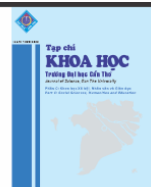




Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ

Số chuyên đề: Công nghệ thực phẩm

website: sj.ctu.edu.vn



DOI:10.22144/ctu.jsi.2021.012

## PHÂN LẬP VÀ NHẬN DIỆN CÁC DÒNG NẤM MỐC HIỆN DIỆN TRÊN VỎ BƯỞI DA XANH VÀ BƯỞI NĂM ROI ĐƯỢC TRỒNG Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Kim Tươi<sup>2</sup> và Hà Thanh Toàn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Học viên Cao học Công nghệ thực phẩm Khóa 26, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Huỳnh Ngọc Thanh Tâm (email: hnttam@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 23/02/2021

Ngày nhận bài sửa: 12/03/2021

Ngày duyệt đăng: 28/04/2021

### Title:

Isolation and identification of fungi on the peels of Da Xanh and Nam Roi pomelo growing in the Mekong Delta

### Từ khóa:

Bưởi Da Xanh, bưởi Năm Roi, nấm mốc, PDA, trình tự gen đoạn ITS

### Keywords:

Da Xanh pomelo, fungi, internal transcribed spacer sequences, Nam Roi pomelo, PDA

### ABSTRACT

This study was performed to isolate and identify fungi associated with two cultivars of pomelo commonly growing in the Mekong Delta, Da Xanh and Nam Roi pomelo. The results show that both cultivars of pomelo demonstrated the high frequency of fungus isolate, which was seen in a total of 8 isolates. Isolated fungi were identified morphologically, microscopically using molecular standard procedures, ITS1, and ITS4. From the peel of Da Xanh pomelo, the isolated fungal genera were *Aspergillus brunneoviolaceus*, *A. aculeatus*, *A. carbonarius*, *Neurospora intermedia*. The identification by sequencing of ITS (internal transcribed spacer) gene revealed that 8 selected isolates from Nam Roi pomelo had 98 ÷ 100% identity to *A. niger*, *A. assiutensis*, *A. aculeatus*, *N. intermedia*, *Schizophyllum commune* and *Penicillium* sp. The identification of fungi strains presented on pomelo peel is the first step for proposing pretreatment and post-harvest technology, helping to prolong the shelf life of fresh pomelo.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục đích phân lập và nhận diện các dòng nấm mốc hiện diện trên bề mặt hai loại bưởi thường trồng ở Đồng bằng sông Cửu Long là bưởi Da xanh và bưởi Năm Roi. Kết quả cho thấy cả hai loại bưởi đều có tần suất phân lập nấm cao, với 8 dòng nấm được tìm thấy đối với mỗi giống bưởi. Các dòng nấm phân lập được xác định đặc tính hình thái và định danh theo phương pháp sinh học phân tử, sử dụng cặp mồi ITS1 và ITS4. Từ vỏ bưởi Da Xanh, các dòng nấm phân lập được là *Aspergillus brunneoviolaceus*, *A. aculeatus*, *A. carbonarius*, *Trichoderma asperellum* và *Neurospora intermedia*. Tương tự, việc xác định bằng giải trình tự gen trên đoạn ITS cho thấy 8 dòng phân lập được chọn lọc từ bưởi Năm Roi có mức độ đồng hình 98 ÷ 100% với *A. niger*, *A. assiutensis*, *A. aculeatus*, *N. intermedia*, *Schizophyllum commune* và *Penicillium* sp. Việc nhận diện các dòng nấm có trên vỏ bưởi là bước đầu tiên để đề xuất điều kiện tiền xử lý và bảo quản sau thu hoạch phù hợp, giúp kéo dài thời gian bảo quản bưởi tươi.

## 1. GIỚI THIỆU

Bưởi Năm Roi (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) và bưởi Da Xanh (*Citrus maxima* Merr., Burm. F.) là hai dòng bưởi phổ biến nhất ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long và có giá trị xuất khẩu cao. Xuất khẩu bưởi, đặc biệt là bưởi Da Xanh, đã được bắt đầu từ năm 2007 ở thị trường Đức và dần dần mở rộng sang các nước khác. Trong năm 2017, Việt Nam đã xuất khẩu hơn 10.000 tấn bưởi, tăng gấp đôi so với năm 2016. Điều này đòi hỏi việc sơ chế và xử lý sau thu hoạch cần được kiểm soát tốt để giúp kéo dài thời gian vận chuyển, bảo quản, đáp ứng được yêu cầu xuất khẩu. Một trong những tác nhân ảnh hưởng đến chất lượng bưởi sau thu hoạch là sự phát triển của vi sinh vật, đặc biệt là nấm mốc (Strano et al., 2017). Bên cạnh việc nhiễm nấm trước khi thu hoạch gây các bệnh thối nâu (*Phytophthora* sp.), bệnh thối nhũn (*Alternaria* sp.), bệnh thối thân (*Trinidadia atalensis* Pole-Evan, *Phomopsis citri* Fawcet), hay nhiễm nấm mốc xám (*Botrytis cinerea* Pers.), quả sau thu hoạch vẫn có khả năng bị hư hỏng do hoạt động của nấm mốc. Đặc biệt là hai dòng nấm mốc xanh *Penicillium digitatum* Sacc. (mốc xanh lá) và *P. italicum* Weh. (mốc xanh dương) hay sự phát triển của *Geotrichum andidum* Link gây thối rữa trong điều kiện bao gói kín (Smilanick et al., 2006; Gobet et al., 2011 ; Strano et al., 2017). Mặc dù vậy, một số nghiên cứu khác cũng đã nhận diện nhiều loại nấm mốc khác phát triển trên bề mặt vỏ quả có múi họ cam quýt, đặc biệt là dòng *Aspergillus* với tần suất phát hiện đến 80%, sau đó là các dòng *Candida*, *Mucor*, *Penicillium* và *Rhizopus* (Oviasogie et al., 2015). Công bố của Aleme và Guta (2017) cũng cho thấy các loài nấm *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Fusarium* sp., *Byssosclamyces* sp. và *Cladosporium* sp. được phát hiện có liên quan đến sự hư hỏng của màu cam. Trước đó, Nguyễn Văn Mười và ctv. (2005) cho thấy trên bề mặt vỏ cam Sánh có sự hiện diện của 2 dòng nấm chính là *Aspergillus niger* và *Penicillium digitatum* cùng một số *Aspergillus* sp. Một điều khá đặc biệt là không tìm thấy các nghiên cứu nhận diện vi sinh vật nói chung hay nấm mốc nói riêng trên bưởi, đặc biệt là giống bưởi nhóm Da Xanh và Năm Roi. Điều này cho thấy cần có bước phân lập và nhận diện chính xác dòng nấm phát triển trên hai dòng này để từ đó có phương thức xử lý phù hợp giúp kéo dài thời gian bảo quản, tăng giá trị sử dụng và đáp ứng được yêu cầu xuất khẩu.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

Bưởi Da Xanh được thu hoạch tại các hộ trồng bưởi theo vùng chỉ dẫn địa lý tại xã Phước Thạnh, huyện Châu Thành, tỉnh Bến Tre; trong khi bưởi Năm Roi thu hoạch tại các hộ trồng bưởi theo VietGAP tại xã Mỹ Hòa, thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Cả hai giống bưởi đều thu hoạch từ cây 5-8 năm tuổi. Sau khi thu hoạch, bưởi được rửa bằng nước sạch để loại bụi bẩn, tạp chất và các vi sinh vật gây hại, sau đó để ráo trước khi chuyển sang nhận diện các dòng nấm hiện diện trên bề mặt vỏ quả.

Môi trường phân lập là thạch PDA (Merck, Đức) được cung cấp bởi công ty TNHH Thiết bị - Hóa chất KHKT An Khánh (Cần Thơ).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phân lập các dòng nấm trên bề mặt vỏ bưởi Da Xanh và Năm Roi

Bưởi sau khi rửa được cắt nhỏ phần vỏ quả và được đặt trực tiếp trên bề mặt môi trường thạch PDA, tiến hành trong điều kiện vô trùng, ủ ở nhiệt độ 28°C. Từ ngày thứ hai đến ngày thứ ba, tiến hành phân lập các khuẩn lạc xuất hiện, quan sát màu và hình thái cơ bản để tách riêng từng nhóm. Cây chuyển nhiều lần trên môi trường PDA để thu được các dòng nấm mốc thuần chủng. Mỗi khuẩn lạc trong đĩa petri được xem là một dòng vi nấm và ghi ký hiệu để lưu trữ và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

#### 2.2.2. Định loại các dòng nấm vừa phân lập dựa trên đặc điểm hình thái

Cây chuyển các dòng nấm đã phân lập sang đĩa petri, ủ ở nhiệt độ 28°C. Quan sát và ghi nhận tất cả 3 đĩa petri của một dòng nấm và xác định các đặc điểm sau ở khuẩn lạc sau thời gian nuôi cấy 7 ngày: dạng mặt của khuẩn lạc (dạng hạt, dạng sợi nấm nằm ngang hay thẳng đứng); màu sắc của mặt trên khuẩn lạc (màu sắc của các khối bào tử trần tạo thành ở trên mặt khuẩn lạc); màu sắc của mặt dưới khuẩn lạc. Định loại vi thể theo đặc điểm bào tử đỉnh sợi nấm có hay không vách ngăn, màu sắc, nhẵn hoặc có gai, hình dạng, màu sắc của bào tử.

#### 2.2.3. Định danh các dòng nấm đã phân lập bằng phương pháp sinh học phân tử

Phương pháp tách chiết DNA tổng số của nấm mốc đã phân lập được thực hiện dựa theo phương pháp của Kwon et al. (2018). Các dòng nấm mốc được nuôi cấy trên màng cellophane, đặt trên môi trường PDA (nhiệt độ 28°C) trong thời gian 5÷10 ngày. Sau khi nuôi cấy, bào tử nấm được thu nhận và nghiền thành bột mịn sử dụng nitrogen lỏng.

DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp CTAB (cetyl trimethylammonium bromide). DNA được làm sạch bằng hỗn hợp phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) và kết tủa DNA bằng isopropanol. Kết tủa DNA được rửa bằng ethanol 70%, sau đó để khô ở nhiệt độ phòng và tái huyền phù DNA bằng cách cho thêm vào 60 µL TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).

DNA tổng số được sử dụng làm khuôn để tiến hành định danh bằng kỹ thuật phân tử dựa trên việc khuếch đại trình tự vùng ITS (internal transcribed spacer) với cặp mồi ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White et al., 1990) bằng kỹ thuật PCR rồi xác định trình tự vùng ITS theo nguyên lý của phương pháp Sanger cải

tiến. Trình tự này được so sánh với các trình tự ITS trên ngân hàng dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST để phân loại, nhận diện các dòng nấm mốc đã được phân lập.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả phân lập và định loại các dòng nấm dựa trên đặc điểm hình thái

Từ các mẫu vỏ bưởi Da Xanh và Năm Roi, 16 dòng nấm mốc khác nhau được phân lập trên môi trường PDA, với 8 dòng trên mỗi loại nguyên liệu. Kết quả tổng hợp số dòng nấm phân lập được trên vỏ bưởi Da Xanh và Năm Roi và tần suất xuất hiện của các dòng này dựa trên kết quả định danh sơ bộ theo đặc điểm đại thể và vi thể (Carlile et al., 2001) được tổng hợp ở Bảng 1.

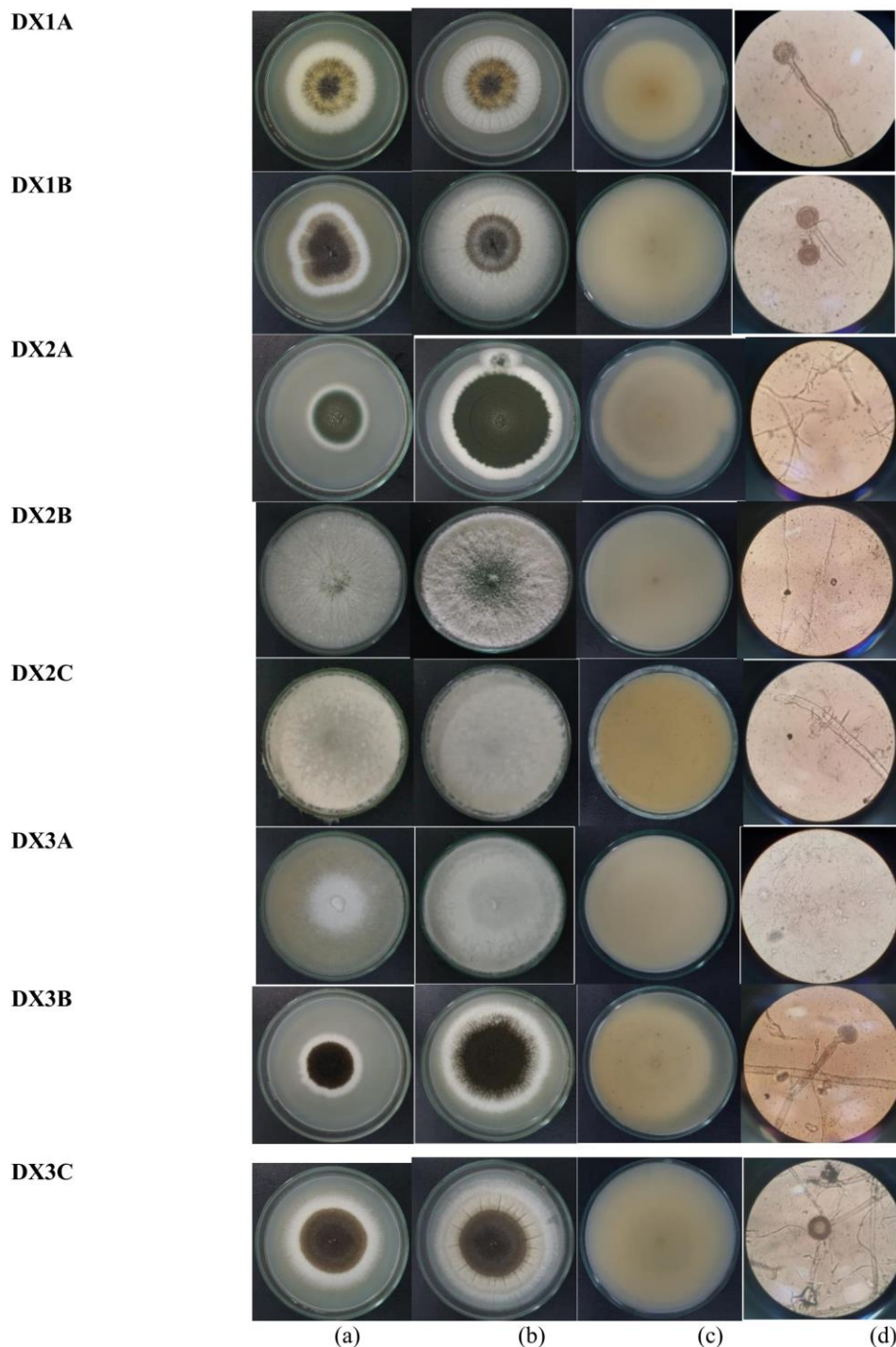
**Bảng 1. Tần suất xuất hiện các dòng nấm được phân lập từ bưởi Da Xanh và Năm Roi**

Loại bưởi		<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Neurospora sp.</i>	Khác
Da Xanh	Số mẫu	4-5/8	-	1/8	2-3/8
	Tần suất (%)	50-62,5		12,5	25-37,5
Năm Roi	Số mẫu	3/8	1/8	2/8	2/8
	Tần suất (%)	37,5	12,5	25,0	25,0

Dựa vào đặc điểm khuẩn lạc sau 3 và 7 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA cũng như khuẩn ty và bào tử dưới kính hiển vi ở vật kính 40X (Bảng 2, Hình 1 đối với các dòng phân lập trên bưởi Da Xanh và Bảng 3, Hình 2 đối với các dòng phân lập trên bưởi Năm Roi), có đến 4/8 dòng phân lập từ vỏ bưởi Da Xanh và 3/8 dòng phân lập từ vỏ bưởi Năm Roi thể hiện rất rõ có đặc điểm giống *Aspergillus sp.*, các dòng còn lại có đặc điểm giống *Penicillium sp.*, *Neurospora sp.* và một số dòng nấm chưa thể nhận diện cụ thể dựa vào đặc điểm hình thái. Nghiên cứu của Oviasogie et al. (2015) cũng cho thấy các loài *Aspergillus* có tần suất và sự phân bố cao nhất từ tất cả các vị trí lấy mẫu trên quả cam (80%). Trong khi đó, Aleme và Guta (2017) lại tìm thấy tần suất xuất hiện nhiều nhất trên cam là *Penicillium spp.* (19,2%) kế đến mới là *Aspergillus spp.* (13,46) và các dòng khác như *Mucor spp.* (5,76%) *Fusarium spp.* (3,84%), *Byssoschlamys spp.* (3,84%) *Rhizopus spp.*

(1,92%) và *Cladosporium spp.* (1,92%). Ngoài ra, còn có nhiều dòng khác không nhận diện được cũng như có sự xuất hiện của cả nấm men *Candida sp.* và *Saccharomyces sp.* được tìm thấy ở cam. Không xác định tần suất của các dòng nấm phân lập, tuy nhiên Rasool et al. (2014) cũng đã xác nhận có sự hiện diện của rất nhiều dòng nấm trên quả có múi họ cam quýt bị hư hỏng, đặc biệt là trên cam bao gồm *Geotrichum candidum*, *Diplodanatalensis*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma viride*, *Fusarium sp.*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus* và *A. ochraceous*.

Các kết quả tổng hợp cho thấy sự hiện diện chủ yếu của các dòng nấm trên bề mặt vỏ bưởi Da Xanh và Năm Roi thuộc *Aspergillus sp.* là chủ yếu, tuy nhiên, trên bề mặt vỏ bưởi Năm Roi còn có sự hiện diện của các dòng khác, điển hình như *Penicillium sp.* hay *Neurospora sp.*



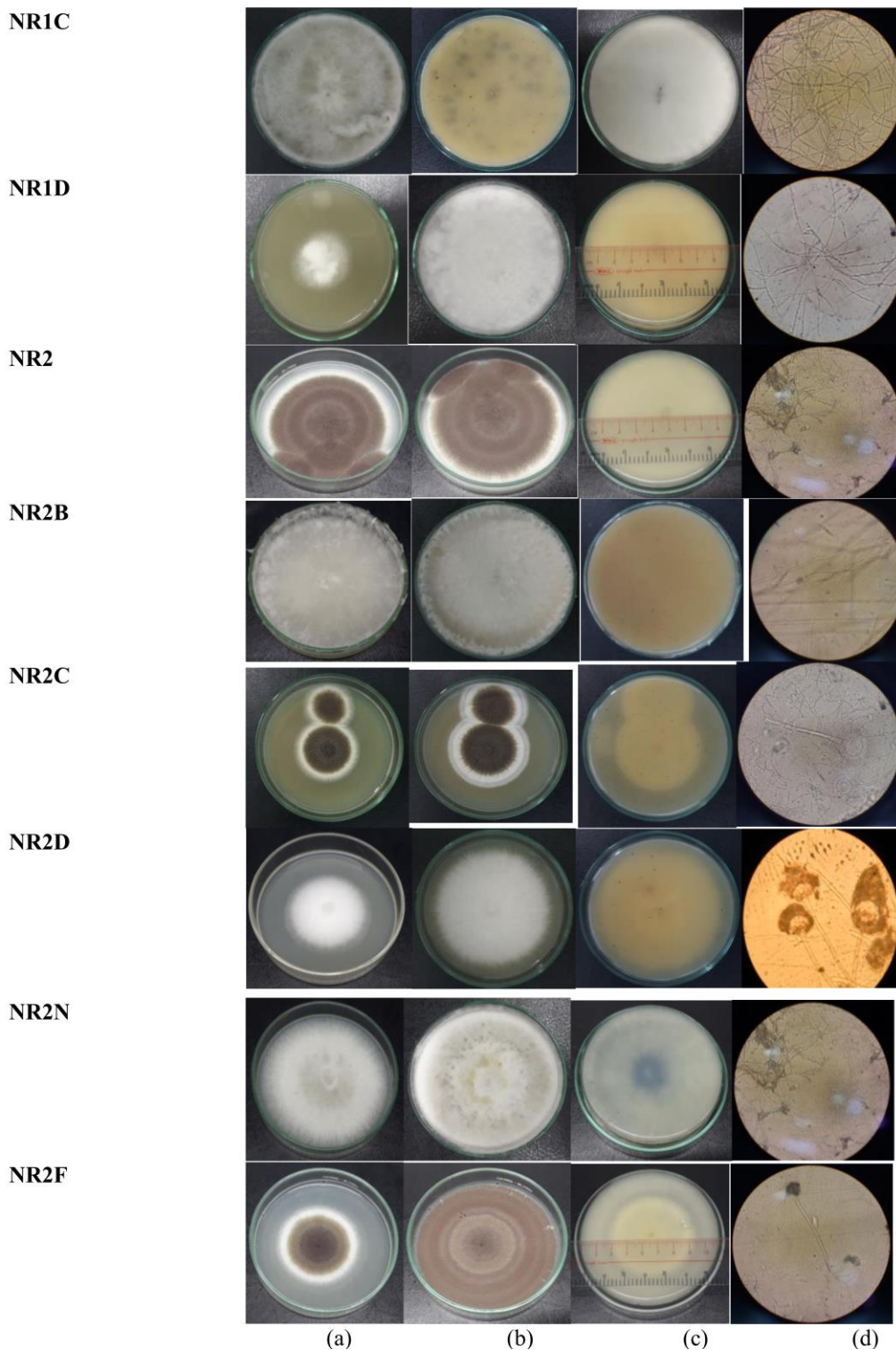
**Hình 1. Hình ảnh của các mẫu nấm mốc được phân lập trên vỏ bưởi Da Xanh**

*a) Mặt trước khuẩn lạc sau 3 ngày, b) Mặt trước khuẩn lạc sau 7 ngày; c) Mặt sau khuẩn lạc sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA; d) Khuẩn ty và bào tử dưới kính hiển vi vật kính x40*



**Bảng 2. Đặc điểm hình thái của các dòng nấm mốc phân lập từ buri Da Xanh**

Ký hiệu mẫu	Đặc điểm hình thái	Nhận xét
DX1A	Khuẩn lạc dạng tủa tròn, ngoài là lớp tơ trắng, không có giọt tiết, mặt phải khuẩn lạc ban đầu có màu vàng nhạt sau chuyển thành màu nâu sẫm, mặt trái vàng nhạt. Sợi nấm lan tơ mảnh, khi già bám sát vào môi trường tạo thành các nếp gấp sâu. Khuẩn ty phân nhánh có vách ngăn, cộng mang túi bào tử thể bình với bào tử đính một tầng. Bào tử hình cầu đến gần cầu, bề mặt có gai mịn, màu nâu.	Chi <i>Aspergillus</i>
DX1B	Khuẩn lạc bên ngoài là lớp tơ trắng mảnh, không có giọt tiết, bào tử màu nâu sẫm, càng vào tâm bào tử đen dần, mặt trái không màu. Khi già, sợi nấm bám sát vào bề mặt môi trường tạo thành các nếp gấp. Khuẩn ty phân nhánh có vách ngăn, cộng mang túi bào tử thể bình với bào tử đính. Túi bào tử hình cầu ở đỉnh. Bào tử có hình cầu, màu nâu đến đen, nhiều phân tầng có bề mặt nhám.	Chi <i>Aspergillus</i>
DX2A	Bề mặt phát triển mịn như nhung, có lông tơ hoặc bột, màu xanh lam đến xanh lục xám với viền trắng hẹp. Màu sắc thường tối dần theo độ tuổi. Sợi nấm có vách ngăn với các tế bào đơn bào có vách. Tế bào có hình bình cầu, đơn nguyên, nhỏ gọn (xếp gần nhau). Đầu bào tử non có thể tỏa ra. Bào tử đính là dạng nhẵn hoặc hơi thô, sắc tố xanh.	Chi <i>Aspergillus</i> và <i>Trichoderma</i>
DX2B	Lúc đầu tản nấm có màu trắng, hơi xốp, tơ nấm sợi dài mịn như bông, tản nấm chuyển dần sang màu xanh, khi về già nấm chuyển về màu xanh hoàn toàn với các giọt tiết. Bào tử có dạng hình cầu hoặc hình trứng, bề mặt nhẵn.	Chưa thể xác định được chi nấm
DX2C	Khuẩn lạc lan rộng, sợi tơ mịn như bông, không bào tử, không giọt tiết, tơ xốp, các sợi nấm ban đầu màu trắng, sau chuyển thành màu cam gạch. Sợi nấm có kích thước khá dài, tiết diện rộng, có gai, sần, phân bố như dạng tơ rối.	Có đặc điểm thuộc chi <i>Neurospora</i> sp. nhưng chưa rõ
DX3A	Bề mặt khuẩn lạc phát triển như dạng bụi, trắng, mịn bám sát vào bề mặt môi trường. Sợi nấm có vách ngăn, đầu sợi nấm phình to dạng cầu hoặc quả lê nhọn ở 2 đầu, không bào tử.	Chưa thể xác định được chi nấm
DX3B	Khuẩn lạc dạng tủa tròn, ngoài là lớp tơ trắng, không có giọt tiết. Bào tử đen huyền, có ánh kim, phát triển mạnh. Bào tử đính có túi bao bọc, cuống dạng bình không phân nhánh.	Có nhiều đặc điểm giống <i>Aspergillus</i> sp.
DX3C	Khuẩn lạc dạng tủa tròn, ngoài là lớp tơ trắng, không có giọt tiết. Bào tử nâu đất, dạng bụi lấm tẩm. Khuẩn ty phân nhánh có vách ngăn, cộng mang túi bào tử thể bình với bào tử đính. Bào tử hình cầu đến gần cầu, bề mặt có gai mịn, màu nâu.	Thuộc <i>Aspergillus</i> sp. với nhiều đặc điểm tương tự <i>A. aculeatus</i>



**Hình 2. Hình ảnh của các mẫu nấm mốc được phân lập trên vỏ bưởi Năm Roi**

*a) Mặt trước khuẩn lạc sau 3 ngày, b) Mặt trước khuẩn lạc sau 7 ngày; c) Mặt sau khuẩn lạc sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA; d) Khuẩn ty và bào tử dưới kính hiển vi vật kính x40*

**Bảng 3. Đặc điểm hình thái của các dòng nấm mốc phân lập từ bưởi Năm Roi**

Ký hiệu mẫu	Đặc điểm hình thái	Nhận xét
NR1C	Ban đầu khuẩn ty mọc nhanh lan khắp đĩa, các sợi nấm nhẵn, có màu trắng xám, xuất hiện giọt tiết. Dần dần khuẩn lạc chuyển sang màu xám đậm, mặt trái từ vàng nhạt chuyển thành màu vàng nâu.	Giống với <i>Neurospora</i> sp.
NR1D	Khi non, sợi khuẩn ty màu trắng, bề mặt nấm mô, mặt sau đĩa có màu trắng, khi già sợi khuẩn ty chuyển sang màu trắng xám, phát triển nhanh mọc lan khắp đĩa, mặt trái đĩa chuyển sang màu vàng.	Khó xác định, gần giống <i>Neurospora</i> nhưng đặc điểm không rõ
NR2	Khuẩn lạc màu đen, mặt trái khuẩn lạc không màu, môi trường thạch nuôi cấy không màu, khuẩn lạc không có vết khía xuyên tâm, không có giọt tiết.	Giống <i>Penicillium</i> sp. với các đặc điểm rõ nét về hình dạng, màu sắc khuẩn lạc
NR2B	Ban đầu môi trường nuôi cấy tạo thành một thảm sợi nấm hình tròn dày. Sau đó sợi nấm kéo dài và tiếp tục phát triển lan khắp đĩa, mặt phải từ màu vàng nhạt chuyển sang màu vàng đậm.	Giống với <i>Neurospora</i> sp. với đặc điểm tương tự DX2C
NR2C	Khuẩn lạc dạng tủa tròn, ngoài là lớp tơ trắng, không có giọt tiết, mặt phải khuẩn lạc ban đầu có màu vàng nhạt sau chuyển thành màu nâu sẫm, mặt trái không màu. Sợi nấm lan tơ mảnh, khi già bám sát vào môi trường tạo thành các nếp gấp sâu.	Giống với <i>Aspergillus</i> sp., có các tính chất của <i>A. aculeatus</i> hay <i>A. brunneoviolaceus</i>
NR2D	Tán nấm màu trắng, sợi khuẩn ty mọc lòi trên môi trường nuôi cấy, sợi nấm kéo dài và phát triển giống như lông vũ, mặt phải và mặt trái khuẩn lạc từ không màu chuyển sang màu vàng nhạt.	Giống với <i>Aspergillus</i> sp.
NR2N	Khi non sợi khuẩn ty màu trắng mọc thưa, tán nấm đều, tạo vòng có màu xám. Khi trưởng thành sợi khuẩn ty chuyển màu xám tro, không mọc bông xốp, vòng chuyển sang màu vàng.	Giống với <i>Aspergillus</i> sp.
NR2F	Khi non khuẩn lạc dạng tủa tròn, ngoài là lớp tơ trắng, không có giọt tiết, tâm có màu đen. Khi trưởng thành chuyển sang dạng bào tử có màu đen, tâm chuyển sang màu vàng nâu, mặt trái khuẩn lạc từ màu trắng chuyển sang màu vàng.	Khó xác định được tính chất, giống với chi <i>Aspergillus</i> và cả chi <i>Alternaria</i>

**3.2. Kết quả định danh một số dòng nấm đã phân lập bằng kỹ thuật sinh học phân tử**

Việc nhận diện chính xác các dòng nấm hiện diện trên bề mặt vỏ quả bưởi Da Xanh và Năm Roi cần phải được thực hiện dựa trên việc trích ly DNA tổng số và sử dụng kỹ thuật PCR để khuếch đại trình tự vùng ITS để xác định đoạn gen tương ứng và so sánh độ tương đồng với cơ sở dữ liệu Genbank (NCBI). Dữ liệu về trình tự ITS rDNA của các dòng nấm được phân lập từ quả bưởi Năm Roi và Da Xanh được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4 cho thấy chuỗi trình tự PCR của vùng ITS rDNA có chiều dài thay đổi, ngoại trừ 2 mẫu DX1B và NR2D chỉ có chiều dài lần lượt là 229 bp và 308 bp, không đủ để nhận diện được đặc điểm của các dòng nấm thu nhận, mẫu tương ứng với dòng nấm phân lập R2C có chiều dài đến 883 bp, còn lại 13 dòng nấm được phân lập từ vỏ bưởi Năm Roi và Da Xanh đều có chiều dài dao động trong khoảng 529 đến 611 bp – nằm trong khoảng kích

thước phù hợp của các dòng nấm đã được định danh ở cơ sở dữ liệu Genbank theo cùng vùng ITS rDNA. Trên thực tế, với chuỗi trình tự 229 bp và 308 bp, việc so sánh độ tương đồng với các dòng nấm sẵn có trên cơ sở dữ liệu có thể được thực hiện khi so sánh với các trình tự gen mã hóa 28S rRNA (xấp xỉ 250 bp, Trần Thanh Trúc, 2013). Tuy nhiên, việc so sánh này không tạo sự tương đồng khi sử dụng cặp mồi khác nhau. Đó chính là lý do cho việc nhận diện các dòng nấm được phân lập từ vỏ bưởi Năm Roi và Da Xanh đều được so sánh với các dòng nấm đã được định danh bằng cách khuếch đại PCR vùng ITS, đồng thời lựa chọn các dòng có chiều dài chuỗi trình tự tương đồng. Không thực hiện trên quả có múi, tuy nhiên nghiên cứu của Kwon et al. (2018) cũng đã cho thấy kỹ thuật giải trình tự bằng cách khuếch đại vùng ITS với đoạn gen dài 534 đến 608 bp là phù hợp để nhận diện các dòng nấm gây bệnh trên quả dâu tằm, tỷ lệ tương đồng từ 88,6 đến 100%.

**Bảng 4. Kết quả bước đầu định danh các dòng nấm mốc phân lập từ bưởi Da Xanh và Năm Roi**

TT	Ký hiệu mẫu	ITS rDNA		Chiều dài đoạn gen (bp)	Nguồn dữ liệu trên Genbank
		Dòng tương đồng	%tương đồng		
1	DX1A	<i>Aspergillus brunneoviolaceus</i>	100	549	<i>A. brunneoviolaceus</i> LrSF7, (MG543687.1)
2	DX1B	Không xác định được	-	229	-
3	DX2A	<i>Aspergillus</i> sp.	99,82	544	<i>Aspergillus</i> sp. Y43, (MT729947.1)
4	DX2B	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	555	<i>Trichoderma asperellum</i> ACCC32912 (MF871566.1)
5	DX2C	<i>Neurospora intermedia</i>	99,46	551	<i>Neurospora intermedia</i> isolate 29 (MH389058.1); WS15JB14(KT844676.1)
6	DX3A	<i>Aspergillus</i> sp./ <i>Aspergillus aculeatus</i>	100/ 99,81	547	<i>Aspergillus</i> sp. Y43 (MT72997.1); <i>A. aculeatus</i> yicha19 (MK418753.1)
7	DX3B	<i>Aspergillus carbonarius</i>	99,82	555	<i>A. carbonarius</i> DQ-23 (KY022748.1)
8	DX3C	<i>Aspergillus aculeatus</i>	99,81	529	<i>A. aculeatus</i> strain B (MK788185.1)
9	NR1C	<i>Neurospora intermedia</i>	99,28	558	<i>Neurospora intermedia</i> WS155B14 (KT844676.1)
10	NR1D	<i>Schizophyllum commune</i>	100	592	<i>Schizophyllum commune</i> AO-DEBCR7 (KT2295671)
11	NR2	<i>Penicillium</i> sp./ <i>Penicillium oxalicum</i>	97,27/ 96,4	611	<i>Penicillium</i> sp. ZY04 (MH6227661)/ <i>P. oxalicum</i> (ED434727.1)
12	NR2B	<i>Neurospora intermedia</i>	100	542	<i>N. intermedia</i> WS1551314(KT844676.1)
13	NR2C	<i>Aspergillus aculeatus</i>	91,05	883	<i>A. aculeatus</i> ASV10 (KP965728.1)
14	NR2D	Không xác định được	-	308	-
15	NR2N	<i>Aspergillus assiutensis</i>	99,62	529	<i>A. assiutensis</i> SCAU170 (MH464418.1)
16	NR2F	<i>Aspergillus niger</i>	99,62	530	<i>A. niger</i> GZ-4 (KT726919.1)

Kết quả nhận diện các dòng nấm đã phân lập bằng kỹ thuật sinh học phân tử cho thấy trong điều kiện nghiên cứu, có 14/16 dòng nấm đã được nhận diện, trong đó các dòng nấm thuộc nhóm *Aspergillus* là 8/14 chiếm tần suất 57,1%, kể đến là *N. intermedia* (3/14, 21,4%), còn lại là *Trichoderma asperellum* (1/14, nhận diện từ bưởi Da Xanh), *Schizophyllum commune* (1/14) và *Penicillium* sp. hay có tính chất giống *Penicillium oxalicum* (1/14) đều nhận diện trên bưởi Năm Roi. Nhìn chung, bưởi Năm Roi có sự phát triển của đa dạng các dòng nấm mốc hơn (4 dòng khác nhau/7 mẫu đã được nhận diện), trong phạm vi khảo sát, trên bề mặt vỏ bưởi Da Xanh có sự xuất hiện của 3 dòng bao gồm: *Aspergillus* sp. (5/7 dòng), *N. intermedia* (1/7) và *Trichoderma asperellum* (1/7). Sự khác biệt này có lẽ cũng phù hợp với việc xử lý bảo quản bưởi Da Xanh thường thuận lợi hơn bưởi Năm Roi nhờ vào hiệu quả ức chế nấm mốc thuộc *Aspergillus* sp. cao hơn khi so sánh với *Penicillium* sp. – thường cần phải kiểm soát bằng nhiệt độ thấp (Shaikh & Chavan, 2017). Một điểm đặc biệt là sự hiện diện của *Schizophyllum commune* có tính chất gần với

loài nấm lớn, thường ở gỗ mục nát, nhưng cũng có thể gây bệnh cho người. Tuy nhiên, đây là dòng nấm được liệu, có tác dụng điều hòa miễn dịch và ngăn sự phát triển khối u (Reddy et al., 2017), đồng thời là nguồn thu nhận hiệu quả các enzyme thuộc nhóm cellulase và xylanase (Bray & Clarke, 1995).

Trong số các dòng thuộc *Aspergillus* sp., *A. brunneoviolaceus*, *A. carbonarius* và cả *A. aculeatus* đều cần phải được kiểm soát để ngăn ngừa các tác động gây thối rữa – một hư hỏng thường gặp ở bưởi nói riêng cũng như quả họ cam quýt được bao kín để kiểm soát sự hô hấp. Ngoài ra, *A. brunneoviolaceus* còn là loài aspergilli đen, có khả năng tạo ra ochratoxin A (Varga et al., 2011). Thậm chí, *A. niger* cũng được xác nhận là dòng nấm có thể gây hư hỏng trên cam ở Ibadan (Akintobi et al., 2011). Oviasogie et al. (2015) cũng xác nhận các nấm bệnh liên quan đến sự hư hỏng của cam (*Citrus sinensis*) là *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp. và *Rhizopus* sp. Trong nghiên cứu này, chỉ có dòng *Aspergillus* và *Penicillium* có mặt trên bưởi. Trong khi đó, *Neurospora* cũng là một trong những



loại nấm sợi phát triển nhanh nhất, xấp xỉ 10 cm mỗi ngày. Giống như nấm mốc nói chung, *Neurospora* phát triển bằng cách kéo dài các đầu của sợi nấm và hình thành các ngọn mới như các nhánh ngay sau ngọn chính. *Neurospora* được phát hiện là những loại nấm mốc làm hỏng trái cây, gây bệnh mốc cam (Gladieux et al., 2020). Các dòng *Trichoderma* cũng là nguyên nhân gây thối nhũn, tạo nên các đốm có màu nâu cao đến màu xanh lá cây trên quả có múi. Một trong những ưu điểm thường được quan tâm của nấm mốc là hiệu quả sinh tổng hợp enzyme dễ dàng lại chính là nguyên nhân dẫn đến sự hư hỏng tăng nhanh của quả sau khi nhiễm nấm. Sự nhiễm nấm trên bề mặt sẽ xúc tác sự tạo thành enzyme, các chất chuyển hóa thứ cấp và một số chất độc hại để phân hủy thức ăn, tạo nguồn chất dinh dưỡng cho sự sinh trưởng và phát triển của chúng. Các chất độc hại sinh ra trong quá trình này vẫn còn nguyên và làm hỏng trái cây, không an toàn cho con người (Shaikh & Chavan, 2017).

Nghiên cứu cho thấy việc rửa bưởi trước khi bảo quản đã giúp hạn chế hiệu quả sự phát triển của nấm mốc, thể hiện ở sự hiện diện chỉ một số ít dòng nấm trên bề mặt vỏ quả bưởi Năm Roi và Da Xanh, không có sự hiện diện của 2 dòng phổ biến là *Penicillium digitatum* Sacc. (tạo mốc xanh lá) và *P. italicum* Weh. (mốc xanh dương). Mặc dù vậy, các dòng nấm này vẫn cần được kiểm soát tốt hơn và định hướng cho việc xác định giải pháp tiên xử lý cũng như bảo quản sau thu hoạch tiếp theo.

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã cho thấy vẫn có sự hiện diện của nấm mốc trên bề mặt vỏ quả bưởi ngay sau khi bưởi đã được rửa nhằm vệ sinh bề mặt quả. *Aspergillus* sp. và *N. intermedia* đều được tìm thấy trên bề mặt bưởi Da Xanh và Năm Roi, trong khi đó, bưởi Da Xanh còn có sự hiện diện của *Trichoderma asperellum* và ở bưởi Năm Roi có mặt của *Penicillium* sp. và *Schizophyllum commune*. Kết quả nghiên cứu đã giúp khẳng định các dòng nấm cần được quan tâm trong việc tiên xử lý và bảo quản sau thu hoạch, giúp kéo dài thời gian bảo quản bưởi Da Xanh và bưởi Năm Roi ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long, đáp ứng yêu cầu xuất khẩu.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện thông qua đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ “Nghiên cứu công nghệ sơ chế, bảo quản bưởi Da Xanh, Năm Roi phục vụ yêu cầu xuất khẩu” (mã số: CT2020.01.TCT.04) thuộc Chương trình khoa học và công nghệ cấp Bộ CT2020.01 do Bộ Giáo dục và Đào tạo quản lý. Ban

chủ nhiệm đề tài cảm ơn sự tham gia nghiên cứu của sinh viên Quách Kim Quyên và sinh viên Nguyễn Thị Kim Hoàng (lớp Vi sinh vật học khóa 43, Trường Đại học Cần Thơ).

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Akintobi, A. O., Okonko, I. O., Agunbiade, S. O., Akano, O. R & Onianwa, O., (2011). Isolation and identification of fungi associated with the spoilage of some selected fruits in Ibadan South Western, Nigeria. *Academia Arena*, 3(11):1-7.
- Aleme, M. & Guta, M., (2017). Isolation and characterization of fungi from the fruit of orange and tomato in Jimma town market sellers, South West Ethiopia. *International Journal of Advanced Research*, 5(3): 108-115.
- Bray, M. R. & Clarke, A. J., (1995). The structure and function relationship of *Schizophyllum commune* xylanase A. *Progress in Biotechnology*, 10: 147-163.
- Carlile, M. J., Watkinson S. C. & Gooday, G. W., (2001). *The Fungi.*, second edition, Academic Press.
- Gladieux, P., De Bellis, F., Hann-Soden, C., Svedberg, J., Johannesson, H. & Taylor, J. W., (2020). *Neurospora* from natural populations: population genomics insights into the life history of a model microbial eukaryote. In: Dutheil J. (eds) *Statistical Population Genomics. Methods in Molecular Biology*, vol 2090. Humana, New York, NY.
- Gobet, J., Zavanella, C., Hermant, N., Comminellis, C., & Ippolito, A., (2014). U.S. Patent Application No. 14/118,295.
- Kwon, O. C., Ju, W. T., Kim, H. B., Sung, G. B., & Kim, Y.S., (2018). Isolation and identification of postharvest spoilage fungi from mulberry fruit in Korea. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 37(3): 221-228.
- Nguyễn Văn Mười, Đỗ Thị Tuyết Nhung và Lâm Văn Mãnh (2005). Phân lập sơ bộ nấm mốc hiện diện ở cam sành sau thu hoạch và biện pháp kiểm soát chúng trong bảo quản. *Chương trình VLIR-IUC CTU- Đề án R.2 “Cây ăn trái”. Hội thảo quốc gia “Cây có múi, xoài và khóm”* (trang 156 -161), NXB Nông nghiệp.
- Oviasogie, F. E., Ogofigure, A. G, Beshiru, A., Ode, J. N. & Omeje F. I., (2015). Assessment of fungal pathogens associated with orange spoilage. *African Journal of Microbiology Research*, 9(29): 1758-1763.
- Rasool, A., Zaheer, I. & Iram, S., (2014). Isolation and characterization of post-harvest fungal pathogens of *Citrus* varieties from the domestic markets of Rawalpindi and Islamabad. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 5(10): 408-418.

- Reddy, B. P. K., Uma Rajashekhar, A., HariKrishna, P. & Lavanya, A. V. N., (2017). Cultural and physiological studies on wild mushroom specimens of *Schizophyllum commune* and *Lentinula edodes*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(7): 2352-2357.
- Shaikh, N. I. & Chavan, A. M., (2017). Isolation and characterization of *Penicillium* sp. from citrus. *International Journal of Current Research*, 9(7): 53465-53466.
- Smilanick, J. L., Mansour, M. F., Gabler, F. M., & Goodwine, W. R., (2006). The effectiveness of pyrimethanil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control citrus green mold after harvest. *Postharvest Biology and Technology*, 42(1): 75-85.
- Strano, M. C., Altieri, G., Admane, N., Genovese, F. & Di Renzo, G. C., (2017). Advance in citrus postharvest management: diseases, cold storage and quality evaluation. *Citrus Pathology* (Edited by Harsimran Gill), Intech Open.
- Trần Thanh Trúc, (2013). *Phân lập và tuyển chọn dòng nấm mốc Aspergillus niger sinh tổng hợp pectin methylesterase hoạt tính cao*. Luận án tiến sĩ ngành Vi sinh vật học, Trường Đại học Cần Thơ.
- Varga, J., Frisvad, J. C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G. & Samson, R. A., (2011). New and revisited species in *Aspergillus* section Nigri. *Studies in Mycology*, 69(1):1-17.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. & Taylor, J., (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, D.H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White, *PCR protocols, a guide to methods and applications*. San Diego, California: Academic Press. p.315-322.