



DOI:10.22144/ctu.jvn.2018.138

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH NẤM GÂY HẠI TRÊN CÂY NGHỆ (*Curcuma*)

Vũ Thị Yên¹, Đỗ Tấn Khang^{2*} và Trần Nhân Dũng²

¹Khoa Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Trường Đại học Kiên Giang

²Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đỗ Tấn Khang (email: dtkhang@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 02/01/2018

Ngày nhận bài sửa: 15/03/2018

Ngày duyệt đăng: 29/10/2018

Title:

Isolation and identification of pathogens and fungi on turmeric (*Curcuma*) medicine

Từ khóa:

Đặc điểm hình thái, giải trình tự, gián đồ phả hệ, ITS, nấm, nghệ, phân lập

Keywords:

Curcuma, fungi, isolation, ITS, morphology characteristics, phylogenetic tree, sequencing

ABSTRACT

In the purpose of finding out the fungi that caused diseases on turmeric (*Curcuma*) to support for storing medicine materials, the study was carried out. Seventeen strains of pathogen fungi were isolated and identified morphology characteristics from four fresh *Curcuma* samples named as Binh Phuoc, Xa Cu, Indonesia, Black and three dried samples of AGZG030510, AGZG010510 and DL020611. All of the isolated strains were verified as saprophytic and pathogenous fungi in plants. Fifteen of them were selected for identification by PCR (polymerase chain reaction) technique and sequencing of internal transcribed spacer (ITS) regions. The result showed that seven of them were belong to *Fusarium* genus: *F. oxysporum*, *F. chlamydosporum*, *F. verticilliodes*, 4 strains of *F. proliferatum*; three strains were *Aspergillus* genus: *A. flavus*, *A. terreus*, *A. tubingensis*; two *Penicillium* species; one was *Rhizopus oryzae*; one was *Dichotomomyces cejpui* and another was *Corioloropsis polyzona*. The phylogenetic tree was drawn based on their ITS sequences. *R. oryzae* and *C. polyzona* species were located on two main branches because they belong to the large fungal phylum as Zygomycetes and Basidiomycetes. The others were Ascomycetes and located on the other two branches with bootstrap value of 87%.

TÓM TẮT

Đề tài được thực hiện nhằm tìm ra những dòng nấm gây hại trên củ nghệ (*Curcuma*) được bảo quản làm dược liệu. Quá trình phân lập và nhận diện sơ bộ thông qua đặc điểm hình thái được 17 dòng nấm gây hại từ bốn mẫu nghệ tươi là nghệ Bình Phước, nghệ Indonesia, nghệ Xà Cừ, nghệ Đen và ba mẫu nghệ khô là AGZG030510, AGZG010510, DL020611. Tất cả các dòng nấm được phân lập đều có hại trên thực vật. Mười lăm dòng nấm được tuyển chọn từ mười bảy dòng trên để tiến hành định danh bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự vùng gene ITS. Kết quả cho thấy có bảy dòng nấm thuộc chi *Fusarium* gồm: *F. oxysporum*, *F. chlamydosporum*, *F. verticilliodes* và bốn dòng *F. proliferatum*; ba dòng thuộc chi *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. terreus*, *A. tubingensis*; hai dòng thuộc chi *Penicillium*; một dòng *Rhizopus oryzae*; một dòng *Dichotomomyces cejpui* và một dòng *Corioloropsis polyzona*. Từ các dòng nấm đã định danh xác định được gián đồ phả hệ thể hiện độ tương quan di truyền giữa chúng. *R. oryzae* và *C. polyzona* thuộc hai nhánh khác vì chúng thuộc hai ngành nấm lớn là Zygomycetes và Basidiomycetes. Các loài nấm còn lại được chia làm hai nhánh có chỉ số bootstrap 87% và cùng thuộc Ascomycetes.

Trích dẫn: Vũ Thị Yên, Đỗ Tấn Khang và Trần Nhân Dũng, 2018. Phân lập và xác định nấm gây hại trên cây nghệ (*Curcuma*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(7B): 33-40.

1 GIỚI THIỆU

Nghệ (*Curcuma*) thuộc chi Nghệ, họ Gừng, là cây bản địa ở các nước thuộc khu vực Nam Á và Đông Nam Á, đặc biệt là tại Ấn Độ (Arunrat *et al.*, 2008). Trong y học, nghệ được coi là thảo dược chữa được nhiều loại bệnh. Củ nghệ có vị đắng, cay, mùi thơm hắc, tính ấm, có tác dụng hành khí phá ú, thông kinh chỉ thống, giúp tiêu mù, lên da non, tác dụng thông mật, làm tăng sự bài tiết mật của tế bào gan, phá cholesterol trong máu (Đỗ Tất Lợi, 2004). Tinh dầu nghệ có tác dụng diệt nấm ngoài da và kháng khuẩn, giải độc ở các chỗ bị côn trùng châm chích, da dày viêm loét, ung nhọt, ghẻ lở, phong thấp, tay chân đau nhức. Lá nghệ dùng làm thuốc đắp, bóp các chỗ bầm giập, sưng tấy, các vết thương, giảm đau nhức mắt, chữa cảm lạnh, ho nhiều đờm (Lã Đình Mới, 2005; Đỗ Tất Lợi, 2004).

Thực trạng cho thấy ở Việt Nam, lượng dược liệu nói chung bị mối mọt lên đến 15-20%, và dược liệu bị nhiễm nấm mốc vào khoảng 12-28%. Nghiên cứu về mức độ nhiễm nấm mốc cho thấy có trên 1.400 chủng nấm mốc thuộc 43 loài có mặt trong 35 loại dược liệu khảo sát (Nguyễn Thị Nguyệt, 2014). Nghiên cứu của Sarathi *et al.* (2014) cho thấy bệnh thối rễ và thân rễ trên cây nghệ do nấm *Pythium* gây ra. Thêm vào đó, nghệ nói riêng và các loại dược liệu nói chung đều rất dễ nhiễm các loài nấm hoại sinh và gây thối như *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* (Aziz *et al.*, 1998; Rawat *et al.*, 2014). Các loài nấm mốc này đều có khả năng phát triển rất nhanh, gây tổn thất lượng dược liệu lớn, thậm chí một số loài có thể tiết ra các độc tố, ảnh hưởng tới chất lượng dược liệu và sức khỏe người dùng. Khi dược liệu đem bảo quản thậm chí sấy khô vẫn bị nhiễm một số loại nấm mốc, hoạt tính dược liệu có thể bị giảm đi, hoặc bị nhiễm độc tố từ các loại nấm mốc trên, như vậy ảnh hưởng rất lớn tới quá trình sản xuất và tiêu thụ thuốc trên thị trường.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Các mẫu củ nghệ nhận được từ công ty cổ phần xuất nhập khẩu y tế Domesco (Đồng Tháp) và tiến hành thực hiện đề tài tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

Bây giống củ nghệ gồm: nghệ vàng khô DL020611, nghệ vàng khô AGZG030510, nghệ vàng khô AGZG010510, nghệ vàng Bình Phước, nghệ vàng Xà Cừ, nghệ đen, nghệ vàng Indonesia. Mỗi giống thu 100 g. Các mẫu nghệ này đã có dấu hiệu bị nhiễm vi sinh vật.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Phân lập

Phương pháp phân lập theo Burgess *et al.* (2008) và Roger and Beasley (2005). Các mẫu nghệ thu thập được rửa sạch và tiến hành phân lập. Kiểm tra bằng quan sát mắt thường và kính hiển vi về độ đồng nhất màu sắc và bề mặt khuẩn lạc nấm, hình dạng khuẩn ty.

2.2.2 Nhận diện sơ bộ các dòng nấm đã được phân lập thông qua đặc điểm hình thái

Sau khi phân lập, các mẫu nấm được quan sát bằng mắt thường và kính hiển vi (Klich, 2002; Nguyễn Lê Anh Đào, 2012) về hình dạng tán nấm, hình dạng khuẩn ty, màu sắc khuẩn ty, màu sắc bào tử, hình dạng bào tử để tiến hành nhận diện sơ bộ.

2.2.3 Định dạng nấm bằng phương pháp sinh học phân tử

Ly trích DNA của nấm

Nấm được nuôi cấy trên môi trường PGA trong 3 ngày ở điều kiện nhiệt độ phòng. Sau đó, tơ nấm được lấy và ly trích DNA theo Trần Nhân Dũng (2011).

Phản ứng PCR và điện di

Các mẫu nấm được khuếch đại với cặp mồi ITS1 và ITS4. Trình tự của ITS1 (forward): 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4 (reverse): 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'. Mẫu nấm được giải trình tự theo phương pháp Sanger, sau đó so sánh trình tự thu được với trình tự trên ngân hàng gene NCBI để so sánh trình tự bộ gene và xác định loài của mẫu nấm khảo sát. Từ trình tự của các mẫu nấm, dùng phần mềm Bioedit và MEGA 6 để vẽ cây phả hệ của các dòng nấm, từ đó xác định mối tương quan giữa các dòng nấm đã phân lập được.

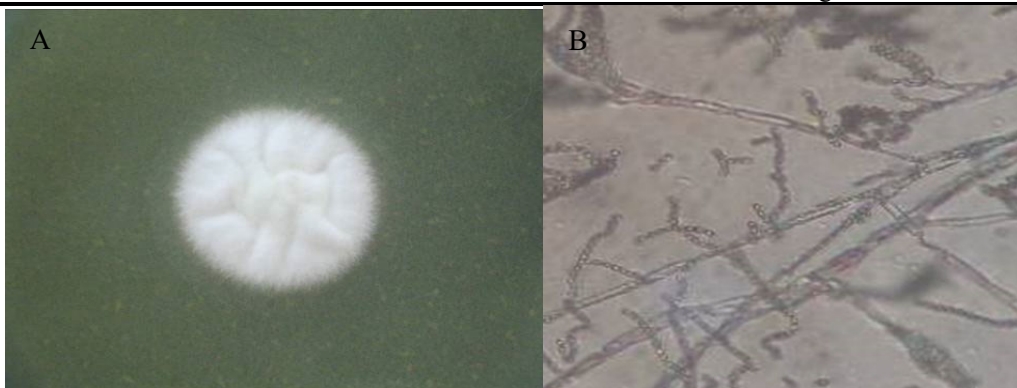
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập và nhận diện sơ bộ các dòng nấm đã được phân lập thông qua đặc điểm hình thái

Từ các mẫu nghệ khác nhau, tiến hành phân lập được 17 dòng nấm trên môi trường PGA gồm 13 dòng nấm từ mẫu nghệ tươi và 4 dòng nấm từ mẫu nghệ khô. Từng mẫu nghệ phân lập được là: 3 dòng từ nghệ Xà cừ, 2 dòng từ nghệ Bình Phước, 3 dòng từ nghệ Indonesia, 5 dòng từ nghệ đen, 1 dòng từ nghệ DL020611, 1 dòng từ AGZG010510, 2 dòng từ AGZG030510. Kết quả phân lập cho thấy sự phân bố của nấm khác nhau từ các mẫu nghệ khác nhau. Các mẫu nghệ tươi bị nhiễm nấm mốc nhiều hơn các mẫu nghệ khô do hàm lượng nước và chất dinh dưỡng trong nghệ tươi còn rất cao. Sau 4 ngày ủ, các đặc điểm của hệ sợi nấm được ghi nhận và tổng hợp trong Bảng 1 và 2.

Bảng 1: Đặc điểm đại thể của khuẩn lạc nấm mốc trên môi trường PGA sau 4 ngày nuôi ủ

STT	Tên dòng	Hình dạng	Hình dạng bề mặt	Màu sắc mặt trên	Đường kính (mm)
1	NEBP1	Gần tròn	Hạt xanh đen, mịn dày	Màu trắng, xanh đen	45-60
2	NEBP2	Gần tròn đến tròn	Hạt vàng, xám,	Màu trắng, xám, vàng	40-50
3	NID(A2)	Gần tròn đến tròn	Hạt xanh, trắng, tơ mịn	Trắng kem	40-45
4	NID2-1	Gần tròn đến tròn	Tơ nấm dày, nhô cao, tạo thành vòng tròn đồng tâm	Trắng	75-85
5	NID1-2	Gần tròn đến tròn	Tơ nấm mịn, dễ thấm nước, nhô cao khỏi mặt môi trường	Màu trắng, hồng	20-35
6	AGZG030510	Gần tròn đến tròn	Hạt trắng, dày, mọc sát mặt môi trường	Trắng	20-40
7	AGZG030510-1	Gần tròn	Tơ nấm dài, mọc lan, sát mặt môi trường	Trắng	30-50
8	AGZG010510	Gần tròn	Tơ nấm mọc dính chặt với nhau và bám chặt vào môi trường	Trắng	20-40
9	DL020611	Gần tròn đến tròn	Hạt vàng, dày	Nâu vàng	35-50
10	ND4	Mọc nhanh, tràn đầy đĩa	Tơ nấm mọc dày đặc, hạt nâu đen	Lúc non màu trắng, lúc già màu xám nâu	80-85
11	ND1-MH	Gần tròn	Tơ nấm mọc dài, dày, nhô sao khỏi môi trường	Màu trắng hơi hồng	20-30
12	ND3	Gần tròn		Màu trắng	20-40
13	ND2	Gần tròn	Khuẩn ty mọc dính chặt mặt môi trường	Trắng kem	45-60
14	ND2-2	Gần tròn đến tròn	Khuẩn ty mọc thành vòng tròn, ngoài bì khuẩn lạc nhô cao	Trắng, hồng	50-70
15	NXC3	Gần tròn	Tơ nấm, mọc dày, nhô cao	Màu trắng, chính giữa hồng	60-85
16	NXC2-1	Gần tròn	Tơ nấm, mọc dày, nhô cao	Màu trắng, chính giữa vàng	15-25
17	NXC1-3	Tròn	Khuẩn ty tạo thành từng vòng tròn	Màu trắng, xám, hồng	50-70



Hình 1: Hình dạng khuẩn lạc và bào tử của dòng nấm AGZG010510

(A: bề mặt tán nấm, B: bào tử nấm quan sát dưới vật kính 40X)

Theo quan sát dưới kính hiển vi kết hợp hình thái, dòng nấm AGZG010510 và AGZG030510

phân lập từ nghệ khô có tán nấm phát triển tròn, mặt trên màu trắng, bì màu vàng nhạt, khuẩn lạc có các rãnh nhỏ. Bào tử dính kết chuỗi dài dính vào

đầu sợi nấm bằng đầu bào tử đính phân nhánh (Hình 1). Kết hợp với nghiên cứu của Ülhan *et al.* (2005) và Visagie *et al.* (2014) kết luận chúng thuộc chi *Penicillium*.

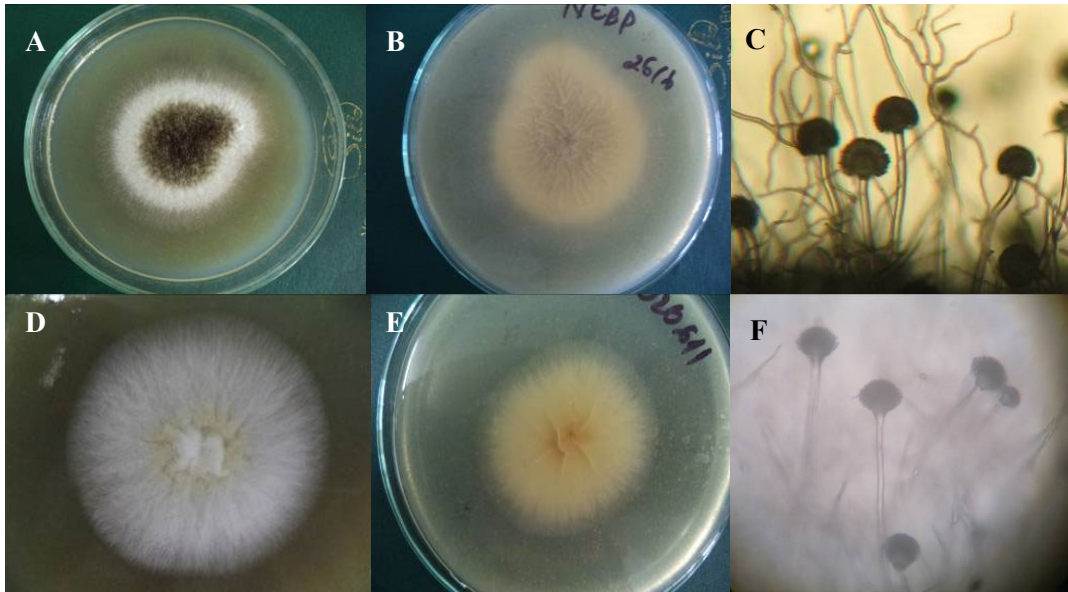
Bảng 2: Đặc điểm vi thể của khuẩn lạc nấm mốc trên môi trường PGA

Dòng nấm mốc	Khuẩn ty	Cuồng bào tử		Bào tử	
		Bề mặt	Kích thước (µm)	Hình dạng	Kích thước (µm)
NBP1	Phân nhánh, có vách ngăn, trong suốt	Nhẵn	500-700	Cầu	1,5-3
NBP2	Phân nhánh, có vách ngăn, màu trắng	Gồ ghề	600-900	Cầu	1,5-4
NID(A2)	Phân nhánh, có vách ngăn, màu trắng	Gồ ghề	270-550	Cầu	1,5-2,5
NID1-2	Phân nhánh, có vách ngăn, màu trắng	Gồ ghề	15-30	Tiểu bào tử hình que Đại bào tử thẳng hoặc hình lưới liềm	2,5-4 x 7,5-10 5-6,75 x 20,27-40,5
NID2-1	Phân nhánh, có vách ngăn, màu trắng	Gồ ghề	15-30	Tiểu bào tử hình que Đại bào tử thẳng hoặc hình lưới liềm	2,5-4 x 7,5-10 5-6,75 x 20,27-30
ND1-MH	Phân nhánh, có vách ngăn, màu trắng	Gồ ghề	15-20	Tiểu bào tử hình que Đại bào tử thẳng hoặc hình lưới liềm	2,5-4x7,5-10 4-6,75 x20,27-30
ND4	Phân nhánh, có vách ngăn, màu nâu	Gồ ghề	900-1130	Cầu	2-3,5
ND2	Phân nhánh, có vách ngăn, trong suốt	Nhẵn	300-500	Cầu	20-30x18-25
ND2-2	Phân nhánh, có vách ngăn, màu trắng, các vách ngăn phình to	Gồ ghề	10-20	Tiểu bào tử hình que	0,5-1x1,5-4
ND3	Phân nhánh, có vách ngăn, màu trắng	Gồ ghề	15-30	Tiểu bào tử hình que Đại bào tử thẳng hoặc hình lưới liềm	2,5-4x7,5-10 4-6,75x20,27-30
NXC1-3	Phân nhánh, có vách ngăn, màu trắng	Gồ ghề	12-20	Tiểu bào tử hình que Đại bào tử thẳng hoặc hình lưới liềm	2,5-4x7,5-10 4-6,75x20,27-30
NXC2-1	Phân nhánh, có vách ngăn, màu trắng, các vách ngăn phình to	Gồ ghề	10-17	Tiểu bào tử hình que	0,5-1x2-4
NXC3	Phân nhánh, có vách ngăn, màu trắng	Gồ ghề	10-17	Tiểu bào tử hình que Đại bào tử thẳng hoặc hình lưới liềm	0,5-1x2-3 5-6,5x20-35
DL020611	Phân nhánh, có vách ngăn, màu trắng	Gồ ghề	600-900	Cầu	1,5-4
AGZG030510	Phân nhánh, có vách ngăn, màu trắng	Gồ ghề	250-500	Cầu	1,5-2,5
AGZG030510-1	Phân nhánh, có vách ngăn, trong suốt	Nhẵn	500-700	Que hoặc bầu dục	1-1,5x4-6
AGZG010510	Phân nhánh, có vách ngăn, màu trắng	Gồ ghề	250-500	Cầu	1,5-2,5

Các dòng nấm NEBP, DL020611, NEBP2, ND2, NID-A2 có hình dạng và màu sắc khuẩn lạc khác nhau như dòng nấm ND2, tơ nấm mỏng mọc sát mặt môi trường, khuẩn lạc màu trắng tròn; dòng

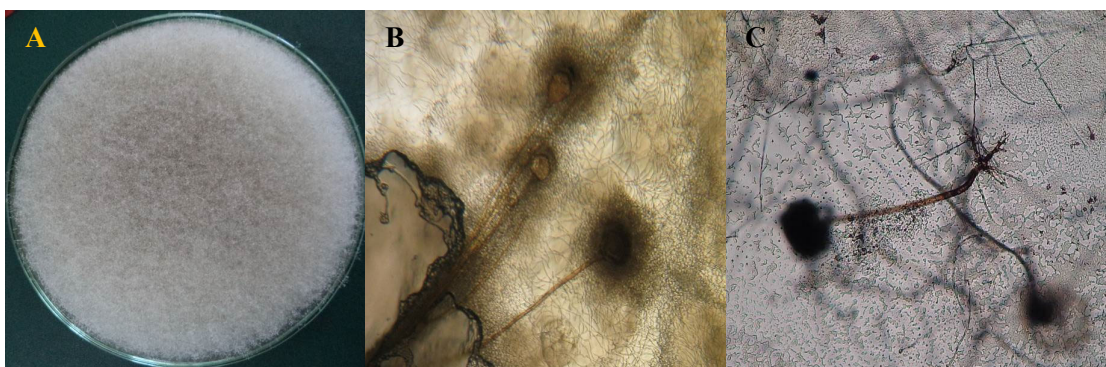
nấm DL020611, tơ mọc thẳng, màu trắng, chính giữa khuẩn lạc có màu vàng nhạt và nếp nhăn; dòng nấm NEBP khuẩn lạc tròn, tơ nấm màu trắng, chính giữa khuẩn lạc có nếp nhăn và màu xám đen; NID-A2 có khuẩn lạc tròn, tơ nấm mọc rối chính giữa có màu vàng chanh. Tuy nhiên, tất cả các

dòng nấm trên đều có bào tử đỉnh hình cầu, kết thành từng chuỗi, cuống bào tử đỉnh trong suốt, bong đỉnh giả dạng hình cầu (Hình 2). Theo Iheanacho *et al.* (2014) và Thilagam *et al.* (2016) từ những kết quả trên có thể kết luận các dòng nấm trên thuộc chi *Aspergillus*.



Hình 2: Hình dạng của dòng nấm NEBP và DL020611 ở vật kính 40X

(A: mặt trên, B: mặt dưới, C: cuống bào tử của dòng NEBP
D: mặt trên, E: mặt dưới, F: cuống bào tử của DL020611)

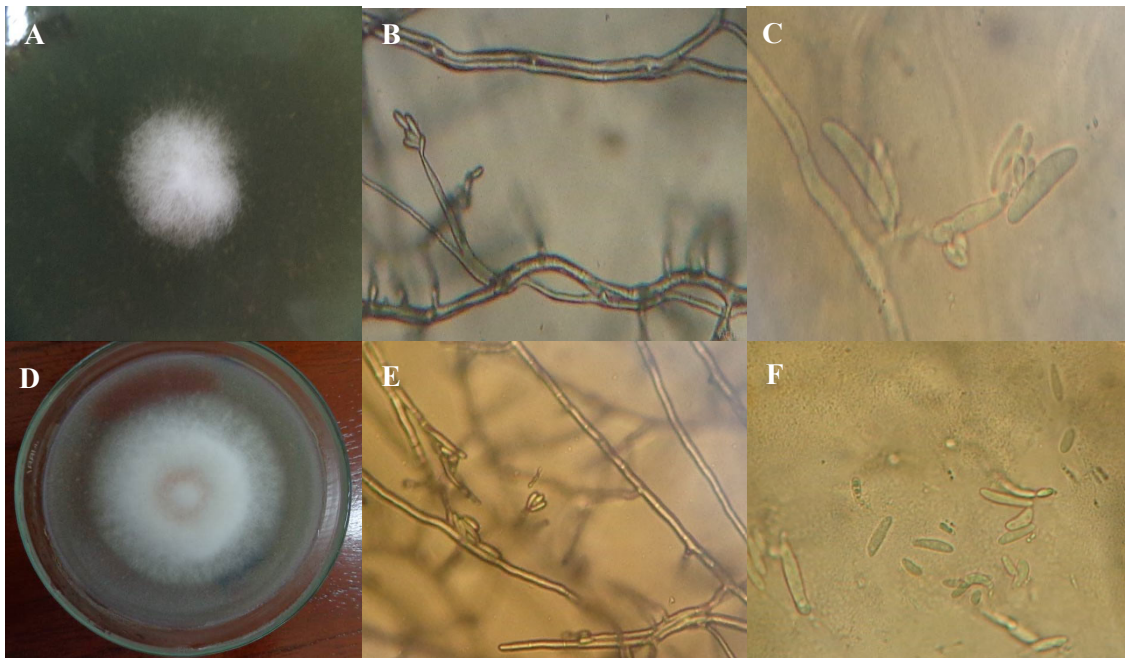


Hình 3: Hình dạng của dòng nấm ND4

(A: bề mặt, B: bào tử, C: rễ giả)

Quan sát dòng ND4 hệ khuẩn ty phát triển rất nhanh, chỉ sau 2 ngày tơ nấm tràn khắp môi trường, không quan sát được hình dạng khuẩn lạc (Hình 3A). Sợi nấm màu nâu, nhám, có vách ngăn, phân nhánh. Có rễ giả (rhizoid) (Hình 3C). Túi bào tử hình cầu màu đen, đường kính 50-70 μm . Bào tử hình cầu đường kính 2-3,5 μm (Hình 3B). Những đặc điểm trên cho thấy đây là chi *Rhizopus* (Kwon and Lee, 2006; El-Fadaly *et al.*, 2015).

Các dòng nấm ND3, NXC3, NID2-1, NID1-2, ND2-2, ND1-MH, ND2-2, NXC2-1 có đặc điểm hình thái gần giống nhau. Khuẩn lạc gần tròn đến tròn, đường kính 50-70 mm. Hệ khuẩn ty có màu trắng hoặc hơi hồng, không dễ thấm nước, phân nhánh nhiều. Mặt dưới màu trắng. Khuẩn ty hơi nhám, đẹp, có vách ngăn hoàn chỉnh tạo thành từng tế bào phình to kích thước từ 7,5-12 μm . Tiêu bào tử hình que dài, kích thước 1,5-4x0,5-1 μm kết thành từng chuỗi (Hình 4). Nhận diện sơ bộ những dòng trên thuộc chi *Fusarium*.



Hình 4: Hình dạng của dòng nấm NDI-MH, NXC3

(A: bề mặt khuẩn lạc nấm; B: hình dạng khuẩn ty; C: bào tử của nấm NDI-MH
D: bề mặt khuẩn lạc nấm; E: hình dạng khuẩn ty; F: bào tử của nấm NXC3)

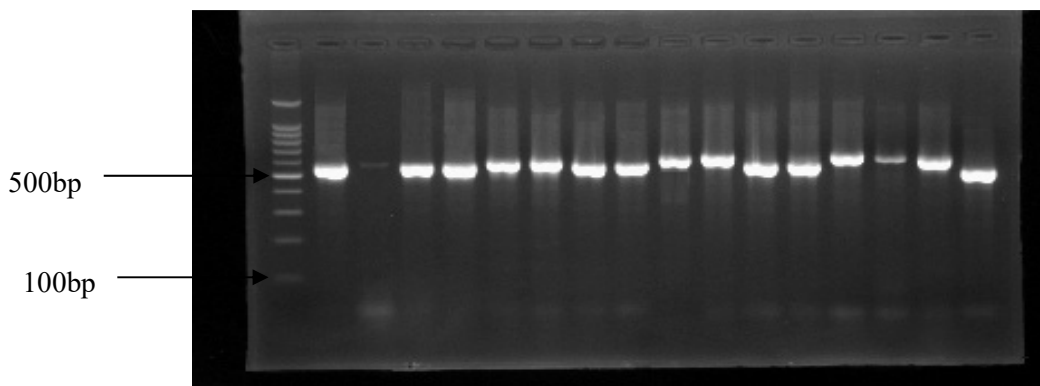
3.2 Nhận diện các dòng nấm mốc đã được phân lập bằng phương pháp sinh học phân tử

3.2.1 Kết quả phản ứng PCR

Các băng nằm ở vị trí từ 500-600 bp (Hình 5) điều này phù hợp với các nghiên cứu trước khi sử dụng cặp mồi chung ITS1 và ITS4 để khuếch đại

gene ITS1, 5,8S và ITS2 trên các dòng nấm là khoảng 500-600 bp. Dựa vào nghiên cứu của Korabecna (2007), trình tự và độ dài vùng ITS của từng loài rất khác nhau, kết hợp với phổ điện di thể hiện kích thước đoạn ITS của các chi nấm có sự khác biệt rất rõ ràng vì vậy có thể kết luận rằng nghệ bị nhiễm nhiều loài nấm mốc khác nhau.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



Hình 5: Phổ điện di của đoạn ITS được khuếch đại của 15 dòng nấm mốc

M: thang chuẩn 100 bp; 1: NXC1-3; 2: ND2; 3: NID1-2; 4: NID2-1; 5: AGZG030510; 6: AGZG010510; 7: ND3; 8: NXC3; 9: DL020611; 10: AGZG030510-1; 11: ND2-2; 12: NDI-MH;

13: ND4; 14: NID-A2; 15: NEBP; 16: đối chứng dương

3.2.2 Giải trình tự vùng gene ITS1, 5,8S, ITS2 và định danh các dòng nấm

Mười lăm dòng nấm được giải trình tự phạm vi vùng gene ITS1, 5,8S và ITS2 và sử dụng chương

trình Nucleotide Blastn để so sánh mức độ tương đồng của trình tự được giải với trình tự của các dòng nấm trong ngân hàng gene trên NCBI (Bảng 3).

Bảng 3: So sánh trình tự gene của các dòng nấm phân lập trên NCBI

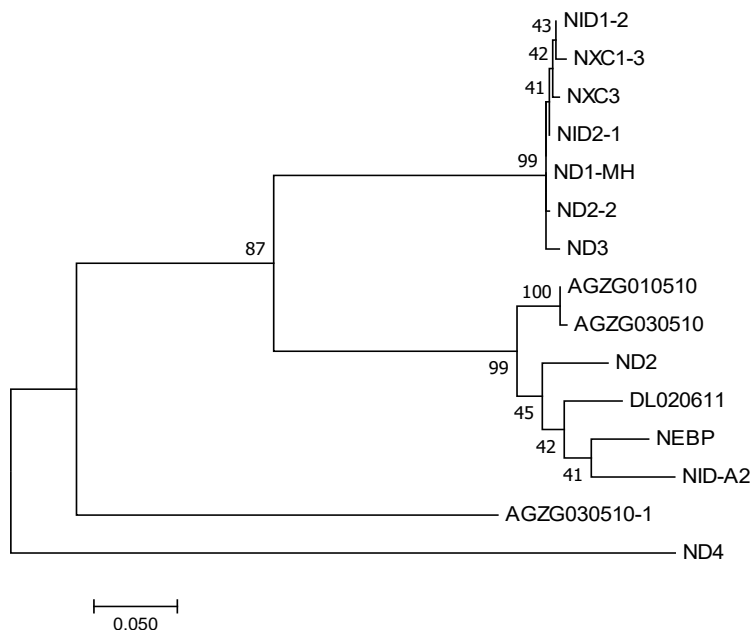
STT	Tên dòng nấm	Loài so sánh trên Genbank	Độ tương đồng (%)
1	ND1-MH	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cicercis</i>	99
2	ND2	<i>Dichotomomyces cejpui</i>	99
3	ND3	<i>Fusarium proliferatum</i>	99
4	ND2-2	<i>Fusarium chlamyosporum</i>	100
5	ND4	<i>Rhizopus oryzae</i>	100
6	NEBP	<i>Asperillus tubingensis</i>	99
7	NID1-2	<i>Fusarium proliferatum</i>	99
8	NID2-1	<i>Fusarium proliferatum</i>	99
9	NID-A2	<i>Aspergillus flavus</i>	99
10	NXC1-3	<i>Fusarium proliferatum</i>	99
11	NXC3	<i>Fusarium verticillioides</i>	99
12	AGZG030510	<i>Penicillium</i> sp.	98
13	AGZG010510	<i>Penicillium</i> sp.	98
14	AGZG030510-1	<i>Corioloopsis polyzona</i>	99
15	DL020611	<i>Aspergillus terreus</i>	99

Bảng 3 cho thấy 15 dòng nấm được giải trình tự đoạn gene ITS1/ITS2 và được so sánh với ngân hàng gene trên NCBI, đã nhận diện được các dòng nấm gây hại ở mức độ loài là 3 dòng thuộc chi *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. terreus*, *A. tubingensis*, 7 dòng thuộc chi *Fusarium*: *F. oxysporum*, *F. chlamyosprum*, 4 dòng *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, 2 dòng thuộc chi *Penicillium*, 1 dòng *Rhizopus oryzae*, 1 dòng *Corioloopsis polyzona* và 1 dòng *Dichotomomyces cejpui*. Kết quả này rất phù hợp với nghiên cứu của El-Gali

(2014) có các loài *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp. và *Fusarium* spp. được tìm thấy trong gừng và nghệ dùng làm gia vị. Các trình tự được gửi lên cơ sở dữ liệu NCBI và được cấp mã số từ MG735754 đến MG735760.

3.3 Vệ giãn đồ phả hệ và so sánh mối quan hệ di truyền giữa các dòng nấm

Từ các trình tự được giải, tiến hành vẽ sơ đồ phả hệ bằng phần mềm MEGA 6 kết quả như Hình 6.



Hình 6: Cây phả hệ maximum likelihood của các dòng nấm gây hại trên cây nghệ

Hình 6 cho thấy sự tương quan di truyền của 15 dòng nấm được vẽ bằng phương pháp maximum likelihood. Các dòng nấm được chia làm 2 nhóm lớn. Nhóm 1 gồm các dòng NXC1-3, NXC3,

NID1-2, NID2-1, ND2-2, ND1-MH và ND3. Chúng thuộc cùng 1 chi là *Fusarium*. Vì vậy, các dòng này có chỉ số tin cậy cao 99%. Tuy vậy, dựa vào chỉ số bootstrap ở đầu nút các dòng nấm trong

nhóm có thể kết luận rằng không có loài nấm nào hoàn toàn trùng lặp với nhau cũng có nghĩa là vùng bảo tồn và biến đổi trong đoạn rDNA của các loài nấm này có sự khác biệt lớn (giá trị bootstrap < 50%). Nhóm 2 gồm các dòng ND2, AGZG030510, AGZG010510, DL020611, NEBP và NID-A2 có chỉ số bootstrap là 99%. Điều này có nghĩa là mặc dù khác nhau về chi nhưng vùng ITS của chúng có những vùng tương đồng nhau khá cao. Trong đó, AGZG030510 và AGZG010510 đều thuộc chi *Penicillium* nên có độ tương đồng cao vì vậy chỉ số tin cậy là 100%, có thể 2 dòng này là một loài.

4 KẾT LUẬN

Từ bảy mẫu nghệ tươi và nghệ khô khác nhau, 17 dòng nấm gây hại đã được phân lập bằng môi trường PGA ở nhiệt độ phòng. Dựa vào các đặc điểm đại thể, vi thể và kết hợp phương pháp giải trình tự đoạn gene bằng môi ITS1/4 kết hợp với hình thái đã định danh được 15 dòng nấm hoại sinh hoặc gây bệnh bao gồm: *A. flavus*, *A. terreus*, *A. tubingensis*, *R. oryzae*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. chlamydosporum*, 4 dòng nấm *F. proliferatum*, *D. cejpii*, *C. polyzona*, 2 dòng *Penicillium* sp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Arunrat, C., Runglawan, S., Tawatchai, T., Piya, M., Nison, S., Jintana, S., 2008. Two new species of *Curcuma* (Zingiberaceae) used as cobra-bite antidotes. *Journal of Systematics and Evolution*. 46(1): 80–88.

Aziz, N.H., Youssef, Y.A., El-Fouly, M.Z., Moussa, L.A., 1998. Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 39: 279-285.

Burgess, L.W., Knight, T.E., Tesoriero, L., Phan, H.T., 2008. Diagnostic manual for plant diseases in Vietnam. *ACIAR Monograph No. 129*, 210 pages.

Đỗ Tất Lợi, 2004. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học. Hà Nội. 1294 trang.

El-Fadaly, H.M., El-Kadi, S.M., Hamad, M.N., Habib, A.A., 2015. Isolation and Identification of Egyptian Ras Cheese (Romy) Contaminating Fungi during Ripening Period. *Journal of Microbiology Research*. 5(1): 1-10.

El-Gali, Z.I., 2014. Detection of fungi associated with some spices in original form. *Global Journal of Scientific Researches*. 2(3): 83-88.

Iheanacho, H.E., Njobeh, P.B., Dutton, F.M., Steenkamp, P.A., Mthombeni, J.Q., Daru, B.H., Makun, A.H., 2014. Morphological and molecular identification of filamentous *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolated from compound feeds in South Africa. *Food Microbiology*. 44: 180-184.

Klich, M.A., 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. Published by the Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. 115 pages.

Korabecna, M., 2007. The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its biological meaning and application in medical mycology. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 81: 783-787.

Kwon, J-H. and Lee, C-J., 2006. Rhizopus soft rot on pear (*Pyrus serotina*) caused by *Rhizopus stolonifer* in Korea. *Mycobiology*. 34:151-153.

Lã Đình Mới, Trần Minh Hợi, Dương Đức Huyền, Trần Huy Thái và Ninh Khắc Bản, 2005. Tài nguyên thực vật có tinh dầu ở Việt Nam tập 1. NXB Nông nghiệp. Hà Nội, 368 trang.

Nguyễn Lê Anh Đào, 2012. Tuyển chọn các dòng nấm mốc *Aspergillus* spp. có khả năng phân hủy bã mía sau trồng nấm. Luận văn thạc sĩ. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.

Nguyễn Thị Nguyệt, 2014. Nghiên cứu công nghệ đặc chế và bảo quản dược liệu hoài sơn sau thu hoạch. Luận văn thạc sĩ. Học Viện Nông Nghiệp Việt Nam. Hà Nội.

Rawat, A., Mahajan, S., Gupta, A., Agnihotri, R.K., Wahi, N., and Sharma, R., 2014. Detection of toxigenic fungi and mycotoxins in some stored Medicinal plant samples. *International Journal of Applied Science Biotechnology*. 2(2): 211-216.

Roger, S. and Beasley, D., 2005. Management of plant pathogen collections. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Queensland, Australia. 82 pages.

Sarathi, V., Kumar, R.S., and Panneerselvam, A., 2014. Studies on rhizome rot pathogen in *Curcuma longa*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3: 296-302.

Thilagam, R., Hemalatha, N., Poongothai, E., and Kalaivani, G., 2016. Identification of *Aspergillus* species isolated from corn and peanuts in storage godowns. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 7: 600- 606.

Trần Nhân Dũng, 2011. Sổ tay thực hành sinh học phân tử. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, 175 trang.

Ülhan, S., Demürel, R., Asan, A., Bay, C., and Kinaci, E., 2005. Colonial and morphological characteristics of some microfungial species isolated from agricultural soils in Eskişehir province (Turkey). *Turkey Journal of Botany*. 30: 95-104.

Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., et al., 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies In Mycology*. 78: 343–371.