

**NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG SINH HỌC NẤM MEN
NỘI SINH PHÂN LẬP TRÊN CHUỐI TIÊU HỒNG
Musa sapientum L. TẠI KHU VỰC GIA LÂM, HÀ NỘI**

CHU THANH BÌNH, ĐỖ THỊ THU HỒNG, NGÔ CAO CƯỜNG

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi sinh vật nội sinh (VSVNS) sống trong mô của tế bào thực vật, không gây hại cho cây mà thường tạo ra các chất có hoạt tính sinh học như: Chất điều hòa sinh trưởng, các chất kháng sinh, nhóm axit pholic... Các hợp chất này đã phát huy vai trò của nó đối với đời sống cây, kích thích sinh trưởng thực vật, sinh kháng sinh ức chế sự phát triển bệnh của cây [8]. Chính vì vậy, VSVNS nói chung và nấm men nội sinh nói riêng được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu bởi vai trò và ý nghĩa của chúng trong đời sống.

Cây chuối là loại cây ăn quả có giá trị dinh dưỡng và kinh tế cao... Chuối Tiêu hồng được người tiêu dùng ưa chuộng hơn cả bởi hương vị, thị hiếu.

Tại Việt Nam, các công trình nghiên cứu về nấm men nội sinh trên đối tượng chuối chưa nhiều. Bài báo này trình bày một số kết quả thu được qua khảo sát và lấy mẫu chuối Tiêu hồng tại khu vực Gia Lâm - Hà Nội, đồng thời nghiên cứu về đa dạng nấm men nội sinh thông qua đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào, hoạt tính enzyme có sử dụng kỹ thuật PCR fingerprinting.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Mẫu cho phân lập VSVNS từ các bộ phận của cây chuối Tiêu hồng; Hoa - 5 mẫu; quả non - 5 mẫu, quả bánh tẻ - 10 mẫu, quả già - 10 mẫu, quả chín - 11 mẫu.

- Địa điểm lấy mẫu thuộc địa phận Thượng Thanh, Gia Lâm, Hà Nội; diện tích khu vực lấy mẫu khoảng 3600 m²; tọa độ dao động quanh vị trí N: 21°04.625'; E: 105°53.794'.

- Môi trường Hansen (g/l): Sacarozơ - 30; Pepton - 10; K₂HPO₄ - 3; MgSO₄.7H₂O - 3; Yeast Extract - 1; NaCl - 1; được sử dụng để phân lập, làm sạch và giữ giống nấm men.

- Môi trường xác định hoạt tính enzyme ngoại bào (cellulase, amylase, protease) bằng phương pháp khuếch tán trên thạch (g/l): cơ chất (CMC, tinh bột, casein) - 1; Agar - 15; pH 7.

- Mồi MST (IDT Technologies) có trình tự như sau: 5' - GTG GTG GTG GTG GTG - 3' [5].

2.2. Phương pháp

- Lấy mẫu và bảo quản mẫu theo TCVN 9017:2011 [1].

- Xử lý mẫu trước khi phân lập: Mẫu được rửa sạch phần mô dưới vòi nước mạnh, cắt thành các đoạn nhỏ $2 \div 4$ cm để dễ thao tác, sau đó được khử trùng bề mặt mẫu, thực hiện lần lượt từng bước sau: ethanol 70% (5 phút); NaClO 5% (5 phút) và etanol (30 giây). Rửa lại 5 lần với nước cất vô trùng. Bổ sung 1 ml nước cất khử trùng. Nghiền nát mô tế bào, hút $100 \div 200$ μ l lên đĩa thạch và trang đều rồi đem nuôi cấy [6, 7].

- Phân loại nấm men dựa trên hình thái khuẩn lạc [9].

- Hoạt tính enzyme: amylase, cellulase, proteinase [3].

- Tách chiết DNA tổng số sử dụng kit tách Norgen, Canada.

- Kỹ thuật PCR fingerprinting: Được báo cáo lần đầu vào năm 1985 bởi giáo sư Alec Jeffreys (Đại học Leicester, Anh). Đây là phương pháp dùng để phân nhóm dưới loài dựa trên sự tương đồng các đoạn ADN vệ tinh. ADN vệ tinh là các đoạn ADN có trình tự lặp lại lớn, thường không mã hóa cho gen và ít bị đột biến, thay đổi. Do đó, chúng thường được dùng làm công cụ đặc trưng trong phân loại. Sử dụng các mồi được thiết kế theo trình tự của các ADN vệ tinh trong phản ứng PCR. Sau đó các đoạn ADN vệ tinh đã khuếch đại sẽ được điện di để so sánh kích thước. Sự tương đồng của các phổ băng thể hiện sự gần gũi của các chủng nấm men [4].

- Phản ứng PCR với các thành phần Master mix (Intron) 1 x 10 μ l, mồi Microsatellite primer Transcrip MST (IDT) - 2 μ l, nước PCR - 11 μ l, DNA khuôn 2 μ l với 35 chu kỳ có chu trình gia nhiệt như sau: 95°C trong 2 phút; 94°C trong 40 giây; 52°C trong 60 giây; 72°C trong 2 phút; 72°C trong 10 phút [2].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả phân lập nấm men nội sinh

20 chủng nấm men đã được phân lập từ 41 mẫu chuối Tiêu hồng ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phân lập nấm men nội sinh trên 41 mẫu chuối Tiêu hồng

KH mẫu	Bộ phận cây chuối	KH chủng nấm men
16	Hoa	16Y1, 16Y3, 16Y4
32		32Y1
14	Quả bánh tẻ	14Y6
31		31Y1
1	Quả già	1Y1
2		2Y1
3		3Y1
8		8Y2
12		12Y6
13		13Y1, 13Y4
37		37Y1
17	Quả chín	17Y2
29		29Y1
36		36Y1, 36Y2, 36Y3, 36Y4

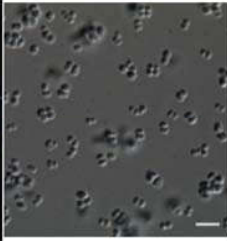
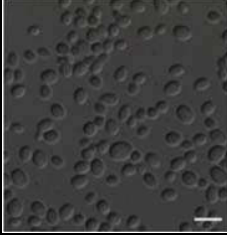
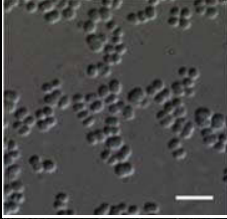
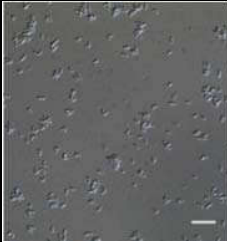
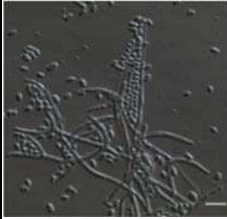
Kết quả cho thấy, giai đoạn chuối già thu được số lượng nấm men nhiều nhất và hiện chưa phân lập được nấm men trên chuối non. Điều này có thể do ở giai đoạn chuối già có các chất dinh dưỡng (đường, vitamin) cũng như các điều kiện sinh trưởng khác (pH, khoáng chất) phù hợp với nhu cầu sinh trưởng của nấm men. Chuối chín thu được chủng nấm men nhiều, tuy nhiên có thể ở giai đoạn này hàm lượng cao của đường, protein, K^+ , Fe^{2+} ... cũng là điều kiện thuận lợi cho sự sinh trưởng của vi khuẩn gây cạnh tranh và làm giảm số lượng nấm men. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu của tác giả Isaeva O. V. [6] với đối tượng quả Bí ngô *Cucurbita pepo* L. ở giai đoạn chín nấm men bị giảm do vi khuẩn cạnh tranh sinh trưởng.

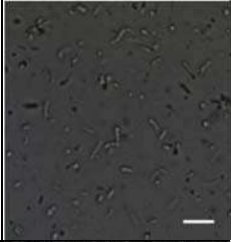
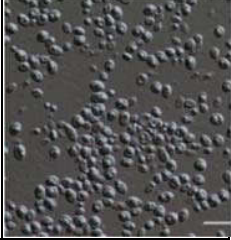
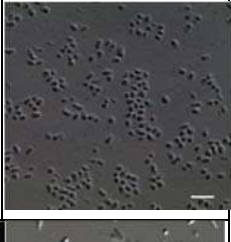
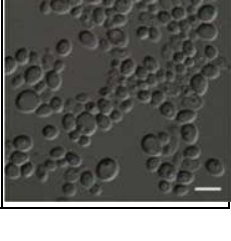
3.2. Phân loại qua hình thái khuẩn lạc và tế bào

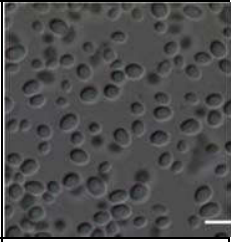
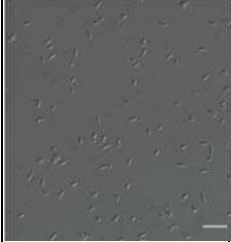
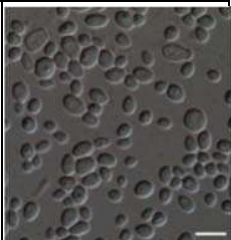
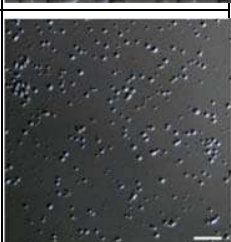
Các chủng nấm men sau khi được làm sạch, thuần khiết và được chụp hình thái, tế bào trên kính hiển vi Eclipse E600-Nikon thước đo 5 μm , độ phóng đại 400X.

Dựa trên đặc điểm hình thái và tế bào, 20 chủng nấm men được chia thành 16 nhóm trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các chủng nấm men nội sinh đại diện cho các nhóm

Nhóm	KH chủng	Đặc điểm hình thái	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào
1	1Y1	Khuẩn lạc màu vàng, đường kính khuẩn lạc 7 mm, bề mặt ướt, hơi bóng, viền trơn.		
2	2Y1 36Y2	Khuẩn lạc màu trắng, bề mặt nổi lên mặt thạch, hơi bóng, đường kính 1,5 mm, viền trơn.		
3	3Y1 12Y6 13Y4 31Y1	Khuẩn lạc màu vàng, bề mặt ướt, xốp, nổi lên mặt thạch, đường kính khuẩn lạc 3 mm, viền trơn		
4	8Y2 16Y3	Khuẩn lạc màu đỏ, đường kính 1 mm, bề mặt hơi bóng, viền trơn.		
5	13Y1	Khuẩn lạc ban đầu trắng, sau chuyển vàng nâu, viền nhẵn, đường kính khuẩn lạc 2 mm.		
6	14Y6	Khuẩn lạc trắng bông, đường kính khuẩn lạc 3 mm, bề mặt khô, sau 5 ngày phân hóa sợi và bào tử.		

7	16Y1	Khuẩn lạc nhỏ đường kính 1 mm, bề mặt khô, sau 3 ngày nuôi cấy chuyển thành màu vàng nâu, sau chuyển sang đen, mọc dày trên mặt thạch.		
8	16Y4	Khuẩn lạc nhỏ, màu trắng, xốp, sau chuyển nâu, tiết sắc tố đỏ vào môi trường, sau 3 ngày nuôi cấy có hiện tượng phân hóa và hình thành bào tử, đường kính khuẩn lạc 4 mm.		
9	17Y2	Khuẩn lạc ban đầu trắng, sau chuyển hồng nhạt, bề mặt ướt, bóng, viền trơn, đường kính khuẩn lạc 2 mm.		
10	29Y1	Khuẩn lạc màu kem, đường kính 5 mm, sau 3 ngày nuôi cấy chuyển màu vàng nâu, bề mặt ướt.		
11	32Y1	Khuẩn lạc ban đầu kem sau chuyển hồng nhạt, bề mặt khô, nhẵn đường kính 11 mm, màu kem.		
12	36Y1	Khuẩn lạc màu trắng, bề mặt ướt, nổi lên mặt thạch, viền trơn, đường kính 2 mm, nổi lên mặt thạch.		

13	36Y2	Khuẩn lạc màu kem, đường kính khuẩn lạc 1 mm, bề mặt khô.		
14	36Y3	Khuẩn lạc màu vàng, đường kính 2 mm, bề mặt khuẩn lạc nhẵn.		
15	36Y4	Khuẩn lạc màu kem, bề mặt ướt, đường kính 5 mm.		
16	37Y1	Khuẩn lạc màu kem, bề mặt khô, đường kính 2 mm.		

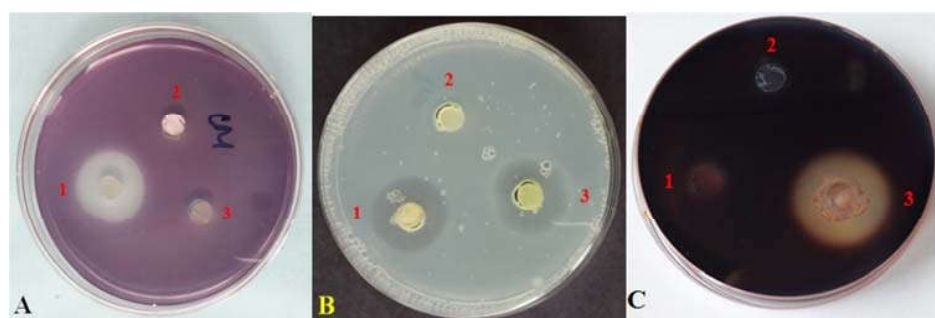
Bảng 2 cho thấy, chủng nấm men có hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào tương tự nhau được sắp xếp cùng nhóm. Tuy nhiên, từ 20 chủng nấm thu được xuất hiện những chủng nấm men đa hình. Nhằm thu được kết quả có độ tin cậy cao hơn, cần tiến hành khảo sát sơ bộ hoạt tính sinh enzyme của các chủng thu được đồng thời đánh giá đa hình bằng kỹ thuật fingerprinting.

3.3. Hoạt tính sinh enzyme

Khảo sát hoạt tính sinh enzyme là rất cần thiết khi nghiên cứu nấm men nội sinh bởi giữa nấm men nội sinh và cây chủ thường xuyên có sự trao đổi các chất dinh dưỡng thông qua hoạt động của nhiều nhóm enzyme [6], trong đó 3 nhóm enzyme phổ biến thường được nghiên cứu là cellulase, protease, amylase. 20 chủng nấm men nội sinh đã được xác định hoạt tính enzyme và kết quả được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Hoạt tính enzyme của các chủng

STT	Ký hiệu chủng	Hoạt tính amylase	Hoạt tính cellulase	Hoạt tính protease
1	1Y1	-	+	+
2	2Y1	-	+	+
3	3Y1	-	+	++
4	8Y2	+	+	+
5	12Y6	-	+	++
6	13Y1	-	-	-
7	13Y4	+	-	++
8	14Y6	+	+	++
9	16Y1	-	+	-
10	16Y3	-	-	-
11	16Y4	-	+	++
12	17Y2	+	+	+
13	29Y1	-	+	++
14	31Y1	-	+	+
15	32Y1	++	+++	+
16	36Y1	-	+	-
17	36Y2	+	+	+
18	36Y3	-	+	+
19	36Y4	-	+	+
20	37Y1	-	-	-



Hình 1. Hoạt tính enzyme của chủng

A. Hoạt tính cellulase; B. Hoạt tính protease; C. Hoạt tính amylase;

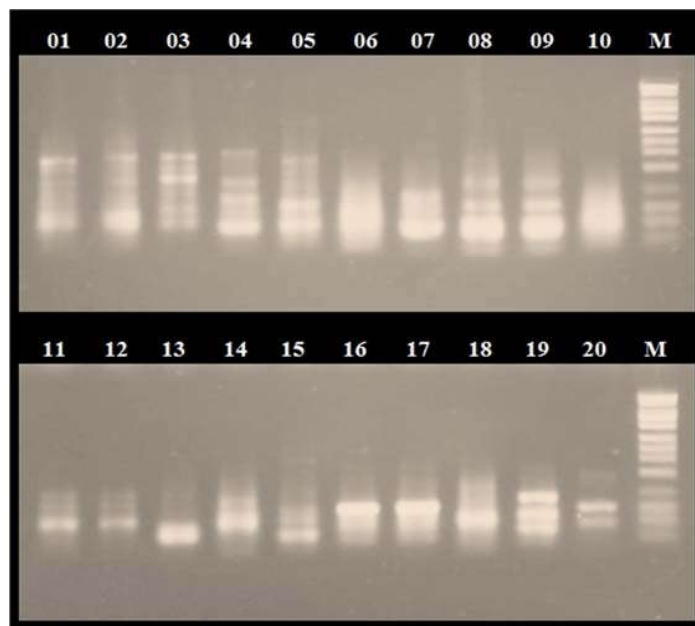
1. Chủng 31Y1; 2. Chủng 16Y3; 3. Chủng 13Y4

Kết quả bảng 3 cho thấy, 6 chủng có hoạt tính sinh amylase, 16 chủng có hoạt tính sinh cellulase, 15 chủng có hoạt tính sinh protease, 5 chủng sinh cả 3 loại enzyme nói trên.

3.4. Phân nhóm bằng kỹ thuật finger printing

Phân nhóm dựa trên hình thái khuẩn lạc và tế bào đôi khi gặp nhiều khó khăn đặc biệt với những chủng nấm men đa hình. Kỹ thuật fingerprinting được sử dụng nhằm khắc phục những hạn chế đó đồng thời cho kết quả nghiên cứu có độ tin cậy cao hơn.

Các chủng nấm men sau khi được làm sạch sẽ được nuôi thu sinh khối và tách DNA tổng số bằng sử dụng kit tách. Sản phẩm DNA tổng số sau khi tách chiết được kiểm tra độ tinh sạch bằng đo quang phổ hấp thụ ở bước sóng 260 nm và 280 nm, tỷ lệ A260/A280 của 20 chủng đều trong ngưỡng 1,8÷2. DNA tinh sạch được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với mỗi MST (hình 2).



Hình 2. Phổ fingerprinting của 20 chủng nấm men nội sinh trên chuỗi Tiêu hồng
M - marker 1kb, 1 - 1Y1, 2 - 3Y1, 3 - 12Y6, 4 - 8Y2, 5 - 29Y1, 6 - 32Y1, 7 - 36Y1,
8 - 36Y4, 9 - 2Y1, 10 - 17Y2, 11 - 13Y4, 12 - 31Y1, 13 - 36Y2, 14 - 16Y1,
15 - 16Y4, 16 - 13Y1, 17 - 36Y3, 18 - 14Y6, 19 - 16Y3, 20 - 37Y1

Kết quả trên hình 2 cho thấy, sản phẩm nhân PCR với mỗi MST của các chủng nấm men cho phổ finger khác nhau và rất đa dạng do sự phân bố về số lượng bản sao cũng như vị trí của DNA vệ tinh trong genome. Kỹ thuật phân nhóm sử dụng mỗi thiết kế dựa trên DNA vệ tinh cho sự phân loại đến loài. Các chủng có cùng một phổ băng finger sẽ thuộc cùng một loài, các chủng có phổ băng finger khác nhau có thể sẽ thuộc các loài khác nhau tùy theo mức độ khác biệt. Các chủng có cùng phổ băng finger sẽ được xếp vào cùng một nhóm và đã chia 20 chủng nấm men thành 15 nhóm (bảng 4).

Bảng 4. Phân nhóm nấm men bằng kỹ thuật fingerprinting

Nhóm	KH chủng
01	1Y1, 3Y1
02	12Y6
03	8Y2
04	29Y1
05	32Y1
06	36Y1, 14Y6
07	36Y4, 2Y1
08	17Y2
09	13Y4, 31Y1
10	36Y2
11	16Y1
12	16Y4
13	13Y1, 36Y3
14	16Y3
15	37Y1

Như vậy, so với phân nhóm bằng hình thái khuẩn lạc và tế bào thì đã có sự thay đổi về thành phần và số lượng chủng giữa các nhóm; ví dụ như 36Y2 đã tách nhóm với 2Y1; 8Y2 tách khỏi 16Y3; 12Y6 tách khỏi nhóm 13Y4 và 31Y1... Kỹ thuật fingerprinting đã giải quyết được khó khăn, đưa ra kết quả có độ tin cậy cao hơn trong đánh giá đa dạng nấm men, đặc biệt nhóm nấm men đa hình, đồng thời cũng là căn cứ có thể sử dụng trong đánh giá mối quan hệ giữa các loài.

4. KẾT LUẬN

- Phân lập được 20 chủng nấm men nội sinh từ 41 mẫu chuối Tiêu hồng trên địa bàn Thượng Thanh, Gia Lâm, Hà Nội; Hình thái, màu sắc khuẩn lạc của các chủng có màu sắc từ màu kem, màu vàng, màu đỏ, màu vàng chuyển xám; có một số chủng đa hình.

- Về khả năng sinh enzyme cellulase, amylase, protease của các chủng nấm men: 6 chủng có hoạt tính sinh amylase, 16 chủng có hoạt tính sinh cellulase, 15 chủng có hoạt tính sinh protease, 5 chủng sinh cả 3 loại enzyme nói trên.

- Bảng kỹ thuật fingerprinting đã chia 20 chủng nấm men nội sinh thành 15 nhóm với độ tin cậy cao.

Lời cảm ơn: Bài báo được sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài E1.4 thuộc Chương trình Ủy ban phối hợp Việt Nam - Liên bang Nga.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. TCVN 9017:2011: *Quả tươi - Phương pháp lấy mẫu trên vườn sản xuất*.
2. Kachalkin A. V., Glushakova A. M., Yurkov A. M. and Chernov I. Yu., *Characterization of Yeast Grouping in the Phyllosphere of Sphagnum Mosses. Microbiology*, 2008, **77**(4):474-481.
3. Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C. and Turck M., *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amer. J. Clin. Pathol.* Depts. Microbiology and Medicine, Univ. Washington, Sch. Med., Seattle, 1966, **45**:6-493.
4. Kate, Brinton, Kim-An Lieberman, *Basics of DNA fingerprinting*, Available online, 2007, URL: <http://protist.biology.washington.edu/fingerprint/dnaintro.html>.
5. Mauricio Ramirez-Castrillon, Sandra Denise Camargo Mendes, Mario Inostroza-Ponta, and Patricia Valente, *(GTG)₅ MST-PCR Fingerprinting as a Technique for Discrimination of Wine Associated Yeasts*. PLOS ONE, 2014, **9**(8):e105870.
6. Isaeva O. V., Glushakova A. M., Garbuz S. A., Kachalkin A. V., and Chernov I. Yu., Chernov. *Endophytic Yeast Fungi in Plant Storage Tissues*. Biology Bulletin, 2010, **37**(1):26-34.
7. Romeiro R. da S., *Métodos em bacteriologia de plantas*, Viçosa: UFRV, 2001, 279p.
8. Snipes C. E., Duebelbeis D. O., Olson M., Hahn D. E., Dent W. H., Gillbert J. R., Werk T. L., Davis G. E., Lee-Lu R., Graupner P. R., *The endophytes in the stem and roots of rice*. Microb Ecol, 2007, **53**:700-707.
9. Yarrow D., *Methods for isolation, maintenance and identification of yeasts*, in The Yeasts, a Taxonomic Study, 4th Ed. By Kurzman C. P. and Fell J. W., Elsevier Science Publ., Amsterdam, 1998, p.77-100.

SUMMARY

STUDY ON BIODIVERSITY OF ENDOPHYTIC YEAST ISOLATED IN BANANAS *Musa sapientum* L. IN GIALAM DISTRICT, HANOI

20 endophytic yeast strains are isolated from 41 samples of flower, young fruit, old fruit of bananas *Musa sapientum* L.. The strains are divided into 16 groups based on morphological characteristics. The number of the endophytic yeast having cellulase, protease and amylase activity is 16, 15 and 6 respectively. When the endophytic yeast strains are studied by fingerprinting, they belong to 15 groups with high reliability.

Từ khóa: Yeast, endophyte, bananas, fingerprinting.

Nhận bài ngày 15 tháng 11 năm 2016

Hoàn thiện ngày 10 tháng 12 năm 2016

Phân viện Công nghệ sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga