

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ  
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

..........

**ĐÀO ÁNH VÂN**

**NGHIÊN CỨU XẠ KHUẨN NỘI SINH TRÊN CÂY CAM  
HÀM YÊN - TUYÊN QUANG VÀ TIỀM NĂNG SINH  
TỔNG HỢP CHẤT KHÁNG NẤM CỦA CHÚNG**

**LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC**

**Chuyên ngành : Vi sinh vật học**

**Mã ngành :60 42 01 03**

**Người hướng dẫn khoa học: TS. PHAN THỊ HỒNG THẢO**

**Hà Nội - 2015**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi .Các số liệu, kết quả nêu trong Luận văn là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tôi xin cam đoan rằng mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện Luận văn này đã được cảm ơn và các thông tin trích dẫn trong Luận văn đã được chỉ rõ nguồn gốc.

Hà Nội, Ngày 25 tháng 11 năm 2015

Học viên

Đào Ánh Vân

## LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Phan Thị Hồng Thảo – Trưởng phòng Vi sinh vật Đất, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam người đã truyền thụ cho tôi những kiến thức chuyên ngành, hướng dẫn, định hướng nghiên cứu và tận tình giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Xin chân thành cảm ơn các thầy, cô thuộc Viện Công nghệ Sinh học – Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã giúp đỡ và chỉ bảo tôi trong quá trình học tập

Xin chân thành cảm ơn các cán bộ Phòng Vi sinh vật Đất, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã động viên, giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình thực hiện đề tài này.

Tôi xin cảm ơn sự hỗ trợ kính phí thực hiện từ đề tài “Nghiên cứu sự đa dạng của xạ khuẩn nội sinh trên cây có múi đặc sản ở miền Bắc Việt Nam và tiềm năng sinh tổng hợp các chất kháng khuẩn và kích thích tăng trưởng thực vật của chúng” Mã số đề tài: VAST.ĐLT.12/15-16 thuộc cấp quản lý Viện Hàn lâm KHCNVN và Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học đã tạo điều kiện và cung cấp các thiết bị để tôi có thể tham gia thực hiện đề tài.

Cuối cùng, tôi xin tỏ lòng biết ơn tới gia đình và bạn bè, những người đã luôn quan tâm giúp đỡ và động viên tôi để có được thành quả ngày hôm nay.

*Hà Nội, Ngày 25 tháng 11 năm 2015*

Học viên

**Đào Ánh Vân**

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

STT	Tên viết tắt	Tên đầy đủ
1	CFU	Đơn vị hình thành khuẩn lạc
2	DNA	Deoxyribosenucleic Acid
3	EDTA	Ethylene diamine tetra-acetic acid
4	HTKS	Hoạt tính kháng sinh
5	ISP	Internationl Streptomyces Project
6	KTCC	Khuẩn ty cơ chất
7	KTKK	Khuẩn ty khí sinh
8	PCR	Polymerase Chain Reaction: Phản ứng khuếch đại gen
9	rDNA	Ribosomal Deoxyribosenucleic Acid
10	RNA	Ribonucleic acid
11	rRNA	Ribosomal Ribonucleic acid
12	SDS	Sodium dodecyl sulfat
13	TAE	Tris-acetat EDTA
14	VSV	Vi sinh vật

## DANH MỤC CÁC BẢNG

<b>Bảng</b>	<b>Tên bảng</b>	<b>Trang</b>
1.1	Tổng hợp một số nghiên cứu trên thế giới về các loài xạ khuẩn nội cộng sinh trên thực vật.	13
3.1	Kết quả phân lập xạ khuẩn nội sinh từ mẫu rễ Cam Hàm Yên Tuyên Quang trên một số môi trường khác nhau	27
3.2	Tỷ lệ các xạ khuẩn phân lập chia theo đa dạng nhóm màu	30
3.3	Khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng xạ khuẩn	30
3.4	Số lượng các chủng xạ khuẩn nội sinh phân lập có khả năng đối kháng với các chủng nấm và vi khuẩn kiểm tra	31
3.5	Kết quả kiểm tra hoạt tính kháng sinh của 4 chủng xạ khuẩn lựa chọn được nuôi cấy trên môi trường dịch thể ISP2 sau 5 ngày	32
3.6	Đặc điểm nuôi cấy của xạ khuẩn nội sinh C12 và R12-4 trên các môi trường ISP	33
3.7	Khả năng đồng hóa nguồn cacbon của 2 chủng xạ khuẩn tuyển chọn sau 14 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C	36
3.8	Ảnh hưởng của nồng độ NaCl trong môi trường ban đầu đến khả năng sinh trưởng và phát triển của 4 chủng xạ khuẩn tuyển chọn	37
3.9	Ảnh hưởng của pH môi trường ban đầu đến khả năng sinh trưởng của 4 chủng xạ khuẩn tuyển chọn	37
3.10	Ảnh hưởng của nhiệt độ ban đầu đến khả năng sinh trưởng của 2 chủng xạ khuẩn tuyển chọn	37
3.11	khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào của các chủng xạ khuẩn	38
3.12	So sánh trình tự gen mã hóa 16S rRNA của chủng R12-4 với gen tương ứng của các chủng xạ khuẩn được đăng ký trên GenBank	39
3.13	Môi trường thích hợp cho sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm của hai chủng xạ khuẩn C12 và R12-4	40
3.14	Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi đến sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm	41
3.15	Nhiệt độ thích hợp cho sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm của hai chủng xạ khuẩn lựa chọn	41
3.16	Lựa chọn dung môi để chiết hoạt chất kháng nấm từ dịch lên men và sinh khối	42
3.17	Ảnh hưởng của các pH chiết khác nhau đến khả năng chiết chất kháng nấm	43
3.18	Xác định độ bền nhiệt đến hoạt tính kháng nấm của chủng R12-4	44

## DANH MỤC CÁC HÌNH

<b>Hình</b>	<b>Tên hình</b>	<b>Trang</b>
3.1	Hình ảnh minh họa kết quả phân lập các chủng xạ khuẩn nội sinh trên một số môi trường sau 6 tuần nuôi cấy	29
3.2	Tỷ lệ xạ khuẩn nội sinh phân lập theo bộ phận của cây Cam Hàm Yên – Tuyên Quang	29
3.3	Khả năng đối kháng của một số chủng xạ khuẩn phân lập với nấm	31
3.4	Xạ khuẩn C12 và R12-4 đối kháng với nấm	32
3.5	Khuẩn lạc xạ khuẩn C12 trên các môi trường ISP	34
3.6	Khuẩn lạc xạ khuẩn R12-4 trên các môi trường ISP	34
3.7	Cuống sinh bào tử, chuỗi bào tử và hình dạng bào tử của xạ khuẩn nội sinh C12	35
3.8	Cuống sinh bào tử, chuỗi bào tử và hình dạng bào tử của xạ khuẩn nội sinh R12-4	35
3.9	Khả năng đồng hóa nguồn cacbon của chủng xạ khuẩn R12-4 và C12 sau 14 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C	36
3.10	Điện di đồ DNA tổng số của hai chủng xạ khuẩn C12 và R12-4 trên gel agarose 1,0 %.	38
3.11	Điện di đồ sản phẩm PCR của chủng xạ khuẩn C12 và R12-4 với cặp mồi sử dụng 27F và 1492R trên gel agarose 1,0%	38
3.12	Mức độ tương đồng di truyền giữa chủng <i>Streptomyces angustmyceticus</i> C12 với các loài xạ khuẩn có họ hàng gần dựa vào 16S rRNA	39
3.13	Độ bền của chất kháng nấm với nhiệt	44
3.14	Độ bền của chất kháng nấm với pH	45
3.15	Khả năng bền với pH của chất kháng nấm	45
3.16	Hoạt chất kháng nấm của kháng sinh tinh sạch	46
3.17	Hình ảnh quang phổ hấp thụ điện tử UV VIS của kháng sinh tinh sạch	46
3.18	Hình ảnh phổ hồng ngoại của kháng sinh tinh sạch	47

## MỤC LỤC

### LỜI CẢM ƠN

### DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

### DANH MỤC CÁC BẢNG

### DANH MỤC CÁC HÌNH

MỞ ĐẦU.....	1
PHẦN I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
<b>1.1. Xạ khuẩn nội sinh trong thực vật.....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Giới thiệu chung về xạ khuẩn.....	3
1.1.2. Xạ khuẩn nội sinh trên thực vật.....	6
1.1.3. Mối quan hệ giữa thực vật và xạ khuẩn nội sinh.....	8
1.1.4. Con đường xâm nhập của vi sinh vật vào cây chủ.....	8
1.1.5. Các phương pháp phân lập xạ khuẩn nội sinh.....	9
1.1.6. Phân loại xạ khuẩn nội sinh.....	10
<b>1.2. Tình hình nghiên cứu xạ khuẩn nội sinh và tiềm năng ứng dụng của xạ khuẩn nội sinh.....</b>	<b>12</b>
1.2.1. Tình hình nghiên cứu xạ khuẩn nội sinh.....	12
1.2.2. Tiềm năng ứng dụng của xạ khuẩn nội sinh.....	15
<b>1.3. Cây có múi và khả năng thu nhận các thể nội sinh.....</b>	<b>17</b>
PHẦN II: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP.....	20
<b>2.1. Vật liệu.....</b>	<b>20</b>
2.1.1. Mẫu cây.....	20
2.1.2. Vi sinh vật kiểm định:.....	20
2.1.3. Hóa chất và thiết bị.....	20
2.1.4. Môi trường nghiên cứu.....	21
<b>2.2. Phương pháp nghiên cứu.....</b>	<b>22</b>
2.2.1. Phân lập các chủng xạ khuẩn nội sinh từ các mô sống của các mẫu thực vật.....	22
2.2.2. Đánh giá khả năng đối kháng của xạ khuẩn.....	22
2.2.3. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của xạ khuẩn.....	23
2.2.4. Phân tích trình tự gen mã hóa 16S rRNA.....	24
2.2.5. Phương pháp tách chiết và tinh sạch kháng sinh.....	24
2.2.6. Phương pháp xác định một số tính chất của chất kháng nấm và kháng khuẩn.....	26

<b>Phần III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b> .....	27
<b>3.1. Phân lập và sàng lọc các chủng xạ khuẩn nội sinh có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm trên cây Cam Hàm Yên – Tuyên Quang.</b> .....	27
3.1.1. <i>Kết quả phân lập các chủng xạ khuẩn nội sinh trên cây cam Hàm Yên – Tuyên Quang</i> .....	27
3.1.2. <i>Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn nội sinh có khả năng sinh chất kháng nấm, kháng khuẩn</i> .....	30
<b>3.2. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của hai chủng xạ khuẩn nội sinh lựa chọn</b> .....	32
3.2.1. <i>Nghiên cứu đặc điểm sinh lý và đặc điểm nuôi cấy của chủng xạ khuẩn lựa chọn</i> .....	32
3.2.2. <i>Đặc điểm sinh học của hai chủng xạ khuẩn lựa chọn</i> .....	35
<b>3.3. Nghiên cứu môi trường và điều kiện sinh tổng hợp chất kháng nấm của hai chủng xạ khuẩn nội sinh lựa chọn</b> .....	40
3.3.1. <i>Lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp cho sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm</i> .....	40
<b>3.4. Nghiên cứu một số tính chất hoá lý của hoạt chất kháng nấm thu nhận từ chủng R12-4.</b> .....	42
3.4.1. <i>Tách chiết chất kháng nấm</i> .....	42
3.4.2. <i>Khả năng bền nhiệt của chất kháng sinh</i> .....	43
3.4.3. <i>Khả năng bền với pH của chất kháng nấm</i> .....	45
3.4.4. <i>Tinh sạch và thu nhận chất kháng sinh</i> .....	46
<b>PHẦN IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ</b> .....	48
<b>KẾT LUẬN</b> .....	48
<b>KIẾN NGHỊ</b> .....	48
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b> .....	49
<b>PHỤ LỤC</b> .....	53



## MỞ ĐẦU

Cây có múi là tên gọi chung của nhóm cây cam, chanh, quýt, bưởi... cùng họ *Rutaceae*. Cây ăn trái có múi được trồng ở hơn 100 quốc gia. Đây là loại quả có tầm quan trọng hàng đầu thế giới, với sản lượng năm 2009 đạt hơn 120 triệu tấn, trong đó cam chiếm 54% [15, 42, 46], bao gồm cả Việt Nam, tại vùng cam nổi tiếng Hàm Yên - Tuyên Quang hiệu quả kinh tế thu về khá cao. Tuy nhiên, việc trồng cây có múi phải đối mặt với một số vấn đề là cây tăng trưởng chậm, côn trùng, sâu bệnh... [41]. Bên cạnh đó, sự phát triển nhanh chóng các vùng trồng và sử dụng lượng hóa chất nông nghiệp thiếu kiểm soát trong nước dẫn đến những tác động tiêu cực về sản xuất, môi trường, chất lượng đất, sức khỏe con người, vật nuôi và ngày càng nhiều vi sinh vật gây bệnh có khả năng kháng các loại thuốc bảo vệ thực vật thông dụng. Vì vậy, việc tìm kiếm và ứng dụng các vi sinh vật để kiểm soát sinh học, kích thích tăng trưởng thực vật là một phương pháp thay thế để giảm sử dụng hoá chất nông nghiệp. Trong số các loài vi sinh vật, xạ khuẩn có vị trí quan trọng do sự đa dạng cao, khả năng sinh tổng hợp nhiều chất có hoạt tính sinh học như enzym, chất kích thích sinh trưởng thực vật, thuốc kháng sinh dùng trong nông nghiệp và y học... Đặc biệt là các loài xạ khuẩn nội sinh trong mô thực vật sống (lá, cành, rễ). Các loài xạ khuẩn sống nội sinh trong thực vật có khả năng tích hợp với cây chủ và sinh tổng hợp một số chất chuyển hóa thứ cấp có lợi cho cây chủ của mình. Đó là một trong những hệ sinh thái đặc biệt và khó tiếp cận, nơi mà xạ khuẩn nội sinh có vai trò quan trọng trong sự phát triển của cây chủ, chúng có thể ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây bằng con đường đồng hóa các chất dinh dưỡng, kích hoạt hệ thống miễn dịch và sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp, giúp cây chủ hạn chế bệnh và kích thích sinh trưởng cho cây [22, 23]. Trong mối quan hệ tương hỗ với cây chủ, vi sinh vật nội sinh cũng nhận được từ cây chủ các chất dinh dưỡng để sinh trưởng. Đến nay, đã có nhiều nghiên cứu công bố về khả năng sản sinh các chất thứ cấp tiêu diệt nhiều loài nấm bệnh và sinh tổng hợp các kháng sinh mới như munumbicin, kakadumycin và coronamycin của các loài xạ khuẩn nội sinh. Như vậy, xạ khuẩn nội sinh thực sự là những ứng cử viên tiềm năng trong kiểm soát sinh học cho tương lai. Tuy nhiên, số lượng các nghiên cứu về xạ khuẩn nội sinh trên cây cam và cây có múi nói chung tại Việt Nam vẫn còn rất hạn chế. Xuất phát từ những lí do trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu đề tài: “Nghiên cứu xạ khuẩn nội sinh trên cây Cam Hàm Yên- Tuyên Quang và tiềm năng sinh tổng hợp chất kháng nấm của chúng”

Mục tiêu cơ bản của đề tài:

Phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn nội sinh trên cây Cam tại Hàm Yên Tuyên Quang có tiềm năng sinh tổng hợp chất kháng nấm cao.

Nội dung nghiên cứu của đề tài:

1. Phân lập các chủng xạ khuẩn nội sinh trên rễ và cành trên các mẫu rễ và cành của cây cam Hàm Yên- Tuyên Quang.
2. Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn nội sinh trên cây cam Hàm Yên –Tuyên Quang có khả năng sinh tổng hợp chất kháng khuẩn và kháng nấm cao.
3. Nghiên cứu đặc điểm sinh học và phân loại các chủng xạ khuẩn nội sinh lựa chọn.
4. Nghiên cứu môi trường và điều kiện sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm của các chủng xạ khuẩn nội sinh lựa chọn
5. Nghiên cứu một số tính chất hoá lý của hoạt chất kháng nấm thu nhận từ xạ khuẩn R12-4.

Đề tài được thực hiện tại phòng Vi sinh vật đất, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam.