

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

-----***-----

NGUYỄN THỊ THU HÀ

**PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH
ENZYM *N*-ACYL-L-HOMOSERINE LACTONE
(AHL) LACTONASE CỦA VI KHUẨN NỘI SINH
SỬ DỤNG TRONG PHÒNG TRỪ BỆNH THỐI NHŨN
CỦ KHOAI TÂY**

LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC

HÀ NỘI - 2015

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

-----***-----

**PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH
ENZYM *N*-ACYL-L-HOMOSERINE LACTONE
(AHL) LACTONASE CỦA VI KHUẨN NỘI SINH
SỬ DỤNG TRONG PHÒNG TRỪ BỆNH THỐI NHŨN
CỦ KHOAI TÂY**

Chuyên ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 60420103

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

TS. Hoàng Hoa Long

HÀ NỘI - 2015

MỞ ĐẦU

Cây khoai tây (*Solanum tuberosum* L), thuộc họ Cà (*Solanaceae*) là loài cây nông nghiệp gần gũi, trồng lấy củ chứa tinh bột. Khoai tây có nguồn gốc ở vùng cao thuộc dãy núi Andes, Nam Mỹ, được người Pháp đưa vào Việt Nam từ năm 1890. Có thời kỳ khoai tây được xem là cây lương thực có tầm quan trọng thứ ba sau lúa và ngô.

Khoai tây có giá trị dinh dưỡng cao vì trong khoai tây có chứa các vitamin, khoáng chất, caronoids và phenol tự nhiên. Khoai tây không chỉ là lương thực mà còn là dược phẩm. Một nhà khoa học của Viện Thực phẩm Anh mới đây phát hiện trong khoai tây chứa hợp chất sinh học cucoamin có tác dụng làm giảm huyết áp nếu ăn thường xuyên. Trong một nghiên cứu khác gần đây, GS Venket Rao, Khoa Dinh dưỡng Đại học Y Toronto Canada đã phát hiện thấy trong khoai tây có nhiều chất chống oxy hóa. Nó có khả năng ngăn ngừa quá trình lão hóa, hạn chế sự phát triển của ung thư và một số bệnh khác.

Theo thông tin của Cục Trồng trọt, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Việt Nam là quốc gia có khả năng phát triển mạnh khoai tây, nhiều nhất ở đồng bằng Bắc Bộ, miền núi phía Bắc, Bắc Trung Bộ và Tây Nguyên, với diện tích ước tính 200.000 ha. Tuy nhiên, hiện nay diện tích trồng khoai tây chỉ đạt 30.000-35.000 ha, với năng suất 10-11 tấn/ha. Một trong những nguyên nhân dẫn đến giảm năng suất và diện tích trồng khoai tây là do tình trạng gây hại của sâu bệnh, đặc biệt là bệnh thối nhũn do vi khuẩn *Erwinia* gây ra, phổ biến nhất là loài *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc). Bệnh gây ra chủ yếu trên các loài cây trồng có giá trị kinh tế cao thuộc họ cà, họ thập tự, họ bầu bí, họ hành, một số loài hoa lan... Bệnh gây hại cho cây từ khi còn được trồng ở ngoài đồng ruộng cho đến khi thu hoạch và bảo quản trong kho. Đặc biệt khi điều kiện thời tiết nóng ẩm và mưa nhiều thì bệnh trở nên trầm trọng hơn. Vi khuẩn *Ecc* sử dụng Quorum Sensing (QS) như một cơ

chế trao đổi thông tin giữa các tế bào và phụ thuộc mật độ quần thể để kiểm soát gen liên quan đến tính độc và các hoạt động của tế bào vi khuẩn. Trong cơ chế này, *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) đóng vai trò như các chất tự cảm ứng (autoinducer) và cũng là các phân tử tín hiệu được tổng hợp và tiết ra trong suốt quá trình phát triển của vi khuẩn. Khi nồng độ phân tử AHLs tăng lên cùng với sự phát triển của quần thể vi khuẩn và đạt đến một ngưỡng nhất định (quorum level), AHLs sẽ gây ra những hiệu ứng kiểu hình thông qua việc điều hòa sự biểu hiện gen đích, mà ở vi khuẩn gây bệnh *Ecc* là gen quy định tính độc đối với cây chủ.

Hiện nay, biện pháp phòng trừ bệnh chủ yếu dựa vào các phương pháp truyền thống và sử dụng thuốc trừ sâu hóa học. Tuy nhiên, các biện pháp này đều không mang lại hiệu quả cao, đặc biệt là việc sử dụng thuốc trừ sâu hóa học đang gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến chất lượng nông sản và môi trường sống của con người. Do đó biện pháp phòng trừ sinh học sử dụng các vi sinh vật đối kháng trong tự nhiên ngày càng được đặc biệt quan tâm. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra trong tự nhiên tồn tại một nhóm vi khuẩn cư trú bên trong mô cây chủ và không gây triệu chứng bệnh cho cây được gọi là vi khuẩn nội sinh (bacterial endophyte). Trong số chúng, có những vi khuẩn có khả năng phân hủy AHLs qua cơ chế Quorum Quenching (QQ), là một hoạt động xảy ra trong tự nhiên có tác dụng chặn đứng những bước quan trọng của hệ thống QS như sự hình thành, tích lũy hoặc tiếp nhận phân tử tín hiệu. Dựa vào cấu trúc phân tử AHLs, các nhà khoa học đã xác định được 3 nhóm enzyme phân hủy AHLs: AHL-lactonase, AHL-acylase và AHL-oxidoreductase. Cho đến nay, enzyme AHL-lactonase được nghiên cứu nhiều nhất. Enzyme này được phát hiện lần đầu tiên từ chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. 240B có khả năng bất hoạt phân tử AHL. Gen mã hóa enzyme này khi được chuyển vào chủng vi khuẩn gây bệnh *E. carotovora* SCG1 đã làm giảm đáng

kể sự giải phóng AHL, giảm hoạt động enzyme pectolytic ngoại bào và giảm độc tính trên khoai tây, cà, cải bắp, cà rốt,... Kể từ đó trên thế giới, nhiều vi khuẩn có hoạt tính AHL-lactonase đã được miêu tả như *Bacillus thuringiensis* subsp. *morisoni*, *Arthrobacter* sp., *Microbacterium testaceum*. Tuy nhiên, ở Việt Nam hiện chưa có nghiên cứu nào về cơ chế gây bệnh của vi khuẩn thối nhũn cũng như sử dụng các chủng vi khuẩn nội sinh (VKNS) đối kháng để phân hủy AHLs của vi khuẩn gây bệnh trong phòng trừ bệnh thối nhũn. Do vậy, tôi đã tiến hành chọn nghiên cứu đề tài **“Phân lập và xác định đặc tính enzyme N-acyl-L-homoserine lactone (AHL) lactonase của vi khuẩn nội sinh sử dụng trong phòng trừ bệnh thối nhũn củ khoai tây”** với hy vọng hướng nghiên cứu này sẽ góp phần đặt một trong những viên gạch để thiết lập một biện pháp phòng trừ hiệu quả bệnh thối nhũn khoai tây do vi khuẩn *Ecc* gây ra tại Việt Nam.

Mục đích của đề tài

Xác định được các hoạt tính của enzyme phân hủy N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs), AHL lactonase của các chủng vi khuẩn nội sinh sử dụng trong phòng trừ bệnh thối nhũn củ khoai tây.

Yêu cầu của đề tài

- Phân lập và xác định khả năng phân hủy AHLs của vi khuẩn nội sinh từ cà dại.
- Thử nghiệm ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy VKNS đến hoạt tính enzyme AHL lactonase.
- Thử nghiệm các loại môi trường nuôi cấy VKNS ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme AHL lactonase.
- Xác định hoạt tính enzyme AHL lactonase của các chủng VKNS phân hủy các loại AHLs tổng hợp C6, C8 và C10.

- Thử nghiệm hiệu quả phòng trừ bệnh thối nhũn củ khoai tây của các chủng vi khuẩn nội sinh có hoạt tính enzyme AHL lactonase trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Ý nghĩa của đề tài

Ý nghĩa khoa học

- Thực hiện đề tài này giúp tôi có thêm kinh nghiệm, kiến thức về các kỹ thuật phân lập, xác định khả năng phân hủy, xác định hoạt tính enzyme phân hủy AHLs từ vi khuẩn nội sinh, đối tượng quan tâm, ngoài ra còn cung cấp thêm hiểu biết về các kỹ thuật khác mà công nghệ sinh học hiện đại đang áp dụng.
- Kết quả nghiên cứu của đề tài sẽ cung cấp các vật liệu khởi đầu cho việc nghiên cứu về enzyme phân hủy AHLs sẽ là tiền đề phát triển một chiến lược phòng trừ bệnh thối nhũn khoai tây an toàn và bền vững sau này.

Ý nghĩa thực tiễn

Ngoài ý nghĩa về khoa học, các vấn đề nghiên cứu trong đề tài còn có ý nghĩa trong thực tiễn. Các chủng vi khuẩn có ích mang enzyme phân hủy AHLs sử dụng để ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh thối nhũn trên nhiều loài cây trồng có giá trị hoặc chuyển những gen mã hóa enzyme này vào cây trồng giúp cây trồng chống chịu được với bệnh hại.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về cây khoai tây

1.1.1. Nguồn gốc địa lý và sự phân bố của cây khoai tây

Khoai tây có tên khoa học *Solanum tuberosum*, thuộc họ Cà (*Solanaceae*). Đây là loài cây nông nghiệp ngắn ngày, trồng lấy củ chứa tinh bột. Cây khoai tây có nguồn gốc ở vùng cao thuộc dãy núi Andes, Nam Mỹ và du nhập vào Tây Ban Nha vào khoảng năm 1570 và Anh Quốc vào năm 1590. Sau đó, nó được lan truyền khắp châu Âu và tiếp theo là châu Á (Hawkes, 1994).

Sau nhiều thế kỷ chọn lọc và nhân giống, hiện nay đã có hơn một nghìn loài khoai tây khác nhau. Hơn 99% các loài khoai tây được trồng hiện nay trên toàn cầu có nguồn gốc từ nhiều giống khác nhau ở vùng đất thấp Trung-Nam Chile, các giống này đã được di dời từ các cao nguyên Andes.

Trên thế giới, cây khoai tây được coi là cây lương thực có tầm quan trọng đứng hàng thứ tư sau lúa mì, lúa nước và ngô (Stevenson và cs., 2001).

Năm 1890, một người Pháp là Giám đốc Vườn bách thảo Hà Nội đem hạt khoai tây trồng thử ở nước ta. Điều kiện khí hậu nhiệt đới gió mùa, mùa đông có nhiệt độ trung bình 15 – 25°C, thuận lợi cho khoai tây sinh trưởng và phát triển. Vào năm 1980, Việt Nam đã trở thành nước sản xuất khoai tây lớn nhất Đông Nam Á với hơn 100.000 ha diện tích trồng (Batt., 2002). Khoai tây trở thành cây lương thực có tầm quan trọng thứ ba sau lúa và ngô ở Việt Nam. Tuy nhiên, theo thống kê của Tổ chức Nông lương Liên hợp quốc (FAO), những năm gần đây diện tích trồng khoai tây chỉ dao động trong khoảng 35.000 - 40.000 ha (Bảng 1.1). Trong đó 90% diện tích tập trung ở các tỉnh thuộc đồng bằng Bắc Bộ, một số ít ở miền núi phía Bắc và Trung Bộ, 0,5% diện tích còn lại được trồng ở Đà Lạt (Lâm Đồng) (Phạm Xuân Tùng, 2001).

**Bảng 1.1: Tình hình sản xuất khoai tây ở Việt Nam
giai đoạn 2005-2011**

Năm	Diện tích (ha)	Năng suất (Tấn/ha)	Sản lượng (tấn)
2005	35.000	10,6	370.000
2006	37.613	11,1	419.161
2007	38.450	11,4	436.710
2008	41.160	11,8	486.184
2009	37.544	11,7	442.791
2010	37.100	12,0	446.200
2011	40.046	11,2	448.710

(Nguồn: FAO, 2012)

Năng suất khoai tây trước đây thường đạt 8 tấn/ha, cao nhất là 18-20 tấn/ha. Từ năm 1981 đến nay, năng suất bình quân đạt gần 12 tấn/ha, cao nhất đạt 35-40 tấn/ha, có thời điểm khoai tây đã xuất khẩu sang Nga (có năm tới 1.000 tấn). Khi lương thực lúa gạo và ngô dồi dào thì khoai tây được nghiên cứu theo hướng chất lượng và hiệu quả.

1.1.2 Đặc điểm nông sinh học của cây Khoai tây

Khoai tây là thân thảo, tán gọn, ưa lạnh, phát triển khoảng 60 cm chiều cao, khoai tây có thời gian sinh trưởng ngắn 80-100 ngày, cây chết sau khi ra hoa. Hoa có màu trắng, hồng, đỏ, xanh, hoặc màu tím, nhụy hoa màu vàng. Khoai tây được thụ phấn chủ yếu bởi côn trùng, ong vò vẽ mang phấn hoa từ cây này đến cây khác. Sau khi khoai tây ra hoa, một số giống cho ra quả màu xanh lá cây giống màu xanh trái cây cà chua anh đào, có thể chứa 300 hạt (Wikipedia).

1.1.3 Vai trò của cây Khoai tây

Khoai tây là một nguồn cung cấp lương thực dồi dào. Theo báo cáo của Tổ chức Nông Lương Liên Hợp Quốc (FAO) sản lượng khoai tây toàn Thế giới đến năm 2010 là 320 triệu tấn, trong đó hơn 2/3 là thức ăn trực tiếp của con người, còn lại là thức ăn cho động vật và nguyên liệu sản xuất tinh bột.

Ở Việt Nam, khoai tây được nhập vào từ năm 1890. Do có giá trị kinh tế cao, thuộc nhóm ưa lạnh nên có lợi thế trong sản xuất vụ đông, thời gian sinh trưởng ngắn, dễ trồng, ít tốn công chăm sóc, phù hợp với nhiều loại đất trồng nên khoai tây đang trở thành cây trồng xóa đói giảm nghèo cho bà con nông dân ở nhiều địa phương thuộc các tỉnh miền Bắc như Thái Bình, Lạng Sơn, Yên Bái,... (Nguồn báo điện tử: Thái Bình, Lạng Sơn, Yên Bái).

Tuy nhiên, ngành Nông nghiệp Việt Nam mới cung cấp được 80% nhu cầu tiêu dùng khoai tây trong nước, chúng ta vẫn phải nhập khẩu gần 100.000 tấn khoai tây hàng năm.

Khoai tây là thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao, trong đó có 2% protein bao gồm cả lysine (một axit amin thường không có trong protein thực vật) nên phối hợp tốt với ngũ cốc. Trong protein khoai tây còn có một số axit amin tự do và các chất kiềm purin. Giá trị sinh học của khoai tây tương đối cao lên tới 75% (theo phương pháp Mitchell). Người ta đã tính khoảng hơn 200g khoai tây nướng cả vỏ cung cấp 844mg Kali (gấp đôi 1 quả chuối), 28% khẩu phần sắt hàng ngày, 43% khẩu phần vitamin C, 35% khẩu phần vitamin B6 và nhiều chất khác như niacin, thiamin, folat...

Việc sử dụng khoai tây làm thực phẩm còn được khuyến khích hơn nữa khi một số nhà khoa học của Viện Thực phẩm Anh mới đây phát hiện, trong khoai tây có hợp chất sinh học cucoamin có tác dụng làm giảm huyết áp nếu ăn thường xuyên và chữa bệnh “ngủ” ở Châu Phi.

Không chỉ được sử dụng để làm lương thực và thực phẩm khoai tây còn được sử dụng trong y dược. Qua nghiên cứu, GS Venket Rao, Khoa Dinh dưỡng Trường đại học Y Toronto, Canada, phát hiện thấy trong khoai tây có nhiều chất chống oxy hóa. Nó có khả năng ngăn ngừa quá trình lão hóa, hạn chế sự phát triển của ung thư và một số bệnh khác. Còn các nhà nghiên cứu Đại học Y Harvard, Mỹ, đã phát hiện ra rằng những người thường xuyên ăn khoai tây có khả năng giảm ung thư tuyến tiền liệt.

1.2 Bệnh thối nhũn khoai tây

1.2.1 Tác nhân gây bệnh và tác hại của bệnh

Trong điều kiện thời tiết khí hậu nước ta những năm gần đây nắng nóng, mưa nhiều đan xen nhiều cơn bão liên tục là điều kiện thuận lợi cho các loài vi khuẩn gây bệnh trên cây trồng. Bệnh do vi khuẩn gây ra rất nguy hiểm và gây nhiều khó khăn cho công tác phòng trừ và bảo quản. Thời gian ủ bệnh rất khó phát hiện và đã gây ra những thiệt hại lớn trong thời kỳ sinh trưởng cũng như trong thời gian bảo quản, lưu trữ nông phẩm. Đối với những khu vực sản xuất thuộc vùng nhiệt đới bệnh thối nhũn ở khoai tây, cà rốt, hành tây, bắp cải....chủ yếu là do vi khuẩn *Erwinia* gây nên. Những nghiên cứu trước đây đã kết luận rằng vi khuẩn gây thối nhũn khoai tây có ba loài: *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* (*Ecc*), *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica* (*Eca*) và *E. chrysanthemi* (*Ech*). Trong đó *Ecc* là loài chủ yếu gây bệnh thối nhũn củ khoai tây (Jeremial), (Randall và cs). Vi khuẩn này khá phổ biến trên bề mặt, trên vết thương của củ khoai tây sau khi thu hoạch. *Ecc* gây bệnh ở cả vùng khí hậu ôn đới và nhiệt đới, và có phổ ký chủ rộng. *Ecc* cư trú trong đất, nước như sông, hồ thậm chí là đại dương. Vi khuẩn này có thể nhân lên và tồn tại trong vùng rễ của rất nhiều cây chủ hoặc không phải là cây chủ cũng như nhiều loài cỏ dại. Hai loài *Eca* và *Ech* là tác nhân chính gây ra bệnh thối đen