

ĐỊNH DANH MỘT SỐ CHỦNG NẤM KÝ SINH CÔN TRÙNG TỪ HAI LOÀI NẤM *METARHIZIUM ANISOPLIAE* SOROKIN, *BEAUVERIA BASSIANA* VUILLEMIN Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG BẰNG PHƯƠNG PHÁP PCR

Lê Hữu Phước¹ và Trần Văn Hai²

ABSTRACT

The study was carried out at the laboratory of Biotechnology Research & Development Institute, Can Tho University to confirm the identification of two entomopathogenic fungi collected from vegetable crops in 4 provinces of the Mekong delta using PCR technique. Five isolates from An Giang (AG), Can Tho (CT), Vinh Long (VL) and Soc Trang (ST) were identified belongs to *Metarhizium anisopliae* Sorokin (Ma) and *Beauveria bassiana* Vuillemin (Bb). PCR products of 3 *Metarhizium anisopliae* isolates namely Ma-AG, Ma-VL, Ma-CT and 2 isolates of *Beauveria bassiana*, Bb-CT and Bb-ST showed band 420 bps and 540 bps respectively with 2 pairs of specific primers: Mac spF, Mac spR for *Metarhizium anisopliae* and Bebas spF, Bebas spR for *Beauveria bassiana* fungi. The PCR analysis confirms the morphological identification of these 5 isolates of insect-pathogen fungi.

Keywords: entomopathogenic fungi, PCR, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*

Title: Identification of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* Sorokin and *Beauveria bassiana* Vuillemin in Mekong delta based on PCR method

TÓM TẮT

Thí nghiệm được thực tại Viện Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại học Cần Thơ nhằm định danh một số chủng nấm ký sinh côn trùng có triển vọng ở trên nhóm rau ăn lá ở bốn tỉnh bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) bằng phương pháp PCR. Kết quả đã phân lập được 5 chủng nấm ký sinh côn trùng từ hai loài nấm *Metarhizium anisopliae* Sorok., *Beauveria bassiana* Vuill. trên một số loài sâu bị nhiễm bệnh từ 4 tỉnh An Giang, Cần Thơ, Sóc Trăng và Vĩnh Long. Trong đó, các chủng nấm được kiểm chứng bằng phương pháp PCR với 2 cặp mồi đặc hiệu Mac spF-Mac spR (đối với nấm *Metarhizium anisopliae*) và Bebas spF-Bebas spR (đối với nấm *Beauveria bassiana*). Sản phẩm PCR của 3 chủng nấm xanh Ma-AG, Ma-VL, Ma-CT là những băng màu có kích thước 420 kb và của 2 chủng nấm trắng Bb-CT, Bb-ST là 540 kb. Điều này chứng tỏ chúng đều cùng thuộc loài *Metarhizium anisopliae* Sorok. và *Beauveria bassiana* Vuill.

Từ khóa: nấm ký sinh, PCR, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Phòng trừ sâu hại là một trong những khó khăn lớn nhất trong nghề trồng rau và là mối quan tâm lo lắng hàng đầu của nông dân. Biện pháp phòng trừ của nông dân chủ yếu dựa vào việc phun thuốc hóa học là chính mà rất ít biết đến các biện pháp khác. Sự phát triển tính kháng thuốc của sâu hại cũng như ảnh hưởng của thuốc

¹ Bộ môn Khoa học Cây trồng, Trường Đại học An Giang

² Bộ môn Bảo vệ thực vật, Khoa NN & SHUD, Trường Đại học Cần Thơ

hóa học lên sức khỏe con người và môi trường đã tạo áp lực mạnh mẽ cho sự phát triển của các tác nhân sinh học trong phòng trừ tổng hợp côn trùng gây hại. Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu ở các nước trên thế giới như Úc, Brazil, Mỹ, Pháp, Colombia, Venezuela đã cho thấy việc sử dụng các loại nấm ký sinh côn trùng trong phòng trừ tổng hợp các loài sâu gây hại một cách hợp lý đã mang lại hiệu quả khá cao (Butt và Copping, 2000). Nghiên cứu được thực hiện nhằm định danh chính xác hơn phương pháp quan sát hình thái bên ngoài một số dòng nấm ký sinh côn trùng ở bốn tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long sau khi phân lập được, làm tiền đề cho việc nghiên cứu hiệu quả của 3 loài nấm này lên một số đối tượng gây hại quan trọng.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguồn nấm

Hai loài nấm *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* được phân lập ở 4 tỉnh đồng bằng sông Cửu Long.

2.2 Hóa chất

Môi trường dùng nuôi cấy nấm gồm: glucose, pepton, MgSO₄, KH₂PO₄, NaNO₃, Yeast, agar, nước cất...

Trích DNA: Extraction buffer (200mM Tris HCl/pH8, 25mM EDTA, 250 mM NaCl, 0,5% SDS), Isopropanol, TE buffer (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA), Chloroform Isoamyl Alcohol, bi nước (nước cất 2 lần vô trùng), NaAc 3M (Sodium Acetate).

Quy trình phản ứng PCR: Bi nước, Buffer (Taq Polymerase + KCL + MgCl₂), dNTP, BSA (Bovine Serum Albumin Acetylated, nồng độ 10mg/ml), DNA mẫu.

Primer đặc hiệu cho nấm *Metarhizium anisopliae*: Mac spF (5' CTG TCA CTG TTG CTT CGG CGG TAC 3' và Mac spR (5' CCC GTT GCG AGT GAG TTA CTA CTG C 3'), cho sản phẩm PCR có kích thước 420 bp (Bon *et al.*, 2009). Cặp mồi đặc hiệu này sẽ khuếch đại phân đoạn DNA có kích thước 420 bp của vùng 18SrDNA của loài nấm *Metarhizium anisopliae* dựa trên trình tự của 18SrDNA có 02 vùng nhận biết ITS1 và ITS2.

Primer đặc hiệu cho nấm *Beauveria bassiana*: Bebas spF (5' AGT CGT AAC AAG GTC TCC GTT G 3') và Bebas spR (5' GTT CCG GTG CGA GCT GTA TT 3'), cho sản phẩm PCR có kích thước 540 bp (Fernandes và Rober, 2008). Cặp mồi đặc hiệu sẽ khuếch đại phân đoạn DNA có kích thước 540 bp của vùng 18SrDNA của loài nấm *Beauveria bassiana* dựa trên trình tự của 18SrRNA có 02 vùng nhận biết ITS1 và ITS2.

2.3 Phương pháp

2.3.1 Ly trích DNA từ các chủng nấm

Mẫu nấm được nuôi cấy trong môi trường SDAY₃ khoảng 3 – 5 ngày ủ trong điều kiện nhiệt độ 25⁰C. Sau 3 – 5 ngày nấm đã bắt đầu phát triển tiến hành các bước sau:

- Cân 4 tube (tube 1,5 ml) mỗi tube 0,4g môi trường có chứa nấm.
- Cho vào mỗi tube 500 µl dung dịch TE (10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA, pH=8).
- Ly tâm 13.000 rpm (vòng/phút) trong 5 phút, đổ dung dịch lỏng ở trên, lấy phần tủa dưới tube, thêm 300 µl Extraction buffer.
- Dùng đũa thủy tinh nghiền nhỏ sợi nấm thật kỹ, lắc đều, đặt tube ở điều kiện -20⁰C trong 20 phút.
- Lấy mẫu ra làm tan đá và ly tâm 13.000 rpm trong 5 phút, chuyển phần lỏng sang tube mới (loại bỏ tủa).
- Thêm vào 600 µl Chloroform Isoamyl alcohol để loại bỏ các thành phần không mong muốn trong mẫu, chủ yếu là các protein bằng tác dụng làm biến tính protein đồng thời không hòa tan acid nucleic. Chú ý mang khẩu trang cẩn thận vì là hóa chất độc, tiến hành trong tủ hút.
- Lắc tube thật mạnh rồi đem ly tâm với tốc độ 12.000 rpm trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Protein khi đã bị biến tính sẽ không còn hòa tan trong pha nước có chứa acid nucleic và sau khi ly tâm sẽ hình thành một màng ngăn giữa DNA và protein.
- Chuyển phần dịch trong phía trên sang tube eppendorf 1,5ml mới, thao tác cẩn thận tránh làm vỡ màng ngăn sẽ không thu được DNA tinh sạch.
- Đem ly tâm với tốc độ 13.000 rpm trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Loại bỏ phần nước. Các DNA có trọng lượng phân tử thấp (bị gãy do thao tác hoặc các enzyme nội bào giải phóng ra môi trường khi phá vỡ tế bào) không bị tủa, vì thế có thể loại chúng ra khỏi sản phẩm khi dùng cách tủa bằng isopropanol.
- Phần DNA tủa sẽ được rửa loại bỏ các dấu vết của isopropanol còn dính lại trên mẫu bằng cách cho vào 1ml ethanol 70% (2 lần). Mỗi lần rửa sẽ đem ly tâm ở 12.000 rpm trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.
- Đem ly tâm chân không trong 15 phút ở 45⁰C để loại bỏ ethanol, hòa tan trong 30 µl nước cất (Bi nước).

2.3.2 Kiểm tra độ tinh sạch của DNA bằng cách đo chỉ số OD_{260nm} (bước sóng 260 nm)

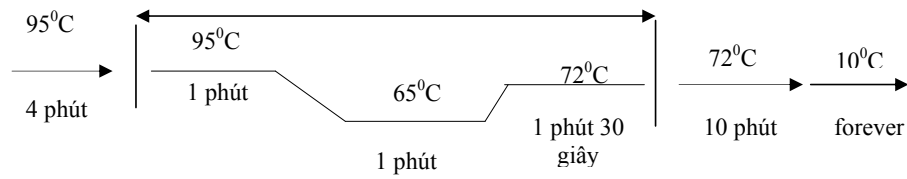
Nguyên tắc của phương pháp này dựa vào sự hấp thụ ánh sáng tử ngoại bước sóng 260nm của các base purine và pyrimidine. Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260nm của các mẫu đo cho phép xác định nồng độ acid nucleotide trong mẫu. Cách tiến hành:

- Pha loãng bằng cách cho vào tube mới 10 µl mẫu + 90 µl H₂O (pha loãng 10 lần).
- 1 đơn vị OD = 50 ng/µl. Trong quá trình thực hiện phản ứng PCR này, nồng độ mẫu được pha loãng 10 lần nên nồng độ DNA = OD x 50 x 10 (ng/µl).

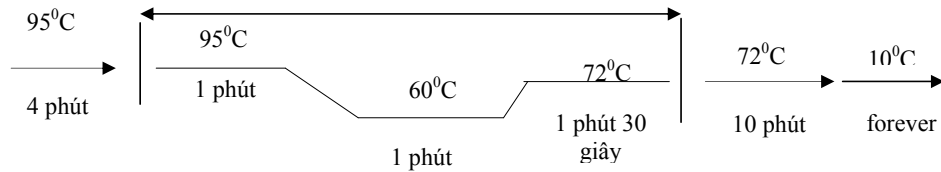
2.3.3 Phản ứng PCR

Quy trình trích DNA và chạy PCR theo quy trình mới nhất của Bon *et al.* (2009) đối với nấm *Metarhizium anisopliae* và Fernandes *et al.* (2008) đối với nấm *Beauveria bassiana*.

- Cho vào mỗi tube nhỏ 24 μ l mix + 1 μ l DNA = 25 μ l (trừ mẫu đối chứng -).
- Cho vào máy PCR và tinh chỉnh thời gian, nhiệt độ.



Hình 1: Chu trình nhiệt của nấm *Metarhizium anisopliae*



Hình 2: Chu trình nhiệt của nấm *Beauveria bassiana*

Đối với nấm *Beauveria bassiana*, chu trình nhiệt cũng tương tự như nấm *Metarhizium anisopliae*, chỉ khác ở giai đoạn gắn môi là 60°C, thay vì nấm *Metarhizium anisopliae* là 65°C, vì theo Fernandes và Robert (2008), nấm trắng *Beauveria bassiana* cần nhiệt độ thấp hơn để gắn các cầu nối lại với chu kỳ đủ dài để chuẩn bị cho bước kéo dài chuỗi DNA.

Sau khi trích DNA các chủng nấm phân lập được, phản ứng PCR được tiến hành bằng máy PCR Bio-Rad DNA Engine (Mỹ) để nhận diện một số chủng nấm với cặp môi đặc hiệu (specific primers).

2.3.4 Điện di gel chứa sản phẩm phản ứng PCR

Các sản phẩm DNA của nấm sau khi đã khuếch đại bằng phản ứng PCR sẽ tiếp tục được phân tích bằng điện di trên gel agarose 1,5% với 6X loading buffer (LB) bởi 15 phút nhuộm với ethidium bromide (0,8mg/l). Sau khi điện di trên gel agarose, các mẫu DNA của nấm được quan sát kết quả dưới tia UV (bước sóng 260 nm) để xác định chất lượng của DNA, cũng như để phát hiện loài nấm muốn định danh. Sử dụng thang chuẩn 100bp (với cặp môi đặc hiệu) để ước lượng kích thước của băng DNA nấm trên hình gel chụp được.

- Bước 1: Chuẩn bị gel agarose 1,5 %
- Bước 2: Chạy điện di trên gel agarose

Đặt khuôn gel vào bể điện di TBE buffer 1X cho ngập giếng, load vào mỗi giếng 10 μ l dung dịch sản phẩm PCR đã được trộn 2 μ l loading buffer. Load 6 μ l thang chuẩn vào giếng còn lại. Bật nguồn điện cho thiết bị chạy ở 100V trong 80 phút. Quan sát khi thấy chất chỉ thị màu di chuyển đến gần cuối gel, tắt nguồn điện, lấy khuôn gel ra khỏi thiết bị điện di, chụp hình gel.

- Bước 3: Chụp hình gel đã chạy điện đi

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Một số đặc điểm của các chủng nấm phân lập

Ở ngoài đồng, khoảng 3-5 ngày đầu các sợi tơ nấm đều có màu trắng nhạt nên dễ nhầm lẫn 3 loại nấm này nếu không quan sát kỹ. Trong môi trường nuôi cấy nhân tạo, mặt trên đĩa nấm *Metarhizium anisopliae* xuất hiện các vòng màu xanh sậm, hơi đen (còn gọi là nấm xanh hay nấm lục cương), trong khi nấm *Beauveria bassiana* mặt trên đĩa petri toàn thể có màu trắng nhạt, sợi nấm mịn (còn được gọi là nấm trắng hay nấm bạch cương) và nấm *Paecilomyces* sp. các tơ nấm dần chuyển sang màu tím than từ nhạt đến đậm (khoảng từ 7-10 ngày sau khi cấy, nên còn gọi là nấm tím). Màu sắc, hình ảnh của tơ nấm được ghi nhận ở hình 18. Những mô tả về hình thái bên ngoài này cũng tương tự như mô tả của các tác giả Trần Văn Mão (2002), Phạm Thị Thùy (1999), Rombach *et al.* (1994), Butt và Copping (2000) khi phân lập các chủng nấm ký sinh côn trùng. Nấm *Metarhizium anisopliae* và *Beauveria bassiana* dễ phân lập hơn nấm *Paecilomyces* sp. do chúng ít nhiễm, sinh trưởng nhanh và tạo bào tử sớm hơn trong môi trường nuôi cấy nhân tạo.

Bảng 1: Một số đặc điểm hình thái của các chủng nấm phân lập

STT	Ký hiệu	Dạng bào tử	Tơ nấm	Mặt dưới đĩa petri	Mặt trên đĩa petri	Cuống bào tử
1	Ma-AG	Cầu, trụ	Vàng nhạt, phân nhánh	Vàng	Xanh lục	Phân nhánh hoặc dạng cây, bào tử trên đỉnh cuống dính liền
2	Ma-VL	Trụ, hạt đậu	Vàng ngả xanh	Vàng	Xanh lục trên nền trắng	Phân nhánh, bào tử trên đỉnh cuống dính liền
3	Ma-CT	Trụ	Xanh lục	Vàng nhạt	Trắng xanh	Phân nhánh như cành cây
4	Bb-CT	Cầu, elip	Trắng ngà, mịn	Trắng đục	Trắng ngà/vàng nhạt	Phân nhánh nhiều ở cuối sợi nấm, bào tử trên đỉnh cuống dính liền
5	Bb-ST	Cầu, trụ	Trắng ngà, mịn	Trắng đục	Trắng ngà/vàng nhạt	Có gốc hình cầu gắn trên cành bào tử so le hoặc bào tử mọc thành chùm

Ghi chú: Ma: *Metarhizium anisopliae*, Bb: *Beauveria bassiana*

AG: An Giang; CT: Cần Thơ; VL: Vĩnh Long; ST: Sóc Trăng

Kiểm tra lại bằng PCR

Trong các phòng thí nghiệm sinh học phân tử, để xác định nồng độ DNA thì phương pháp dùng phổ biến là phương pháp quang phổ kế. Có thể đo trực tiếp nồng độ DNA và biết được độ tinh sạch của dịch DNA một cách chính xác. Quy trình trích DNA và chạy PCR theo quy trình mới nhất của Bon *et al.* (2009) đối với

nấm *Metarhizium anisopliae* và Fernandes và Roberts (2008) đối với nấm *Beauveria bassiana*.

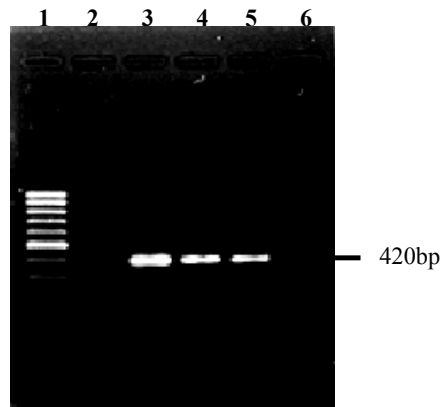
Nồng độ DNA của từng chủng nấm sau khi trích DNA là rất tinh sạch, không lẫn protein và có tỷ số OD_{260/280} từ 1,8108 đến 1,9446 (nằm trong khoảng 1,8-2,0) (Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2002).

Theo Bennasar *et al.* (1996), nồng độ DNA trước khi thực hiện phản ứng PCR có nồng độ khoảng 100 ng/μl sẽ cho kết quả rõ nhất. Do đó, phải pha loãng DNA mẫu trước khi thực hiện phản ứng khuếch đại PCR tùy theo nồng độ của chúng.

Đối với ba chủng nấm Ma-AG, Ma-VL, Ma-CT

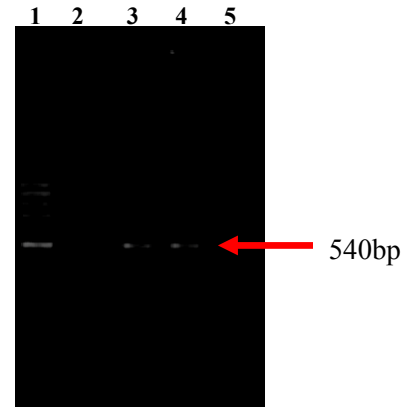
Phản ứng PCR của 3 chủng nấm xanh *Metarhizium anisopliae* với 2 đoạn mồi chuyên biệt Mac spF CTG TCA CTG TTG CTT CGG CGG TAC 3' và Mac spR CCC GTT GCG AGT GAG TTA CTA CTG C 3', cùng 35 chu kỳ nhiệt và được kiểm tra trên gel agarose 1,5%. Kết quả điện di sản phẩm PCR được trình bày ở hình 3.

Cả ba chủng nấm Ma-AG (giếng số 3), Ma-VL (giếng số 4) và Ma-CT (giếng số 5) đều xuất hiện băng ở vị trí 420 kb, trong khi mẫu đối chứng âm (*Aspergillus sp.*, giếng số 2) và mẫu nước (giếng số 6) không xuất hiện băng màu vì cặp mồi chuyên biệt Mac spF và Mac spR được thiết kế để nhận dạng loài *Metarhizium anisopliae*, chỉ khuếch đại phân đoạn DNA có kích thước 420 kb ở 2 vùng ITS1 và ITS2 của loài nấm *Metarhizium anisopliae* mà không cho sản phẩm PCR với các chủng nấm khác (Bon, *et al.*, 2009). Do đó, có thể kết luận là 3 chủng nấm phân lập được từ 3 tỉnh là cùng loài *Metarhizium anisopliae* Sorok., thuộc ngành phụ lớp nấm bất toàn *Deuteromycetes*, bộ *Clavicipitales*.



Hình 3: Xác định 3 chủng nấm *Metarhizium anisopliae* bằng PCR với cặp mồi chuyên biệt Mac spF và Mac spR

(1): Maker 100 bp; (2): *Aspergillus sp.*; (3): Ma-AG; (4): Ma-VL; (5): Ma-CT; (6): Nước



Hình 4: Xác định 2 chủng nấm *Beauveria bassiana* bằng PCR với cặp mồi chuyên biệt Bebas spF và Bebas spR

(1): Maker 100 bp; (2): Nước; (3): Bb-CT; (4): Bb-ST; (5): Ma-CT

ĐỐI VỚI HAI CHỦNG NẤM Bb-CT, Bb-ST

Phản ứng PCR của 2 chủng nấm trắng *Beauveria bassiana* với 2 đoạn mồi chuyên biệt Bebas spF 5' AGT CGT AAC AAG GTC TCC GTT G 3' và Bebas spR 5' GTT CCG GTG CGA GCT GTA TT 3', cùng 35 chu kỳ nhiệt và kiểm tra trên gel agarose 1,5%. Kết quả điện di sản phẩm PCR được trình bày trong hình 4.

Cả hai chủng nấm Bb-CT (giếng số 3) và Bb-ST (giếng số 4) đều xuất hiện băng màu ở vị trí 540 kb, trong khi mẫu đối chứng âm (Ma-CT, giếng số 6) và đối chứng nước (giếng số 2) không xuất hiện băng màu vì cặp mồi chuyên biệt Bebas F và Bebas spR được thiết kế để nhận dạng loài *Beauveria bassiana*, chỉ khuếch đại phân đoạn DNA có kích thước 540 kb ở 2 vùng ITS1 và ITS2 của loài nấm *Beauveria bassiana* mà không cho sản phẩm PCR với các chủng nấm khác (Fernandes và Roberts, 2008). Do đó, có thể kết luận là 2 chủng nấm phân lập được từ 2 tỉnh cùng là loài *Beauveria bassiana* Vuill., thuộc lớp nấm bất toàn Deuteromycetes, bộ Clavicipitales.

4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã định danh được 5 chủng nấm ký sinh côn trùng từ 4 tỉnh ĐBSCL: hai chủng nấm *Metarhizium anisopliae* (Ma-AG, Ma-VL, Ma-CT) và ba chủng nấm *Beauveria bassiana* (Bb-CT và Bb-ST) từ côn trùng bị nhiễm nấm ngoài tự nhiên. Qua kiểm tra bằng PCR ba chủng nấm *Metarhizium anisopliae* này với cặp mồi đặc hiệu, khuếch đại phân đoạn DNA cho sản phẩm PCR có kích thước 420 kb, đã định danh được cả ba chủng nấm này đều là loài *Metarhizium anisopliae*. Trong khi đó, hai chủng nấm Bb-CT và Bb-ST có sản phẩm PCR kích thước 540 kb, cùng thuộc loài *Beauveria bassiana*. Điều này khẳng định lại kết quả định danh bằng hình thái qua quan sát dưới kính hiển vi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bon, M., Maniana, N., Ouna, E., Vaughan, L., Jeanneau, M. and Mercadier, G. 2009. "Multilocus sequence typing of *Metarhizium anisopliae* isolates as microbial agents for locust and grasshopper control". *Appl. Environ. Microbiol.* 101 (4) :122-140.

Butt, T. M and Copping L. 2000. "Fungal biological control agents". *Pesticide Outlook* 11: 186-191.

Fernandes, E. K. K and Roberts, D. W. 2008. "Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers", *Journal of invertebrate pathology* 82 (2): 75-83.

Hồ Huỳnh Thùy Dương. 2002. *Sinh học phân tử* (tái bản lần 2). NXB Giáo dục.

Phạm Thị Thủy. 1999. "Kết quả ứng dụng nấm *Beauveria bassiana* để phòng trừ sâu róm thông ở Lâm trường Phù Ban Yên, Sơn La". *Tạp chí Nông Nghiệp và Công Nghiệp thực phẩm số 3/1999*: 119-121.

Rombach, et al. 1994. "Pesticide bioassays with arthropods". CRC Boca Raton, FL.

Trần Văn Mão. 2002. "Sử dụng côn trùng và vi sinh vật có ích (Tập II)", NXB Nông Nghiệp, Hà Nội.