

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

ĐỖ TIẾN MẠNH

**NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN
CHŨNG NẤM *CORDYCEPS TAKAOMONTANA*
TỪ RỪNG TỰ NHIÊN VIỆT NAM CÓ KHẢ NĂNG TỔNG HỢP
MỘT SỐ HOẠT CHẤT SINH HỌC GIÁ TRỊ**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2015

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

ĐỖ TIẾN MẠNH

**NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN
CHỦNG NẤM *CORDYCEPS TAKAOMONTANA*
TỪ RỪNG TỰ NHIÊN VIỆT NAM CÓ KHẢ NĂNG TỔNG HỢP
MỘT SỐ HOẠT CHẤT SINH HỌC GIÁ TRỊ**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

PGS.TS. Nguyễn Thị Thanh Bình

Hà Nội - 2015

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan các số liệu và kết quả nghiên cứu được trình bày trong Luận văn này là trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nghiên cứu nào khác.

Tôi xin cam đoan các thông tin trích dẫn trong Luận văn đã được chỉ rõ nguồn gốc.

Tôi xin chịu trách nhiệm về nghiên cứu của mình.

Học viên

Đỗ Tiến Mạnh

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới Quý Thầy, Cô đã giảng dạy trong chương trình Cao học khóa 17 - Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, những người đã truyền đạt cho tôi kiến thức hữu ích làm cơ sở giúp tôi thực hiện tốt luận văn này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới PGS.TS. Nguyễn Thị Thanh Bình, người Thầy luôn tận tình hướng dẫn, dìu dắt và tạo điều kiện thuận lợi để tôi có thể hoàn thành luận văn thạc sĩ khoa học.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến các cô chú, anh chị đang làm việc tại Phòng Công nghệ Gen Động vật – Viện Công nghệ Sinh học đã quan tâm và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực tập tại phòng thí nghiệm của Viện.

Sau cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến gia đình và bạn bè đã tạo điều kiện, động viên để tôi hoàn thành khóa học và thực hiện luận văn thạc sĩ với kết quả tốt nhất.

Học viên

Đỗ Tiến Mạnh

MỤC LỤC

| | |
|---|-----|
| LỜI CAM ĐOAN | i |
| LỜI CẢM ƠN..... | ii |
| DANH MỤC BẢNG | vi |
| DANH MỤC HÌNH..... | vii |
| MỞ ĐẦU..... | 1 |
| MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU..... | 3 |
| NỘI DUNG NGHIÊN CỨU | 4 |
| CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU NGHIÊN CỨU | 4 |
| 1.1. Tổng quan về nấm <i>Cordyceps</i> spp..... | 4 |
| 1.1.1. Giới thiệu về nấm <i>Cordyceps</i> spp. | 4 |
| 1.1.2. Quá trình xâm nhiễm của nấm <i>Cordyceps</i> spp. vào cơ thể côn trùng | 6 |
| 1.1.3. Tình hình nghiên cứu chi <i>Cordyceps</i> trên thế giới..... | 6 |
| 1.1.3.1. Đa dạng và phân bố..... | 6 |
| 1.1.3.2. Tình hình nhân nuôi nấm <i>Cordyceps</i> spp. trên thế giới..... | 8 |
| 1.1.4. Tình hình nghiên cứu <i>Cordyceps</i> tại Việt Nam..... | 9 |
| 1.1.4.1. Đa dạng và phân bố..... | 9 |
| 1.1.4.2. Tình hình nhân nuôi nấm <i>Cordyceps</i> spp. ở Việt Nam..... | 12 |
| 1.1.5. Thành phần hóa học, hoạt chất sinh học và giá trị dược liệu của nấm <i>Cordyceps</i> spp. | 13 |
| 1.1.5.1. Thành phần hóa học và hoạt chất sinh học | 13 |
| 1.1.5.2. Giá trị dược liệu của nấm <i>Cordyceps</i> spp. | 14 |
| 1.2. Sơ lược về hoạt chất Adenosine..... | 16 |
| 1.2.1. Cấu trúc hóa học của Adenosine | 16 |
| 1.2.2. Ứng dụng của Adenosine | 16 |
| 1.3. Sơ lược về hoạt chất Beauvericine..... | 17 |
| 1.3.1. Cấu trúc hóa học của Beauvericine..... | 17 |
| 1.3.2. Ứng dụng của Beauvericine | 18 |
| CHƯƠNG II: NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU ... | 20 |
| 2.1. Nguyên liệu..... | 20 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1.1. Nguyên liệu | 20 |
| 2.1.2. Hóa chất sử dụng | 20 |
| 2.1.3. Thiết bị sử dụng | 21 |
| 2.1.4. Môi trường nuôi cấy | 21 |
| 2.2. Phương pháp nghiên cứu | 22 |
| 2.2.1. Phương pháp vi sinh vật..... | 22 |
| 2.2.1.1. Phân lập và thuần khiết vi nấm..... | 22 |
| 2.2.1.2. Hoạt hóa giống..... | 22 |
| 2.2.1.3. Nghiên cứu khả năng tổng hợp các hoạt chất sinh học trên môi trường lỏng và môi trường rắn của chủng nấm nghiên cứu..... | 23 |
| 2.2.2. Phương pháp sinh học phân tử..... | 24 |
| 2.2.2.1. Tách chiết DNA tổng số | 24 |
| 2.2.2.2. Định lượng DNA bằng quang phổ kế..... | 26 |
| 2.2.2.3. PCR | 26 |
| 2.2.2.4. Điện di kiểm tra DNA tổng số và sản phẩm PCR..... | 27 |
| 2.2.2.5. Xác định trình tự gen | 27 |
| 2.2.3. Phương pháp phân tích hóa lý (HPLC)..... | 28 |
| 2.2.4. Xử lý số liệu..... | 29 |
| CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN | 30 |
| 3.1. Thu thập, phân lập và tuyển chọn chủng nấm | 30 |
| 3.2. Đánh giá khả năng tạo thể quả của các chủng nấm phân lập..... | 33 |
| 3.3. Xác định tên khoa học của chủng nấm phân lập bằng trình tự ITS | 34 |
| 3.4. Lựa chọn môi trường thạch thích hợp cho nhân giống | 36 |
| 3.5. Lựa chọn môi trường lỏng thích hợp cho nhân giống..... | 38 |
| 3.6. Nghiên cứu nhân nuôi sinh khối tạo hoạt chất sinh học | 40 |
| 3.6.1. Nhân nuôi trên môi trường lỏng tĩnh | 40 |
| 3.6.2. Nhân nuôi trên môi trường rắn | 42 |
| 3.7. Nghiên cứu khả năng tổng hợp Adenosine và Beauvericine trong môi trường lỏng tĩnh và môi trường rắn..... | 44 |
| 3.7.1. Kết quả trên hệ thống LC/MS..... | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 3.7.1.1. Định lượng Adenosine..... | 44 |
| 3.7.1.2. Định lượng Beauvericine | 47 |
| 3.7.2. Nghiên cứu khả năng tổng hợp Adenosine và Beauvericine trong môi trường lỏng tĩnh và môi trường rắn..... | 48 |
| 3.7.2.1. Trong môi trường lỏng tĩnh..... | 48 |
| 3.7.2.1. Trong môi trường rắn | 49 |
| CHƯƠNG IV: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ..... | 52 |
| 4.1. Kết luận..... | 52 |
| 4.2. Kiến nghị..... | 52 |
| PHỤ LỤC | 53 |
| Tài liệu tham khảo | 54 |

DANH MỤC BẢNG

| | |
|--|----|
| Bảng 2.1. Các hóa chất sử dụng | 20 |
| Bảng 2.2. Các thiết bị chính được sử dụng trong nghiên cứu | 21 |
| Bảng 2.3. Thành phần các môi trường sử dụng trong nghiên cứu (g/l) | 21 |
| Bảng 2.4. Thành phần PCR | 27 |
| Bảng 2.5. Chu trình nhiệt PCR | 27 |
| Bảng 2.6. Gradient nồng độ thiết lập | 28 |
| Bảng 3.1. Khả năng tạo thể quả của các chủng nấm đã phân lập | 33 |
| Bảng 3.2. Khả năng sinh bào tử của chủng A9 trên các môi trường hoạt hóa lỏng . | 39 |
| Bảng 3.3. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng lên sinh khối lỏng tĩnh | 41 |
| Bảng 3.4. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng lên quá trình tạo thể quả | 42 |
| Bảng 3.5. Các nồng độ Adenosine sử dụng trong xây dựng_đường chuẩn định lượng | 46 |
| Bảng 3.6. Các nồng độ Beauvericine sử dụng trong xây dựng_đường chuẩn định lượng | 48 |
| Bảng 3.7. Hàm lượng Adenosine, Beauvericine_trong sinh khối lên men lỏng tĩnh | 49 |
| Bảng 3.8. Hàm lượng Adenosine và Beauvericine_trong sinh khối lên men rắn | 50 |

DANH MỤC HÌNH

| | |
|---|----|
| Hình 1.1. Nấm <i>C.takaomontana</i> /thể vô tính và hữu tính | 5 |
| Hình 1.2. Nấm <i>Isaria tenuipes</i> / thể vô tính của <i>C.takaomontana</i> | 5 |
| Hình 1.3. Nấm <i>Cordyceps crinalis</i> | 7 |
| Hình 1.4. Nấm <i>Cordyceps sinensis</i> (Beck). | 7 |
| Hình 1.5. Nấm <i>Cordyceps militaris</i> | 8 |
| Hình 1.6. Nấm <i>C.nutans</i> | 11 |
| Hình 1.7. Nấm <i>C.sphecocephala</i> | 11 |
| Hình 1.8. Nấm <i>Cordyceps prolifica</i> | 12 |
| Hình 1.9. Nấm <i>Cordyceps pseudomilitaris</i> | 12 |
| Hình 1.10. Cấu trúc hóa học của Adenosine | 16 |
| Hình 1.11. Cấu trúc hóa học của Beauvericin | 17 |
| Hình 3.1. Mẫu VN3..... | 30 |
| Hình 3.2. Mẫu VN4..... | 30 |
| Hình 3.3. Mẫu VN6..... | 30 |
| Hình 3.4. Mẫu VN7..... | 30 |
| Hình 3.5. Mẫu VN8..... | 30 |
| Hình 3.6. Mẫu VN9..... | 30 |
| Hình 3.7. Đĩa khuẩn lạc rìa và khuẩn lạc chấm điểm chủng A3 | 32 |
| Hình 3.8. Đĩa khuẩn lạc rìa và khuẩn lạc chấm điểm chủng A6 | 32 |
| Hình 3.9. Đĩa khuẩn lạc rìa và khuẩn lạc chấm điểm chủng A7 | 32 |
| Hình 3.10. Đĩa khuẩn lạc rìa và khuẩn lạc chấm điểm chủng A8 | 32 |
| Hình 3.11. Đĩa khuẩn lạc rìa và khuẩn lạc chấm điểm chủng A9 | 33 |
| Hình 3.12. Ảnh điện di DNA của chủng A9..... | 34 |
| Hình 3.13. Ảnh điện di sản phẩm PCR..... | 35 |
| Hình 3.14. Trình tự ITS của chủng A9 | 35 |
| Hình 3.15. Sơ đồ cây phân loại chủng <i>C.takaomontana</i> A9 | 36 |
| Hình 3.16. Biểu đồ tốc độ tăng trưởng đường kính khuẩn lạc của chủng <i>C.takaomontana</i> A9 | 37 |

| | |
|--|----|
| Hình 3.17. Hình ảnh khuẩn lạc chủng A9 trên các môi trường | 38 |
| Hình 3.18. Hình ảnh bào tử của chủng <i>C.takaomontana</i> A9 dưới kính hiển vi quang học (độ phóng đại 400 lần) | 40 |
| Hình 3.19. Hình ảnh bào tử của chủng <i>C.takaomontana</i> A9 dưới kính hiển vi quang học (độ phóng đại 400 lần) | 40 |
| Hình 3.20. Chủng nấm A9 nuôi lỏng tĩnh trên các môi trường | 42 |
| Hình 3.21. Sinh khối tươi của chủng A9 trên các môi trường..... | 42 |
| Hình 3.22. Chủng <i>C.takaomontana</i> A9 nảy mầm trên các môi trường DD | 43 |
| Hình 3.23. Thể quả tươi của chủng A9 trên các môi trường DD | 44 |
| Hình 3.24. Sắc kí đồ HPLC UV 260 nm của chất chỉ thị Adenosine (A) và của mẫu (B)..... | 45 |
| Hình 3.25. Sắc kí đồ MS ESI Positive của chất chỉ thị Adenosine | 46 |
| Hình 3.26. Sắc kí đồ Sim 806,0 của chất chỉ thị Beauvericine (A) và của mẫu (B) | 47 |
| Hình 3.27. Sắc kí đồ MS - ESI Positive của chất chỉ thị Beauvericine.... | 48 |