

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

LÊ ĐÌNH QUYỀN

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG VI KHUẨN
***Pseudomonas* SP. ĐA3.1 TRONG KIỂM SOÁT NẤM**
HẠI CÂY TRỒNG *Rhizoctonia* VÀ *Fusarium*

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Hà Nội – 2012

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

**NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG VI KHUẨN
Pseudomonas SP. ĐA3.1 TRONG KIỂM SOÁT NẤM
HẠI CÂY TRỒNG *Rhizoctonia* VÀ *Fusarium***

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60 42 30

Học viên: Lê Đình Quyền

Hướng dẫn khoa học: PGS. TS. QUYỀN ĐÌNH THI

Hà Nội - 2012

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, tôi đã nhận được sự giúp đỡ của PGS TS Quyền Đình Thi, Trưởng phòng Công nghệ Sinh học Enzyme, Phó Viện trưởng Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, người đã định hướng nghiên cứu, tận tình hướng dẫn, sửa luận văn và tạo mọi điều kiện về kinh phí, hóa chất và trang thiết bị nghiên cứu giúp tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ tận tình của TS Đỗ Thị Tuyên cùng tập thể Phòng Công nghệ sinh học enzyme.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến các thầy, các cô trong viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, trường Đại học Thái Nguyên đã tạo điều kiện cho tôi trong quá trình học tập.

Tôi xin cảm ơn gia đình, bạn bè và cơ quan công tác, luôn động viên và là động lực tinh thần để tôi hoàn thành luận văn này.

Hà Nội, tháng 12 năm 2012

Học viên

Lê Đình Quyền

MỤC LỤC

	Trang
MỞ ĐẦU.....	10
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	12
1.1 Bệnh cây trồng do nấm <i>Fusarium</i> và <i>Rhizocronia</i> gây ra	12
1.1.1 Đặc điểm sinh học của nấm <i>Fusarium</i> và <i>Rhizocronia</i> hại cây trồng	12
1.1.2 Tình hình bệnh hại cây trồng do nấm <i>Fusarium</i> và <i>Rhizocronia</i> gây ra tại Việt Nam	15
1.1.3 Biện pháp phòng trừ nấm bệnh hại cây trồng	16
1.2 Vi khuẩn <i>Pseudomonas</i>	18
1.2.1 Khái quát về vi khuẩn <i>Pseudomonas</i>	18
1.2.2 Tình hình nghiên cứu ứng dụng của chủng <i>Pseudomonas</i> trong kiểm soát nấm bệnh trên thế giới.....	19
1.2.3 Tình hình nghiên cứu ứng dụng các chế phẩm sinh học kiểm soát nấm bệnh tại Việt Nam	22
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP.....	24
2.1 Chủng giống	24
2.2 Hóa chất	24
2.2.1. Dung dịch và đệm	24
2.2.2 Môi trường nuôi cấy.....	25
2.3 Thiết bị	25
2.4 Sàng lọc chủng <i>Pseudomonas</i> có khả năng ức chế nấm <i>F. oxysporum</i> và <i>R. solani</i> cao.....	26
2.5 Phương pháp thử hoạt tính ức chế nấm.....	26
2.6 Các phương pháp sinh học phân tử	26
2.6.1 Tách chiết DNA tổng số.....	26
2.6.2 Khuếch đại gen bằng PCR	27
2.6.3 Gắn sản phẩm PCR vào pJET1.2	27
2.6.4 Biến nạp plasmid.....	27
2.6.5 Tách chiết plasmid	28
2.6.6 Cắt plasmid bằng enzyme giới hạn	29
2.6.7 Điện di trên gel agarose	29

2.6.7	Độc trình tự nucleotide.....	29
2.7	Tách chiết hoạt chất thứ cấp bằng dung môi phân cực.....	30
2.8	Sắc kí cột.....	30
2.9	Sắc kí bản mỏng.....	30
2.10	Sắc ký khối phổ.....	30
2.11	Phân tích cấu trúc bằng cộng hưởng từ hạt nhân.....	31
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....		32
3.1	Sàng lọc chủng vi khuẩn có độc lực cao với nấm <i>F. oxysporum</i> và <i>R. solani</i>	32
3.2	Định tên chủng.....	32
3.3	Hoạt tính ức chế nấm của dịch lọc ngoại bào chủng <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1.....	34
3.4	Đánh giá tính chất lí hóa của dịch lọc ngoại bào chủng <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1.....	35
3.4.1	Ảnh hưởng của nhiệt độ.....	35
3.4.2	Ảnh hưởng của pH.....	37
3.4.3	Ảnh hưởng của proteinase K.....	38
3.5	Tinh sạch hoạt chất thứ cấp ngoại bào ức chế nấm.....	39
3.5.1	Tách chiết và tinh sạch hoạt chất từ dịch nuôi cấy ngoại bào từ chủng <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1.....	39
3.5.2	Xác định cấu trúc hoạt chất tinh sạch từ <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1.....	40
3.5.3	Đánh giá tính chất lí hóa của hoạt chất tinh sạch.....	44
3.5.4	Hoạt tính ức chế tối thiểu (MIC) của hoạt chất PCA với nấm <i>R. solani</i> và <i>F. oxysporum</i>	45
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....		48
KẾT LUẬN.....		48
ĐỀ NGHỊ.....		48
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....		49
Tài liệu tiếng Việt:.....		49
Tài liệu tiếng Anh:.....		50
PHỤ LỤC.....		54

DANH MỤC BẢNG

	Trang
Bảng 2.1. Các dung dịch và đệm được sử dụng	24
Bảng 2.2. Các thiết bị được sử dụng.....	25
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ dịch lọc tế bào <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1 lên sinh trưởng của <i>F. oxysporum</i>	35
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ dịch lọc tế bào <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1 lên sinh trưởng của sợi nấm <i>R. solani</i>	35
Bảng 3.3. Dữ liệu phổ NMR của hoạt chất ức chế nấm tinh sạch từ <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1 (CDCl ₃ , ¹ H: 500 MHz; ¹³ C: 125,76 MHz) δppm.....	41

DANH MỤC HÌNH

Trang

Hình 1.1. Hình thái nấm <i>F. oxysporum</i> trên đĩa PDA (A) và bào tử nấm <i>F. oxysporum</i> soi trên kính hiển vi (B).....	12
Hình 1.2. Hình thái nấm <i>R. solani</i> trên đĩa PDA (A) và sợi nấm <i>R. solani</i> soi trên kính hiển vi (B)	13
Hình 1.3. Hình ảnh khuẩn lạc chủng <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1 trên đĩa thạch (A) và hình thái tế bào (B).....	18
Hình 3.1. Chọn lọc chủng vi khuẩn ức chế nấm <i>F. oxysporum</i> (A) và <i>R. solani</i> (B)	32
Hình 3.2. Điện di đồ DNA tổng số (A); Sản phẩm PCR (B): với khuôn DNA tách chiết từ chủng <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1; Dòng plasmid tái tổ hợp được lựa chọn (C); Sản phẩm cắt vector tái tổ hợp bằng <i>Xba</i> I và <i>Xho</i> I (D). M: Marker.	33
Hình 3.3. Cây phân loại chủng <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1 (HQ914782.1: <i>P. aeruginosa</i> strain TAUC7; HM597240.1: <i>Pseudomonas</i> sp. MB65; HM439411.1: <i>P. aeruginosa</i> strain PCP26; FN645730: <i>P. aeruginosa</i>)	33
Hình 3.4. Hoạt tính ức chế sinh trưởng <i>F. oxysporum</i> và <i>R. solani</i> của chủng <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1 ở các nồng độ khác nhau sau 5 ngày nuôi cấy	34
Hình 3.5. Hình ảnh ức chế phát triển của dịch nuôi cấy ngoại bào từ chủng <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1 với nấm <i>F. oxysporum</i> (A→D) và <i>R. solani</i> (E→H) sau 5 ngày nuôi cấy ở các nồng độ khác nhau. (A, E: nồng độ 1%; B, F: nồng độ 10%; C, G: nồng độ 20%; D, H: nồng độ 50%; 1: đĩa đối chứng, 2: đĩa thí nghiệm).	34
Hình 3.6. Hoạt tính ức chế sinh trưởng <i>F. oxysporum</i> và <i>R. solani</i> của chủng <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1 sau khi xử lý ở các nhiệt độ sau 5 ngày nuôi cấy	36
Hình 3.7. Hoạt tính ức chế sinh trưởng của dịch ngoại bào <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1 sau khi xử lý ở 100°C đối với <i>F. oxysporum</i> và <i>R. solani</i> sau 5 ngày nuôi cấy. (A, C: <i>F. oxysporum</i> ; B, D: <i>R. solani</i> ; C: không xử lý; D: Đối chứng âm).....	36
Hình 3.8. Hoạt tính ức chế sinh trưởng <i>F. oxysporum</i> và <i>R. solani</i> của dịch lọc ngoại bào <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1 sau khi xử lý ở các độ pH khác nhau.....	37
Hình 3.9. Hoạt tính ức chế sinh trưởng của dịch lọc ngoại bào chủng <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1 sau khi xử lý pH đối với <i>F. oxysporum</i> (A→D) và <i>R. solani</i> (E→H) sau 5	

ngày thử nghiệm. (A, E: pH 2; B, F: pH 4; C, G: pH 8; D, H: pH 10). 1: Môi trường nuôi cấy ban đầu; 2: Dịch nuôi cấy.....	37
Hình 3.10. Hoạt tính ức chế sinh trưởng <i>F. oxysporum</i> và <i>R. solani</i> của dịch lọc ngoại bào <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1 sau khi xử lý với proteinase K ở nồng độ khác nhau sau 5 ngày xử lý.....	38
Hình 3.11. Hoạt tính ức chế sinh trưởng của dịch lọc ngoại bào <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1 sau khi xử lý proteinase K đối với nấm <i>F. oxysporum</i> (A, B) và <i>R. solani</i> (C, D) (A,C: 0,1 mg/ml proteinase K; B,D: 0,5 mg/ml Proteinase K; 1,2: Đĩa thí nghiệm; 3: Dịch không xử lý; 4: Đối chứng âm).....	39
Hình 3.12. Sắc ký đồ TLC hoạt chất tinh sạch từ <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1 (A) (1: hoạt chất tinh sạch, 2: dịch chiết). Thử hoạt tính ức chế <i>F. oxysporum</i> của các phân đoạn tinh sạch (B) (1: đối chứng nước cất, 2: methanol, 3: dịch sau chiết, 4: dịch nuôi cấy; 5-7: các phân đoạn tinh sạch).....	40
Hình 3.13. Phổ ^{13}C (A) và phổ ^1H (B) của hoạt chất ức chế nấm tinh sạch từ chủng <i>P. aeruginosa</i> ĐA3.1.....	41
Hình 3.14. So sánh dữ liệu phổ NMR (A, B) và cấu tạo phân tử (C, D) của hoạt chất tinh sạch từ chủng <i>P. fluorescens</i> 2-79 (A), (C) và chủng <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1 (B), (D).....	42
Hình 3.15. Cấu trúc phân tử của PCA tinh sạch từ chủng <i>P. aeruginosa</i> ĐA3.1	42
Hình 3.16. Quy trình tinh sạch hoạt chất PCA từ dịch nuôi cấy của <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1 phân lập ở Việt Nam.....	43
Hình 3.17. Hoạt tính kháng nấm <i>F. oxysporum</i> và <i>R. solani</i> của hoạt chất PCA tinh sạch sau khi xử lý với nhiệt độ (A), với pH khác nhau (B), với proteinase K (C)	44
Hình 3.18. Hoạt tính kháng nấm <i>F. oxysporum</i> (A→D) và <i>R. solani</i> (E→H) của hoạt chất PCA tinh sạch xử lý với nhiệt độ (A, E), với pH khác nhau (B, C, F, G), với proteinase K (D, H) sau 5 ngày nuôi cấy.....	44
Hình 3.19. Khả năng ức chế nấm <i>F. oxysporum</i> và <i>R. solani</i> của hoạt chất PCA tinh sạch từ chủng <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1	45
Hình 3.20. Hoạt tính ức chế tối thiểu của PCA với <i>F. oxysporum</i> (A) và <i>R. solani</i> (B) tách chiết và tinh sạch từ dịch nuôi cấy chủng <i>Pseudomonas</i> sp. ĐA3.1 ở nồng độ: 30, 40, 50, 60, 70, 80 $\mu\text{g/ml}$	46

BẢNG CHỮ VIẾT TẮT

bp	Base pair
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
dNTP	2'-Deoxynucleoside 5'-triphosphate
ĐC	Đối chứng
EtBr	Ethidium bromide
HCN	Hydrogen Cyanide
MIC	Minimum Inhibition Concentrate
IPM	Integrated Pests Management
PCR	Polymerase chain reaction
PCA	Phenazine-1-Carboxylic Axit
TLC	Thin Layer Chromagraphy
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris EDTA
TBE	Tris boric acid EDTA
v/v	volume/volume (thể tích/thể tích)
w/v	weight/volume (khối lượng/thể tích)

MỞ ĐẦU

Hàng năm trên thế giới, bệnh cây gây ra những tổn thất to lớn cho sản xuất nông nghiệp. Chúng phá hủy đến 537,3 triệu tấn các loại nông sản chủ yếu, chiếm 11,6% tổng sản lượng nông nghiệp trên thế giới. Trong các loại bệnh cây thì bệnh do nấm gây ra chiếm khoảng 83%, trong đó bệnh do nấm *Fusarium* và *Rhizocronia* gây ra chiếm tỉ lệ tương đối lớn. Nấm bệnh *Fusarium* và *Rhizoctonia* gây bệnh trên nhiều loại cây rau quả và cây lương thực như lạc, cà chua, khoai tây, cà phê, tiêu. Chúng có khả năng tồn tại trong đất trong một thời gian dài, phát sinh và gây hại ngay từ giai đoạn cây con và kéo dài cho tới khi thu hoạch nếu không áp dụng các biện pháp phòng trừ triệt để.

Biện pháp phòng trừ các bệnh hại cây trồng phổ biến nhất cho đến nay vẫn là sử dụng các loại thuốc hóa học. Mặc dù có ưu điểm là phổ tác dụng rộng, hiệu quả và tác dụng nhanh, nhưng thuốc hóa học ngày càng bộc lộ rõ những nhược điểm như hiệu quả phòng trừ thấp đối với các loại nấm bệnh trong đất, nhanh bị ức chế bởi nấm bệnh sau một thời gian sử dụng, gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người. Bên cạnh việc làm giảm chất lượng lương thực, thực phẩm, các loại hóa chất còn tích tụ trong đất, gây ô nhiễm môi trường và làm cho sản xuất kém bền vững. Hiện nay trên thế giới cũng như ở Việt Nam, việc sử dụng các chế phẩm vi sinh thay thế một phần thuốc hóa học để phòng trừ một số bệnh cây trồng do vi sinh vật gây ra đang là xu hướng chủ yếu. Các chế phẩm này đang được sử dụng rộng rãi nhằm tạo ra một nền nông nghiệp hữu cơ an toàn và bền vững.

Pseudomonas là chi vi khuẩn phổ biến trong môi trường, đã được sử dụng trong kiểm soát nhiều bệnh hại cây trồng khác nhau. Từ những năm 1970, trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu ứng dụng *Pseudomonas* để phòng trừ nấm bệnh bảo vệ cây trồng, nhiều sản phẩm đã được sản xuất và thương mại hóa (Kommedahl, Chang-Mew, 1975; Cook, Rovira, 1976; Howell, Stipanovic, 1980; Aziz *et al.*, 2012). Tuy nhiên, kết quả đạt được trong nghiên cứu và sử dụng các chế phẩm sinh học bảo vệ thực vật còn hạn chế. Chi phí thuốc bảo vệ thực vật trên thế giới đạt hơn 39,4 tỷ USD trong năm 2007, giá trị thương mại của thuốc bảo vệ thực vật sinh học được sử dụng trên toàn thế giới chỉ chiếm 1,9% tổng giá trị của các loại thuốc bảo vệ thực vật (Kiely *et al.*, 2004; Grube *et al.*, 2011). Vì vậy, việc tăng