

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT



**TRẦN THỊ HỒNG**

**NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH ĐỐI KHÁNG NẤM GÂY  
BỆNH THỰC VẬT CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI SINH  
VẬT PHÂN LẬP TỪ ĐẤT TRỒNG TIÊU Ở QUẢNG TRỊ**

Ngành : Sinh học

Chuyên ngành : Động vật học

Mã số : 60420103

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC**

**Người hướng dẫn khoa học : PGS.TS. PHẠM VIỆT CƯỜNG**

Hà Nội - 2014

## LỜI CẢM ƠN

Để có thể hoàn thành đề tài luận văn thạc sĩ, bên cạnh sự nỗ lực cố gắng của bản thân còn có sự hướng dẫn nhiệt tình của quý Thầy Cô, cũng như sự ủng hộ động viên của gia đình và bạn bè trong suốt thời gian học tập nghiên cứu và thực hiện luận văn thạc sĩ.

Xin chân thành bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến PGS.TS. Phạm Việt Cường-Viện trưởng Viện Nghiên cứu Khoa học Miền Trung – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, người đã hết lòng giúp đỡ và tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi hoàn thành luận văn này.

Đồng thời, tôi xin được gửi lời cảm ơn tới PGS.TS.Nguyễn Thị Kim Cúc cùng các anh chị em Phòng Công nghệ sinh học – Viện Hóa sinh biển – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Trung tâm Sinh học phân tử Nghĩa Đô –Viện Nghiên cứu Khoa học Miền Trung - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến toàn thể quý Thầy Cô trong bộ môn Vi sinh vật học đã hết lòng truyền đạt những kiến thức quý báu cũng như tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu để cho tôi có thể hoàn thiện đề tài.

Cuối cùng xin chân thành bày tỏ lòng biết ơn đến gia đình, bạn bè, những người đã không ngừng động viên, hỗ trợ và tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt thời gian học tập và thực hiện luận văn.

*Hà nội, ngày 30 tháng 09 năm 2014*

Học viên

Trần Thị Hồng

## MỤC LỤC

Trang

LỜI CẢM ƠN

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

DANH MỤC CÁC BẢNG

DANH MỤC CÁC HÌNH

MỞ ĐẦU.....	1
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1 Đặc điểm của một số vi nấm gây bệnh ở thực vật.....	3
1.1.1 Khái quát về nấm gây bệnh.....	3
1.1.2 Đặc điểm hình thái, sinh lý, cơ chế gây bệnh và biểu hiện của <i>Fusarium oxysporum</i> .....	4
1.1.3 Đặc điểm hình thái, sinh lý, cơ chế gây bệnh và biểu hiện của <i>Fusarium solani</i> .....	6
1.1.4 Đặc điểm hình thái, sinh lý, cơ chế gây bệnh và biểu hiện của <i>Phytophthora spp</i> .....	6
1.2 Tổng quan về cây tiêu.....	8
1.3 Tình hình nghiên cứu về các loại vi sinh vật gây hại cho tiêu và biện pháp phòng trừ trong và ngoài nước .....	9
1.3.1. Tình hình nghiên cứu ngoài nước.....	9
1.3.2. Tình hình nghiên cứu trong nước.....	14
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP.....	21
2.1 ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ.....	21
2.1.1 Đối tượng nghiên cứu.....	21
2.1.2 Vật liệu.....	21
2.1.3 Hóa chất và thiết bị.....	21
2.2 PHƯƠNG PHÁP.....	24
2.2.1 Phương pháp phân lập và làm sạch vi sinh vật.....	24
2.2.1.1 Phương pháp phân lập và làm sạch nấm.....	24
2.2.1.2 Phương pháp phân lập vi khuẩn và xạ khuẩn đối kháng.....	24
2.2.2 Nuôi cấy và lưu giữ các chủng vi sinh vật.....	24

2.2.3	Phương pháp nhuộm Gram.....	25
2.2.4	Phương pháp xác định khả năng ức chế nấm gây bệnh của các chủng nấm phân lập.....	26
2.2.5	Phương pháp đực lỗ xác định hoạt tính kháng sinh trong dịch nuôi.....	27
2.2.6	Phương pháp sinh học phân tử.....	27
2.2.6.1	<i>Quy trình tách chiết ADN genom</i> .....	27
2.2.6.2	<i>Xác định nồng độ ADN nhờ máy quang phổ tử ngoại</i> .....	28
2.2.6.3	<i>Trình tự và thông số cặp mồi sử dụng để tiến hành PCR</i> .....	29
2.2.6.4	<i>Kỹ thuật PCR</i> .....	29
2.2.6.5	<i>Điện di ADN trên gel agarosa</i> .....	31
2.2.6.6	<i>Xác định trình tự nucleotit của gen</i> .....	31
2.2.6.7	<i>Xử lý trình tự ADN và phân tích số liệu bằng phần mềm máy tính</i> .....	32
2.2.7	Phương pháp xác định hoạt tính đối kháng nguồn bệnh nấm thực vật của một số chủng tuyển chọn trên cây cà chua.....	32
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....		34
3.1	PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG NẤM CÓ HOẠT TÍNH ĐỐI KHÁNG.....	34
3.1.1	Phân lập và tuyển chọn nấm.....	34
3.1.2	Định danh các chủng vi nấm phân lập.....	35
3.1.3	Đánh giá khả năng ức chế sinh trưởng nguồn bệnh nấm của các vi nấm phân lập.....	39
3.2	PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI KHUẨN CÓ HOẠT	

TÍNH ĐỐI KHÁNG.....	42
3.2.1. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn.....	42
3.2.2 Tách dòng và giải trình tự gen mã hoá 16s rARN của bốn chủng vi khuẩn nghiên cứu.....	47
3.2.2.1 Tách ADN genome từ vi khuẩn.....	48
3.2.2.2 Nhân gen 16S ADN riboxom.....	48
3.2.2.3. Giải trình tự gen của 4 chủng vi khuẩn nghiên cứu.....	49
3.3 PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG XẠ KHUẨN CÓ HOẠT TÍNH ĐỐI KHÁNG.....	54
3.3.1 Phân lập và tuyển chọn xạ khuẩn.....	54
3.3.2 Tách dòng và giải trình tự 16S ARN của 2 chủng xạ khuẩn.....	55
3.3.2.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số của chủng xạ khuẩn XK3 và XK28.....	56
3.3.2.2. Kết quả nhân gen 16S-rARN bằng PCR.....	57
3.3.2.3. Giải trình tự gen của 2 chủng xạ khuẩn nghiên cứu.....	57
3.4. ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ĐỐI KHÁNG NGUỒN BỆNH <i>F.OXYSPORUM</i> CỦA CÁC CHỦNG TUYỂN CHỌN TRÊN MÔ HÌNH CÂY CÀ CHUA.....	59
Chương 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	64
4.1 KẾT LUẬN.....	64
4.2 KIẾN NGHỊ VỀ NHỮNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO.....	65
CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN.....	66
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	67
PHỤ LỤC	

**DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT**

NCBI	: National Center for Biotechnology Information
BLAST	: <i>BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL</i>
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
dNTP	: Deoxyribonucleotide triphosphate
EtBr	: Ethidium bromide
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
SDS	: Sodium dodecyl sulphate
Bp, Kb	: Base pair, Kilo base
CFU	: Colony forming units
mRNA	: Messenger RNA
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RNA	: Ribonucleic acid
RNase	: Ribonuclease
TAE	: Tris-Acetate-EDTA
Taq polymerase	: Polymerase <i>Thermus aquarius</i>
TE	: Tris- EDTA

PIMG	: Percentage of inhibition of growth
ĐC	: Đối chứng
cs	: Cộng sự
đtg	: Đồng tác giả
CSK	: Chất kháng sinh
CLĐ	: Mẫu đất lấy từ huyện Cam Lộ- Quảng Trị
CLR	: Mẫu rễ lấy từ huyện Cam Lộ- Quảng Trị
VLĐ	: Mẫu đất lấy từ huyện Vĩnh Linh- Quảng Trị
VLR	: Mẫu rễ lấy từ huyện Vĩnh Linh- Quảng Trị
PDA	: Potato dextrose agar
PSA	: Potato sucrose agar

#### DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1: Địa điểm và thời gian lấy mẫu.....	21
Bảng 2.2: Trình tự và thông số cặp mồi để khuếch đại gen 16S rRNA cho Vi khuẩn.....	29
Bảng 2.3: Trình tự và thông số cặp mồi để khuếch đại gen 16S rRNA cho xạ khuẩn.....	29
Bảng 2.4: Thành phần phản ứng PCR cho vi khuẩn.....	29
Bảng 2.5: Thành phần phản ứng PCR cho xạ khuẩn.....	30
Bảng 2.6: Sơ đồ thí nghiệm.....	33
Bảng 3.1: Đặc điểm bào tử của các chủng nấm phân lập.....	35
Bảng 3.2: Tỷ lệ ức chế nguồn bệnh của các vi nấm phân lập sau 7 ngày nuôi cây...39	
Bảng 3.3: Tỷ lệ ức chế nguồn bệnh của các vi nấm phân lập sau 7 ngày nuôi cây...40	
Bảng 3.4: Hình thái tế bào của các chủng đối kháng.....	43
Bảng 3.5: Khả năng đối kháng một số nguồn bệnh nấm của các chủng vi khuẩn.....	44

Bảng 3.6: Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của các chủng nghiên cứu.....	47
Bảng 3.7: Kết quả xác định tỷ lệ A260/A280 và nồng độ ADN ( $\mu\text{g/ml}$ ) của các chủng nghiên cứu.....	48
Bảng 3.8: Kết quả nhận dạng các chủng vi sinh vật nghiên cứu sau khi so sánh bằng BLAST.....	50
Bảng 3.9: Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của các chủng nghiên cứu trên môi trường ISP4.....	54
Bảng 3.10: Khả năng kháng nấm kiểm định của các chủng xạ khuẩn.....	55
Bảng 3.11: Kết quả xác định tỷ lệ A260/A280 và nồng độ ADN ( $\mu\text{g/ml}$ ) của các chủng nghiên cứu.....	56
Bảng 3.12: Kết quả nhận dạng các chủng xạ khuẩn nghiên cứu sau khi so sánh bằng BLAST.....	57
Bảng 3.13: Ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật tuyển chọn lên sinh trưởng <u>của cây cà chua</u> .....	60

## DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1: Triệu chứng cây tiêu bị nhiễm <i>Phytophthora</i> spp.....	16
Hình 1.2: Triệu chứng cây tiêu bị nhiễm <i>Fusarium oxysporum</i> .....	16
Hình 2.1: Phương pháp cấy đối kháng trực tiếp.....	26
Hình 3.1: Hình thái khuẩn lạc đặc trưng của nấm sợi phân lập từ các mẫu vật.....	34
Hình 3.2: Hình thái bào tử đặc trưng của một số chủng nấm sợi phân lập.....	39
Hình 3.3: Khả năng đối kháng của nấm <i>P.oxalicum</i> và <i>T.harzianum</i> với nấm bệnh.....	41
Hình 3.4: Khả năng đối kháng của 1 số vi khuẩn phân lập với nấm <i>F.oxyporum</i> .....	45
Hình 3.5: Khả năng tồn tại trong môi trường MPA của một số chủng vi khuẩn	



đối kháng.....	46
Hình 3.6: Điện di đồ DNA genom của các chủng nghiên cứu.....	48
Hình 3.7: Điện di đồ sản phẩm PCR gen 16 S-rRNA của các chủng nghiên cứu.....	49
Hình 3.8: Cây phát sinh chủng loại chủng CLĐvk 30.1.....	50
Hình 3.9: Cây phát sinh chủng loại chủng CLĐvk 31.3.....	51
Hình 3.10: Cây phát sinh chủng loại chủng CLĐvk 31.6.....	51
Hình 3.11: Cây phát sinh chủng loại chủng CLRvk 31.8.....	52
Hình 3.12: Khả năng đối kháng của hai chủng xạ khuẩn CLĐ XK3, VLĐ XK 28 với nấm <i>F.solani</i> và <i>F.oxysporum</i> .....	55
Hình 3.13: Ảnh điện di AND tổng số của 2 chủng xạ khuẩn.....	56
Hình 3.14: Điện di đồ sản phẩm PCR gen 16S-rARN của 2 chủng xạ khuẩn.....	57
Hình 3.15: Cây phát sinh chủng loại chủng CLĐxk3.....	58
Hình 3.16: Cây phát sinh chủng loại chủng VLĐ xk28.....	58
Hình 3.17: Khả năng đối kháng <i>F.oxysporum</i> của các chủng CLĐ VK30.1, CLĐ XK3, VLĐ XK28.....	61

## MỞ ĐẦU

Hàng năm, bệnh cây đã gây ra những tổn thất to lớn cho nông nghiệp, chúng phá hủy các loại nông sản chủ yếu, chiếm 12% tổng sản lượng nông nghiệp trên Thế giới. Đã có hơn 11000 loại bệnh cây được phát hiện, nguyên nhân là do khoảng 120 chi nấm, 30 loại virus và 8 chi vi khuẩn. Thiệt hại do nấm hại cây chiếm khoảng 80% tổng thiệt hại mùa màng, trong đó bệnh do *Fusarium*, *Phytophthora* gây ra chiếm tỷ lệ tương đối lớn. Đây là các tác nhân chủ yếu gây nên bệnh chết héo, tắc mạch dẫn và thối rễ thối thân ở nhiều loại cây trồng như : lạc, cà chua, khoai tây, cà phê, tiêu, bông...[6].

Nền nông nghiệp nước ta có vai trò rất quan trọng, nó không chỉ cung cấp lương thực, thực phẩm, mà còn tạo ra hàng hóa có giá trị xuất khẩu cao, đặc biệt là các cây công nghiệp như: tiêu, bông, cà phê... Tuy nhiên năng suất và chất lượng cây trồng đã và đang phải đối mặt với rất nhiều vấn đề hết sức khó khăn, đặc biệt là bệnh cây trồng do nấm gây ra.

Hiện nay, biện pháp hóa học được sử dụng phổ biến và xem như hữu hiệu nhất trong phòng trừ bệnh cho cây trồng. Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc hóa học trong nông nghiệp trong đó có thuốc trừ nấm ngày càng nhiều gây ảnh hưởng xấu đến môi trường và làm giảm chất lượng sản phẩm khi dư lượng thuốc cao, chi phí phòng trị bệnh cao. Ngoài ra, đất đai bạc màu, làm chết các sinh vật có ích, làm tăng khả năng kháng thuốc của sinh vật gây hại, kết quả là việc sản xuất nông nghiệp rơi vào tình trạng khó khăn. Đặc biệt là khu vực Miền Trung cây tiêu và cây cà phê thường bị thối cổ rễ do *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Phytophthora* và một số tác nhân khác [4], [5].

Để góp phần khắc phục tồn tại này, các nhà khoa học đang chú ý đến nguồn tài nguyên lớn thứ ba của giới tự nhiên – Tài nguyên vi sinh vật có ích để bảo vệ môi trường sinh thái. Phương pháp sử dụng vi sinh vật trong bảo vệ môi trường không những mang lại hiệu quả cao, an toàn, sản phẩm thu hoạch không ảnh hưởng tới người sử dụng, có lợi cho cân bằng sinh thái, mà còn giảm phần lớn lượng thuốc hoá học sử dụng.