

BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO

**VIỆN KHOA HỌC
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

.....o0o.....

TRẦN QUANG MINH

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP ĐỘT BIẾN NHÂM
TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG BỆNH HÉO XANH CÀ
CHUA DO VI KHUẨN RALSTONIA SOLANACEARUM CỦA MỘT
SỐ CHỦNG VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Hà Nội – 2010

BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO

**VIỆN KHOA HỌC
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

.....o0o.....

TRẦN QUANG MINH

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP ĐỘT BIẾN NHÂM
TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG BỆNH HÉO XANH CÀ
CHUA DO VI KHUẨN RALSTONIA SOLANACEARUM CỦA MỘT
SỐ CHỦNG VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Hà Nội – 2010

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin cảm ơn phòng Đào tạo và các thầy cô giáo tại Cơ sở đào tạo sau đại học Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam luôn quan tâm, tạo điều kiện cho tôi trong quá trình học tập.

Để hoàn thành luận văn tốt nghiệp này, đầu tiên tôi xin bày tỏ lòng biết ơn và kính trọng sâu sắc tới **TS. Lê Như Kiều – Trưởng bộ môn Vi sinh vật – Viện Thổ nhưỡng Nông hóa** đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực tập.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến các cô chú và các anh chị trong bộ môn **Vi sinh vật – Viện Thổ nhưỡng Nông hóa** đã giúp đỡ và tạo điều kiện cho tôi trong suốt quá trình thực tập.

Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn tới gia đình, bạn bè đã động viên, góp ý và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập cũng như trong thời gian thực tập.

Hà Nội, ngày 28 tháng 12 năm 2010

Học viên

Trần Quang Minh

BẢNG KÝ HIỆU VIẾT TẮT

ADN	Axít deoxyribonucleic
AO	Acridine da cam
ARN	Axít ribonucleic
Bp	Base pair (cặp bazơ)
rARN	ARN riboxom
C _{hc}	Các bon hữu cơ
CFU	Colony forming unit (Đơn vị hình thành khuẩn lạc)
CT	Công thức
cs	Cộng sự
ĐC	Đối chứng
N _{ts}	Nitơ tổng số
PCR	Polymerase chain reaction (Phản ứng chuỗi trùng hợp)
P _{ts}	Phốt pho tổng số
VSV	Vi sinh vật
VSVĐK	Vi sinh vật đối kháng

MỤC LỤC BẢNG

	Tên bảng	Trang
Bảng 1.	Đặc tính sinh lý sinh hoá chính của vi khuẩn <i>R.solanacearum</i>	8
Bảng 2.	Đánh giá độc tính vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i>	26
Bảng 3.	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc các chủng vi khuẩn phân lập từ đất bệnh và cây bệnh	34
Bảng 4.	Nguồn gốc và đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn phân lập được	44
Bảng 5.	Hoạt lực đối kháng của các chủng vi khuẩn với đại diện các chủng <i>R. solanacearum</i>	45
Bảng 6.	Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn đối kháng	47
Bảng 7.	Kết quả định danh các chủng vi khuẩn đối kháng bằng chương trình NCBI BLAST	49
Bảng 8.	Kích thước vòng đối kháng của các thể đột biến của chủng DM ở nồng độ xử lý AO 24 µl/ml	50
Bảng 9.	Kích thước vòng đối kháng của các thể đột biến của chủng DM ở nồng độ xử lý AO 30 µl/ml	51
Bảng 10.	Kích thước vòng đối kháng của các thể đột biến chủng BK ở nồng độ xử lý AO 24µl/ml	53
Bảng 11.	Kích thước vòng đối kháng của các thể đột biến chủng BK ₁ ở nồng độ xử lý AO 30 µl/ml	54
Bảng 12.	Tác động của một số thể đột biến lên bệnh héo xanh cà chua trong điều kiện nhà kính	57
Bảng 13.	Ảnh hưởng của một số thể đột biến đến khả năng sinh	58

trưởng và phát triển của cây cà chua giống HT7 khi 2 tuần tuổi

Bảng 14.	Kết quả thử độc tính của chế phẩm đối kháng trên chuột	59
Bảng 15.	Kết quả xử lý thống kê trọng lượng chuột thí nghiệm	60
Bảng 16.	Ảnh hưởng của thành phần môi trường lên men đến mật độ hoạt tính sinh học của hai thể đột biến	63
Bảng 17.	Ảnh hưởng nhiệt độ môi trường lên men đến mật độ và hoạt tính sinh học của hai thể đột biến	67
Bảng 18.	Ảnh hưởng độ pH môi trường lên men đến mật độ và hoạt tính sinh học của hai thể đột biến	67
Bảng 19.	Mật độ vi khuẩn đột biến trên nền chất mang khác nhau sau 6 tháng lưu giữ bảo quản	67
Bảng 20.	Thành phần lý hóa của than bùn	69
Bảng 21.	Thành phần lý hóa của bột bã mía	69
Bảng 22.	Kích thước vòng đối kháng của các thể đột biến trong chế phẩm	71
Bảng 23.	Một số tính chất hóa học và sinh học đất thí nghiệm (Mê Linh- Hà Nội)	73
Bảng 24.	Khả năng phòng chống bệnh héo xanh cà chua của thể đột biến trên ruộng trồng tại xã Tiên Phong- Mê Linh- Hà Nội	74
Bảng 25.	Ảnh hưởng của chế phẩm vi khuẩn đột biến đến năng suất cà chua tại xã Tiên Phong- Mê Linh- Hà Nội	76

DANH MỤC HÌNH

<i>Tên hình</i>	<i>Trang</i>
<i>Hình 1. Cây cà chua bị bệnh héo xanh do R. Solanacearum</i>	<i>39</i>
<i>Hình 2. Biểu hiện triệu chứng nhiễm bệnh héo xanh vi khuẩn ở lát cắt dọc đoạn thân cây cà chua</i>	<i>40</i>
<i>Hình 3. Một số hình thái khuẩn lạc đại diện cho vi khuẩn gây bệnh héo xanh cà chua</i>	<i>41</i>
<i>Hình 4. Sản phẩm PCR của các chủng vi khuẩn gây bệnh trên cà chua</i>	<i>43</i>
<i>Hình 5. Hoạt tính đối kháng của một số chủng vi khuẩn</i>	<i>46</i>
<i>Hình 6. Hoạt tính đối kháng của một số thể đột biến</i>	<i>52</i>
<i>Hình 7. Khả năng phòng trừ bệnh héo xanh của một số thể đột biến trong điều kiện nhà lưới</i>	<i>56</i>
<i>Hình 8. Hình ảnh chuột sau 4 tuần thí nghiệm</i>	<i>60</i>
<i>Hình 9. Hoạt tính đối kháng của các thể đột biến trong chế phẩm sau 6 tháng</i>	<i>72</i>
<i>Hình 10. Các giai đoạn bón chế phẩm vi sinh vật đột biến</i>	<i>74</i>

MỤC LỤC

	Trang
MỞ ĐẦU	1
1. Tính cấp thiết của đề tài	1
2. Cơ sở khoa học của đề tài	2
3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài	2
4. Mục tiêu của đề tài	3
5. Nội dung nghiên cứu	3
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Tình hình gieo trồng cà chua ở Việt Nam và trên thế giới	4
1.2. Bệnh héo xanh cà chua	4
1.3. Mức độ phổ biến và gây hại của <i>R. solanacearum</i>	5
1.4. Vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i>	6
1.4.1. Hình thái và phân loại	6
1.4.2. Đặc điểm sinh lý, sinh hoá của vi khuẩn <i>R. solanacearum</i>	8
1.4.3. Tính độc của <i>Ralstonia solanacearum</i>	9
1.5. Các con đường xâm nhiễm của vi khuẩn <i>R. solanacearum</i>	11
1.6. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn <i>R.solanacearum</i>	11
1.6.1. Nhiệt độ không khí	11
1.6.2. Nhiệt độ đất	12
1.6.3. Cường độ chiếu sáng	12
1.6.4. Độ ẩm của đất	12
1.6.5. Ảnh hưởng của các loại đất	12
1.7. Biện pháp phòng trừ	13
1.7.1. Biện pháp hóa học	13
1.7.2. Biện pháp sinh học	13
1.8. Phòng trừ bệnh hại cây trồng bằng phương pháp sinh học	14
1.8.1. Khái niệm	14
1.8.2. Lựa chọn tác nhân phòng trừ sinh học	15
1.8.3. Sử dụng tác nhân vi sinh vật trong phòng bệnh hại thực vật	15
1.9. Nghiên cứu đột biến	16
1.9.1. Khái niệm đột biến	16
1.9.2. Gây đột biến nhân tạo bằng tác nhân vật lý	17
1.9.3. Gây đột biến nhân tạo bằng tác nhân hoá học	17
1.10. Phương pháp phát hiện đột biến	19
1.10.1. Phương pháp đề kháng	19

1.10.2. Phương pháp làm giàu chậm	19
1.10.3. Phương pháp làm giàu hạn chế	20
1.10.4. Phương pháp làm giàu nhờ penicilline	20
1.10.5. Phương pháp lọc	20
1.10.6. Trong phương pháp in	20
1.11. Mục đích tạo ra các thể đột biến	21
1.12. Ảnh hưởng của liều lượng và cường độ các chất gây đột biến	21
1.13. Thành tựu chọn tạo giống vi sinh vật bằng phương pháp đột biến	22
1.13.1. Một số thành tựu chọn tạo giống vi sinh vật bằng phương pháp đột biến trên thế giới và ở Việt Nam	22
II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	24
2.1. Vật liệu	24
2.2. Phương pháp nghiên cứu	25
2.2.1. Phân lập và tuyển chọn chủng <i>Ralstonia solanacearum</i> gây bệnh héo xanh cà chua	25
2.2.1.1. Thu mẫu và phân lập vi khuẩn gây bệnh	25
2.2.1.2. Đánh giá tính độc của <i>R. solanacearum</i>	26
2.2.1.3. Nhận dạng vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> bằng kỹ thuật PCR	27
2.2.2. Phương pháp phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật đối kháng	29
2.2.3. Nghiên cứu các đặc điểm sinh học và phân loại các chủng vi khuẩn đối kháng	32
2.2.3.1. Xác định đặc tính sinh lý, sinh hóa	32
2.2.3.2. Phân loại vi sinh vật đối kháng bằng phương pháp tự gen phân tử 16S rARN	34
2.2.4. Phương pháp xử lý đột biến	35
2.2.5. Phương pháp đánh giá khả năng phòng chống bệnh héo xanh cà chua của chế phẩm vi sinh vật trong điều kiện nhà lưới quy mô nhỏ	36
2.2.6. Đánh giá tính an toàn của các chủng vi sinh vật đối kháng	37
2.2.7. Phương pháp đánh giá khả năng kiểm soát bệnh héo xanh cà chua của chế phẩm vi sinh đối kháng ngoài đồng ruộng	37
2.2.8. Phương pháp xử lý số liệu	38
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	39
3.1. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> gây bệnh héo xanh cà chua	39
3.1.1. Thu mẫu, phân lập và tuyển chọn vi khuẩn gây bệnh	39
3.1.2. Thử nghiệm tính độc của các chủng <i>R. solanacearum</i>	42
3.1.3. Nhận dạng vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> bằng kỹ thuật PCR	42
3.2. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật đối kháng với <i>R. solanacearum</i> từ mẫu cây và đất trồng cà chua	43

3.2.1. Thu mẫu, phân lập vi khuẩn đối kháng	43
3.2.2. Đánh giá hoạt lực đối kháng của các chủng vi khuẩn	45
3.3. Nghiên cứu các hoạt tính sinh học và phân loại các chủng vi sinh vật đối kháng	47
3.3.1. Nghiên cứu các hoạt tính sinh học	47
3.3.2. Phân loại vi sinh vật đối kháng bằng phương pháp giải trình tự gen phân tử 16S rARN	48
3.4. Xử lý đột biến và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng cao nhất với vi khuẩn <i>R. Solanacearum</i> gây bệnh héo xanh bằng phương pháp đột biến	50
3.4.1. Xử lý đột biến và tuyển chọn các thể đột biến	50
3.5. Đánh giá khả năng kiểm soát bệnh héo xanh cà chua của một số thể đột biến trong nhà lưới	55
3.6. Đánh giá tính an toàn của các chủng vi sinh vật đối kháng	58
3.7. Nghiên cứu, sản xuất chế phẩm vi sinh vật đột biến phòng trừ bệnh héo xanh cà chua	61
3.7.1. Giống vi sinh vật	61
3.7.2. Môi trường nhân giống	61
3.7.3. Nghiên cứu lựa chọn môi trường sản xuất	62
3.7.4. Một số yếu tố chính ảnh hưởng quá trình lên men thu sinh khối	64
3.7.4.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình lên men vi khuẩn đột biến	64
3.7.4.2. Ảnh hưởng của pH đến quá trình lên men vi khuẩn đột biến	65
3.7.4.3. Nghiên cứu lựa chọn chất mang	69
3.7.4.4. Nghiên cứu quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn đột biến	70
3.7.4.5. Đánh giá hoạt tính đối kháng của các chế phẩm đột biến trong thời gian bảo quản	71
3.8. Đánh giá hoạt tính đối kháng của chế phẩm trong điều kiện ngoài đồng ruộng	72
IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	77
1. KẾT LUẬN	77
2. KIẾN NGHỊ	78
V. TÀI LIỆU THAM KHẢO	79
A. Phần tiếng Việt	79
B. Phần tiếng Anh	82