

Thuy, T.T.T., 2010. *Incidence and effect of Meloidogyne incognita (Nematoda: Meloidogyninae) on black pepper plants in Vietnam*. Thesis, Katholieke Universiteit Leuven, België. Unpublish.

Trinh, P.Q., W.M. Wesemael, H.A. Tran, C.N. Nguyen, M. Moens, 2012. Resistance screening of Coffea spp. accessions for *Pratylenchus coffeae* and *Radopholus arabocoffeae* in Vietnam. *Euphytica*, 185 (2): 233-241.

Testing of bio-product P1 to control nematodes causing disease on black pepper in Dak Lak province

Chu Thanh Binh, Tran Van Tuan, Bui Thi Viet Ha

Abstract

Paecilomyces sp. P1 was isolated from pepper soil in Dak Lak province, which was a potential filamentous fungus for killing nematodes. Bio-product P1 was tested for the ability to kill nematodes at the nursery with the efficiency of 22.2% - 52.48% after 30 days. The black pepper at 5 -7 old age had the yield higher than that of the control by 7.42% when using bio-product P1 after 12 months on a 3 ha model.

Keywords: Black pepper, nematode, *Paecilomyces* sp., Bio-product P1

Ngày nhận bài: 17/4/2020

Ngày phản biện: 25/4/2020

Người phản biện: TS. Trương Hồng

Ngày duyệt đăng: 29/4/2020

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG GEN KHÁNG NOURSEOTHRICIN LÀM MARKER CHỌN LỌC DÙNG CHO CHUYỂN GEN VÀO NẤM ƯA NHIỆT *Myceliophthora thermophila* NHỜ VI KHUẨN *Agrobacterium tumefaciens*

Trần Văn Tuấn^{1,2}

TÓM TẮT

Myceliophthora thermophila là một loài nấm ưa nhiệt có khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzyme bền nhiệt. Một số enzyme do loài nấm này sinh ra như cellulase, xylanase và phytase có tiềm năng sử dụng để bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. Phát triển công cụ phục vụ cải biến di truyền nhằm tăng khả năng sinh tổng hợp enzyme ở *M. thermophila* giữ một vai trò quan trọng. Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên gen kháng nourseothricin được sử dụng thành công làm marker chọn lọc để chuyển gen vào chủng nấm *M. thermophila* DSM 1799 nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Chủng *M. thermophila* DSM 1799 được đánh giá về mức độ mẫn cảm với kháng sinh nourseothricin. Kết quả cho thấy chủng nấm này bị ức chế hoàn toàn ở nồng độ nourseothricin khá thấp (50 µg/ml). Kết quả nghiên cứu cũng chứng minh gen huỳnh quang GFP được chuyển thành công vào hệ gen của chủng *M. thermophila* DSM 1799 khi sử dụng marker chọn lọc là gen kháng nourseothricin. Sử dụng PCR với cặp mồi đặc hiệu GFP-F/GFP-R đã xác nhận sự có mặt của gen GFP trong hệ gen của các thể chuyển gen thu được. Đặc biệt khi quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, các thể chuyển gen đã có khả năng sinh tổng hợp protein GFP để phát màu huỳnh quang xanh trong hệ sợi và bào tử nấm.

Từ khóa: Chuyển gen thông qua *Agrobacterium tumefaciens*, *Myceliophthora thermophila*, marker chọn lọc kháng nourseothricin, vector nhĩ thể

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Myceliophthora thermophila được coi như nhà máy tế bào tiềm năng cho sản xuất các loại enzyme bền nhiệt (Singh, 2016). Đặc điểm vượt trội của loài nấm này là có khả năng sinh tổng hợp một số enzyme có giá trị để bổ sung vào thức ăn chăn nuôi như cellulase, xylanase giúp chuyển hóa cellulose và xylan thành các phân tử đường đơn giản, hay

phytase phân giải phytate để giải phóng photpho vô cơ giúp vật nuôi dễ hấp thụ (Gomes *et al.*, 2019; Maheshwari *et al.*, 2000). Tuy nhiên, khả năng sinh tổng hợp các enzyme này của chủng nấm tự nhiên thường tương đối thấp. Để nâng cao năng lực cho các chủng tự nhiên, các kỹ thuật về cải biến chỉnh sửa hệ gen thường được áp dụng. Việc can thiệp vào hệ gen nấm có thể giúp tăng hiệu suất sinh tổng

¹ Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

² Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN

hợp các enzyme mong muốn. Việc cải biến di truyền thông qua chuyển gen bằng tế bào trần đã được thực hiện thành công ở nấm *M. thermophila* (Visser *et al.*, 2011). Tuy nhiên, quá trình chuẩn bị tế bào trần cũng như quy trình chuyển gen khá phức tạp, chi phí cao và không ổn định ở những lần lặp lại. Trong khi đó, phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* đã được chứng minh là có hiệu quả cao đối với với nhiều nấm sợi khác nhau (Michielse *et al.*, 2005). Gen kháng nourseothricin mã hóa cho nourseothricin acetyltransferase bất hoạt kháng sinh nourseothricin theo cơ chế acetyl hóa (Kochupurakkal and Iglehart, 2013). Gen kháng nourseothricin thường được sử dụng làm marker chọn lọc trong chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*, tuy nhiên gen này chưa được sử dụng cho chuyển gen vào nấm *M. thermophila*. Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên gen kháng nourseothricin được chứng minh là marker chọn lọc mới và hiệu quả cho chuyển gen vào *M. thermophila* thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng nấm *M. thermophila* DSM 1799 được cung cấp bởi Bảo tàng Vi sinh vật và Tế bào - DSMZ, Viện Leibniz, Đức.

Vector nhị thể pGreen3 (Vu *et al.*, 2018) sử dụng trong nghiên cứu này mang cấu trúc kháng nourseothricin dưới sự điều hòa của promoter *trpC* và cấu trúc biểu hiện gen mã hóa protein huỳnh quang xanh *GFP* dưới sự điều hòa của promoter *gpdA* từ nấm sợi *Aspergillus nidulans*. Vector này được cung cấp bởi Phòng Genomic, Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu bào tử nấm

Chủng *M. thermophila* DSM 1799 được nuôi trên môi trường PDA (potato dextrose agar) ở 37°C trong 5 ngày. Bổ sung nước cất vô trùng lên bề mặt đĩa và dùng que gạt vô trùng gạt tách bào tử ra khỏi hệ sợi nấm. Hỗn hợp dịch thu được từ đĩa nuôi cấy được lọc qua màng Miracloth (Đức). Tiến hành ly tâm dịch lọc ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút và đổ bỏ phần dịch nổi. Phần cặn ly tâm chứa bào tử nấm được rửa 2 lần với nước cất vô trùng. Sau đó, bào tử được pha trong nước cất vô trùng.

2.2.2. Đánh giá mức độ miễn cảm của chủng DSM 1799 với nourseothricin

Nhỏ 10 µl dịch bào tử nấm (10^6 bào tử/ml) lên môi trường PDA có bổ sung kháng sinh nourseothricin ở các nồng độ 50, 100 và 150 µg/ml. Đĩa được ủ ở 37°C trong 7 ngày. Nồng độ kháng sinh ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của chủng DSM 1799 sẽ được sử dụng cho thí nghiệm chuyển gen.

2.2.3. Chuyển gen vào và xác nhận thể chuyển gen

Việc chuyển gen vào chủng *M. thermophila* DSM 1799 được thực hiện dựa trên quy trình chuyển gen vào nấm *Penicillium digitatum* của nhóm nghiên cứu đã công bố (Vu *et al.*, 2018). Vector nhị thể pGreen3 được biến nạp vào chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 bằng xung điện. Vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 mang vector pGreen3 được sử dụng cho chuyển gen vào chủng *M. thermophila* DSM 1799. Vi khuẩn và bào tử nấm được đồng nuôi cấy trên môi trường IM (1M-MES 40 ml/l; MM salts 2,5X 400 ml/l (3,625 g/l KH_2PO_4 ; 5,125 g/l K_2HPO_4 ; 0,375 g/l NaCl; 1,25 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,165 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,0062 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,25 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$); glucose 0,9 g/l; glycerol 5 ml/l; agar 20 g/l) chứa 200 µM AS, ở 25°C trong 72 giờ. Sau thời gian đồng nuôi cấy, màng giấy lọc cellulose được chuyển sang môi trường PDA có bổ sung kháng sinh nourseothricin (50 µg/ml) để chọn lọc các khuẩn lạc nấm chuyển gen và kháng sinh cefotaxime (300 µg/ml) để loại bỏ vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1. Đĩa chuyển gen được ủ 5 ngày, ở nhiệt độ 37°C. Các khuẩn lạc nấm xuất hiện trên môi trường chọn lọc được thuần khiết trên môi trường PDA có chứa nourseothricin. Các thể chuyển gen thu được sau đó được nuôi cấy để tách chiết DNA tổng số phục vụ cho việc xác nhận quá trình chuyển gen đã thành công bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gen *GFP* là GFP-F (ATGGTGAGCAAGGGCGAG)/GFP-R (TCACTTGACAGCTCG TCCATGC) (Nguyen *et al.*, 2016). Đồng thời hệ sợi các thể chuyển gen được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan (Carl Zeiss, Đức) để phát hiện sự biểu hiện của protein GFP.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

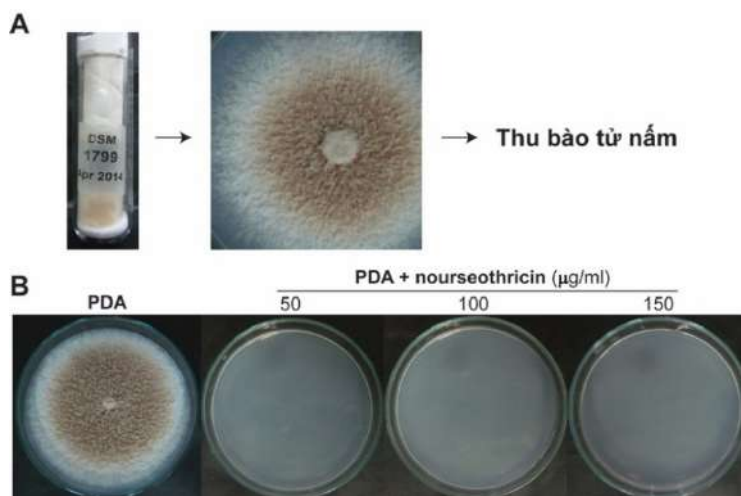
Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 3/2019 đến tháng 3/2020 tại Bộ môn Vi sinh vật học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Mức độ mẫn cảm với nourseothricin của chủng *M. thermophila* DSM 1799

Nourseothricin là kháng sinh được sử dụng thành công trong nghiên cứu chuyển gen ở một số loài nấm sợi (Alshahni *et al.*, 2010; Vu *et al.*, 2018). Tuy nhiên, kháng sinh này chưa được sử dụng cho chuyển gen ở nấm *M. thermophila*. Để lựa chọn được nồng độ kháng sinh nourseothricin phù hợp cho

chọn lọc các thể chuyển gen, chủng *M. thermophila* DSM 1799 được nuôi cấy trên môi trường PDA có bổ sung nourseothricin với các nồng độ khác nhau. Kết quả thu được cho thấy, sinh trưởng của chủng *M. thermophila* DSM 1799 bị ức chế hoàn toàn ở nồng độ 50 µg/ml (Hình 1). Như vậy, kháng sinh nourseothricin với nồng độ 50 µg/ml được lựa chọn cho nghiên cứu chuyển gen vào *M. thermophila* DSM 1799.



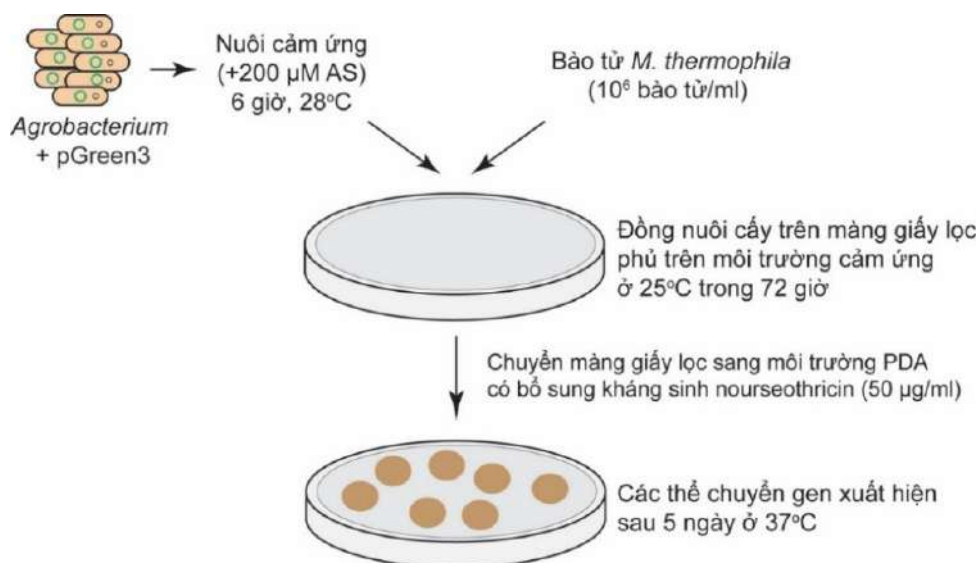
Hình 1. Mức độ mẫn cảm của *M. thermophila* DSM 1799 với nourseothricin

Ghi chú: (A) Chủng DSM 1799 trên môi trường PDA; (B) Sinh trưởng của chủng DSM 1799 trên môi trường PDA bổ sung nourseothricin.

3.2. Chuyển gen vào *M. thermophila* DSM 1799 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Để thực hiện chuyển gen vào *M. thermophila* DSM 1799 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*, vector

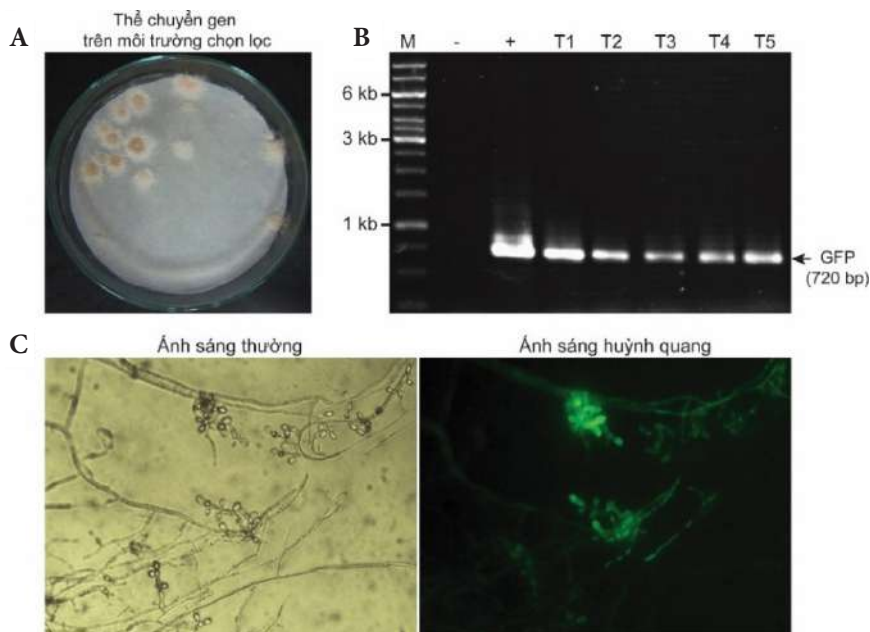
nhị thể pGreen3 được biến nạp vào chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 bằng xung điện. Quy trình chuyển gen vào *M. thermophila* DSM 1799 được mô tả như trong Hình 2.



Hình 2. Quy trình chuyển gen vào *M. thermophila* DSM 1799 nhờ *A. tumefaciens*

Sau bước đồng nuôi cấy, màng giấy lọc được chuyển sang môi trường PDA có bổ sung kháng sinh nourseothricin (50 µg/ml) để chọn lọc các thể chuyển gen. Sau 5 ngày ở 37°C, một số khuẩn lạc nấm đã xuất hiện trên màng giấy lọc (Hình 3A). Các khuẩn lạc này được cấy chuyển sang môi trường mới và 5 thể chuyển gen (T1-T5) được chọn cho tách chiết DNA tổng số. DNA tổng số được sử dụng để xác nhận sự có mặt của gen chỉ thị *GFP* nhờ PCR với cặp mồi đặc hiệu GFP-F/GFP-R. Kết quả phân tích sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8% cho thấy hệ gen của cả 5 thể chuyển gen đều cho băng DNA có kích thước 720 bp tương ứng với gen *GFP* (Hình 3B). Kết quả quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang cũng xác nhận sự biểu hiện thành công của gen *GFP* trong hệ sợi và bào tử nấm chuyển gen với

tín hiệu huỳnh quang xanh rất rõ nét (Hình 3C). Các kết quả thu được đã chứng minh rằng gen *GFP* đã được tích hợp thành công vào hệ gen của nấm *M. thermophila* DSM 1799 nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* và marker chọn lọc là gen kháng nourseothricin. Gần đây, việc chuyển gen vào nấm *M. thermophila* sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens* đã được thực hiện thành công với marker là gen kháng hygromycin (Xu *et al.*, 2015). Tuy nhiên, gen kháng nourseothricin chưa từng được sử dụng cho chuyển gen ở *M. thermophila*. Đây là nghiên cứu đầu tiên chứng minh gen kháng nourseothricin là một marker chọn lọc tin cậy để sử dụng cho chuyển gen vào nấm ưa nhiệt *M. thermophila*. Kết quả này mở ra triển vọng trong nghiên cứu biểu hiện gen cũng như nghiên cứu chức năng của gen ở loài nấm sợi quan trọng này.



Hình 3. Chuyển gen huỳnh quang *GFP* vào nấm *M. thermophila*

Ghi chú: (A) Các thể chuyển gen trên môi trường chọn lọc; (B) Xác nhận chuyển gen với cặp mồi GFP-F/GFP-R; (C) Biểu hiện của gen huỳnh quang xanh *GFP*.

IV. KẾT LUẬN

Chủng nấm *M. thermophila* DSM 1799 bị ức chế hoàn toàn bởi kháng sinh nourseothricin ở nồng độ 50 µg/ml. Gen kháng nourseothricin được sử dụng thành công làm marker chọn lọc cho chuyển gen vào nấm *M. thermophila* nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens*. Sự biểu hiện của gen *GFP* dưới sự điều hòa của promoter *gpdA* từ *A. nidulans* cho tín hiệu huỳnh quang xanh khá tốt ở chủng nấm chuyển gen thu được.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alshahni M. M., Makimura K., Yamada T., Takatori K. and Sawada T., 2010. Nourseothricin acetyltransferase: a new dominant selectable marker for the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*. *Medical Mycology*, 48 (4): 665-668.

Gomes A. C. D. S., Falkoski D., Battaglia E., Peng M., de Almeida M. N., Linares, N. C., Meijnen J. P., Visser J. and de Vries, R. P., 2019. *Myceliophthora thermophila* Xyr1 is predominantly involved in xylan degradation and xylose catabolism. *Biotechnology for Biofuels*, 12 (1): 220-237.

- Kochupurakkal B. S. and Iglehart J. D.**, 2013. Nourseothricin N-acetyl transferase: a positive selection marker for mammalian cells. *PLoS one*, 8 (7):1-4.
- Maheshwari R., Bharadwaj G. and Bhat M. K.**, 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (3): 461-488.
- Michielse C. B., Hooykaas P. J., van den Hondel C. A. and Ram A. F.**, 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics*, 48 (1): 1-17.
- Nguyen K. T., Ho Q. N., Pham T. H., Phan T.-N. and Tran V. T.**, 2016. The construction and use of versatile binary vectors carrying *pyrG* auxotrophic marker and fluorescent reporter genes for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus oryzae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32 (12): 204-212.
- Singh B.**, 2016. *Myceliophthora thermophila* syn. *Sporotrichum thermophile*: a thermophilic mould of biotechnological potential. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36 (1): 59-69.
- Visser H., Joosten V., Punt P. J., Gusakov A. V., Olson P. T., Joosten R., Bartels J., Visser J., Sinitsyn A. P., Emalfarb M. A., Verdoes J. C. and Wery J.**, 2011. Development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a *Myceliophthora thermophila* isolate, previously known as *Chrysosporium lucknowense* C1. *Industrial Biotechnology*, 7 (3): 214-223.
- Vu T. X., Ngo T. T., Mai L. T. D., Bui T. T., Le D. H., Bui H. T. V., Nguyen H. Q., Ngo B. X. and Tran V. T.**, 2018. A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using *DsRed* and *GFP* to visualize citrus host colonization. *Journal of Microbiological Methods*, 144: 134-144.
- Xu J., Li J., Lin L., Liu Q., Sun W., Huang B. and Tian C.**, 2015. Development of genetic tools for *Myceliophthora thermophila*. *BMC Biotechnology*, 15 (1): 35-44.

Nourseothricin resistance gene as a new selection marker for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*

Tran Van Tuan

Abstract

Myceliophthora thermophila is a thermophilic fungus capable of biosynthesis of thermally stable enzymes. Some enzymes produced by this fungus such as cellulase, xylanase and phytase have the potential to be used as animal feed supplements. Developing tools for genetic manipulation in order to increase the ability of enzyme biosynthesis plays an important role in *M. thermophila*. In this study, for the first time, the nourseothricin resistance gene was successfully employed as a selection marker for gene transfer into *M. thermophila* DSM 1799 via *Agrobacterium tumefaciens*. The *M. thermophila* DSM 1799 strain was examined for its sensitivity towards nourseothricin. Results showed that this strain was completely inhibited at a quite low concentration of nourseothricin (50 µg/ml). The results also demonstrated that the *GFP* gene was successfully transferred to the genome of *M. thermophila* DSM 1799 using the nourseothricin resistance marker. The PCR-based analysis with the specific primer pair GFP-F/GFP-R has confirmed the presence of the *GFP* gene in the genome of all tested transgenic strains. Especially, when observed under a fluorescence microscope, these transgenic strains were able to produce the *GFP* protein, which emits the green fluorescent signal in fungal mycelium and spores.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, *Myceliophthora thermophila*, nourseothricin resistance marker, binary vector

Ngày nhận bài: 15/4/2020
Ngày phản biện: 24/4/2020

Người phản biện: PGS. TS. Nguyễn Xuân Cảnh
Ngày duyệt đăng: 29/4/2020