

ĐỊNH LOẠI NẤM MEN PHÂN LẬP TẠI VƯỜN QUỐC GIA NAM CÁT TIỀN, TỈNH ĐỒNG NAI

Ngô Đức Duy¹, Nguyễn Hữu Hùng^{1,2},

Nguyễn Quang Thạch^{2,3}, Hoàng Quốc Khánh¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu này tập trung phân lập và định loại các chủng nấm men tự nhiên ở hoa, lá cây và phần còn trùng tại Vườn Quốc gia Nam Cát Tiên dựa vào các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và trình tự vùng bảo tồn Internal Transcribed Spacer (ITS). Đã phân lập được 3 chủng (H5, H7 và H9) từ hoa, 4 chủng (L5, L10, L24 và L29) từ lá cây và 2 chủng (P2 và P5) từ phần còn trùng. Định loại theo đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa cho thấy chủng H5, H9, L5 và L10 thuộc chi *Candida*, chủng H7 thuộc chi *Sporisorium*, chủng L24 thuộc chi *Ustilago*, chủng L29 thuộc chi *Cryptococcus*, chủng P2 thuộc chi *Sporidiobolus* và chủng P5 thuộc chi *Williopsis*. Giải trình tự vùng bảo tồn ITS của các chủng trên cho thấy mức độ tương đồng giữa H5 và *Candida quercitusa* là 94%, H9 và *Candida quercitusa* là 94%, L5 và *Candida diddensiae* là 89%, L10 và *Candida naeodendra* là 91%, L24 và *Ustilago trichophora* là 94%, L29 và *Cryptococcus sp. CBS 8368* là 94%, P2 và *Sporidiobolus ruineniae* là 99% và giữa P5 và *Williopsis* là 94%.

Từ khóa: Cây phát sinh loài, D1/D2, gen 26S rDNA, gen ITS và nấm men.

1. MỞ ĐẦU

Theo thống kê của trung tâm dữ liệu thế giới về vi sinh vật (World data centre for microorganisms) có 1.216 chi nấm men đã được mô tả tính đến thời điểm năm 2013.

Hệ thống phân loại nấm men kinh điển chủ yếu dựa vào hình thái học, sinh lý và sinh hóa (Kurtzman C. P. et al., 1991 và 1998). Trong đó, một số đặc điểm thường được khảo sát là hình dạng tế bào sinh dưỡng và hình thức sinh sản như phân chia tế bào, hình thái bào tử nang, khả năng đồng hóa nguồn các bon và nitơ, khả năng lên men. Phân tích sinh học phân tử giúp xác định các quan hệ về loài và sự phát sinh loài trong quá trình tiến hóa hình thành nên một hệ thống phân loại hiện đại. Dù đặc điểm sinh học phân tử không thể thay thế được các đặc điểm kinh điển nhưng nó chứng tỏ được sự hữu ích trong xác định tính đa dạng sinh học trong quần thể của nấm men (Roger Schneider, 2004).

Trong những năm gần đây, việc giải trình tự các vùng gen bảo tồn, gồm 28S, 26S, 18S, 5.8S, 5S và ITS đã được ứng dụng để định danh nấm men. Mặc dù vậy, việc định loại nấm men được cho thấy là cần sự kết hợp các đặc điểm kinh điển gồm hình thái học, sinh lý học, sinh hóa học và các đặc điểm hiện đại về

sinh học phân tử (Barnett J. A. et al., 2000; Fell J. W. et al., 2000; H. W. Mewes et al., 1997; José Manuel Guilmón et al., 1998; Rosa De L. F. et al., 2004; Sasitorn Jindamorakot et al., 2004).

Trong nghiên cứu này, đã phân lập được 9 chủng nấm men tự nhiên ở hoa, lá và phần còn trùng tại Vườn Quốc gia Nam Cát Tiên, tỉnh Đồng Nai. Bằng phân tích các đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa, 4 chủng thuộc chi *Candida*, 1 chủng thuộc chi *Sporisorium*, 1 chủng thuộc chi *Ustilago*, 1 chủng thuộc chi *Cryptococcus*, 1 chủng thuộc chi *Sporidiobolus* và 1 chủng thuộc chi *Williopsis* được xác định. Kết quả của việc giải trình tự vùng gen ITS đã khẳng định được sự định loại trên. Tuy nhiên, việc giải trình tự các vùng bảo tồn khác cần phải được thực hiện tiếp theo để có một kết quả so sánh và khẳng định vai trò của vùng gen ITS.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguồn nấm men

Các chủng nấm men H5, H7, H9, L5, L10, L24, L29, P2 và P5 được phân lập từ hoa, lá và phần còn trùng trong tự nhiên tại Vườn Quốc gia Nam Cát Tiên - Tỉnh Đồng Nai.

2.2. Khảo sát các đặc điểm hình thái tế bào nấm men

Nấm men được phân lập bằng môi trường phân lập YM aga có chứa cloramphenicol và natri propionat. Sau đó, môi trường PGA được dùng để giữ giống nấm men, môi trường YMB được dùng để khảo sát hình thái tế bào sinh dưỡng nấm men, môi

¹ Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

³ Đại học Nông nghiệp Hà Nội

trường phân chiết mạch nha 5% và môi trường thạch axetat được dùng để khảo sát bào tử nấm men. Hình thái khuẩn ty được khảo sát bằng phương pháp Dalmat trên môi trường YM aga.

2.3. Xác định các đặc tính sinh lý và sinh hóa của nấm men

Sự lên men các nguồn đường khác nhau của các chủng nấm men được phân lập trên được thực hiện theo phương pháp ống Durham. Các nguồn đường được sử dụng gồm glucoza, maltoza, lactoza, galactoza, sucroza, raffinosa và trehaloza. Sự đồng hóa các nguồn các bon khác nhau được xác định qua khả năng đồng hóa các nguồn glucoza, maltoza, lactoza, galactoza, sucroza, raffinosa, trehaloza, sorboza, xyloza, sobitol, glyxerol, manitol, inositol, ethanol, axit lactic, axit xitric, axit succinic và tinh bột. Sự đồng hóa các nguồn nitơ khác nhau được xác định qua khả năng đồng hóa các nguồn $(NH_4)_2SO_4$, KNO_3 , $NaNO_3$, L-lyzin hydroclorit và etylamin hydroclorit. Môi trường 10%, 20%, 30%, 40%, 50% và 60% glucoza aga được dùng để khảo sát khả năng phát triển của nấm men. Môi trường thạch cacbonat được dùng để khảo sát đặc tính sinh axit của nấm men. Môi trường urê được dùng để khảo sát khả năng phân giải urê của nấm men. Môi trường lipid (môi trường Seliber) được dùng để khảo sát khả năng đồng hóa lipid của nấm men. Cuối cùng, môi trường chứa gelatin được dùng để khảo sát khả năng phân giải gelatin của nấm men. Thời gian khảo sát các đặc tính sinh lý và sinh hóa trên của các chủng nấm men là 15 ngày. Khả năng tăng trưởng và sinh sản được xác định bằng phương pháp độ mờ thước kẻ. Các phương pháp hình thái, sinh lý và sinh hóa được thực hiện theo phương pháp Yarrow D. (1998).

2.4. Tách chiết và tinh sạch ADN

Sử dụng bộ kit tách chiết và tinh sạch ADN của Qiagen. Qui trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.5. Phản ứng PCR

Vùng ITS được nhân bản bằng PCR, trong đó mỗi xuôi ITS-1 là 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' và mỗi ngược ITS-4 là 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' (White et al., 1990). Quá trình nhân bản: 94°C/5 phút, 35 chu kỳ (94°C/1 phút, 55°C/1 phút, 72°C/2 phút), 72°C/10 phút và giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được phân tách trên gel agarosa 0,8% và được phát hiện bằng Ethidium bromide. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng Kit PCR GFX™ Band Purification Kit của Amersham.

2.6. Giải trình tự đoạn gen

Sản phẩm PCR được giải trình tự bởi Công ty Macrogen Inc, Hàn Quốc.

2.7. Phần mềm phân tích dữ liệu trình tự đoạn gen ITS và thiết lập cây phát sinh loài

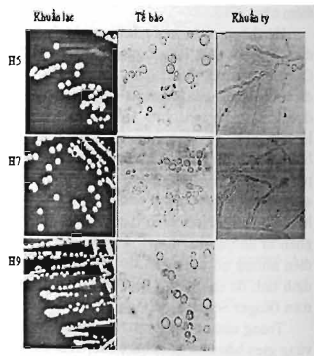
Các phần mềm và website phân tích trực tuyến sau được sử dụng: ClustalX1.8, Treeview, BioEdit, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> và <http://www.ebi.ac.uk/Tools>.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập nấm men từ hoa, lá cây và phân côn trùng

Các mẫu của hoa, lá cây và phân côn trùng được thu nhận tại Vườn Quốc gia Nam Cát Tiên, tỉnh Đồng Nai. Nấm men trong các mẫu trên được phân lập và xác định sơ bộ trên môi trường chuyên biệt. Các khuẩn lạc và hình ảnh tế bào cho phép xác định các chủng nấm men có ký hiệu sau: chủng H5, H7 và H9 được phân lập từ hoa; chủng L5, L10, L24 và L29 được phân lập từ lá; các chủng P2 và P5 được phân lập từ phân côn trùng.

3.2. Các đặc điểm hình thái học của nấm men được phân lập

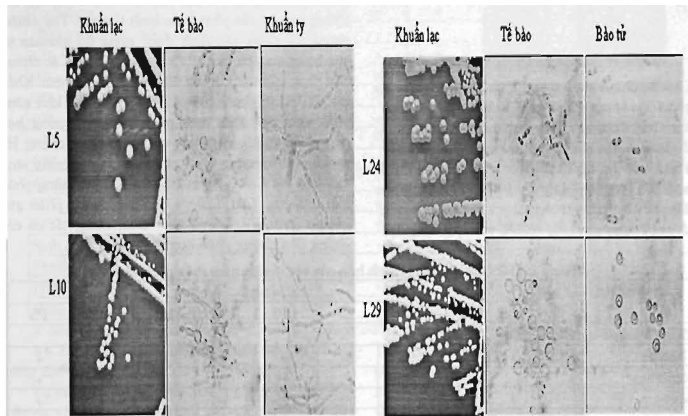


Hình 1. Các chủng nấm men H5, H7, và H9 được phân lập từ hoa. Hình dạng khuẩn lạc trên môi trường YMA được xác định sau khi ủ 48 giờ ở 25°C. Hình dạng tế bào dinh dưỡng và kiểu sinh sản nảy chồi trong môi trường YMB được xác định sau khi ủ 48 giờ ở 25°C với độ phóng đại 100X. Hình dạng khuẩn ty trên môi trường YMA được xác định sau 5 ngày nuôi cấy ở 25°C với độ phóng đại 100X

Các chỉ tiêu hình thái gồm đặc điểm khuẩn lạc, tế bào sinh dưỡng, sinh bào tử và tạo khuẩn ty. Ở các chủng được phân lập từ hoa, kết quả khảo sát (Hình 1) cho thấy chủng H5 tạo khuẩn lạc trắng đục và có bề mặt trơn, tế bào sinh dưỡng hình tròn, có kiểu sinh sản nảy chồi đa hướng, không tạo nang bào tử và có hình thành khuẩn ty. Chủng H7 giống với H5, ngoại trừ khuẩn lạc của H7 có bề mặt khô và chủng H9 giống chủng H5 nhưng chủng này chồi đơn hướng và không hình thành khuẩn ty.

Ở các chủng được phân lập từ lá, kết quả (Hình 2) cho thấy rằng chủng L5 tạo khuẩn lạc trắng đục với bề mặt trơn, có tế bào sinh dưỡng hình tròn hoặc

elip, có kiểu sinh sản nảy chồi đơn hướng, không tạo nang bào tử và có hình thành khuẩn ty. Chủng L10 tạo khuẩn lạc trắng đục, bề mặt khuẩn lạc khô, tế bào dinh dưỡng hình elip hoặc que, kiểu sinh sản nảy chồi đa hướng, không tạo nang bào tử và có hình thành khuẩn ty. Chủng L24 hình thành khuẩn lạc nâu nhỏ, bề mặt khuẩn lạc trơn, tế bào sinh dưỡng hình que, kiểu sinh sản nảy chồi đơn hướng, tạo nang bào tử và không hình thành khuẩn ty. Chủng L29 tạo khuẩn lạc trắng đục, bề mặt khuẩn lạc trơn, tế bào sinh dưỡng hình tròn, kiểu sinh sản nảy chồi đơn hướng, tạo nang bào tử và không hình thành khuẩn ty.

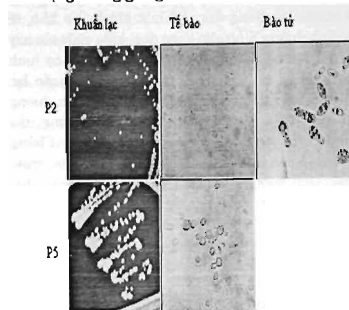


Hình 2. Các chủng nấm men L5, L10, L24 và L29 được phân lập từ lá cây. Hình dạng khuẩn lạc trên môi trường YMA được xác định sau khi ủ 48 giờ ở 25°C. Hình dạng tế bào sinh dưỡng và kiểu sinh sản nảy chồi trên môi trường YMB được xác định sau khi ủ 48 giờ ở 25°C với độ phóng đại 100X. Hình dạng khuẩn ty chủng L5 và L10 trên môi trường YMA được xác định sau 5 ngày nuôi cấy ở 25°C với độ phóng đại 100X. Hình dạng nang bào tử chủng L24 và L29 trên môi trường thạch axetat được xác định sau 7 ngày nuôi cấy ở 25°C với độ phóng đại 100X

Ở các chủng được phân lập từ phân côn trùng, kết quả (Hình 3) cho thấy chủng P2 có khuẩn lạc màu cam, bề mặt khuẩn lạc trơn, tế bào dinh dưỡng hình que, kiểu sinh sản nảy chồi đơn hướng, tạo nang bào tử và không hình thành khuẩn ty. Chủng P5 khuẩn lạc trắng đục, bề mặt khuẩn lạc trơn, tế bào dinh dưỡng hình tròn, kiểu sinh sản nảy chồi đơn hướng, không tạo nang bào tử và khuẩn ty.

Các kết quả trên cho thấy các chủng nấm men được phân lập có sự đa dạng về đặc điểm hình thái học. Hầu hết các chủng tạo khuẩn lạc có màu trắng đục ngoại trừ chủng L24 cho khuẩn lạc màu nâu và chủng P2 tạo khuẩn lạc màu cam. Hình dạng tế bào sinh dưỡng của các chủng đa dạng gồm hình tròn, elip và hình que. Một số chủng nảy chồi đơn hướng và phần còn lại nảy chồi đa hướng. Một số chủng có

khả năng hình thành bào tử nang và khuẩn ty với hình dạng không giống nhau.



Hình 3. Các chủng nấm men P2 và P5 được phân lập từ phân côn trùng. Hình dạng khuẩn lạc trên môi trường YMA được xác định sau khi ủ 48 giờ ở 25°C. Hình dạng tế bào sinh dưỡng và kiểu sinh sản nảy chồi trên môi trường YMB được xác định sau khi ủ 48 giờ ở 25°C với độ phóng đại 100X. Hình dạng bào tử chủng P2 trên môi trường thạch axêtat được xác định sau 7 ngày nuôi cấy ở 25°C với độ phóng đại 100X

3.3. Đặc điểm sinh lý sinh và sinh hóa của nấm men được phân lập

Tiến hành khảo sát các đặc điểm sinh lý, sinh hóa như: khảo sát khả năng lên men các loại đường và khả năng đồng hóa các nguồn các bon và nitơ khác nhau. Kết quả thu nhận từ các thử nghiệm này được trình bày trong bảng 1. Ngoài khả năng lên men và đồng hóa các nguồn các bon và nitơ, chúng tôi còn thử nghiệm khả năng phát triển ở các nồng độ glucoza khác nhau, khả năng chịu nhiệt, khả năng sinh axit, phân giải lipid, phân giải ure và phân giải gelatin của nấm men. Kết quả (Bảng 1) cho thấy chủng H5, H9, P2 và P5 giảm dần khả năng phát triển khi nồng độ đường tiến tới 60%, trong khi các chủng còn lại vẫn phát triển bình thường. Tuy nhiên, chúng tôi chưa xác định được nồng độ glucoza ức chế hoàn toàn tất cả các chủng nấm men. Các chủng đều phát triển tốt ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Khảo sát khả năng chịu nhiệt ở 37°C và 42°C, khả năng phát triển của nấm men giảm dần từ trường hợp chủng H7 và L5. Điều này chứng tỏ rằng, chủng H7 và L5 có khả năng chịu nhiệt cao. Các chủng sinh axit làm tan CaCO_3 gồm H5 và H9. Các chủng phân giải ure gồm L24, L29 và P2. Các chủng phân giải gelatin gồm H9, L5 và L24. Cuối cùng, tất cả các chủng đều không phân hủy lipid.

Bảng 1. Đặc tính sinh lý và sinh hóa của các chủng nấm men phân lập

Đặc tính	Chủng								
	H5	H7	H9	L5	L10	L24	L29	P2	P5
Đồng hóa các nguồn các bon									
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinoza	-	+	y	-	+	+	+	+	+
Maltoza	+	+	-	+	y	+	+	+	+
Sucroza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactoza	y	+	+	+	+	+	+	+	-
Lactoza		+	-	y	y	+	+	-	+
Sorboza	-	+	+	-	-	+	y	-	-
Xyloza	+			-	-	+	+	-	+
Trehaloza	+	-	-	y	+	+	+	-	-
Sorbitol	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Glyxerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	c	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	-	y		+	-	+	-	-
Ethanol	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Axit lactic	+			-		+	-	+	+
Axit xitric	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Axit succinic	+		+	+	+	+	+	+	+
Tinh bột	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Đông hóa các nguồn nitơ

(NH ₄) ₂ SO ₄	+	+/.	+	+	+	+	+	+	+
KNO ₃		-	-			+	-	+	
NaNO ₃	-	-	-	-	-	+		+	-
L-Lysin hydroclorit	-	+	y	+	+	-	-		-
Etylamin hydroclorit	-	+	y	+	+	-	+		-

Lên men các nguồn đường

Glucosa	+, k	+, k	+, k	+, k	+, k		+, k	-	+, k
Maltoza	-	+	-	y	y		+		-
Lactoza		-	y	-	-	-	-	-	
Galactoza	-	+	-	+, k	+, k		-	-	-
Sucroza	+	-	+, k	-	+		-		+, k
Raffinoza	-	-	-	+	-		+		+
Trehaloza	-	-	-	+	+	-	-		

Phát triển ở các nồng độ glucose khác nhau

10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50%		+		+	+	+	+	+	+
60%	-	+	-	+	+	+	+	y	y

Các đặc điểm khác

37°C		+		+	+	y		+	+
42°C	-	+	-	+					
Sinh axit	+		+			-	-	-	
Phân giải urê	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Phân giải gelatin	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Phân giải lipid	-	-	-	-	-				

+: dương tính, -: âm tính, y: yếu, c: chậm, +/-: thay đổi, k: sinh khí.

3.4. Định loài các chủng nấm men được phân lập
bảng đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa

Từ các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của các chủng nấm men được phân lập ở trên và dựa vào khóa định danh của J. Lodder và N. J. W. Kreger-Van Rij (The yeast, a taxonomic study, Amsterdam), Cletus P. Kutzman và Jack W. Fell (The Yeast, A

Taxonomic, Elsevier) các chủng nấm men đã được định loại (Bảng 2). Kết quả cho thấy rằng 4 chủng gồm H5, H9, L5 và L10 thuộc chi Candida, chủng H7 thuộc chi Sporisorium, chủng L24 thuộc chi Ustilago, chủng L29 thuộc chi Cryptococcus, chủng P2 thuộc chi Sporidiobolus và chủng P5 thuộc chi Williopsis.

Bảng 2. Định loài các chủng nấm men được phân lập

Chủng	Đặc điểm	Định loài
H5	Khuẩn lạc trắng đục; không tạo bào tử nang; tạo khuẩn ty giả; nảy chồi đa hướng; lên men glucosa và sucroza; không đông hóa gốc NO ₃ .	Candida
H7	Khuẩn lạc trắng đục; không tạo bào tử nang; tạo khuẩn ty giả; nảy chồi đa hướng; lên men glucosa, maltoza và galactoza; không đông hóa NO ₃ .	Sporisorium
H9	Khuẩn lạc trắng đục; không tạo bào tử nang; không tạo khuẩn ty giả; nảy chồi đơn hướng; lên men đường glucosa, sucroza và lactoza (yếu); không đông hóa NO ₃ .	Candida
L5	Khuẩn lạc màu trắng đục; không tạo bào tử nang; tạo khuẩn ty giả; nảy chồi đơn hướng; lên men đường glucosa, galactoza, trehaloza và maltoza (yếu); không đông hóa NO ₃ .	Candida
L10	Khuẩn lạc trắng đục; không tạo bào tử nang; tạo khuẩn ty giả; nảy chồi đa hướng; lên	Candida

	men đường glucoza, galactoza, sucroza, galactoza và maltoza (yếu); không đồng hóa NO ₃ ;	
L24	Khuẩn lạc màu nâu; tạo bào tử nang, không tạo khuẩn ty, nảy chồi đơn hướng, không lên men đường, đồng hóa NO ₃ ;	<i>Ustilago</i>
L29	Khuẩn lạc trắng đục; tạo bào tử nang; không tạo khuẩn ty; nảy chồi đơn hướng; lên men đường glucoza, maltoza và raffinosa; không đồng hóa NO ₃ ;	<i>Cryptococcus</i>
P2	Khuẩn lạc màu cam; tế bào sinh dưỡng hình que; tạo bào tử nang; không tạo khuẩn ty; nảy chồi đơn hướng; không lên men đường, đồng hóa NO ₃ ;	<i>Sporidiobolus</i>
P5	Khuẩn lạc trắng đục; không tạo bào tử nang; không tạo khuẩn ty giả; nảy chồi đơn hướng; lên men đường glucoza, sucroza và raffinosa; không đồng hóa NO ₃ ;	<i>Williopsis</i>

3.5. Định loài các chủng nấm men bằng trình tự bảo tồn ITS

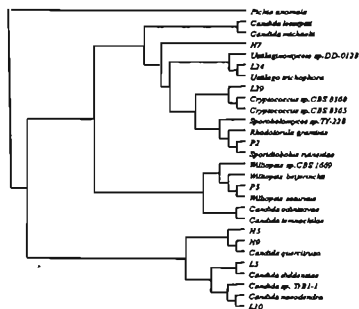
Vùng bảo tồn ITS của các chủng nấm men được nhân bản bằng PCR và sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarosa 0,8% và các sản phẩm PCR này sau đó được tinh sạch và giải trình tự (bảng 3). Trình tự các vùng ITS này được so sánh với trình tự ITS của các chủng được xác định trên ngân hàng dữ liệu. Kết quả so sánh tương đồng (Hình 5) cho thấy chủng H5 và chủng *Candida quercitusa* có mức độ tương đồng 94%. Chủng H7 có mức tương đồng 86% với chi *Ustilago* và *Ustilaginomycete* không cao, do vậy theo hình thái học, sinh lý và sinh hóa có thể xác định rằng chủng H7 thuộc chi *Sporisorium*

cao hơn hai chi trên. Chủng H9 tương đồng 94% với chủng *Candida quercitrusa*. Chủng L5 với chủng *Candida diddensiae* có mức độ tương đồng 89%. Chủng L10 với chủng *Candida naeodendra* có mức độ tương đồng là 91%. Chủng L24 với chủng *Ustilago trichophora* có mức độ tương đồng là 94%. Chủng L29 có quan hệ gần nhất với chủng *Cryptococcus sp. CBS 8368* với mức độ tương đồng là 94%. Chủng P2 với chủng *Sporidiobolus ruineniae* có mức độ tương đồng là 99%. Chủng P5 với chủng *Williopsis saturnus* có mức độ tương đồng là 94%. Kết quả này khẳng định sự phân loài các chủng nấm men được phân lập bằng đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa.

Bảng 3. Trình tự ITS của các chủng nấm men được nhân bản bằng PCR

Chủng	Trình tự ITS được nhân bản bằng PCR
H5	GGCCCCGGGACCGCCAGCAACGAGGGGAAAGCGACCGACCGACCGCCACCCCAAGAAATTCGACGGAAAGAGTGTAAGGCTGTCTGTAACAGGTTTCCGTAGGTGAACCTCGCGGAAGGATCATTATAGTATCTGTGTCCACGCGCTGTGATGCGCGGACTCCTACACATGCTCTATTGTATGAGATAACCTCCGGGTTCTAACTCAAGATTAAATCTTTTATAAACTATGTCAATTGATTATTAACAAATAATTCAAACCTTCAACAACCGATCTCTGTGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCA GCGAATTGCGATAAGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAATTGCGCTCTCTGGTAT TCCGGAGAGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTCTCTCTCAAAGGAACTTTTGTATTGAGTGATACTCTTTGGAGTTA ACTTGAAATAGAGTGCTGGAGCATCGTGTGGATGATCTGTCTGGATAATGATTAGGTTCTACCGACTCAATTATAAAG TAGGGTATTAGTCTGTGCATATGCAAAAAGTGAATTTTCTATAACTGACCTCAATCAGTCGCACCATC
H7	GAGGCATCAACAGGGAGATATTACGCTATTATTCTGCCACGCGCTTAATTGCGCGCGGGGAAATACCTTACACACTG TGTAATTTTGTNNACAAATTTGCTTTGGCTTGGCGCAAGCTGGGCGGAGGACACAAACTTCAAATTTTATTGAAATTG TTTTITTAACGTGTGTCAATTTGTTTGAATTAATCAAAATACTCTCAAAACTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCG CATCGATGAAGAACGCGAGCGAAATGCGATAAGTAAATGAATTGAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA CATTGCGCTCTTGGAAATCCAGGAAGCATGCCTGTTTGAACAACATTTCACTCTCAAAACCCCTGGCTTTGGTATTGAG TAACAACCGATTATTCACCTATTCCGAGAAAGTCTATTATTAACGACAGAAGATGAACGACCAACGAAGCACCC ACCTAAGCCTCAATGAATTACGCCACAACATAACATTGAAACCTAAAGACTAATACACCTCCOCCATCATAAAAACC ACCACCCCCACG
H9	GGGCGACGACGGGAGATTTAATTTGTCGTAANCCAGTTTCCGTAGGTGACCTGCGGAAGGATCATTATAGTATTCCTT GGCCTGCGCTTGATTGCGCGGCTGCTCAACACTTGCTAAGTATTAAAGACTTACTTTGTGCTCGGAAGAGCACAGCA GAACTCAGATTAATTTCTCTACAAACAGCTACGAAGTATTACAATATAATCTTCAAAACTTCAACAACCGGAT CTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCGAGGAAATGCGATACGTAATGTGAATGACGGTTTCGTGAATCATCGA ATCTTTGAACGACATATGCGCCCTCTGGTATTCAGAGGGCATGCTGTTTGAAGCGTACTTTCTCTCACTCTCCGA AGTGCTCTTGAGTGATACTGCTGTGAGTGTAACCTGAAATAGTAGGCTGGGACGGCTGGAAGCTCTCTCTGGAA

	TAATGTAATTAGGTTCTGCCAACTCGTTAGGAAAGAGGAAGCGTGAAAGCTGCGCTCCGGCTCATACTACCCAAAGTTG ACCTCAATCAGTAGATCCCATCGG
L3	CCATACCTTGAGGAAACGATGCAAGATATTTGTCTGTACAACCACTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT CAGTTTAATTTCTGCCAGCGCTTAATTGCGCGCGGGAAATACCTTACACACTGTGTATTTTGTATACAAATTTGC TTTGGCTTGGCGCAAGCTGGGCGGAGGACACAACTTCAAATTTTATTGAATTGTTTTTAACTGTGTCAATTTG TTTGATTAAATTTAAAAATAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCGCGA AATGCGATAAGTAATATGAATTGCGAGATTTTCTGTAATCATCGAATCTTGAACGCGCATTTGCGCCTCTTGGTATTTCCA GGAGGCATGCGCTTTGAGCGCTATTCTCTCAAACTTGGGTTGGTATTGATGATACCTTTAGTCAATAAGGCT TTGCTTGAATGTAGCGCATGGGCGCGCTAGATAGTGCAGCGGATTCATTCAATGTATTAGGTTTATCCAACCTCGTT GAACGGACGGACGTGAATTTCTGCGGTAGGCTTGGCTTACAACAACAAACAGTTGACCTCAATCAGTAGATCCC ATGCC
L10	CCGAGGAAGGAGGGAGATTACGTTATTTTGTCTGTANACCAAGGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACA GTATTACTTTCTGCCAGCGCTTAACCTGCGCGGTGGGAAATACCTTACACACTGTGTATTTTGTATTACAAGAACCA TTGCTTTGGCTTGGCGCAAGCTGGGCGAGAGGAACACATAAACTTCAATTTATTGAATTGTTATTTTAAACGGTTGTCA ATTTGTTTGATTAATTTCAAATTAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCA GCGAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCGAGATTTTCTGTGAATCATCGAATCTTGAACGCGCATTTGCGCCCTTGGTA TTCCAGGGGGCATGCTGTTTGAAGCGTCATTTCTCTCAAAACCGCAAGGTTTGGTATTGAGTGATACCTTTAGTCGGA CTAGGCGTTTGTGTAAGGATGAGCGCATGAGCGCGCTGGATAGTGCGAGCTGATTATTTCAATGTATTAGGTTATCC AACTCGTTGAACGGTCGGAGCTAAATTTCTGGCGGTAGGCTTGGCTTACAACAACAAACAGTTACCTCAATCAGTG GTACCATCC
L24	GCAATAAATGTTTAAAGATGTTTTTGTAGTGATAGGGGAAGGGTATGCGAAGAGAAAGGAGGACAGAGAACCAGCAG GCAAAAAAATATGCTGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGAGATGGATCATTTTCGATGAAAACCTTTTTTCTGA GGTGTGGCTCGCATGCTGCTCAAACTTGAAGCTGAGCTACCTTTTCAACACGGTTGCACTGCGGCTGTCAACAGC GCGCGCAATGCTGCTGCTGGGCGCAGGATGCGGACTTTACACAACACTTTTGAATCTAGGATTTGAAGGAAAAA AGTTTCTATTTTTCGATGAAAAACCGACTGGTAATGCGGTGCTCTAAATCTAAAAACACTTTTGGCAACGGATCTCTT GGTCTCCCATCGATGAAGAACGCGAGCGAATGCGGATAAGTAATGTGAATGCGAAGTGAATCATCGAATCTTTGAA CGCACCTTGGCTCCCGGACAGATCTAATCTGGGGAGCATGCTGTTTGGGCGCGCAATTTGTTTGAACGTCGCTT TTTTTACGAAAAAGGAGACGATCGGTAGTGAGGGGTTTTGCCATTACCGCGCTCCCTCGAAATGCATTAGCGCA TCCATTTGATAGGCAAAAGACGGACGAAGGCTGCGCTTTTCCGCCCTTTCTCCCTGCGGGTTTTGATAATATCAGGACT TCGGAGACGAAGAAAGGGTC
L29	TTGTCGTAAACAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGATTGGCTAACGCGCCTTTCATTAATCCC AAACCTCTGTGAACCGTTGACCTCCGGGTCTATACAACATTAGTGTAATGAACGCTCTTTGATTTTAAACAAAAAAA ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCGAGGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCGA ATTGAGTAATCATCGAATCTTTGAACGCACTTGGCTTGGTATTCCGAAAGGCAATGCGCTTTTGAAGTGCATGA AATCTCAACCCCTCCAGGTTTCTGATCTGGGGTGGCTTGGACTTGGACGTGTGCCAGCCAAATGGCTGCTCAAAAG GATTAGTGGAAATCTCGACATCCACGGCAGACGTAATAAGTTTCTGCTCGCCTCTTGTGATAGGCTGCTCACAACCTGC CATCGCGACCTTTATGACTCTACCCAAATCAGTAGNTECCATCC
P2	CATAGCGGAGGGGNCAGTGGAGATTAATCTGATATTTGTCTGTAACCAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGG ATCATTAGTGAATAATAGGACGTTCCATTTAACTGGAAGTCCGAACCTCTACTTTCAACCTGTGATTTGTTTGGC TAGTAGGATGCTTGGCTCCGAACACCTCTTCAATTTACAACAACAAAGTCTATGAATGTTTAAATTTTAAACAAAAA AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCGAGGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCGA ATTGAGTAATCATCGAATCTTTGAACGCACTTGGCACTCTTGGTATTCGAGGAGATAGCTGTTTGAAGTGCATGA ATTCTTCAACCCCTCTCTTTTCTAGTGATTAGAGAGGAGCTTGGATTTCTGATGTTGCTCTTACCCGAGCTCATTCGTA ATCATTAGCATCATTAATCGCACTTTGCGGATGAGCTTGAAGTAAATAGACTATTGCTGAGGAATCTAACTTCCGTTAG AGCCGGGTTGAACATAGGAAGCTCCTAATCTAGCTTAGTCTACTTTTAGATTAGATCTCAATCAGGTAGATACCGGATC CC
P5	GGGGCATCTATGCGGAGAAATATTTTGTCTGAACCAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATAGTATTC TATTGCCAGCGCTTAATTGCGCGCGGATAAACCTTACACACTATGTTTATTTTCTTGGATTTTGTCTTGGGTGGTTT AGACTACGCCCCAAGGTTTTTAAACAAAAAGTTATCTTTTTTTTAAACTATAGTCAAGAAGTATTATTAACATCTTC



4. KẾT LUẬN

Theo phương pháp này, kết quả định loài nấm men trong nghiên cứu này cho thấy chủng H5, H9, L5, L10 cùng thuộc chi *Candida*, chủng H7 thuộc chi *Sporisorium*, chủng L24 thuộc chi *Ustilago*, chủng L29 thuộc chi *Cryptococcus*, chủng P2 thuộc chi *Sporidiobolus*, chủng P5 thuộc chi *Williopsis*. Kết quả xác định trình tự vùng bảo tồn ITS ngoài việc khẳng định kết quả định loài nêu trên, nó còn giúp xác định quan hệ gần với các chủng nấm men đã được xác định trên ngân hàng dữ liệu. Theo đó, mức độ tương đồng giữa H5 và *Candida quercitrusa* là 94%, giữa H9 và *Candida quercitrusa* là 94%, giữa L5 và *Candida diddensiae* là 89%, giữa L10 và *Candida naeodendra* là 91%, giữa L24 và *Ustilago trichophora* là 94%, giữa L29 và *Cryptococcus Sp.CBS 8368* là 94%, giữa P2 và *Sporidiobolus ruineniae* 99%, và giữa P5 và *Williopsis saturnus* là 94%.

Nghiên cứu này đã định loại được ở cấp độ chủng các chủng nấm men được phân lập tại Vườn Quốc gia Nam Cát Tiên. Tuy nhiên, cần phải so sánh các chủng trên với các chủng được phân lập tại các vùng lân cận nhằm hiểu được sự phân bố và vai trò của chúng trong tự nhiên. Ngoài ra, tính chất sinh

học bao gồm cả sinh học phân tử của chúng cũng cần được nghiên cứu thêm nhằm xác định cụ thể chủng đặc hữu Việt Nam và từng bước có những ứng dụng cụ thể. Ví dụ, chủng L24 và P2 tạo khuẩn lạc có sắc tố nên chúng có thể được ứng dụng để chiết tách màu sinh học hoặc chủng P5 gắn gũi với chủng *Williopsis saturnus* nên chúng có khả năng kiểm soát nấm men và nấm mốc gây hư hỏng sữa chua (Shao Quan Liu et al., 2010). Cuối cùng, nghiên cứu này đóng góp các chủng nấm men mới vào kho nấm men làm phong phú sự đa dạng sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barnett J. A., Payne R. W. and Yarrow D. (2000). *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3rd Ed. Cambridge University Press, Cambridge.
2. Fell J. W., Boekhout T., Fonseca A., Scorzetti G. and Statzell-Tallman A. (2000). *Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50, 1351-1371.
3. H. W. Mewes, K. Albermann, M. Bähr, D. Frishman, A. Gleissner, J. Hani, K. Heumann, K. Kleine, A. Maierl, S. G. Oliver, F. Pfeiffer & A. Zollner (1997). *Overview of the yeast genome*. Nature. Vol. 387.
4. J. Lodder and N. J. W. Kreger-Van Rij, 1952. *The yeast, a taxonomic study*. Amsterdam. North-Holland Pub.; New York: Interscience, 1952. 713 pp.
5. José Manuel Guillaumon, Josepa Sabaté, Eladio Barrio, Josep Cano, A. Querol (1998). *Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region*. Archives of Microbiology. Vol. 169, pp 387-392.
6. Kurtzman C. P. & Fell, J. W. (1998). *Summary of species characteristics*. In: Kurtzman C. P. & Fell J. W. (eds). *The Yeasts, A Taxonomic Study*, Elsevier, Amsterdam.
7. Kurtzman C. P. & Robnett C. J. (1991). *Phylogenetic relationships among species of Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Debaryomyces and Schwanniomyces determined*

from partial ribosomal RNA sequences. Yeast 7: 61-72.

8. Roger Schneiter (2004). *Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast*. Université De FriBourg Suisse.

9. Rosa De L. F., Teresa M. F. E. and Querol A. (2004). *Identification of species of the genus Candida by analysis of the 5.8S rDNA gene and the two ribosomal transcribed spacers*. Antonie Van Leeuwenhoek, 85, 175-185.

10. Sasitorn Jindamorakot, Somjit Am-in, Tran Thanh Thuy, Ngo Duc Duy, Hiroko Kawasaki, Wanchern Potacharoen, Savitree Limtong, Morakot Tanticharoen, and Takashi Nakase (2004). *Candida easanensis sp. nov., Candida pattaniensis sp. nov. and Candida nakhonratchasimensis sp. nov., three new species of yeast isolated from insect frass in Thailand*. J. Gene. Appl. Microbiol., 50: 261-269.

11. Shao Quan Liu, Marlene Tsao (2010). *Biocontrol of spoilage yeasts and moulds by Williopsis*

saturnus var. saturnus in yoghurt. Nutrition & Food Science. Vol. 40 Iss: 2, pp.166 – 175.

12. Tống Kim Thuận, Trần Thanh Thủy, Phạm Công Hoạt (2006). *Phân loại đến loài chủng nấm men NT5 có khả năng tổng hợp carotenoid astaxanthin*. Tạp chí Công nghệ Sinh học 4 (4): 481-488.

13. Trần Thanh Thủy, Tống Kim Thuận (2003). *Phân loại 2 chủng nấm men sinh mảng nhầy Lipomyces PT2.3 và PT7.1 phân lập từ đất trồng đối trọc tỉnh Phú Thọ*. Tạp chí Công nghệ Sinh học 1 (4): 477-486.

14. Trần Thanh Thủy, Tống Kim Thuận (2005). *Phân loại chủng nấm men biến TS1 sinh lipid, phân lập từ nước biển đảo Trường Sa*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ 43 (4): 15-21.

15. Yarrow D. (1998). *Methods for the identification of yeasts*. In the yeast. A taxonomic study. 4th Ed. Edited by Kurtzman C. P., Fell J. W., Elsevier Science B. V., Amsterdam. 77-100, 248-253.

IDENTIFICATION OF YEASTS ISOLATED FROM NAM CAT TIEN NATIONAL PARK BY MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS AND ITS SEQUENCE

Ngo Duc Duy¹, Nguyen Huu Hung^{1,2}, Nguyen Quang Thach^{2,3}, Hoang Quoc Khanh¹

(1) Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy Sciences and Technology

(2) Nguyen Tat Thanh University, (3) Hanoi University of Agriculture

Summary

This study isolated and identified the yeast strains collected from flowers, leaves and insect frass in Nam Cat Tien National Park based on morphological, physiological and biochemical characteristics and conserved sequence of Internal Transcribed Spacer (ITS) gene region. Three strains (H5, H7 and H9) from flower, four strains (L5, L10, L24 and L29) from leaf and two strains (P2 and P5) from insect frass were isolated. Morphological, physiological and biochemical data showed that the H5, H9, L5 and L10 belong to *Candida* genus, H7 strain belongs to *Sporisorium* genus, L24 belongs to *Ustilago* genus, L29 strain belongs to *Cryptococcus* genus, P2 strain belongs to *Sporidiobolus* genus and P5 strain belongs to *Williopsis*. Sequencing of ITS gene region of these isolated strains showed that similarity between H5 and *Candida quercitrusa* is 94%, H9 and *Candida quercitrusa* is 94%, L5 and *Candida diddensiae* is 89%, L10 and *Candida naeodendra* is 91%, L24 and *Ustilago trichophora* is 94%, L29 and *Cryptococcus sp. CBS 8368* is 94%, P2 and *Sporidiobolus ruineniae* is 99%, and P5 with *Williopsis saturnus* là 94%.

Keywords: D1/D2, gene 26S rDNA, gene ITS, Phylogenetic tree and yeast.

Người phản biện: PGS.TS. Phạm Xuân Hội

Ngày nhận bài: 9/6/2013

Ngày thông qua phản biện: 15/7/2013

Ngày duyệt đăng: 24/8/2013