

BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG HỆ TRÌNH TỰ LẶP LẠI ĐƠN GIẢN (SSRs) TRONG NGHIÊN CỨU QUAN HỆ DI TRUYỀN GIỮA CÁC CHỦNG NẤM MỐC *Aspergillus* spp.

Nguyễn Khắc Hải, Đỗ Hải Quỳnh, Bùi Thị Thanh, Nguyễn Văn Thương,
Nguyễn Ngọc Hòa, Nguyễn Ngọc Chinh, Đặng Xuân Nghiêm*

Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

Email: dxnghiem@hua.edu.vn*

Ngày gửi bài: 01.10.2012

Ngày chấp nhận: 12.12.2012

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm hiểu thành phần và mức độ đa hình của hệ trình tự lặp lại đơn giản (SSRs) ở *Aspergillus oryzae* để làm cơ sở cho việc ứng dụng chúng như những chỉ thị phân tử trong nghiên cứu quan hệ di truyền và kiểm định các chủng hoặc loài nấm mốc thuộc chi *Aspergillus*. Kết quả nghiên cứu bằng phần mềm tin sinh học đã cho thấy bộ gene nhân của *Aspergillus oryzae* chứa 841 trình tự SSR. Mật độ các trình tự SSR trên 8 nhiễm sắc thể dao động trong khoảng từ 16 đến 26 SSR/Mb. Các trình tự SSR có mức độ bảo thủ hoàn hảo (100%) chiếm 44,6% trong tổng số 841 trình tự SSR có mức độ bảo thủ trên 70%. Việc nhân dòng thành công tất cả 17 locus SSR và iSSR (inter-simple sequence repeat) đã chỉ ra mức độ đa hình của chúng khá cao với khoảng 4,88 allele trên mỗi locus và chỉ số PIC trung bình đạt 0,6. Đặc biệt, đa số các locus SSR đã được nhân dòng có số lượng và kích thước allele đặc trưng cho từng nhóm nấm mốc trong nghiên cứu. Kết quả này mở ra khả năng ứng dụng hệ trình tự SSR trong nghiên cứu quan hệ di truyền và kiểm định việc nhiễm những nấm mốc này trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi.

Từ khóa: *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus* spp., chỉ thị phân tử, nấm mốc, SSRs.

Preliminary Evaluation of Potential Use of Simple Sequence Repeats (SSRs) in Studying Genetic Relationships among Isolates of *Aspergillus* spp.

ABSTRACT

This study is aimed at exploring simple sequence repeats (SSRs) arrays and their polymorphism in *Aspergillus oryzae*, laying the foundations for the application of those sequences as molecular markers in investigation of genetic relationships among *Aspergillus* spp. isolates and in identification of a certain *Aspergillus* spp. strain. *In silico* data reveals that there is a total of 841 SSRs in the nuclear genome of *Aspergillus oryzae*. The density of those SSRs on 8 chromosomes ranges from 16 to 26 SSRs per Mb. The perfect SSRs sequences with 100% conserved repeats are in the majority, accounting for 44,6% of all 841 with the conservation bigger than 70%. The successful amplification of 17 SSR and iSSR loci revealed a high average number of alleles of 4,88 and a high genetic diversity with the average PIC value of 0,6 for each locus. Especially, there are specific patterns of allele number and length for each groups of the investigated moulds. This results confirmed a high potential application of those SSR loci for detecting the presence of those moulds in human food and animal feed.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus* spp., molecular markers, moulds, SSRs.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi nấm mốc *Aspergillus* là một chi nấm ưa khí cao gồm khoảng 200 loài, phân bố rộng rãi trong tự nhiên, sinh sản vô tính bằng bào tử. Đây là một trong những chi nấm có vai trò quan trọng

nhất trong sinh thái tự nhiên cũng như đối với đời sống con người (Bennett, 2010). Nhiều loài có vai trò quan trọng trong các ngành công nghiệp, đặc biệt là công nghiệp thực phẩm cũng như trong công nghệ sinh học. Trong đó, *A. oryzae* là loài hữu ích nhất đối với đời sống con người, đặc

biệt trong các ngành công nghiệp sản xuất đồ uống, sản xuất một số loại enzyme thương mại (Kobayashi & cs., 2007; Machida & cs., 2008). Ngoài ra, *A. niger* cũng được ứng dụng nhiều trong việc sản xuất acid citric, chiếm 70% sản lượng acid citric trên toàn thế giới (Pagagianni, 2007), cũng như sản xuất một số loại enzyme hữu ích khác. Tuy nhiên, chi nấm này cũng có nhiều loài là tác nhân gây bệnh cho con người và động vật, hay thường làm hư hỏng thức ăn, hoặc tiết ra các độc tố nguy hiểm đối với sức khỏe con người (Samson và Varga, 2009). Ví dụ như *A. fumigatus* gây nên một loạt các hội chứng Aspergillosis; và *A. flavus* có thể tiết aflatoxin, một chất có khả năng gây ung thư, ức chế hệ miễn dịch (Williams & cs., 2004). Việc phân loại các loài thuộc chi *Aspergillus* theo phương pháp truyền thống được dựa trên các đặc điểm về hình thái và hóa sinh. Công việc phân biệt những loài có mối quan hệ gần gũi khá khó khăn và tốn thời gian, đặc biệt khi phải phân biệt giữa *A. oryzae* và *A. flavus*, 2 loài có các đặc điểm về hình thái rất giống nhau (Raper và Fennell, 1965; Payne & cs., 2006). Do đó, các nhà khoa học cần có các phương pháp khác nữa nhằm phân loại một cách nhanh chóng và chính xác các loài thuộc chi này.

Gần đây, các kỹ thuật phân tử đã được sử dụng để phân biệt các chủng *Aspergillus* spp. như phân tích trình tự các gene mã hóa 18S rRNA; 5,8S rRNA hoặc các trình tự ITS (Inter-Transcribed Spacer). Chúng là những công cụ hữu ích trong việc hỗ trợ các phương pháp phân loại các loài *Aspergillus* spp. khác nhau (Samson & cs., 2006; Varga, 2006). Tuy vậy, các trình tự lặp lại đơn giản (simple sequence repeat: SSR) lại ít được sử dụng ở Việt Nam và trên thế giới như một chỉ thị DNA để lập bản đồ di truyền cũng như phân biệt giữa các chủng vi sinh vật thuộc chi này. Điều này một phần là do việc xác định các chỉ thị SSR tiềm năng theo phương pháp truyền thống mất nhiều công sức. Thực tế này có thể sẽ thay đổi khi gần đây bộ gene hoàn chỉnh của vài loài trong chi *Aspergillus* đã được giải mã (Galagan & cs., 2005; Machida & cs., 2005). Điều này làm cho việc xác định các locus SSRs dễ dàng hơn rất nhiều. Trên cơ sở các tiền đề kể trên, nghiên cứu

này được tiến hành nhằm bước đầu đánh giá khả năng sử dụng các chỉ thị SSRs trong việc nghiên cứu nhanh quan hệ di truyền giữa các chủng nấm mốc *Aspergillus* spp.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Tìm kiếm các trình tự SSR nằm trong bộ gene

Trình tự bộ gene đầy đủ của loài *A. oryzae* được tải về từ ngân hàng gen ở cả 2 định dạng Genbank và Fasta. Trong đó, định dạng thứ hai được sử dụng như nguồn dữ liệu để tìm kiếm các trình tự SSRs. Các trình tự SSR được tìm kiếm bằng phần mềm Tandem Repeat Finder của Benson (1999), do đại học Boston cung cấp trực tuyến. Các thông số cho điểm của một trình tự SSR khi mỗi nucleotide (nu) giống, khác, hay thừa thiếu (match, mismatch hay indel) với trình tự lặp bảo thủ lần lượt là 2, 7, 7 được sử dụng trong nghiên cứu này (Tomimura & cs., 2009). Tất cả các trình tự lặp từ 1 - 6 với số điểm tối thiểu là 50 cùng với vùng trình tự chặn 2 đầu của chúng được thống kê.

2.2. Thiết kế môi

Trình tự môi được thiết kế trong vùng trình tự chặn 2 đầu của mỗi locus SSR, sử dụng phần mềm Primer 3 được cung cấp trực tuyến bởi đại học California, San Diego. Chiều dài của môi được thiết kế trong khoảng 18 - 25nu và các vùng trình tự được thiết kế sao cho không xuất hiện cấu trúc bậc 2 cũng như các chuỗi lặp đơn. Đồng thời, môi được thiết kế sao cho tỉ lệ GC nằm trong khoảng 40 - 60% và Tm khoảng 55°C. Bên cạnh đó, môi cho các chỉ thị ISSR cũng được thiết kế theo cách tương tự.

2.3. Phân lập các chủng *Aspergillus* spp.

Các chủng nấm được phân lập từ nhiều mẫu tại các địa phương khác nhau như mốc tương, men rượu truyền thống, các loại hạt mốc, thực phẩm bị nhiễm mốc, v.v. Các chủng nấm mốc được phân lập bằng cách cấy trải trên môi trường PDA đặc theo phương pháp Koch (Êgôrôv, 1983), được cấy chuyển nhiều lần để làm thuần. Sau đó chúng được quan sát các đặc điểm đại thể và vi thể để sơ bộ xác định chi, loài.

Bước đầu đánh giá khả năng ứng dụng hệ trình tự lặp lại đơn giản (SSRs) trong nghiên cứu quan hệ di truyền giữa các chủng nấm mốc *Aspergillus* spp.

2.4. Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số nấm mốc được tách chiết dựa trên phương pháp tách chiết bằng kiềm (alkaline extraction). 100mg sợi nấm đã được rửa sạch, thu từ môi trường nuôi lỏng, được trộn kỹ với 600µl đệm TENS (10mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA; 1N NaOH và 0,5% SDS) trong ống Eppendorf 1,5ml và ủ ở 55°C trong 15 phút. Sau khi ủ, đá thủy tinh được thêm vào để phá vỡ thành tế bào nấm bằng cách vortex bốn lần một phút với thời gian nghỉ 1 phút trong đá lạnh giữa các lần. Đá thủy tinh được loại bỏ bằng ly tâm. Sau đó, chloroform được thêm vào dịch phá tế bào ở trên với tỉ lệ 1:1, để ở nhiệt độ phòng 5 phút. Hỗn hợp trên được ly tâm 12500 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, dịch nổi được hút vào ống Eppendorf 1,5 ml mới. Tiếp theo, iso - propanol lạnh được thêm vào với tỷ lệ 1: 1, ly tâm với tốc độ 15000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C, và loại bỏ dịch nổi. Sau đó, kết tủa DNA được rửa 2 - 3 lần bằng 500µl ethanol 70% trước khi được hòa trong 50µl đệm TE. Chất lượng DNA được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% (Sambrook và Russell, 2011).

2.5. Quy trình PCR kiểm tra sự đa hình ở các locus SSR

2.5.1. Quy trình PCR

Quy trình PCR được thực hiện với tổng thể tích 25µl chứa 1µl DNA khuôn; 2,5µl đệm PCR 10x (100 mM Tris-HCl pH 8; 500 mM KCl; 25 mM MgCl₂); 0,5µl môi; 1 U Taq polymerase, và chu trình nhiệt: 95°C trong 5 phút (1), 94°C trong 30 giây (2), 52 - 56°C trong 1 phút 30 giây (3), 72°C trong 1 phút 30 giây (4) và 35 chu kỳ lặp lại từ (2) đến (4); (5) 72°C trong 5 phút và sau đó giữ lạnh ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2,5%.

2.5.2. Phát triển quy trình multiplex PCR

Căn cứ vào kết quả nhân dòng SSR bằng các cặp môi nghiên cứu, phương pháp multiplex PCR được phát triển nhằm phân biệt *A. flavus* với *A. oryzae*. Các cặp môi tham gia phản ứng multiplex PCR được chọn dựa trên điều kiện chung về nhiệt độ gắn môi; kích thước sản phẩm

nhân lên khác nhau giữa các môi. Thành phần và chu trình multiplex PCR được thiết lập tương tự như phản ứng PCR ngoại trừ việc dùng nhiều cặp môi trong cùng một phản ứng.

2.6. Phân tích kết quả

Dựa trên kết quả điện di sản phẩm PCR, các băng trên gel được xác định và quy ước (0) không có băng và (1) có băng. Hệ số tương đồng di truyền Jaccard trong NTSYSpc phiên bản 2.1 được sử dụng để phân tích đánh giá mối liên hệ về mặt di truyền giữa các chủng nấm mốc (Rohlf, 1988). Các băng sản phẩm PCR được dùng để phân tích độ tương đồng và vẽ sơ đồ hình cây về mức độ tương đồng di truyền.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

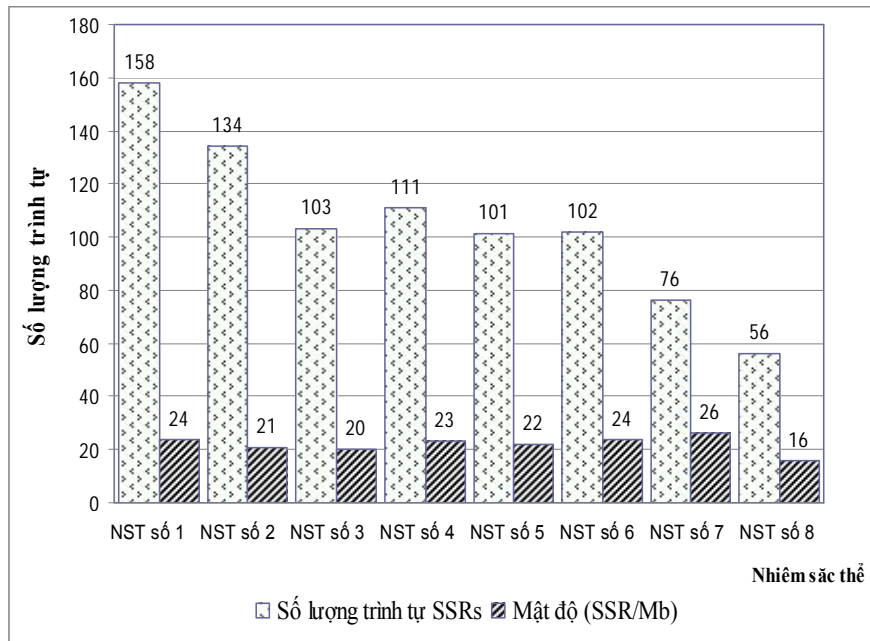
3.1. Xác định các trình tự SSR

Các đoạn trình tự SSRs có chiều dài tối thiểu 25nu được lựa chọn khảo sát dựa trên các thông số đầu vào ở mục 2.1. Kết quả tìm kiếm trình tự SSRs trên bộ gene của chủng *A. oryzae* RIB40 bằng phần mềm tin sinh cho thấy có tổng cộng 841 trình tự SSRs phân bố trên 8 nhiễm sắc thể (NST) và một trình tự SSR nằm trong DNA ty thể. Số lượng trình tự SSR của nấm mốc thấp hơn so với một số loài thực vật như lúa *Oryza sativa* (298819 locus SSR), *Arabidopsis thaliana* (104102 locus SSR) (Lawson và Zhang, 2006), *Cucumis sativus* (112073 locus SSR) (Cavagnaro & cs., 2010), tuy nhiên cao hơn nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (408 locus SSR) (Đặng Xuân Nghiêm & cs., 2012, số liệu chưa công bố). Mật độ SSR phân bố trên toàn bộ bộ gene nằm là khoảng 22 SSR/Mb. Số lượng trình tự SSR trên từng NST được trình bày ở hình 1. Kết quả cho thấy mật độ SSRs cao nhất ở NST số 1, 6, 7 tương ứng với mật độ là 24, 24, 26 SSR/Mb và thấp nhất ở NST số 8 với mật độ 16 SSR/Mb. So sánh mức độ tương quan giữa số lượng trình tự SSR và số lượng gene ước tính trên từng NST cho thấy có mức độ tương quan chặt giữa số lượng SSRs với số lượng gene trên từng NST với hệ số tương quan là 0,91. Kết quả trên cũng phù hợp với những quan sát về mức độ tương quan giữa số lượng SSRs và số lượng

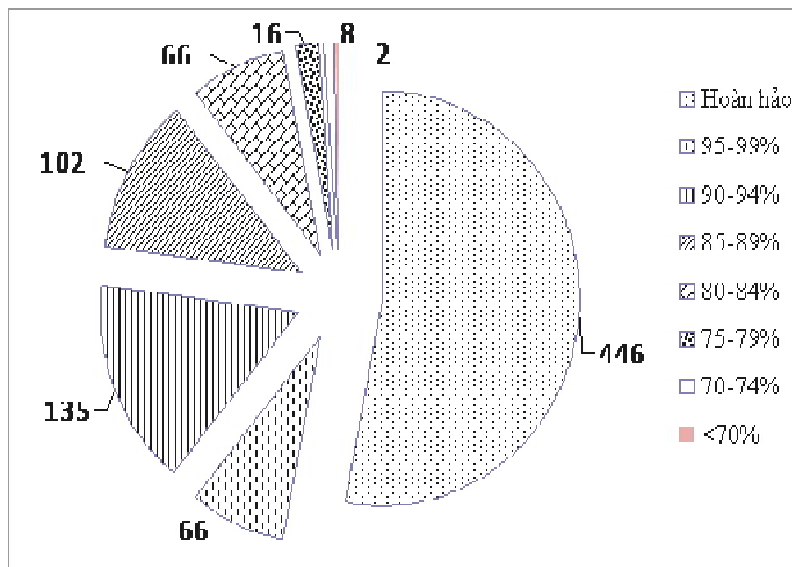
gene đã được công bố trước đây ở trên lúa (McCouch & cs., 2002) cũng như ở nhiều loài khác (Cardle & cs., 2000; Toth & cs., 2000).

Việc tiến hành phân loại SSR theo mức độ hoàn hảo của trình tự lặp (Gallego & cs., 2005) cho thấy các trình tự lặp hoàn hảo chiếm số lượng lớn với 446 trình tự (53,03%). Tiếp theo là

các trình tự có mức độ bảo thủ từ 90 - 94% và 85-89% với số trình tự lần lượt là 135 (16,05%) và 102 (12,13%). Các trình tự có mức độ bảo thủ nhỏ hơn 80% với các mức 75 - 79%, 70 - 74% và < 70% chiếm số lượng rất ít, lần lượt là 16 (1,9%), 8 (0,95%) và 2 (0,23%) trình tự. Các nghiên cứu về hệ thống SSR ở nhiều loài đã khảo sát các



Hình 1. Số lượng và mật độ SSR trên từng nhiễm sắc thể



Hình 2. Số lượng các locus SSR phân chia theo mức độ bảo thủ

Bước đầu đánh giá khả năng ứng dụng hệ trình tự lặp lại đơn giản (SSRs) trong nghiên cứu quan hệ di truyền giữa các chủng nấm mốc *Aspergillus* spp.

trình tự có mức độ bảo thủ cao trong locus SSR như trên lúa (McCouch & cs., 2002), dưa chuột (Cavagnaro & cs., 2010), *Saccharomyces cerevisiae* (Perez & cs., 2001; Galloego & cs., 2005). Việc phân biệt các trình tự lặp minisatellite và microsatellite dựa trên mức độ bảo thủ của chúng đã được thực hiện ở trên người (Naslund & cs., 2005) cũng như một số loài thực vật (Morgante & cs., 2002); tuy nhiên, đây là nghiên cứu đầu tiên phân biệt rõ mức độ bảo thủ của từng locus SSR trong bộ gene ở nấm

A. oryzae. Kết quả thống kê này được quan tâm do có mối tương quan giữa mức độ bảo thủ của trình tự SSR với tiềm năng đa hình của locus trên nhiều loài (McCouch & cs., 2002; Morgante & cs., 2002).

3.2. Kết quả thiết kế môi

17 locus SSR được chọn ra để khảo sát sự đa hình. Một số nhà khoa học cho rằng, tiềm năng đa hình của các locus SSR phụ thuộc vào cả mức độ hoàn hảo của trình tự cũng như

Bảng 1. Vị trí, trình tự và đặc điểm các cặp môi được khảo sát

TT	ID	Trình tự môi	Kích thước (bp)	Trình tự lặp/ mức độ bảo thủ	Nhiệt độ gắn môi (°C)	Trích dẫn/ ghi chú
1	AOI.3.21	F: TCAACGGACGTTAAGTTGTGTC R: CAGGTCACGGAATACGACTAAG	246	(AC) _{53,5} /94%	54	
2	Aol-i1	F: GAGAATAAGCCTCTTTCTTTCTCTTT R: AGAAAGAAAAAGAAGAAGAAGAAGA	327		53	Inter-sequence
3	AOII.2.6	F: AGAACTCCGGCCTGCTTTTA R: GCAGGAAAGAATGGAAAAGAGA	323	(AC) _{105,5} /99%	52	
4	AOII.1.57	F: TAGCGGCTCATCCTATTCTCTC R: TCAGCTCAACGTAGTTGCGTAT	242	(TG) ₄₅ /100%	54	
5	AOII.1.18	F: GCCGATTATTAATGCCATTGG R: AGACCACCGATGATGGAAAA	215	(CTT) ₂₉ /100%	53	Tomimura & cs., 2009
6	AOIII.1.29	F: CCCATCACTTGACTTCTAACG R: TAATGTTTACGGCGGAGGAT	197	(GA) ₂₂ (GT) ₁₄ /100%	52	
7	AOIII.1.25	F: GAGGTCTTCATGCCATGTTT R: GGCTTGCAAGTCTAATCTGCA	232	(AAG) _{41,7} /100%	53	Tomimura & cs., 2009
8	AOIV.1.8	F: ATCGAGGGGACGAAGGATA R: TCGACCAACCCTGTTTCATC	250	(GT) _{36,5} /100%	52	
9	AoIV-i1	F: TCATTTCTTCCTCTCTCTCTCTC R: GCTTGTTTTGTCTTCTTCTTCTTCTC	627		56	Inter-sequence
10	AOIV.1.46	F: GTTTCGAATGTCCCCTTGAT R: ACTGGTCATGAATCCAGCTGA	270	(AAGAAC) _{19,7} /100%	53	Tomimura & cs., 2009
11	AOV.1.36	F: AGTTTCTCGATCCATGTTGAGG R: CTGGAGCACCCAGGAAATT	221	(AAT) _{46,3} /100%	55	
12	AOV.2.5	F: ATTGGCCGAGGACAAGACTT R: AATGATTCGACCCTACAGATCTGG	169	(AG) ₂₅ /96%	53	
13	AOVI.1.20	F: TTATGTTTCCCTCAATTGGAA R: GTGAGTTACTCTTGAGGAGTAGA	224	(TTC) _{30,7} /100%	55	
14	AOVII.3.6	F: GCAATCTAATACTATTTAAAGCTAT R: ATAGATCTAATCTTCTAAAAGTCTAGTA	327	(ATA) ₆₂ /91%	55	
15	AOVII.2.2	F: TTTTCTCTCCTCCGCTGAACA R: CCTGAATCTGGATCTTCAGCA	383	(AAAG) _{47,8} /98%	53	
16	AOVIII.1.15	F: AGATACTACTATACTAACTTTAGGCAC R: GTCGTGGCCTAGTAGAGTC	406	(ACC) ₈ (ACT) ₈₇ /100%	53	
17	AOVIII.1.2	F: GATCTTAGGGTTTGTACTATTAAT R: GCTGTCTATCGTAGTATATTATCG	209	(TAC) _{34,7} /100%	49	

độ dài của chúng (Kashi và King, 2006; McCouch & cs., 2002; Morgante & cs., 2002). Nhằm khảo sát mối tương quan giữa mức độ hoàn hảo của trình tự lặp và mức độ đa hình của các locus SSR ở chi nấm *Aspergillus*, trên mỗi nhiễm sắc thể (NST) của nấm *A. oryzae*, từ 2 - 3 locus với mức độ hoàn hảo từ 90-100% và có độ dài đoạn lặp lớn được lựa chọn để nhân dòng. Các mẫu được thiết kế theo thông số đã được trình bày ở mục 2.2 (Bảng 1).

Trong tổng số 17 locus được khảo sát, 3 locus được tham khảo theo nghiên cứu của Tomimura & cs. (2009); 2 locus là trình tự nằm giữa hai locus

SSR gần nhau (iSSR). Đồng thời, để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo về hệ SSR ở *A. oryzae*, các locus SSR được đặt tên một cách có hệ thống theo phân bố trong bộ gene của loài này (số liệu chưa công bố), trong đó “Ao” là kí hiệu viết tắt của loài *A. oryzae*, chữ số la mã chỉ tên NST, số tiếp theo chỉ mức độ bảo thủ của locus SSR (1) trình tự lặp hoàn hảo (bảo thủ 100%), (2) trình tự lặp có mức độ bảo thủ từ 95-99%, (3) trình tự lặp có mức độ bảo thủ từ 90-94%..., số cuối cùng chỉ thứ tự của locus SSR trên NST đó.

3.3. Phân lập và sơ bộ định danh các chủng vi nấm

Bảng 2. Danh sách các chủng nấm mốc dùng trong nghiên cứu

TT	Ký hiệu	Mẫu	Địa điểm	Sơ bộ định danh đến chi hoặc section	Sơ bộ định danh đến loài
1	M40.1	Mốc đậu tương	Gia Lâm - Hà Nội	<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus</i> spp.
2	M31	Mốc bánh mì	Đống Đa - Hà Nội	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> spp.
3	M36.2	Mốc củ lạc	Ngọc Lặc - Thanh Hóa	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. oryzae</i>
4	M43.1	Mốc phân lập labo	ĐH Nông nghiệp Hà Nội	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. oryzae</i>
5	M48.2	Mốc bánh mì	Đức	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. oryzae</i>
6	M54.1	Mốc bánh mì	Ngọc Lặc - Thanh Hóa	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. oryzae</i>
7	M57.2	Mốc tương	Mỹ Đức - Hà Nội	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. oryzae</i>
8	M58	Mốc tương	Mỹ Đức - Hà Nội	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. oryzae</i>
9	M60	Mốc cơm	Gia Lâm - Hà Nội	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. oryzae</i>
10	M62	Mốc hạt lúa	Văn Giang - Hưng Yên	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. oryzae</i>
11	M16	Mốc tương	Hưng Yên	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. oryzae</i>
12	040 A.O		IMBT- VNUH	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. oryzae</i>
13	M34	Mốc đậu xanh	Bắc Giang	<i>Aspergillus</i> section Nigri	<i>A. niger</i>
14	M48.1	Bánh mì	Đức	<i>Aspergillus</i> section Nigri	<i>A. niger</i>
15	M49.3	Bã cà phê	Đống Đa - Hà Nội	<i>Aspergillus</i> section Nigri	<i>A. niger</i>
16	M55	Mốc măng khô	Ngọc Lặc - Thanh Hóa	<i>Aspergillus</i> section Nigri	<i>A. niger</i>
17	M57.1	Mốc tương	Mỹ Đức - Hà Nội	<i>Aspergillus</i> section Nigri	<i>A. niger</i>
18	M59	Mốc gạo	Gia Lâm - Hà Nội	<i>Aspergillus</i> section Nigri	<i>A. niger</i>
19	M61	Mốc hạt lúa	Văn Giang - Hưng Yên	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. flavus</i>
20	035 A.N		IMBT- VNUH	<i>Aspergillus</i> section Nigri	<i>A. niger</i>
21	M33.1	Mốc hạt bí ngô	Gia Lâm - Hà Nội	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. flavus</i>
22	M35.1	Mốc hạt đậu tương	Thanh Chương- Nghệ An	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. flavus</i>
23	M44.1	BN (men vi sinh)	Hà Nội	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. oryzae</i>
24	M45	CO (men vi sinh)	Hà Nội	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. oryzae</i>
25	M47.1	LA (men vi sinh)	Hà Nội	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. oryzae</i>
26	013 A.F		IMBT- VNUH	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. flavus</i>
27	M51	PK (men vi sinh)	Hà Nội	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. oryzae</i>
28	M52.1	Mốc hạt lạc	Hà Nội	<i>Aspergillus</i> section Flavi	<i>A. flavus</i>
29	M37	Mốc đậu xanh	Ngọc Lặc - Thanh Hóa	<i>Aspergillus</i> section Nigri	<i>Aspergillus</i> spp.
30	M39	Mốc quả sấu	Gia Lâm - Hà Nội	<i>Aspergillus</i> section Nigri	<i>Aspergillus</i> spp.

Chú thích: IMBT- VNUH - Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học - Đại học Quốc gia Hà Nội

Bước đầu đánh giá khả năng ứng dụng hệ trình tự lặp lại đơn giản (SSRs) trong nghiên cứu quan hệ di truyền giữa các chủng nấm mốc *Aspergillus* spp.

Từ các nguồn khác nhau, 27 chủng nấm mốc đã được phân lập, 3 chủng nấm thu thập thêm đã được giải trình tự và xác định loài từ Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học - Đại học Quốc gia Hà Nội (IMBT- VNUH) (Bảng 2).

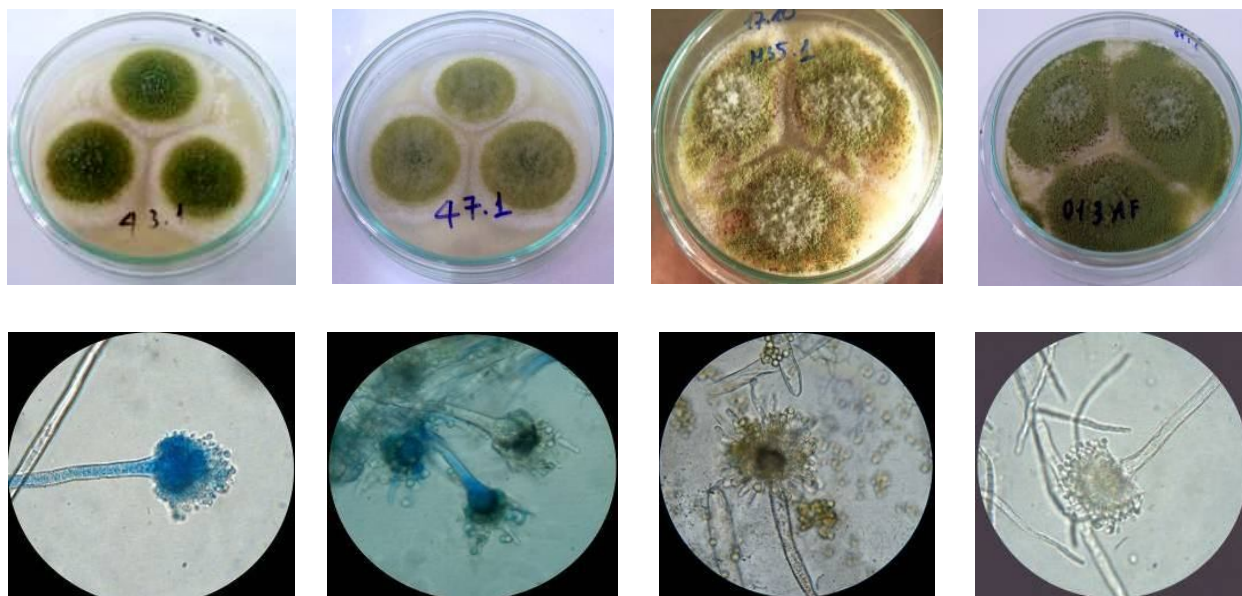
Dựa trên các đặc điểm hình thái như khuẩn lạc màu xám tro, sợi nấm đơn bào, có hệ rễ giả, theo khóa phân loại của Schipper và Stalpers (1984), chủng M40.1 được xác định thuộc chi *Rhizopus*. Chủng M31 với cấu trúc cụm cành bào tử dạng chổi đặc trưng được xác định thuộc chi *Penicillium* (Pitt và Hocking, 2009).

Các chủng nấm còn lại mang đặc trưng của chi *Aspergillus*. Trong đó, dựa vào màu sắc khuẩn lạc, hình thái tế bào và một số chỉ thị hóa sinh, chúng tôi tiếp tục sơ bộ định danh các chủng nấm đến loài (Hình 3) (Đình Hồng Duyên & cs., 2010; Klich, 2002; Lương Đức Phẩm, 2004). *A. oryzae* và *A. flavus* được sơ bộ phân biệt thông qua chỉ thị hóa sinh xác định khả năng sinh aflatoxin trên môi trường thạch cốt dừa (Pitt và Hocking, 2009). Hình thái khuẩn lạc

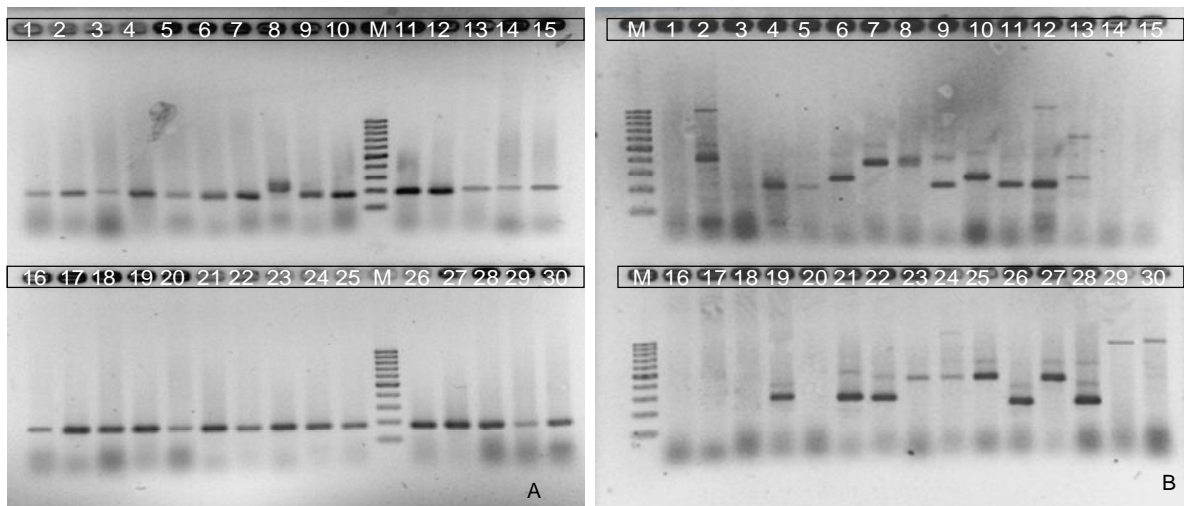
(KL) và đặc điểm vi thể 4 chủng đại diện cho 2 loài được sơ bộ định danh thuộc *A. oryzae* (M43.1, M47.1) và *A. flavus* (M35.1, 013 AF) được thể hiện trong hình 3. Hai chủng M37 và M39 được sơ bộ sắp xếp vào nhóm (section) Nigri nhưng chưa xác định được loài vì nó có nhiều đặc điểm vi thể giống với *A. niger*, màu sắc khuẩn lạc lại có màu xanh tím, tốc độ sinh trưởng và hệ sợi khí sinh có nhiều đặc điểm khác với *A. niger*.

3.4. Khảo sát sự đa hình của 17 locus SSR và iSSR

Sự đa hình của 17 locus SSR và iSSR kể trên được khảo sát trên 30 chủng nấm mốc. DNA tổng số của 30 chủng nấm sau khi tách đã được sử dụng làm khuôn sau khi điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Trong nghiên cứu này, mỗi băng DNA sản phẩm trên bản điện di với cùng một kích thước nhất định được coi là một allele. Ví dụ, hình 4 cho thấy locus AOIV.1.46 có 3 allele (A), còn locus AOI-i1 có 6 allele.



Hình 3. Hình thái khuẩn lạc, bào tử, cuống phát sinh bào tử, bong bào tử, thể bình của 4 chủng nấm mốc
(Từ trái qua phải lần lượt là các cặp ảnh của M43.1, *A. oryzae*; M47.1, *A. oryzae*; M35.1, *A. flavus*; 013AF, *A. flavus*)



Hình 4. Điện di sản phẩm PCR với mỗi AOIV.1.46 (A) và AOI-i1 (B).
Chú thích: M - thang chuẩn DNA 100 Kb, 1 - 30 là thứ tự các chủng theo bảng 2

Tiến hành chạy PCR riêng rẽ với tổng số 17 mỗi nghiên cứu, thu được 83 allele trên 30 mẫu nấm mốc thu thập từ các nguồn khác nhau ở các địa phương. Trung bình 4,88 allele cho mỗi locus. Mỗi locus có tổng số allele từ 2 - 16 (Bảng 3). Số allele này không những phụ thuộc vào bản thân sự đa hình của các locus mà còn phụ

thuộc vào sự đa dạng các chủng và loài trong tập đoàn mẫu được khảo sát và dung lượng mẫu nghiên cứu. Tomimura & cs. (2008) cũng có được kết quả tương tự khi phân tích sự đa hình của 18 locus SSR trên 41 chủng thuộc 3 loài *Aspergillus* spp.

Bảng 3. Số allele và chỉ số đa dạng di truyền của mỗi locus SSR

TT	Tên locus	Chung cho 30 chủng			Số allele trên mỗi locus khi xét riêng từng nhóm				Tổng
		Tổng số allele	Hệ số PIC	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> nhóm Flavi	<i>Aspergillus</i> nhóm Nigri		
1	AOI.3.21	3	0,54	1	1	2	1	5	
2	AOI-i1	6	0,84	0	3	6	3	12	
3	AOII.2.6	5	0,46	2	1	2	3	8	
4	AOII.1.57	5	0,71	1	1	5	2	9	
5	AOII.1.18	4	0,37	1	1	3	3	8	
6	AOIII.1.29	7	0,72	1	0	5	4	10	
7	AOIII.1.25	4	0,59	1	1	4	3	9	
8	AOIV.1.8	2	0,56	0	0	2	0	2	
9	AOIV-i1	5	0,75	2	1	3	1	7	
10	AOIV.1.46	3	0,12	1	1	3	1	6	
11	AOV.1.36	16	0,9	3	4	10	13	30	
12	AOV.2.5	3	0,21	1	1	3	1	5	
13	AOVI.1.20	3	0,68	1	1	3	0	5	
14	AOVII.3.6	4	0,54	0	0	4	0	4	
15	AOVII.2.2	5	0,77	1	1	4	2	8	
16	AOVIII.1.15	3	0,71	0	0	3	2	5	
17	AOVIII.1.2	5	0,73	1	1	5	4	11	
Tổng số		83		17	19	67	42	144	

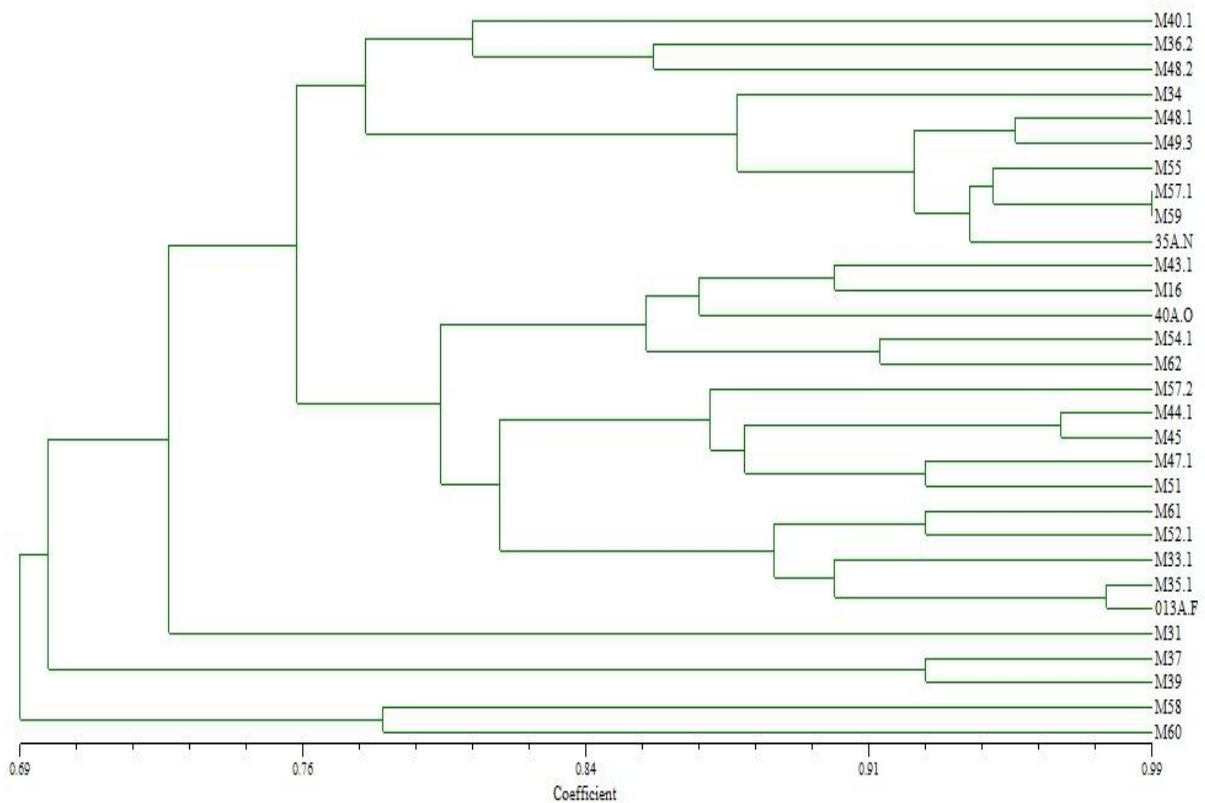
Chú thích: chỉ số PIC (Polymorphism Information Content) là hệ số đa dạng từng locus gene. $PIC = 1 - \sum P_i^2$, trong đó P là tần xuất xuất hiện của allele thứ (i).

Bước đầu đánh giá khả năng ứng dụng hệ trình tự lặp lại đơn giản (SSRs) trong nghiên cứu quan hệ di truyền giữa các chủng nấm mốc *Aspergillus* spp.

Nếu không tính 2 chủng nấm mốc không thuộc chi *Aspergillus* spp., 17 cặp mỗi nghiên cứu cho 82 allele trên tổng 28 mẫu nấm mốc thuộc chi *Aspergillus* spp., trung bình 4,82 allele cho mỗi locus. Locus AOV.2.5 với chỉ 25 trình tự lặp đôi không hoàn hảo và locus AOIV.1.46 có chỉ số đa hình (PIC) thấp nhất, tương ứng là 0,21 và 0,12; còn các locus lặp hoàn hảo AOV.1.36 với 46 trình tự lặp 3 và AOI-i1 có chỉ số đa hình cao nhất, tương ứng là 0,9 và 0,84 (Bảng 3). Số allele trung bình của các locus có trình tự lặp dài trên 120 nu là 6,28, trong khi của các trình tự lặp ngắn hơn chỉ là 3,5. Tương tự, số allele trung bình của các trình tự lặp hoàn hảo và không hoàn hảo tương ứng là 5,5 và 4. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Temnykh & cs. (2001) trên lúa về mối tương quan giữa độ dài của locus SSR và mức độ bảo thủ với mức độ đa hình.

Với cách thống kê số liệu như trong bảng 3, số allele chung cho ít nhất 2 nhóm của mỗi locus chính là hiệu của tổng số allele khi xét riêng từng nhóm trừ đi tổng số allele khi xét chung cả 30 chủng nấm mốc. Như vậy cả 17 locus SSR và iSSR có 61 allele chung cho ít nhất 2 nhóm, và có 2 locus chỉ được nhân lên ở *Aspergillus* nhóm Flavi là AOIV.1.8 và AOVII.3.6. Số locus không được nhân lên ở từng nhóm *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp., và *Aspergillus* nhóm Nigri lần lượt là 4; 4; và 3. Các locus không có allele chung giữa các nhóm này có thể sử dụng làm chỉ thị phân tử để phân biệt giữa các nhóm nấm mốc kể trên.

Nhằm đánh giá mối quan hệ di truyền của các chủng dựa trên các locus SSR được khảo sát, sơ đồ hình cây về mức độ tương đồng di truyền trên 17 trình tự được xây dựng dựa theo phương pháp được mô tả trong mục 2.6 (Hình 5). Ở mức



Hình 5. Sơ đồ hình cây về mức độ tương đồng di truyền trên 17 trình tự SSR và iSSR của 30 chủng nấm mốc
Thang trục hoành chỉ hệ số tương đồng (coefficient)

độ tương đồng 0,77; 30 chủng nấm mốc nghiên cứu này được phân ra làm 5 nhóm. Nhóm I gồm 10 chủng trong đó một chủng thuộc chi *Rhizopus*: M40.1; 2 chủng *A. oryzae*: M36.2 và M48.2; 7 chủng *A. niger*: M34, M48.1, M49.3, M55, M57.1, M59, 35A.N. Nhóm II gồm có 10 chủng *A. oryzae*: M43.1, M16, 40 A.O, M54.1, M62, M57.2, M44.1, M45, M47.1, M51; và 5 chủng *A. flavus*: M61, M52.1, M33.1, M35.1, 013AF. Nhóm III gồm có 1 chủng thuộc chi *Penicillium*, M31. Nhóm IV có 2 chủng có khuẩn lạc màu xanh tím thuộc chi *Aspergillus*, M37 và M39. Nhóm V có 1 chủng *A. oryzae*: M60. Trong nhóm II, ở mức độ tương đồng 0,82, các chủng nấm mốc này phân ra làm 3 nhóm, trong đó có một nhóm chứa tất cả các chủng *A. flavus*, M61, M52.1, M33.1, 013AF và M35.1. Cũng ở mức độ tương đồng này, các chủng *A. niger* tách ra thành một nhóm riêng. Kết quả cho thấy, tập hợp kiểu hình SSR và iSSR của 17 locus trên có khả năng phân biệt được 3 loài *A. niger*, *A. oryzae* và *A. flavus*.

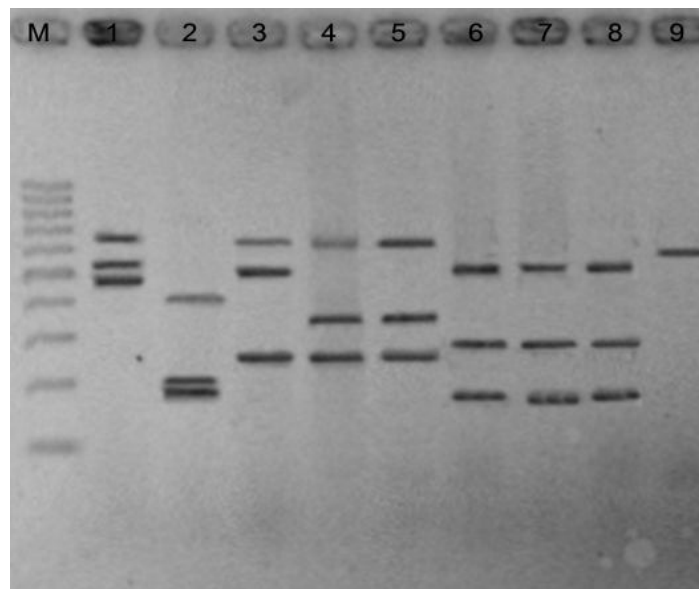
3.5. Tối ưu phản ứng multiplex PCR

Căn cứ vào kết quả phản ứng PCR nhân dòng riêng từng locus, phản ứng multiplex PCR đã được

thiết kế với mục tiêu phân biệt nhanh *A. oryzae* và *A. flavus* ở mức độ DNA. 3 locus có các allen khác nhau ở *A. oryzae* và *A. flavus* được chọn để nhân dòng trong phản ứng multiplex PCR là AOIV-i1, AOVII.3.6, AOVIII.1.15.

Qua khảo sát các điều kiện khác nhau, nhiệt độ gắn môi và chu trình tối ưu cho phản ứng multiplex PCR được xác định như sau: (1) 95°C trong 5 phút, (2) 94°C trong 30 giây, (3) 54°C trong 1 phút 30 giây, (4) 72°C trong 1 phút 30 giây và 35 chu kỳ lặp lại từ (2) đến (4), (5) 72°C trong 5 phút và sau đó giữ lạnh ở 4°C.

Kết quả kiểm nghiệm các chủng nấm mốc bằng phản ứng multiplex PCR mới được thiết lập cho thấy nó không chỉ giúp phân biệt giữa hai loài *A. oryzae* và *A. flavus* mà còn giúp phân biệt được các chủng thuộc *Aspergillus* section Flavi với các chủng thuộc nhóm phân loại tương đương khác. Việc này mở ra khả năng ứng dụng phản ứng multiplex PCR với môi SSR để kiểm định nhanh việc nhiễm các loại nấm mốc *Aspergillus* trong thực phẩm cho người và thức ăn chăn nuôi.



Hình 6. Điện di sản phẩm của phản ứng Multiplex PCR

Các môi gồm: AoIV-i1 (627 bp), AOVII.3.6 (327 bp), AOVIII.1.15 (406 bp).
Các chủng gồm: 1: M40.1; 2: M31; 3: M57.2; 4: M62; 5: M16; 6: M61; 7: 013AF;
8: M52.1; 9: M48.1. Lane M là thang chuẩn DNA 100 Kb

Bước đầu đánh giá khả năng ứng dụng hệ trình tự lặp lại đơn giản (SSRs) trong nghiên cứu quan hệ di truyền giữa các chủng nấm mốc *Aspergillus* spp.

4. KẾT LUẬN

Bộ gene nhân của *Aspergillus oryzae* RIB40 có 841 trình tự SSR với mật độ trung bình 22 SSR/Mb. Mật độ các trình tự SSR trên từng nhiễm sắc thể dao động trong khoảng từ 16 đến 26 SSR/Mb. Các trình tự SSR có mức độ bảo thủ hoàn hảo (100%) chiếm 44,6% trong tổng số 841 trình tự SSR có mức độ bảo thủ trên 70%.

13 locus SSR và 2 locus iSSR đã được thiết kế mới mỗi và 17 locus đã được nhân dòng thành công trên 30 chủng nấm mốc, trong đó có 28 chủng thuộc chi *Aspergillus*. Tất cả các locus đều thể hiện sự đa dạng di truyền trong tập đoàn 30 chủng nấm mốc dùng trong nghiên cứu này với trung bình 4,88 allele trên mỗi locus và giá trị PIC trung bình bằng 0,6. Đa số các locus SSR được nghiên cứu có mặt cả ở các loài nấm không thuộc *Aspergillus* section Flavi như *Aspergillus* section Nigri, *Rhizopus* và *Penicillium*. Mức độ đa hình của mỗi locus SSR có xu hướng tỷ lệ thuận với độ bảo thủ và độ dài trình tự lặp.

Các locus được khảo sát có thể ứng dụng làm chỉ thị phân tử để phân biệt giữa các chủng trong cùng một loài nấm mốc thuộc chi *Aspergillus* hay giữa các loài có nhiều đặc điểm hình thái giống nhau là *A. oryzae* và *A. flavus*.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Dự án Việt-Bỉ (CUI Project) và Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội đã cấp kinh phí để chúng tôi có thể thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bennett, J. W. (2010). An overview of the genus *Aspergillus*. *Aspergillus: Molecular biology and genomics*. Caister Academic Press.

Benson, G. (1999). Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic acids research*. 27 (2), 573-580.

Cardle, L., L. Ramsay, D. Milbourne, M. Macaulay, D. Marshall and R. Waugh (2000). Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeat in plants. *Genetics*. 156, 847-854.

Cavagnaro, P. F., D. A. Senalik, L. Yang, P. W. Simon (2010). Genome-wide characterization of simple

sequence repeat in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *BMC Genomic*. 11 (569).

Đinh Hồng Duyên, Phạm Thị Thảo Nguyên, Phạm Thúy Kiều (2010). Đánh giá đặc tính sinh học và định tên nấm dùng trong xử lý phế thải nông nghiệp. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*. 8 (2), 287 - 295.

Êgôrôv, N. X. (1983). *Thực tập vi sinh vật học*. Nhà xuất bản "MIR" Maxcova (Nguyễn Lâm Dũng dịch).

Galagan, J. E., S. E. Calvo, L. J. Ma (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*. 48, 1105-1115.

Gallego, F. J., M. A. Perez, Y. Nunez, P. Hidalgo (2005). Comparison of RAPDs, AFLPs and SSR markers for genetic analysis of yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*. 22, 561-568.

Kashi, Y. and D. G. King (2006). Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *TRENDS in Genetic*. 22 (5), 253-259.

Klich, M. A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. The Netherlands: Ponsen & Looijen.

Kobayashi, T., K. Abe, K. Asai, K. Gomi, P. R. Juvvadi, M. Kato, K. Kitamoto, M. Takeuchi, and M. Machida (2007). Genomic of *Aspergillus oryzae*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 71 (3), 646-670.

Lawson, M. J. and L. Zhang (2006). Distinct pattern of SSR distribution in the *Arabidopsis thaliana* and rice genome. *Genome Biology*. 7 (2): R14.

Machida, M., K. Asai, M. Sano, T. Tanaka, T. Kumagai (2005). Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*. 438, 1157-1161.

Machida, M., O. Yamada, K. Gomi (2008). Genomic of *Aspergillus oryzae*: Learning from the history of koji mold and exploration of its future. *DNA Research*. 15, 173-183.

McCouch, S. R., L. Teytelman, Y. Xu, K. B. Lobos (2002). Development and mapping of 2240 new SSR maker for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*. 9, 199-207.

Morgante, M., M. Hanafey, W. Powell (2002). Microsatellites are preferentially associated with non repetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetic*. 30, 194-200.

Naslund, K., B. Saetre, J. von Salome, T. F. Bergstrom, N. Jareborg, E. Jazin (2005). Genomic-wide prediction of human VNTRs. *Genomics*. 85, 24-35.

Payne, G.A., Nierman, W.C., Wortman, J.R., Pritchard, B.L., Brown, D., Dean, R.A., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Machida, M., and Yu, J. (2006). Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. *Medical mycology*. 44, 9-11.

Perez, M. A., F. J. Gallego, I. Martinez, P. Hidalgo (2001). Detection, distribution and selection of

- microsatellites (SSRs) in the genome of yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Applied microbiology*. 33, 461-466.
- Lương Đức Phẩm (2004). Công nghệ vi sinh. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- Pitt, J. I. and Hocking, A. D. (1985). *Fungi and Food Spoilage*. Australian Academic Press.
- Raper, K.B. and Fennell, D. I. (1965). *The Genus Aspergillus*. Williams & Wilkins.
- Rohlf, F. J. (1988). NTSYS-pc number taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Publishing.
- Sanbrook J. and Russell (2001): *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, New York.
- Samson, R. A., S-B. Hong, J. C. Frisvad (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*. 44, 133-148.
- Samson, RA, Varga J. (2009). What is a species in *Aspergillus*. *Medical Mycology*. 47,13-20.
- Schipper, M. A. A. and Stalpers, J. A. (1984). A revision of the genus *Rhizopus*. *Studies in Mycology*. Centraalbureau Voor Schimmelcultures. 1 (25), 20-34.
- Temnykh, S., G. DeClerck, A. Lukashova, L. Lipovich, S. Cartinhour, and S. McCouch (2001). Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Research*. 11, 1441-1452.
- Tomimura K., K. Iwashita, O. Yamada and K. Kobayashi (2009). Development of VNTR markers for three *Aspergillus* species used in brewing. *Molecular Ecology Resources*. 9, 613-615.
- Toth G., Z. Gaspari and J. Jurka (2000). Microsatellite in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*. 10, 967-981.
- Varga J. (2006). Molecular typing of *Aspergilla*: Recent development and outcomes. *Medical Mycology*. 44, 149-161.
- Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M. and Aggarwal, D (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *American Journal of Clinical Nutrition*. 80, 1106-1122.