

**NGHIÊN CỨU CƠ CHẾ KHÁNG NẤM *Fusarium oxysporum*
GÂY BỆNH Ở CÂY TRỒNG CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN
Pseudomonas SINH HUỖNH QUANG CHỌN LỌC**

NGUYỄN THỊ TUYẾT NHUNG, NGUYỄN MINH ANH,
PHAN THỊ HOÀI ANH, NGUYỄN NGỌC DŨNG

Viện Công nghệ sinh học

Nhóm vi khuẩn *Pseudomonas* sinh huỳnh quang là một trong những nhóm vi sinh vật có nhiều tiềm năng để làm tác nhân phòng chống nấm gây bệnh ở cây trồng. Do đó, nhiều nghiên cứu về những cơ chế tác động của chúng đối với nấm gây bệnh ở cây trồng đã được công bố [2, 3, 4, 5, 8, 9, 12]. Theo đó, những cơ chế kháng nấm ở nhóm vi khuẩn này có thể là do sự cạnh tranh dinh dưỡng, hoặc do những sản phẩm trao đổi chất có tính kháng, tính độc đối với tế bào của nấm hay do những enzym có khả năng phân hủy thành tế bào của sợi nấm.

Thời gian qua, một số chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sinh huỳnh quang có khả năng kháng một số nấm gây bệnh cây trồng như *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* và *Phytophthora* sp. gây thối nõn dứa, đã được phân lập từ các mẫu vật khác nhau ở Việt Nam

và một số đặc tính sinh học cơ bản của một số chủng chọn lọc đã được xác định [6, 7].

Để bảo quản giống và khai thác những chủng có tiềm năng ứng dụng trong phòng chống sinh học đối với nấm gây bệnh ở cây trồng một cách có hiệu quả thì việc nghiên cứu cơ chế kháng của chúng là hết sức cần thiết. Với mục đích như vậy, trong bài báo này, những tác nhân có tác động kháng nấm của một số chủng *Pseudomonas* sinh huỳnh quang chọn lọc sẽ được trình bày.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn *Pseudomonas* chọn lọc được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

Các chủng vi khuẩn *Pseudomonas* chọn lọc

STT	Chủng	Phân loại	Tài liệu
1	<i>P. chlororaphis</i> Ps9-1	gien ADNr-16S	[6]
2	<i>P. fluorescens</i> Ps7-1	gien ADNr-16S	
3	<i>P. fluorescens</i> ĐDPT5-1	API 20NE	
4	<i>P. fluorescens</i> RDPT5-DT2	API 20NE	
5	<i>P. fluorescens</i> ĐDPT5-2	API 20NE	
6	<i>P. fluorescens</i> RDPT7-F2	API 20NE	
7	<i>P. fluorescens</i> ĐDPT9	API 20NE	

Chủng *Serratia plymuthica* C48 do Phòng Vi sinh vật học, thuộc Viện Sinh học phân tử và Công nghệ sinh học, trường đại học tổng hợp

Rostock, CHLB Đức cung cấp.

2. Môi trường

Các môi trường thạch-chitin [1], thạch-10%

đậu tương thủy phân TSA bổ sung laminarin gắn azurin [8], thạch-sữa bột gầy, thạch-CMC và NB (Merck) đã được sử dụng.

3. Phương pháp

- Để xác định khả năng phân giải chitin, laminarin, xenluloza và protein, phương pháp thạch đĩa đã được xác định. Kết quả được coi là dương tính khi hình thành vùng sáng quanh khuẩn lạc sau thời gian ủ 3-14 ngày ở nhiệt độ 20°C hoặc 30°C và hoạt độ được xác định bằng cách đo đường kính của vùng phân giải.

- Siderôpho được xác định theo Schwyn & Neilands (1987).

- Để xác định xianit trong dịch nuôi vi khuẩn (30°C, 72 giờ), bộ Aquaquant 14417-Testsystem (Merck, Darmstadt, Đức) đã được sử dụng và thu hoạch kết quả được tiến hành theo chỉ dẫn của nhà cung cấp.

- Khả năng sinh tổng hợp 2,4-diaxetin-phloroglucinol được xác định thông qua sự hiện diện của phân đoạn gen *phlD* trên bản điện di agarosa (1%) sản phẩm của phản ứng nhân bản gen (PCR) với cặp mồi Phl2a và Phl2b [9].

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chủng *P. chlororaphis* Ps9-1 và các chủng *P. fluorescens* Ps7-1, ĐDPT5-1, RDPT5-DT2, ĐDPT5-2, RDPT7-F2, ĐDPT9 là những chủng chọn lọc có khả năng kháng các loài nấm *F. oxysporum*, *R. solani* và *Phytophthora* sp. gây

thối nồm dưa [7]. Để làm sáng tỏ nguyên nhân dẫn đến hiện tượng này, những tác nhân có liên quan đã được tiến hành xác định và kết quả xác định được trình bày ở bảng 2 và các hình 1, 2, 3. Trong số những enzym thủy phân có thể phá vỡ cấu trúc của thành tế bào của sợi nấm được xác định, chỉ có proteinaza tồn tại ở tất cả các chủng chọn lọc; kết quả này được minh họa ở hình 1. Trừ hai chủng ĐDPT5-2 và ĐDPT9, những chủng còn lại cho hoạt độ thủy phân sữa gầy xấp xỉ hoặc cao hơn so với chủng *Serratia plymuthica* C48-chủng có giá trị phòng chống nấm *Verticillium dahliae* gây bệnh ở cây đậu đất [4]. Trong cơ cấu thành phần hóa học của thành tế bào của sợi nấm, protein chỉ chiếm một tỷ lệ nhỏ, trong khi đó các polysaccharit chiếm tới 80-90%. Ở *Fusarium*, thành phần chitin được xác định là không bằng nhau, tùy theo loài [2]. Theo Berg và cs. (2000) [1], trong 10 chủng *P. fluorescens* được xác định, không có chủng nào cho chitinaza, nhưng có 4 chủng có khả năng tổng hợp glucanaza. Một tài liệu khác cho thấy tần số chủng *P. fluorescens* có khả năng phân giải chitin rất thấp [5].

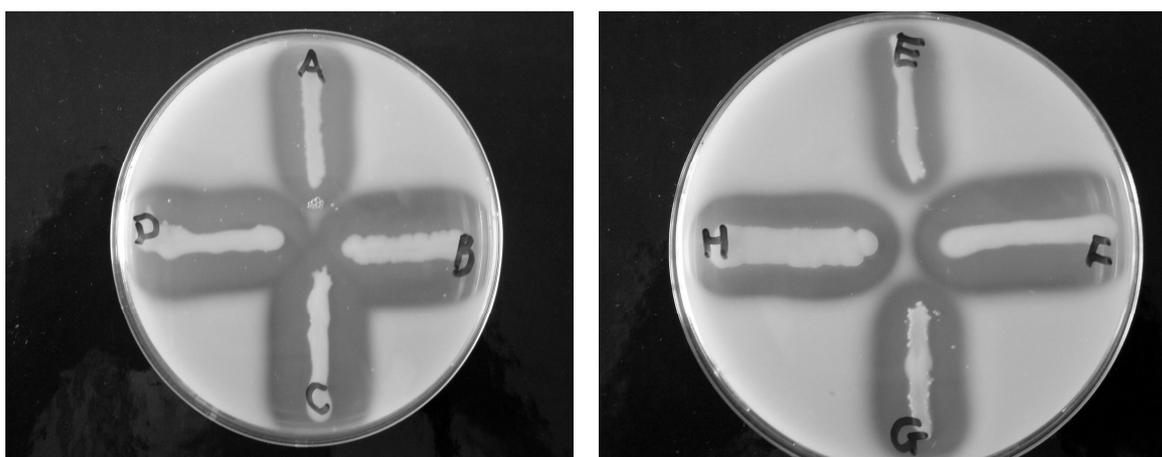
Một cơ chế kháng nấm khác ở nhóm vi khuẩn *Pseudomonas* sinh huỳnh quang là khả năng bài tiết xianit vào môi trường [1]. Ở đây, tất cả các chủng *Pseudomonas* chọn lọc đều có khả năng tổng hợp xianit, mạnh nhất là chủng ĐDPT5-1, có thể đạt tới 0,013 mg/l dịch nuôi. Một kết quả tương tự như vậy cũng đã được công bố [5].

Bảng 2

Kết quả xác định tác nhân kháng nấm của các chủng vi khuẩn *Pseudomonas* chọn lọc

Chủng vi khuẩn	Chi (mm)	Glu (mm)	Xen (mm)	Pro (mm)	Xia (mg/l)	Sid (mm)	<i>phlD</i> (745 bp)
Ps9-1	0	0	0	19,0	0,002	24,5	-
Ps7-1	0	0	0	25,0	0,002	21,0	+
ĐDPT5-1	0	0	0	23,0	0,013	16,0	-
RDPT5-DT2	0	0	0	22,5	0,002	13,0	-
ĐDPT5-2	0	0	0	12,0	0,004	18,0	-
RDPT7-F2	0	0	0	21,5	0,002	11,5	-
ĐDPT9	0	0	0	16,0	0,002	11,0	-
C48	12	9	0	19,0	0,000	15,0	kxđ

Ghi chú: Chi. chitinaza; Glu. glucanaza; Xen. xenluloza; Pro. proteinaza; Xia. cyanit; Sid. Siderophore; kxđ. không xác định.



Hình 1. Khả năng thủy phân sữa gây của các chủng vi khuẩn *Pseudomonas* chọn lọc
 Ghi chú: A. Ps9-1; B. Ps7-1; C. ĐDPT5-1; D. RDPT5-DT2; E. ĐDPT5-2; F. RDPT7-F2; G. ĐDPT9; H. C48.

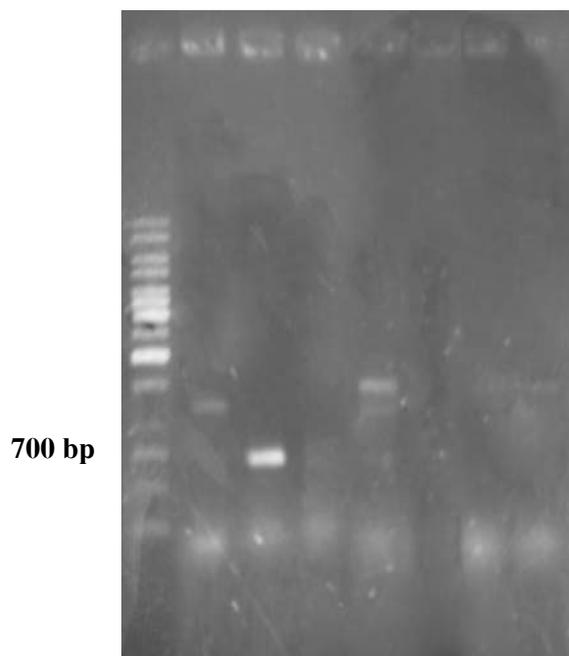
Một số sản phẩm trao đổi chất ở nhóm vi khuẩn *Pseudomonas* sinh huỳnh quang có đặc tính kháng đối với tế bào của nấm đã được xác định [2]. Có tác giả cho rằng, trong số những chất kháng sinh chống nấm, chất 2,4-diaxetinhloroglucinol đóng vai trò quan trọng [9]. Bằng kỹ thuật nhân bản phân đoạn gen *phlD* - một trong 4 gen tham gia mã hóa tổng hợp 2,4-diaxetinhloroglucinol có tính bảo thủ cao [9], kết quả nhận được cho thấy gen này chỉ tồn tại ở chủng *P. fluorescens* Ps7-1 (hình 2).

Kết quả ở bảng 2 và hình 3 cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn *Pseudomonas* chọn lọc đều có khả năng sinh tổng hợp siderôpho, nhưng không đồng nhất, mạnh nhất ở chủng *P. chlororaphis* Ps9-1. Siderôpho đóng vai trò quan trọng trong cạnh tranh ion sắt - một nguyên tố cần thiết cho tế bào sống, nhưng tồn tại rất ít ở dạng có giá trị dinh dưỡng. Có tài liệu cho rằng siderôpho của nhóm vi khuẩn *Pseudomonas* sinh huỳnh quang có ái lực với ion sắt mạnh hơn so với siderôpho của các vi sinh vật gây bệnh ở cây [10].

Theo Chet và cs. (1990) [2], các vi sinh vật kháng nấm có hiệu quả là những chủng có nhiều cơ chế tác động khác nhau. Ở các chủng *Pseudomonas* chọn lọc, sự kháng nấm cũng có thể là kết quả của sự kết hợp nhiều cơ chế khác nhau; cụ thể ở chủng *P. chlororaphis* Ps9-1 và các chủng *P. fluorescens* ĐDPT5-1, RDPT5-DT2, ĐDPT5-2, RDPT7-F2, ĐDPT9 là sự kết hợp cơ chế thủy phân protein của thành tế bào,

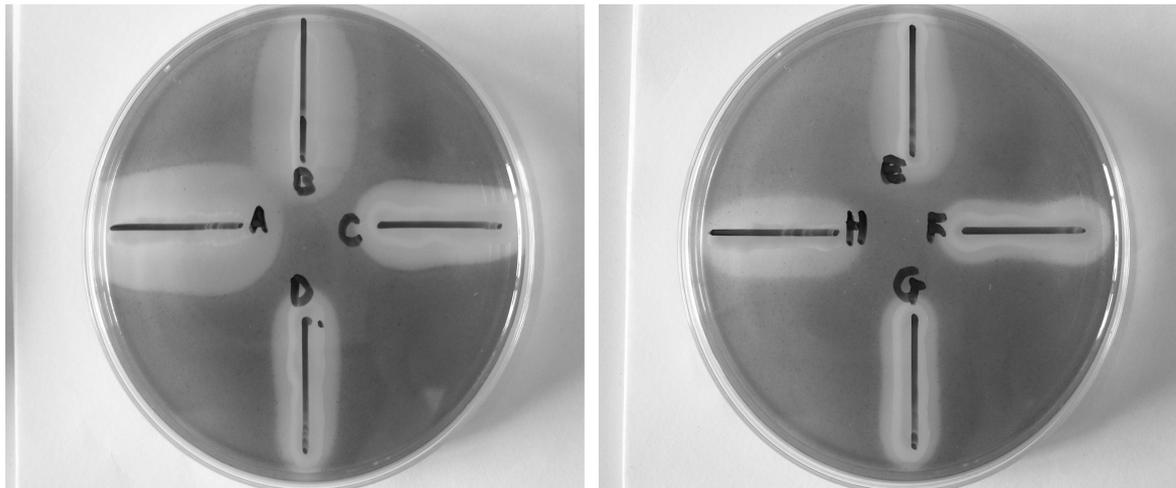
sự cạnh tranh ion sắt nhờ các siderôpho, tác động của xianit; riêng ở chủng *P. fluorescens* Ps7-1, còn có sự tham gia của 2,4-diaxetinhloroglucinol.

M A B C D E F G



Hình 2. Điện di sản phẩm nhân bản phân đoạn *phlD*

Ghi chú: M. chỉ thị phân tử (marker); A. Ps9-1; B. Ps7-1; C. RDPT5-DT2; D. ĐDPT5-1; E. ĐDPT5-2; F. RDPT7-F2; G. ĐDPT9.



Hình 3. Khả năng sinh tổng hợp siderôpho của các chủng vi khuẩn *Pseudomonas* chọn lọc
 Ghi chú: A. Ps9-1; B. Ps7-1; C. ĐDPT5-1; D. RDPT5-DT2; E. ĐDPT5-2; F. RDPT7-F2; G. ĐDPT9; H. C48.

III. KẾT LUẬN

Một số tác nhân cơ bản liên quan tới cơ chế kháng nấm của 7 chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sinh huỳnh quang chọn lọc đã được xác định. Tất cả các chủng đều có khả năng sinh tổng hợp siderôpho, xianit và cho proteinaza ngoại bào, nhưng không đồng nhất; chúng không có khả năng sinh tổng hợp chitinaza, glucanaza và xenluloza. Chỉ có chủng *P. fluorescens* Ps7-1 mang gien mã hóa kháng sinh 2,4-diaxetino-phloroglucinol. Sự kháng nấm *F. oxysporum* của các chủng vi khuẩn *Pseudo-monas* chọn lọc có thể là kết quả của sự kết hợp các cơ chế đã được xác định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Berg G. et al.**, 2000: Can. J. Microbiol., 46, 1128-1137.
2. **Chet I. et al.**, 1990: Plant and Soil, 129, 85-92.
3. **Klopper J. W. et al.**, 1980: Microbiol., 4317-320.
4. **Kurze S. et al.**, 2001: Biological Control of Fungal Strawberry Diseases by *Serratia plymuthica* HRO-C48.
5. **Marten P.**, 1999: Rhizobacterien von Raps fuer den biologischen Pflanzenschutz. Doctor Arbeit. Rostock University.
6. **Nguyễn Thị Tuyết Nhung và cs.**, 2003: Tạp chí Di truyền học và ứng dụng, 1: 18-25.
7. **Nguyễn Thị Tuyết Nhung và cs.**, 2003: Tuyển tập Hội thảo những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong sinh học lần thứ hai: 189-192.
8. **Nielsen M. N. et al.**, 1998: Appl. Environ. Microbiol., 64: 3563-3569.
9. **Raaijmakers J. et al.**, 1997: Appl. Environ. Microbiol., 63: 881-887.
10. **Scher F. M. and Baker R.**, 1982: Phytopathology, 72: 1567-1573.
11. **Schwyn B. and Neilands B.**, 1987: Anal. Biochem., 160: 47-56.
12. **Thomashow L. S.**, 1996: Current opinion in Biotechnology, 7: 343-347.

**STUDY ON THE ANTAGONISTIC MECHANISM OF SOME
SELECTED FLUORESCENT *Pseudomonas* STRAINS
TOWARD *Fusarium oxysporum***

NGUYEN THI TUYET NHUNG, NGUYEN MINH ANH,
PHAN THI HOAI ANH, NGUYEN NGOC DUNG

SUMMARY

The presence of antifungal agents in 7 selected fluorescent *Pseudomonas* strains were tested. The obtained results showed that none of them was able to decompose chitin, laminarin and cellulose, but capable to use skim milk. All strains could produce siderophores and cyanid, but there was a difference among them. Only the *P. fluorescens* strain Ps7-1 showed the presence of *phlD*, one of 4 genes coding 2,4-Diacetylphloroglucinol. With such results, it could be suggested that the antagonism of some selected fluorescent *Pseudomonas* strains toward *F. oxysporum* might be a combination of more than one mechanism.

Ngày nhận bài: 8-5-2004