổng số được hòa trong 30 µl đệm TE và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Bảng 1. Một số loài nấm dùng trong phân tích phả hệ vùng ITS

Loài nấm	Mẫu phân lập	Mã ITS truy cập Ngân hàng Gen	Nguồn gốc*	
			Phân lập	Quốc gia
<i>C. brasiliense</i>	C-07	KT357646	Không rõ	Ấn Độ
<i>C. brasiliense</i>	C-76	KT371339	Rễ cây rau mùi	Ấn Độ
<i>C. cupreum</i>	CC1	AB509366	Đất	Thái Lan
<i>C. cupreum</i>	CC10	AB509373	Đất	Thái Lan
<i>C. cupreum</i>	AHBR18	KF305757	Bụi lãg	Singapore
<i>C. cupreum</i>	CH031	KF601372	Rễ cây lạc	Brasil
<i>C. erectum</i>	CBS140.56	HM449044	Mùi tây	Trung Quốc
<i>C. erectum</i>	CBS111.63	JX280782	Không rõ	Hà Lan
<i>C. globosum</i>	Cg9	AY429056	Đất	Ấn Độ
<i>C. globosum</i>	TU2-1	AB470915	Đất	Trung Quốc
<i>C. globosum</i>	B221	GQ365152	Không rõ	Trung Quốc
<i>C. globosum</i>	PI476372	KC175290	Đậu trắng	Hoa Kỳ
<i>C. globosum</i>	NSW3	EU035807	Đất	Australia
<i>C. gracile</i>	KAUEF12	HF548698	Bông bông quí	Ả rập Xê út
<i>Achaetomium strumarium</i>	CBS333.67	AY681204	Đất	Ấn Độ

b) Phản ứng PCR

Hai cặp mồi ITS4 và ITS5 (White *et al.*, 1990) được sử dụng để nhân vùng liên gen (internal transcribed spacer, ITS) của nấm. Cho vào mỗi ống PCR loại 0,5 ml với tổng thể tích phản ứng là 25 µl, trong đó có chứa 2,5 µl đệm PCR; 0,5 µl DNA tổng số; 0,5 µl dNTPs; 1 µl mỗi loại mồi và 0,2 µl Taq polymerase. Phản ứng PCR được thực hiện với nhiệt độ gần mỗi là 50°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% được chuẩn bị bằng đệm TAE và chứa 0,5 mg/ml ethidium bromide.

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. Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được ước lượng nồng độ trên bản điện di gel agarose và được giải trình tự trực tiếp với bộ mồi dùng trong phản ứng PCR, thực hiện với kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) trên máy PCR (Macrogen, Hàn Quốc).

d) Phân tích trình tự sản phẩm PCR

Trình tự nucleotide của các mẫu nấm được biên tập và lắp ráp dùng phần mềm Seqman

(DNASTAR, LaserGene). Dựa vào các trình tự thu được, tìm kiếm cơ sở dữ liệu trên Ngân hàng Gen (GenBank) bằng dùng phần mềm trực tuyến BLAST tại NCBI (the National Center for Biotechnology Information).

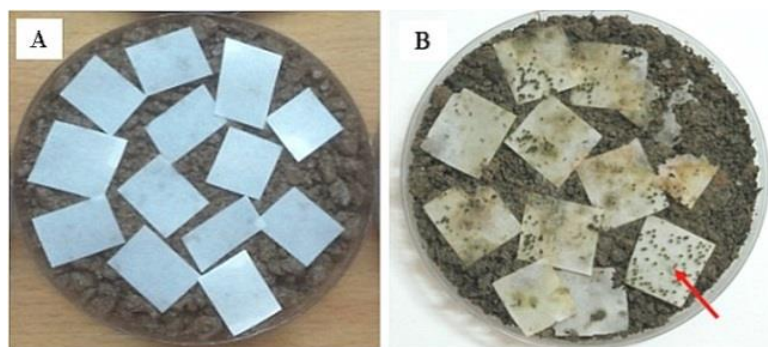
Trình tự nucleotide của các mẫu nấm trong nghiên cứu được phân tích vùng gen ITS với các loài nấm khác thuộc chi *Chaetomium* và sử dụng 1 mẫu nấm khác nhóm là *Achaetomium strumarium* (mã truy cập AY681204) sẵn có trên Ngân hàng Gen cũng được sử dụng trong phân tích làm mẫu tham khảo (Bảng 1). Phương pháp phân tích trình tự và phả hệ được thực hiện với các phần mềm BioEdit 7.0, ClustalX 1.83 và MEGA 6.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm hình thái nấm thuộc chi *Chaetomium*

Bằng kỹ thuật sử dụng đặt bẫy giấy vô trùng, có 58 mẫu nấm thuộc chi *Chaetomium* đã được phân lập. Tiếp theo, quả thể xuất hiện trên bẫy giấy được chuyển trực tiếp lên môi trường WA và làm thuần trên môi trường PDA để xác định sự hình thành và đặc điểm hình thái tản nấm.

Xác định danh tính nấm *Chaetomium cupreum* và *Chaetomium globosum* trên đất trồng cây ăn quả có múi tại miền Bắc Việt Nam



Hình 4.1. Minh họa kết quả cấy nấm thuộc chi *Chaetomium* bằng đặt giấy vô trùng

Ghi chú: A) Đặt cấy bằng giấy vô trùng; B) Quả thể nấm xuất hiện trên bề mặt mẫu giấy (mũi tên màu đỏ).

Trong tổng số 58 mẫu nấm thuộc chi *Chaetomium* có 2 loài nấm tiềm năng gồm loài *C. cupreum* (mẫu LN4-2) và *C. globosum* (mẫu VG4-1) được mô tả chi tiết ở các tiểu mục 3.1.1 và 3.1.2.

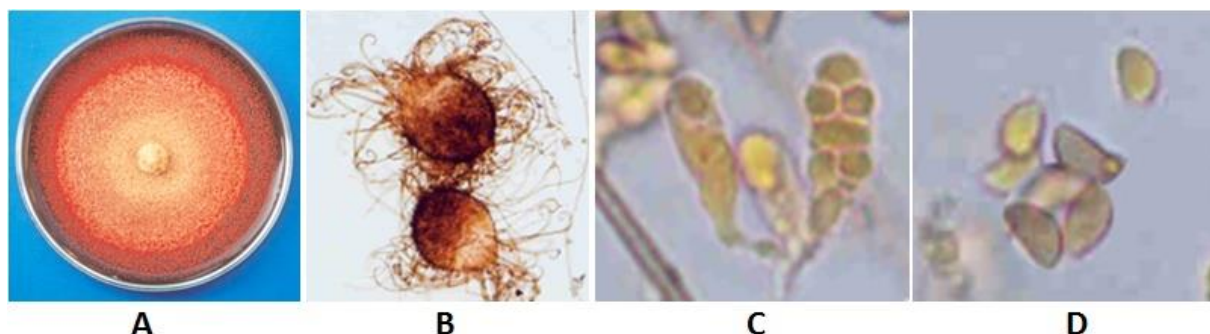
3.1.1. Đặc điểm hình thái nấm *C. cupreum*

Nấm thuộc chi *Chaetomium* được phân loại

dựa vào các đặc điểm hình thái cơ bản sau: i) hình dạng quả thể mở (perithecium); ii) lông bề mặt (lateral hair), lông bên của quả thể (terminal hair); và iii) túi (ascus). Danh tính nấm *C. cupreum* (mẫu LN4-2) phân lập trên đất trồng cây có múi tại miền Bắc Việt Nam được xác định dựa vào một số đặc điểm hình thái (bảng 2).

Bảng 2. Đặc điểm hình thái nấm *C. cupreum*

Đặc điểm	Chỉ tiêu theo dõi		
	Hình dạng	Màu sắc	Kích thước
Tân nấm	Tân nấm mọc đều, dạng vòng tròn đồng tâm. Sợi nấm bông xốp ăn sâu vào môi trường	Trên môi trường PDA sinh tiết sắc tố màu đỏ nhạt	Đường kính tân nấm đạt 9 cm sau 10 ngày nuôi cấy
Quả thể	Hình trứng - hình cầu	Nâu tía, nâu đỏ	113,7 x 128,4 μm
Lông bề mặt	Dài, xoắn ngọn	Nâu đồng	3,2 - 4,7 μm
Lông bên	Ngắn, nhỏ hơn lông bề mặt	Nâu nhạt	3,5 μm
Túi	Hình cà vạt, bên trong có chứa 8 bào tử	Màu trong suốt	22,7 x 11,8 μm
Bào tử túi	Hình trứng, hình lưới liềm. Có 1 lỗ mầm ở đỉnh	Nâu nhạt	10,1 x 7,4 μm



Hình 2. Hình thái nấm *C. cupreum* trên môi trường PDA

Ghi chú: tân nấm (A), quả thể (B), túi (C) và bào tử túi (D)

Quan sát đặc điểm hình thái nấm cho thấy, tản nấm mọc đều dạng vòng tròn đồng tâm, sợi nấm bông xốp, màu trắng, sinh tiết sắc tố màu đỏ nhạt trên môi trường PDA. Kích thước bào tử túi trung bình 10,1 x 7,4 μm có sai khác với tài liệu đã công bố trước đó. Kích thước bào tử túi theo tài liệu của Soyong and Quimio (1989) là 11 x 8 μm ; 13,2 x 10,4 μm - 9,6 x 8,4 μm (Ahammed *et al.*, 2005); 10 x 7,6 μm (Park *et al.*, 2005). Tuy nhiên, căn cứ vào hình dạng, màu sắc của quả thể, lông bề mặt, lông bên, túi và bào tử túi với khoá phân loại của Soyong & Quimio (1989) thì danh tính nấm được xác định chính xác là loài *C. cupreum* thuộc chi *Chaetomium*.

3.1.2. Đặc điểm hình thái nấm *C. globosum*

Danh tính nấm *C. globosum* (mẫu VG4-1) phân lập trên đất trồng cây có mùi tại miền Bắc Việt Nam được xác định dựa vào một số đặc điểm hình thái (Bảng 3).

Quan sát đặc điểm hình thái nấm cho thấy, tản nấm mọc đều dạng vòng tròn đồng tâm, sợi

nấm bông xốp, màu trắng nhưng không sinh tiết sắc tố trên môi trường PDA. Kích thước bào tử túi trung bình 10,9 x 12,2 μm có sai khác với tài liệu đã công bố của Soyong & Quimio (1989) là 10,2 x 11,5 μm . Tuy nhiên, căn cứ vào hình dạng, màu sắc của quả thể, lông bề mặt, lông bên, túi và bào tử túi với khoá phân loại của Soyong & Quimio (1989) thì danh tính nấm được xác định chính xác là loài *C. globosum* thuộc chi *Chaetomium*.

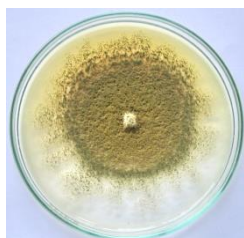
3.2. Định danh nấm bằng sinh học phân tử

3.2.1. Định danh bằng giải trình tự sản phẩm PCR

Sau khi đã được xác định danh tính bằng đặc điểm hình thái, 2 loài nấm có tiềm năng gồm *C. cupreum* và *C. globosum* trong nghiên cứu này được tiếp tục xác định danh tính bằng giải trình tự vùng ITS (internal transcribed spacer). DNA tổng số của nấm (được nuôi cấy trên môi trường PDA) được chiết bằng phương pháp CTAB theo phương pháp mô tả của Doyle

Bảng 3. Đặc điểm hình thái nấm *C. globosum*

Đặc điểm	Chỉ tiêu theo dõi		
	Hình dạng	Màu sắc	Kích thước
Tản nấm	Tản nấm mọc đều, dạng vòng tròn đồng tâm. Sợi nấm nhiều, bông xốp	Trên môi trường PDA có màu xám, xanh xám	Đường kính tản nấm đạt 9 cm sau 10 ngày nuôi cấy
Quả thể	Dạng hình cầu méo	Xanh ô liu xám - xanh ô liu đen	213 - 225 μm
Lông bề mặt	Dạng lượn sóng, xù xì	Nâu nhạt	3,84 - 3,97 μm
Lông bên	Ngắn, hơi lượn sóng	Nâu nhạt	2,3 - 3,1 μm
Túi	Dạng hình chùy, bên trong có chứa 8 bào tử	Màu trong suốt	29,7 - 10,5 μm
Bào tử túi	Hình quả chanh, có 1 lỗ mầm	Nâu nhạt - nâu đậm	10,9 x 12,2 μm



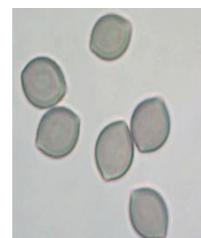
Mẫu VG4-1



Quả thể



Túi và bào tử túi



Bào tử túi

Hình 3. Một số đặc điểm hình thái nấm *C. globosum* trên môi trường PDA

Bảng 4. Kết quả PCR nhân vùng ITS

Mẫu phân lập	Nguồn gốc		Kết quả PCR
	Địa điểm (huyện - tỉnh/thành phố)	Đất trồng	
BQ5	Bắc Quang - Hà Giang	Cam	+
HY2	Hàm Yên - Tuyên Quang	Cam	+
KB3-2	Kim Bôi - Hoà Bình	Cam	+
LN4-2	Lục Ngạn - Bắc Giang	Cam	+
VG3	Văn Giang - Hưng Yên	Cam	+
LN6	Lục Ngạn - Bắc Giang	Cam	+
HN3-1	Thanh Oai - Hà Nội	Bưởi	+
CP5-2	Cao Phong - Hoà Bình	Cam	+
VG1-1	Văn Giang - Hưng Yên	Cam	+
VG4-1	Văn Giang - Hưng Yên	Cam	+
Nước cất vô trùng	Invitrogen (đối chứng âm)	-	-

Ghi chú: (-) phản ứng PCR âm tính; (+) phản ứng PCR dương tính.

& Doyle (1987), phản ứng PCR đã được thực hiện để nhân vùng ITS dùng 2 mỗi chung là ITS4 và ITS5 như mô tả trong phần phương pháp. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, 10 mẫu nấm tạo băng sản phẩm với kích thước xấp xỉ khoảng 600 bp, trong khi đó mẫu đối chứng là nước cất vô trùng không xuất hiện vạch băng trên bản điện di (hình không đưa ra). Các mẫu nấm này tiếp tục được giải trình tự để định danh tên loài và phân tích phả hệ.

Tiếp theo, sản phẩm PCR của các mẫu nấm phân tích được tinh chiết từ gel agarose dùng kit tách chiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất, các mẫu nấm được giải trình tự 2 chiều dùng cặp mỗi chung là ITS4 và ITS5. Kết quả giải trình tự cho thấy, 10 mẫu nấm đều có chất lượng giải trình tự tốt, vạch băng rõ nét, kích thước trình tự đọc được từ 513 nts (mẫu phân lập VG3) đến 552 nts (mẫu phân lập LN6 và CP5-2).

Từ kết quả trên, 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 của NCBI (Bảng 5).

Kết quả tìm kiếm các chuỗi tương đồng trên Ngân hàng Gen cho thấy, trình tự của 10 mẫu

nấm phân tích đều là các chuỗi mã hoá vùng gen ITS của nấm *C. cupreum* và *C. globosum* phân lập từ đất và trên nhiều loại cây ký chủ khác nhau.

Trình tự của 5 mẫu (gồm BQ5, HY2, KB3-2, LN4-2 và VG3), phần trăm đoạn so sánh là 100% có mức đồng nhất trình tự 99% so với các mẫu nấm *C. cupreum* được phân lập từ đất tại Thái Lan. Trình tự của 5 mẫu (gồm LN6, HN3-1, CP5-2, VG1-1 và VG4-1), phần trăm đoạn so sánh là 100% có mức đồng nhất trình tự 99 - 100% với các mẫu nấm *C. globosum* được phân lập từ đất (mã truy cập AB470915, AY429056, GQ365152 và EU035807) ở Ấn Độ, Trung Quốc, Australia và trên cây cà chua (mã truy cập KU681434) ở Ai Cập.

3.2.2. Phân tích phả hệ

Phân tích phả hệ dựa trên 10 trình tự nucleotide được xác định là loài *C. cupreum* và *C. globosum* nhằm hiểu rõ hơn mối quan hệ của các mẫu phân tích này. Trước khi xây dựng quan hệ phả hệ, các trình tự nucleotide được căn trình tự đa chuỗi bằng phần mềm ClustalX. Khoảng cách di truyền giữa các trình tự nấm được xác định dựa trên mô hình thay thế Kimura 2-Parameter trong MEGA 6.0. Cây phả hệ được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-

Joining và độ tin cậy của các mối quan hệ phải được tính toán bằng kỹ thuật “bootstrap” với 1.000 lặp. Quan hệ phả hệ của 10 mẫu trong nghiên cứu này được phân tích với đại diện của 6 loài thuộc chi *Chaetomium* và đối chứng ngoài nhóm là nấm *Achaetomium strumarium* (bảng 1). Kết quả được trình bày ở hình 4.

Kết quả phân tích phả hệ cho thấy, có 5 mẫu (gồm BQ5, HY2, KB3-2, LN4-2 và VG3)

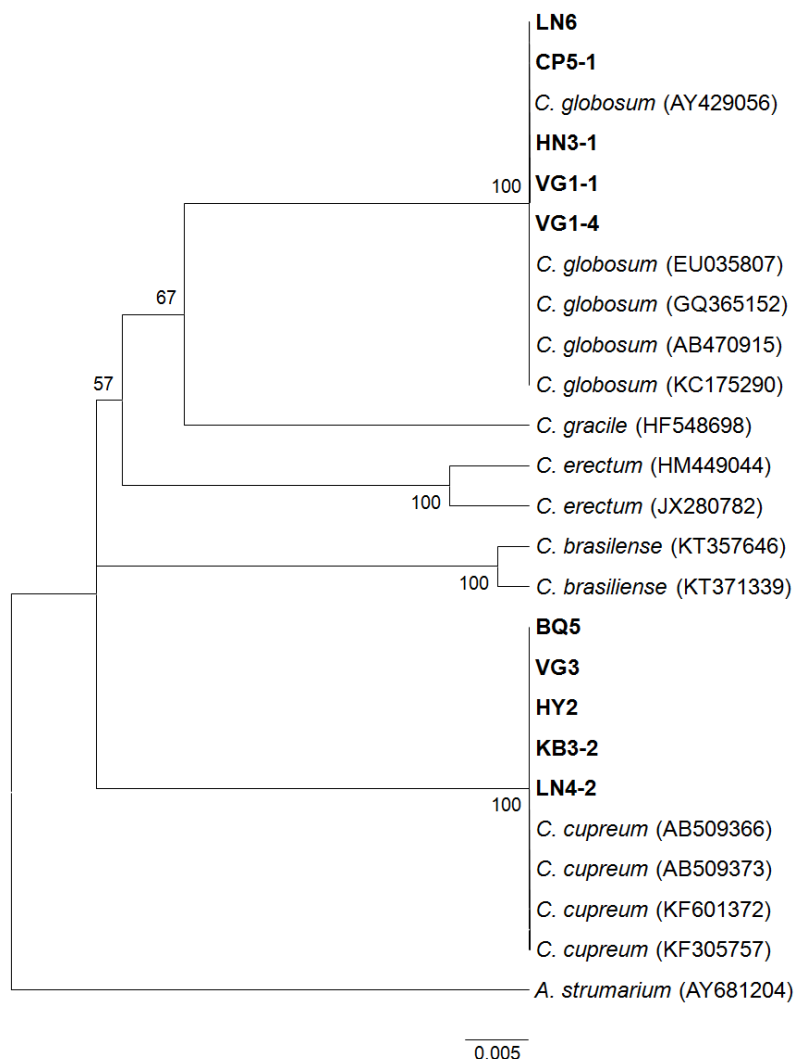
phân nhóm rõ rệt, nằm cùng cụm nhánh với các mẫu nấm thuộc loài *C. cupreum* (giá trị bootstrap 100%) được phân lập tại Thái Lan, Singapore và Brasil. Còn 5 mẫu (gồm LN6, HN3-1, CP5-2, VG1-1 và VG4-1) phân nhóm rõ rệt, nằm cùng cụm nhánh với các mẫu nấm thuộc loài *C. globosum* (giá trị bootstrap 100%) được phân lập tại Hoa Kỳ, Trung Quốc và Australia.

Bảng 5. Kết quả tìm kiếm các trình tự gắn gửi trên Ngân hàng Gen

Mẫu nấm	Loài gắn gửi nhất trên Ngân hàng Gen*			Phần trăm đoạn so sánh (%)	Mức đồng nhất trình tự (%)
	Nguồn gốc	Tên loài	Mã truy cập		
BQ5	Thái Lan	<i>C. cupreum</i>	AB509368	100	99
	Thái Lan	<i>C. cupreum</i>	AB509373	100	99
	Thái Lan	<i>C. cupreum</i>	AB509372	100	99
HY2	Thái Lan	<i>C. cupreum</i>	AB509368	100	99
	Thái Lan	<i>C. cupreum</i>	AB509373	100	99
	Thái Lan	<i>C. cupreum</i>	AB509372	100	99
KB3-2	Thái Lan	<i>C. cupreum</i>	AB509368	100	99
	Thái Lan	<i>C. cupreum</i>	AB509373	100	99
	Thái Lan	<i>C. cupreum</i>	AB509372	100	99
LN4-2	Thái Lan	<i>C. cupreum</i>	AB509368	100	99
	Thái Lan	<i>C. cupreum</i>	AB509373	100	99
	Thái Lan	<i>C. cupreum</i>	AB509372	100	99
VG3	Thái Lan	<i>C. cupreum</i>	AB509368	100	99
	Thái Lan	<i>C. cupreum</i>	AB509373	100	99
	Thái Lan	<i>C. cupreum</i>	AB509372	100	99
LN6	Ai Cập	<i>C. globosum</i>	KU681434	100	100
	Ấn Độ	<i>C. globosum</i>	AY429056	100	99
	Trung Quốc	<i>C. globosum</i>	GQ365152	100	99
HN3-1	Trung Quốc	<i>C. globosum</i>	GQ365152	100	99
	Trung Quốc	<i>C. globosum</i>	AB470915	100	99
	Ấn Độ	<i>C. globosum</i>	AY429056	100	99
CP5-2	Ai Cập	<i>C. globosum</i>	KU681434	100	100
	Ấn Độ	<i>C. globosum</i>	AY429056	100	99
	Trung Quốc	<i>C. globosum</i>	GQ365152	100	99
VG1-1	Trung Quốc	<i>C. globosum</i>	GQ365152	100	100
	Ấn Độ	<i>C. globosum</i>	AY429056	100	100
	Australia	<i>C. globosum</i>	EU035807	100	100
VG4-1	Trung Quốc	<i>C. globosum</i>	GQ365152	100	100
	Trung Quốc	<i>C. globosum</i>	AB470915	100	100
	Australia	<i>C. globosum</i>	EU035807	100	100

Ghi chú: * Chỉ trình bày 03 trình tự gắn gửi nhất trên Ngân hàng Gen.

Xác định danh tính nấm *Chaetomium cupreum* và *Chaetomium globosum* trên đất trồng cây ăn quả có múi tại miền Bắc Việt Nam



Hình 4. Phân tích phả hệ dựa trên trình tự toàn bộ vùng ITS của các mẫu nấm

Ghi chú: Các mẫu nấm chi *Chaetomium* của Việt Nam được in đậm. Cây được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining. Giá trị ở các nút là giá trị thống kê bootstrap dưới dạng% (1.000 lần lặp). *A. strumarium* được đưa vào làm đối chứng. Thanh bar thể hiện khoảng cách di truyền.

Như vậy, kết quả phân tích phả hệ dựa trên trình tự nucleotide cho kết quả tương tự với phân tích đồng nhất trình tự. Kết hợp với định danh bằng hình thái, cả 10 mẫu nấm này đều thuộc chi *Chaetomium* và đã được định danh chính xác là loài *C. cupreum* và *C. globosum*.

4. KẾT LUẬN

Đã xác định được danh tính nấm *C. cupreum* và *C. globosum* thuộc chi *Chaetomium* trên đất trồng cây ăn quả có múi dựa vào đặc điểm hình thái và bằng sinh học phân tử. Tảo

nấm *C. cupreum* (mẫu LN4-2) mọc đều dạng vòng tròn đồng tâm, sinh tiết sắc tố màu đỏ nhạt trên môi trường PDA, kích thước bào tử túi trung bình 10,1 μm x 7,4 μm . Tảo nấm *C. globosum* (mẫu VG4-1) mọc đều dạng vòng tròn đồng tâm nhưng không sinh tiết sắc tố trên môi trường PDA, kích thước bào tử túi trung bình 10,9 μm x 12,2 μm . Trong tổng số 10 mẫu được giải trình tự, có 5 mẫu (gồm BQ5, HY2, KB3-2, LN4-2 và VG3) thuộc loài *C. cupreum* và 5 mẫu (gồm LN6, HN3-1, CP5-2, VG1-1 và VG4-1) thuộc loài *C. globosum*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aggarwal, R. (2015). *Chaetomium globosum*: A potential biocontrol agent and its mechanism of action. *Indian Phytopathology*, 68(1): 8-24.
- Ahammed, S.K., Aggarwal, R. and Renu T. (2005). Use of PCR based RAPD technique for characterization of *Chaetomium globosum* isolates. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 40(3-4): 303-314.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- 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.
- Hung, P.M., Wattanachai, P., Kasem, S. and Poeaim, S. (2015). Efficacy of *Chaetomium* species as biological control agents against *Phytophthora nicotianae* root rot in citrus. *Mycobiology*, 43(3): 288-296.
- Kean, S., Soyong, K., and Toanun, C. (2010). Application of biological fungicides to control citrus root rot under field condition in Cambodia. *Journal of Agricultural Technology*, 6(2): 219-230.
- Park, J.H., Choi, G.J., Jang, K.S., Lim, H.K., Kim, H.T., Cho, K.Y. and Kim, J.C. (2005). Antifungal activity against plant pathogenic fungi of chaetoviridins isolated from *Chaetomium globosum*. *FEMS Microbiology Letters*, 252(2): 309-313.
- 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.
- Timmer, L.W., Agostini, J.P., Graham, J.H. and Castle, W.S. (1991). Relationship of citrus rootstock to *Phytophthora* root rot and populations of *Phytophthora parasitica*. In: *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 104: 173-178.
- von Arx, J.A., Guarro J. and Figueras M.J. (1986). Ascomycete genus *Chaetomium*. *Beih. Nova Hedwigia*, 84: 1-162.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.). Academic Press, Inc., New York, pp. 315-322.
- Soyong, K. and Quimio, T.H. (1989). A taxonomic study on the Philippine species of *Chaetomium*. *The Philippine Agriculturist*, 72(1): 59-72.
- Soyong, K., Kanokmadhakul, S., Kukongviriyapa, V. and Isobe, M. (2001). Application of *Chaetomium* species (Ketomium®) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control: a review article. *Fungal Diversity*, 7: 1-15.