

NHẬN DIỆN GEN MÃ HOA ĐỘC TỐ CASSICOLIN TRÊN CÁC MẪU NẤM *Corynespora cassicola* PHÂN LẬP TRÊN CÂY CAO SU Ở VIỆT NAM

Nguyễn Đôn Hiệu^{1,2}, Nguyễn Anh Nghĩa¹, Nguyễn Bảo Quốc²

TÓM TẮT

Cassicolin là độc tố thực vật được sản sinh bởi nấm *Corynespora cassicola*, có vai trò chọn lọc ký chủ trong quá trình xâm nhiễm và gây bệnh của nấm. Gen mã hóa độc tố cassicolin (gen Cas) là một trong những yếu tố quan trọng liên quan với sự đa dạng di truyền và tính gây bệnh của nấm *C. cassicola*, có ít nhất 6 nhóm gen Cas đã được phát hiện. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật PCR khuếch đại gen Cas với 7 cặp mồi chuyên biệt đã được thực hiện nhằm xác định sự hiện diện của gen mã hóa cassicolin trên 76 mẫu phân lập nấm *C. cassicola* thu thập từ 16 đồng cỏ tinh cao su tại nhiều vùng địa lý ở Việt Nam. Kết quả phát hiện được 40/76 mẫu phân lập nấm (chiếm tỷ lệ 52,6%) có sự hiện diện của gen Cas 2 và 36 mẫu nấm còn lại không phát hiện được gen Cas, xếp vào nhóm Cas 0.

Từ khóa: *Corynespora cassicola*, cassicolin, gen Cas, mẫu phân lập (MPL), đồng cỏ tinh cao su (DVT cao su).

1. BẬT VẦN ĐỀ

Nấm *Corynespora cassicola*, tác nhân gây bệnh rụng lá *Corynespora* trên cây cao su. Sự phát sinh và phát triển của bệnh rụng lá *Corynespora* phụ thuộc vào tương tác giữa tính gây bệnh của quần thể nấm *C. cassicola* đang hiện diện, mức độ miễn dịch của ký chủ và yếu tố môi trường thuận lợi. Trong đó, tính gây bệnh của loài nấm này là rất phức tạp, khó lý giải vì phụ thuộc vào mức độ chuyên tính của mỗi mẫu phân lập (MPL) và có liên quan đến nhiều gen khác nhau. Trong quá trình xâm nhiễm gây bệnh, nấm tiết ra độc tố cassicolin, hợp chất này rất độc với cây cao su, chỉ với một vài vết bệnh nhỏ trên gân lá cũng đủ gây rụng lá. Cassicolin là một dạng protein độc với thực vật (phytotoxic protein) tiết ra trong quá trình gây bệnh trên lá cao su (Breton và ctv, 2000). Gen mã hóa độc tố cassicolin (gen Cas) là một trong những yếu tố quan trọng liên quan với sự đa dạng di truyền và tính gây bệnh của nấm *C. cassicola*. Sự đa dạng về đặc tính gây bệnh (tính độc hay không độc, tính xâm nhiễm, chuyên tính ký chủ) của các MPL nấm *C. cassicola* có thể được làm sáng tỏ bởi nhiều yếu tố liên quan đến tính gây bệnh, trong đó phải kể đến gen mã hóa độc tố cassicolin. Có 6 nhóm gen Cas đã được phát hiện bằng kỹ thuật PCR khuếch đại DNA của các mẫu nấm *C. cassicola* phân lập từ các cây ký chủ trên nhiều vùng địa lý và có sự khác biệt

về mức độ gây bệnh của các mẫu nấm mang gen Cas khác nhau (Đèo và ctv, 2014). Các kết quả nghiên cứu về nhận diện gen Cas bằng kỹ thuật PCR đã được thực hiện tại Trung Quốc và Malaysia cho thấy, nhóm gen Cas 4 và Cas 5 được phát hiện trên những MPL nấm tại Malaysia (Shuib và ctv, 2015), nhóm gen Cas 2 và Cas 5 được tìm thấy trên những MPL nấm tại Trung Quốc (Lau và ctv, 2015). Tại Việt Nam, các kết quả nghiên cứu về nhận diện gen Cas trên các mẫu nấm *C. cassicola* vẫn còn ít, có 6 MPL nấm thuộc nhóm Cas 2 đã được nhận diện (Phạm Thị Ngọc Giàu, 2017; Văn Thị Mỹ Linh, 2018). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm bổ sung cơ sở dữ liệu, thông tin về sự hiện diện của gen mã hóa độc tố cassicolin trong các mẫu nấm *C. cassicola* thu thập trên cây cao su tại Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Nguồn nấm

Nguồn nấm đơn bào từ được phân lập trên cây cao su tại nhiều vùng trồng cao su ở Việt Nam. Tổng số mẫu nấm phân lập được là 76 mẫu nấm tại 12 tỉnh phân bố trải rộng từ khu vực Đông Nam bộ, Tây Nguyên, miền Trung và miền núi phía Bắc. Số mẫu nấm thu thập tại vùng Đông Nam bộ là 40 MPL, bao gồm: Bình Dương (12 MPL), Bình Phước (8 MPL), Tây Ninh (5 MPL), Đồng Nai (15 MPL). Số mẫu nấm thu thập tại vùng Tây Nguyên là 8 MPL, bao gồm: Gia Lai (4 MPL), Kon Tum (4 MPL). Số mẫu nấm thu thập tại miền Trung là 19 MPL, gồm: Bình Thuận (7 MPL),

¹ Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam

² Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

Email: donhieuv@gmail.com

Quảng Nam (9 MPL), Quảng Trị (3 MPL). Số mẫu nấm thu tại miền núi phía Bắc là 9 MPL, gồm: Lai Châu (3 MPL), Sơn La (3 MPL) và Lào Cai (3 MPL). Các MPL nấm đã được khảo sát hình thái, giải trình tự vùng rDNA-ITS và được xác định đúng là nấm *Corynespora cassicola*. Trình tự nucleotide của 76 MPL nấm đã được đăng ký trên cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI GenBank database) với mã số đăng ký (accession number) từ KF387577 đến KF387609, và từ MK896359 đến MK896420.

2.1.2. Dụng cụ và hóa chất cần thiết

Hóa chất ly trích DNA: dung dịch nitor lỏng, Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Mỹ).

Hóa chất sử dụng cho kỹ thuật PCR: GoTag[®] Green Master Mix (Promega) bao gồm dNTPs, MgCl₂, PCR buffer. Mẫu DNA ly trích từ MPL nấm, Nuclease - free water (Promega). Bảy (7) cặp mồi đặc hiệu cho các nhóm gen Cas, bao gồm năm cặp

mồi đã được mô tả bởi tác giả Déon và ctv (2012a; 2012b; 2014) và hai cặp mồi (F1CasU1-2-6 + R1CasU1-2-6; F1CasU'3-4-5 + R1CasU3-4-5) được tác giả Déon cung cấp thông tin qua trao đổi hợp tác nghiên cứu. Chi tiết 7 cặp mồi được trình bày tại bảng 1.

Hóa chất để điện di sản phẩm PCR: Agarose (Promega), TBE buffer 1X (Promega), Ladder 100bps.

Máy móc và thiết bị: Bồn ủ nhiệt Memmert WB/OB 7 45 WBU 45, máy vortex KMS1 Minishaker IKA®, máy ly tâm lạnh Hettich Zentrifugen MikRo 22R, tủ hút khí độc ESCO®, máy PCR PTC-100, bồn điện di Thermo EC 330, nguồn điện di GE Healthcare EPS 301, máy chụp gel GelDoc - It - Imaging System UVP, tủ lạnh siêu Sanaky, tủ mát AquaFun, pipette và đầu tip các loại, tube eppendorf 1.5 ml và 0,2 ml.

Bảng 1. Danh sách các cặp mồi, trình tự và mục tiêu gen Cas (Déon và ctv, 2012a; 2012b; 2014)

Cặp mồi	Tên mồi	Trình tự (5' - 3')	Mục tiêu gen Cas	Kích thước sản phẩm (bp)
1	F1CasU1-2-6	CTCTGCTTTGTAGCAGCCG	Cas 1, Cas 2 và Cas 6	457 - 461
	R1CasU1-2-6	GTGTGGTGTATATGTAGCGC		
2	CasF17	GGATTTGCCTGAGATCCTA	Cas2	759
	CasR24	CAAACAATGCTAACCAAAACAAC		
3	CasF18	CCCAGATACATGTTTGTADTGT	Cas1	700
	CasR27	CCACACAAAGCAAGATACAGAATGAGC		
4	CasF16	GCTTGATTTGCCTGTGAGATACT	Cas6	764
	CasR25	AAAACGATGCTAAAACAAAAGGA		
5	F1CasU3-4-5	TCCCTATCCTCATCTCGGC	Cas 3, Cas 4 và Cas 5	418 - 419
	R1CasU3-4-5	GTCCAGAATACTTGGTAGC		
6	CasF20	GTCCGGCTAACTTGGGAAAACTCT	Cas3, Cas4	774
	CasR28	GCAGGAAGCAAAACACAGAACAAG		
7	CasF19	CGGGGAGGTATCAGGTGTGAGATA	Cas5	706
	CasR26	CAGAACAAGCCAAAAGAGAACTAC		

* F (Forward primer): mồi xuôi; R (Reverse primer): mồi ngược.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Ly trích DNA các MPL nấm *C. cassicola*

MPL nấm được nghiền trong nitor lỏng bằng chày và cối sứ và sau đó ly trích DNA bằng Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit theo quy trình khuyến cáo bên nhà cung cấp bộ Kit (Promega, USA). Sau khi ly trích hoàn tất, mẫu được trữ ở tủ

đông -20°C. Các DNA mẫu sau khi ly trích sẽ được điện di trên gel agarose 1,0% để định tính DNA và đo nồng độ DNA bằng máy đo mật độ quang chuyên dụng IMPLEN-P330 (Germany).

2.2.2. Phản ứng PCR nhận diện gen Cas

Phản ứng PCR nhận diện gen Cas được thực hiện với 7 cặp mồi đặc hiệu cho các nhóm gen Cas được mô tả bởi tác giả Déon và ctv (2012a; 2012b;

2014), trình tự các cặp mới được trình bày tại bảng 1. Thể tích cho mỗi phản ứng PCR là 25 μ l gồm PCR buffer IX [Tris - HCl 10 mM (pH 8,8 ở 25°C), KCl 50 mM, Tris X - 100 50 mM], $MgCl_2$ 1,5 mM, 0,2 mM mỗi loại dNTP, 0,4 μ M mỗi mỗi loại, 0,5 U DNA Polymerase và 25 ng DNA mẫu.

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy luân nhiệt (MJ Research PTC-100, USA) với nhiệt độ biến tính ban đầu là 94°C trong 2 phút, sau đó là 30 chu kỳ với nhiệt độ biến tính là 94°C trong 30 giây, nhiệt độ bắt cặp là 56°C trong 30 giây, nhiệt độ kéo dài là 72°C trong 1 phút và nhiệt độ kéo dài cuối cùng là 72°C trong 10 phút (Luu và ctv, 2015).

Kiểm tra đoạn DNA được khuếch đại bằng phương pháp điện di trên gel. Hút 2 μ l sản phẩm PCR, trộn đều với 3 μ l đệm tải màu 6X, điện di trên gel 1,2% pha bằng TBE buffer IX ở 70V trong 45 phút ở nhiệt độ phòng. Gel được quan sát dưới đèn UV và chụp ảnh bằng máy chuyên dụng (GelDoc - It - Imaging System UVP, USA). Kích thước của các đoạn DNA khuếch đại được so sánh với thang DNA chuẩn 100 bps.

Các sản phẩm PCR với cặp mới CasF17-CasR24 (Cas 2) của một số MPL đại diện được giải trình tự bởi Công ty First BASE (Singapore). Kết quả giải trình tự của mỗi MPL được kiểm tra và hiệu chỉnh bằng phần mềm BioEdit phiên bản 7.2.5 (Hall, 2013). Trình tự của các MPL được căn chỉnh hàng bằng cách sử dụng Clustal W Multiple Alignment (Thompson và ctv, 1994) trong phần mềm BioEdit, sử dụng BLAST alignment để đối chiếu với các trình tự Cas 2 trên cơ sở dữ liệu GenBank.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

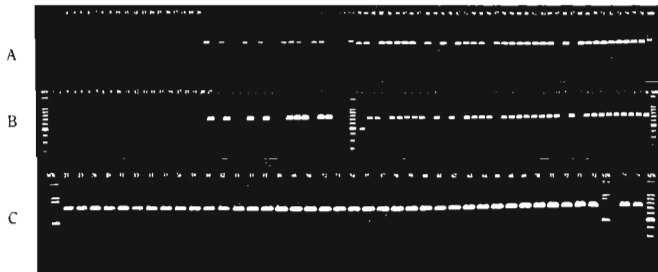
3.1. Xác định sự hiện diện của gen Cas trên các MPL nấm *C. cassicola*

Các phản ứng PCR-Cas được thực hiện với từng cặp mới đặc hiệu theo thứ tự từ 1 đến 7 để nhận diện gen Cas (Bảng 1). Đầu tiên, thực hiện phản ứng PCR với cặp mới F1CasU1-2-6 và R1CasU1-2-6 đặc hiệu để xác định sự hiện diện của nhóm gen Cas 1, Cas 2 hoặc Cas 6. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng PCR thể hiện ở hình 1A xuất hiện băng DNA với kích thước khoảng 450 - 500 bp trên 40 giếng tương ứng

với 40 MPL. Năm có sự hiện diện của một trong ba nhóm gen Cas 1 hoặc Cas 2 hoặc Cas 6. Tiếp theo, thực hiện phản ứng PCR với cặp mới CasF17 và CasR24 đặc hiệu để xác định sự hiện diện của Cas 2, kết quả điện di sản phẩm phản ứng PCR thể hiện ở hình 1B xuất hiện băng DNA với kích thước 750 - 800 bp trên 40 giếng tương khớp hoàn toàn với 40 MPL năm đã thực hiện với cặp mới F1CasU1-2-6 và R1CasU1-2-6, chứng tỏ 40 MPL năm này có gen Cas 2. Những MPL năm có gen Cas 2 bao gồm: CoryTN09, CoryTN11, CoryDN06, CoryDN10, CoryDN15, CoryDN21, CoryDN23, CoryDN25, CoryDN27, CoryDN39, CoryPK01, CoryGL02, CoryGL03, CoryKT01, CoryKT02, CoryKT03, CoryBT03, CoryBT08, CoryBT13, CoryBT17, CoryBT18, CoryQN01, CoryQN03, CoryQN04, CoryQN05, CoryQN06, CoryQN07, CoryQN08, CoryQN13, CoryQN14, CoryQT02, CoryLC01, CoryLC02, CoryLC03, CorySL01, CorySL02, CorySL03, CoryLCA1, CoryLCA2 và CoryLCA3 (Bảng 2 và hình 1C).

Sau đó, các phản ứng PCR-Cas tiếp tục được thực hiện lần lượt với các cặp mới CasF18 + CasR27 (nhận diện Cas 1); CasF16 + CasR25 (nhận diện Cas 6); F1CasU3-4-5 + R1CasU3-4-5 (nhận diện Cas 3, Cas 4 và Cas 5); CasF20 + CasR25 (nhận diện Cas 3, Cas 4) và cặp mới CasF19 + CasR26 (nhận diện Cas 5) nhưng sản phẩm thu được không có băng DNA, chứng tỏ các MPL năm không có các nhóm gen Cas 1, Cas 6, Cas 3, Cas 4 hoặc Cas 5.

Sản phẩm PCR với cặp mới CasF17 - CasR24 (Cas 2) của 4 MPL đại diện gồm: CoryDN39, CoryPK01, CoryQN01 và CorySL02 được giải trình tự bởi First BASE. Kết quả giải trình tự DNA sản phẩm PCR có cùng kích thước là 759 bp tương khớp với kích thước gen Cas 2 theo mô tả của Déon và ctv (2014). Trình tự gen Cas 2 của 4 MPL hoàn toàn giống nhau. Kết quả tìm kiếm sự tương đồng bằng công cụ BLAST cho thấy 4 MPL có độ tương đồng từ 99,44% - 99,86% so với các mẫu năm *C. cassicola* mang gen Cas 2 đã được đăng ký trên cơ sở dữ liệu GenBank (Hình 2). Điều này xác nhận và khẳng định sự hiện diện của gen Cas 2 trên 40 MPL. Trong số 76 MPL đã được nghiên cứu.



Hình 1. Gel điện di sản phẩm PCR của các MPL nấm *C. cassiicola* nhận diện các nhóm gen Cas. (A) Sản phẩm PCR của 76 MPL nấm với cặp mồi F1CasU1-2-6 và R1CasU1-2-6 để nhận diện Cas 1, Cas 2 và Cas 6; (B) Sản phẩm PCR của 76 MPL nấm với cặp mồi CasF17 và CasR24 để nhận diện Cas 2; (C) Tổng hợp 40 MPL nấm có sự hiện diện của gen Cas 2



Hình 2. Trình tự nucleotide gen Cas 2 và kết quả so sánh bằng công cụ BLAST. (A) Trình tự gen Cas 2 của MPL CoryDN39; (B) Kết quả so sánh độ tương đồng của 4 MPL CoryDN39, CoryKT01; CoryQN01 và CorySL02; (C) Kết quả so sánh trình tự gen Cas 2 của 4 MPL trên GenBank

Bảng 2. Danh sách và phân nhóm gen Cas trên các mẫu nấm *C. cassicola*

Mã số	Tên mẫu nấm	Địa điểm	Kỳ chủ (DVT)	Năm phân lập	Gen Cas
1	CoryLK02	Bình Dương	LH01/0131	2009	Cas 0
2	CoryLK24	Bình Dương	IAN 873	2010	Cas 0
3	CoryLK27	Bình Dương	LH90/1094	2010	Cas 0
4	CoryLK29	Bình Dương	RRIV3	2010	Cas 0
5	CoryLK32	Bình Dương	LH94/062	2010	Cas 0
6	CoryLK33	Bình Dương	RRIV1	2010	Cas 0
7	CoryLK60	Bình Dương	LH90/463	2018	Cas 0
8	CoryDT01	Bình Dương	RRIV3	2010	Cas 0
9	CoryDT02	Bình Dương	RRIV2	2010	Cas 0
10	CoryDT03	Bình Dương	RRIV4	2010	Cas 0
11	CoryDT04	Bình Dương	RRIV4	2010	Cas 0
12	CoryDT05	Bình Dương	PB260	2010	Cas 0
13	CoryBL01	Bình Phước	RRIV3	2009	Cas 0
14	CoryDP03	Bình Phước	RRIV4	2010	Cas 0
15	CoryDP04	Bình Phước	RRIV2	2010	Cas 0
16	CoryDP07	Bình Phước	RRIV4	2016	Cas 0
17	CoryDP08	Bình Phước	RRIV4	2016	Cas 0
18	CoryDP09	Bình Phước	RRIV3	2016	Cas 0
19	CoryDP11	Bình Phước	RRIV4	2017	Cas 0
20	CoryTN02	Tây Ninh	RRIV4	2010	Cas 0
21	CoryTN09	Tây Ninh	RRIV3	2016	Cas 2
22	CoryTN10	Tây Ninh	RRIV4	2016	Cas 0
23	CoryTN11	Tây Ninh	RRIV4	2016	Cas 2
24	CoryTN13	Tây Ninh	RRIV4	2017	Cas 0
25	CoryDN03	Đồng Nai	RRIV4	2010	Cas 0
26	CoryDN06	Đồng Nai	RRIV4	2015	Cas 2
27	CoryDN07	Đồng Nai	RRIV4	2015	Cas 0
28	CoryDN10	Đồng Nai	RRIV4	2015	Cas 2
29	CoryDN12	Đồng Nai	RRIV4	2015	Cas 0
30	CoryDN13	Đồng Nai	RRIV4	2015	Cas 0
31	CoryDN15	Đồng Nai	RRIV4	2015	Cas 2
32	CoryDN21	Đồng Nai	RRIV4	2016	Cas 0
33	CoryDN23	Đồng Nai	RRIV4	2016	Cas 2
34	CoryDN24	Đồng Nai	RRIV4	2016	Cas 0
35	CoryDN25	Đồng Nai	RRIV4	2016	Cas 2
36	CoryDN27	Đồng Nai	RRIV4	2016	Cas 2
37	CoryDN30	Đồng Nai	RRIV4	2016	Cas 0

38	CoryDN32	Đồng Nai	RRIV3	2016	Cas 0
39	CoryDN39	Đồng Nai	RRIV4	2017	Cas 2
40	CoryPK01	Gia Lai	LH 88/732	2009	Cas 2
41	CoryGL01	Gia Lai	RRIV106	2017	Cas 0
42	CoryGL02	Gia Lai	RRIC110	2017	Cas 2
43	CoryGL03	Gia Lai	RRIC110	2017	Cas 2
44	CoryKT01	Kon Tum	RRIV4	2010	Cas 2
45	CoryKT02	Kon Tum	PB235	2010	Cas 2
46	CoryKT03	Kon Tum	RRIV4	2010	Cas 2
47	CoryKT04	Kon Tum	PB260	2010	Cas 0
48	CoryBT03	Binh Thuận	RRIV3	2014	Cas 2
49	CoryBT06	Binh Thuận	RRIV4	2014	Cas 0
50	CoryBT08	Binh Thuận	RRIV4	2015	Cas 2
51	CoryBT09	Binh Thuận	RRIV4	2015	Cas 0
52	CoryBT13	Binh Thuận	RRIV3	2017	Cas 2
53	CoryBT17	Binh Thuận	RRIV4	2017	Cas 2
54	CoryBT18	Binh Thuận	RRIV4	2017	Cas 2
55	CoryQN01	Quảng Nam	PB260	2009	Cas 2
56	CoryQN02	Quảng Nam	RRIV4	2009	Cas 0
57	CoryQN03	Quảng Nam	RRIV4	2017	Cas 2
58	CoryQN04	Quảng Nam	RRIV4	2017	Cas 2
59	CoryQN05	Quảng Nam	RRIV4	2017	Cas 2
60	CoryQN06	Quảng Nam	RRIV4	2017	Cas 2
61	CoryQN07	Quảng Nam	RRIV4	2017	Cas 2
62	CoryQN08	Quảng Nam	RRIV4	2017	Cas 2
63	CoryQN13	Quảng Nam	RRIV4	2017	Cas 2
64	CoryQN14	Quảng Nam	RRIV4	2017	Cas 2
65	CoryQT01	Quảng Trị	RRIV 124	2017	Cas 0
66	CoryQT02	Quảng Trị	RRIV 124	2017	Cas 2
67	CoryQT03	Quảng Trị	RRIV 124	2017	Cas 0
68	CoryLC01	Lai Châu	IAN 873	2017	Cas 2
69	CoryLC02	Lai Châu	IAN 873	2017	Cas 2
70	CoryLC03	Lai Châu	IAN 873	2017	Cas 2
71	CorySL01	Sơn La	RRIV 4	2018	Cas 2
72	CorySL02	Sơn La	RRIV 4	2018	Cas 2
73	CorySL03	Sơn La	RRIV 4	2018	Cas 2
74	CoryLCA1	Lào Cai	VN774	2018	Cas 2
75	CoryLCA1	Lào Cai	VN774	2018	Cas 2
76	CoryLCA3	Lào Cai	VN774	2018	Cas 2

3.2. Thảo luận

Gen mã hóa độc tố cassicolin lần đầu tiên được phát hiện và mô tả bởi Deon và ctv (2012a), trong một nghiên cứu về đặc điểm gen mã hóa độc tố cassicolin của ba MPL đại diện cho mức độ gây bệnh khác nhau. Gen Cas đã được phát hiện trên MPL có tính gây bệnh mạnh (CCP) và gây bệnh trung bình (CCAM3) nhưng không phát hiện trên mẫu nấm gây bệnh yếu (CCAM1). Trong một nghiên cứu khác, bốn (4) mẫu nấm *C. cassicola* nổi sinh trên lá cây cao su không có triệu chứng bệnh tại Nam Mỹ, được xác định mang gen mã hóa cassicolin thuộc nhóm Cas 3 và Cas 4 (Déon và ctv, 2012b). Đến nay, đã có 6 nhóm gen Cas bao gồm Cas 1, Cas 2, Cas 3, Cas 4, Cas 5, Cas 6 đã được phát hiện trên các MPL nấm *C. cassicola* trên cây cao su và một số cây ký chủ khác, những MPL nấm chưa phát hiện có gen Cas được ký hiệu là Cas 0 (Déon và ctv, 2014). Trình tự các nhóm gen Cas đã được giải mã và đăng ký trên ngân hàng dữ liệu Genbank (Déon và ctv, 2012a; 2012b; 2014).

Trong nghiên cứu này đã phát hiện 40 MPL trong tổng số 76 MPL nấm *C. cassicola* trên cây cao su ở Việt Nam có sự hiện diện của nhóm gen Cas 2 (chiếm tỷ lệ 52,6%) và 36 MPL còn lại không phát hiện gen Cas được ký hiệu là Cas 0. Có sự khác biệt khá rõ về kiểu di truyền gen Cas của những MPL nấm *C. cassicola* trên cây cao su tại Việt Nam so với các kết quả nghiên cứu trước đây tại các quốc gia khác. Theo kết quả nghiên cứu của Deon và ctv (2014), các nhóm gen Cas 1, Cas 3, Cas 4, Cas 5 được phát hiện trên các MPL nấm *C. cassicola* từ cây cao su và nhóm Cas 2, Cas 6 trên các MPL nấm từ cây ký chủ khác, duy nhất MPL CC04 mang gen Cas 2 có nguồn gốc từ cây cao su tại Trung Quốc. Tiếp theo sau đó, Liu và ctv (2015) đã phát hiện gen Cas 2 và Cas 5 trên 40 MPL nấm *C. cassicola* thu thập từ cây cao su và một số cây ký chủ khác tại Trung Quốc, trong đó chỉ có sáu MPL nấm mang gen Cas 2 có nguồn gốc từ cây cao su. Nhóm tác giả đi đến nhận định: những mẫu nấm *C. Cassicola* trên cây cao su tại Trung Quốc có nguồn gốc từ các cây ký chủ khác. Trong khi đó, Shuib và ctv (2015) phát hiện có 13 MPL nấm mang gen Cas 3 và một MPL mang gen Cas 4 trong số 26 MPL nấm *C. cassicola* trên cây cao su tại Malaysia. Như vậy, kết quả nghiên cứu tại Việt Nam cũng với kết quả của những nghiên cứu trước đây tại các quốc gia khác đã chỉ ra rằng, sự đa dạng

di truyền giữa các nhóm gen Cas khác nhau được thể hiện rõ qua sự phân bố của các nhóm gen tại các vùng địa lý khác nhau, nhóm gen Cas 1 được tìm thấy trên các MPL nấm được thu thập từ cây cao su tại Ghana, Cameroon và Philippines, nhóm gen Cas 3 và Cas 4 được tìm thấy trên các MPL nấm tại Brazil, nhóm gen Cas 5 được tìm thấy trên các MPL nấm tại Malaysia và Sri Lanka (Déon và ctv, 2014). Nhóm gen Cas 4 và Cas 5 được tìm thấy trên những MPL nấm tại Malaysia (Shuib và ctv, 2015), nhóm gen Cas 2 và Cas 5 được tìm thấy trên những MPL nấm tại Trung Quốc (Liu và ctv, 2015). Trong khi đó, nhóm Cas 2 được tìm thấy trên những MPL nấm từ cây cao su tại Việt Nam.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Có hai nhóm gen Cas là Cas 2 và Cas 0 được phát hiện trên các mẫu nấm *C. cassicola* phân lập từ cây cao su tại Việt Nam.

4.2. Đề nghị

Đánh giá tính gây bệnh của các MPL nấm thuộc hai nhóm gen Cas trên các DVT cao su, chọn lọc một số MPL nấm có tính gây bệnh mạnh đại diện cho các phân nhóm gen Cas phục vụ cho công tác tạo tuyển giống kháng bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Breton F., Sanier C. and d'Auzac. J. , 2000. Role of Cassicolin, a Host-selective toxin, in pathogenicity of *Corynespora cassicola*, causal agent of a leaf fall disease of *Hevea*. *Journal of Rubber Research* 3: 115 - 128.
- Déon M., Bourre Y., Gimenez S., Berger A., Bieysse D., de Lamotte F., Poncet, J., Roussel V., Bonnot F., Oliver G., Franchel J., Seguin M., Leroy T., Roedel-Drevet P and Pujade-Renaud V., 2012a. Characterization of a cassicolin-encoding gene from *Corynespora cassicola*, pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Science* 187:186-227-237.
- Déon M., Scamporrin A., Texier A., Mattos C., Leroy T., Seguin M., Roedel-Drevet P and Pujade-Renaud V., 2012b. First characterization of endophytic *Corynespora cassicola* isolates with variant cassicolin genes recovered from rubber trees in Brazil. *Fungal Diversity* 57: 87-107.
- Déon M., Fumanal B., Gimenez S., Bieysse D., Oliveira R. R., Shuib S. S., Breton F., Elumalai S.,

- Vida J.B., Seguin M., Leroy T., Roeckel-Drevet and Pujade-Renaud V., 2014. Diversity of the cassicolin gene in *Corynespora cassicola* and relation with the pathogenicity in *Hevea brasiliensis*. *Fungal Biology* 118(1): 32-47.
5. Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95 - 108.
6. Liu X., Li B., Cai J, Li C. and Huang G., 2015. Diversity of the cassicolin gene in *Corynespora cassicola* of rubber tree in china. In *Proceeding of International rubber conference*. Ho Chi Minh city, Viet Nam. 176 - 181.
7. Phạm Thị Ngọc Giàu (2017). Bước đầu đánh giá biểu hiện gen Cas của nấm *Corynespora cassicola* gây bệnh rụng lá cao su dưới sự tương tác đối kháng với vi khuẩn kháng nấm. Luận văn thạc sĩ chuyên ngành vi sinh. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.
8. Shuib S. S. S, Déon M, Mahyuddin M. M, Izhar A, Fumanal B, Sunderasan E and Renaud V. P, 2015. *Cassicolin Genes among Corynespora cassicola Isolates from Rubber Plantations in Malaysia*. *Journal of rubber research*, 18 (2): 109 - 126.
9. Thompson D. J., Higgins D. G. and Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673 - 4680.
10. Văn Thị Mỹ Linh (2018). Phát hiện và mô tả các gen mã hoá cassicolin trên các chủng *Corynespora cassicola* (Berk. & Curt.) Wei. phân lập tại Việt Nam. Luận văn thạc sĩ chuyên ngành Công nghệ sinh học. Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc Gia TP. HCM.

DETECTION OF CASSICOLIN-ENCODING GENES IN *Corynespora cassicola* ISOLATES FROM RUBBER TREES IN VIETNAM

Nguyen Don Hieu, Nguyen Anh Nghia, Nguyen Bao Quoc

Summary

Cassicolin, a phytotoxic protein produced by *Corynespora cassicola*, was previously described as a host-selective toxin and played an important role in infection process of the pathogen. Cassicolin-encoding gene (Cas gene) was known as the important effector that related to the genetic diversity and pathogenicity of *C. cassicola* and 6 groups of Cas genes were discovered. In this study, Cas genes were amplified using PCR technique with 7 specific primer pairs in order to detect cassicolin encoding genes in 76 *C. cassicola* isolates collected from 16 rubber clones from several geographic regions of Vietnam. Cassicolin protein isoform Cas 2 encoding gene was detected in 40 out of 76 isolates (52.6%), meanwhile no Cas genes was detected in the remaining 36 isolates, which were subsequently classified to Cas 0 group.

Keywords: *Corynespora cassicola*, cassicolin, Cas gen, isolate, rubber clone.

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Đông

Ngày nhận bài: 20/6/2019

Ngày thông qua phản biện: 22/7/2019

Ngày duyệt đăng: 29/7/2019