

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

****000****



KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

**ĐỊNH DANH NẤM *Trichoderma* DỰA VÀO TRÌNH TỰ
VÙNG ITS – rDNA VÀ VÙNG *TEF***

Ngành học: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Niên khóa : 2002 – 2006

Sinh viên thực hiện : LẠI HÀ TỐ HOA

Thành phố Hồ Chí Minh
- Tháng 9/2006

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
****000****

ĐỊNH DANH NẤM *Trichoderma* DỰA VÀO TRÌNH TỰ
VÙNG ITS – rDNA VÀ VÙNG *TEF*

Giáo viên hướng dẫn
TS. LÊ ĐÌNH ĐÔN

Sinh viên thực hiện
LẠI HÀ TỐ HOA

Thành phố Hồ Chí Minh
-Tháng 9/2006-

Lời Cảm Ơn

Em xin chân thành cảm ơn Ban giám hiệu cùng toàn thể các thầy, cô của trường Đại học Nông Lâm TP. HCM đã tận tình truyền đạt kiến thức và kinh nghiệm trong suốt 4 năm qua. Đặc biệt TS. Lê Đình Đôn đã hướng dẫn và hỗ trợ cho em rất nhiều để hoàn thành tốt luận văn này.

Em xin chân thành cảm ơn các anh, chị ở phòng Bảo Vệ Thực Vật (Phòng 118) khu Phụng Vỹ Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM và các anh chị ở Phòng Công Nghệ Sinh Học Động- Thực Vật - Trung Tâm Phân Tích Thí Nghiệm Hoá – Sinh -Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM đã giúp đỡ và động viên em trong suốt khoá luận.

Xin gửi lời cảm ơn đến gia đình, những người thân và bạn bè đã giúp đỡ và động viên trong suốt thời gian học tập cũng như trong quá trình hoàn thành luận văn này.

TÓM TẮT

LẠI HÀ TỐ HOA, ĐH Nông Lâm TPHCM, Tháng 6-2006. “ĐỊNH DANH NẤM *Trichoderma* DỰA VÀO TRÌNH TỰ VÙNG ITS – rDNA VÀ VÙNG *TEF*”

Tại phòng Bảo vệ thực vật, Khoa nông học trường Đại học Nông Lâm và trung tâm phân tích thí nghiệm – phòng Công nghệ sinh học Thực vật Đại học Nông Lâm – TP.HCM.

Thời gian thực hiện đề tài: 20/2/2006 đến 5/2006.

Giáo viên hướng dẫn: TS. Lê Đình Đôn.

Nội dung nghiên cứu:

- Phục hồi các dòng nấm *Trichoderma* được phân lập từ những địa điểm khác nhau ở Việt Nam (10 mẫu), các mẫu này chỉ được định danh dựa vào hình thái học của các dòng nấm và những dòng *Trichoderma* của nước ngoài (10 mẫu) từ những ống nghiệm chứa bào tử.
- Nhân sinh khối, thu sinh khối nấm.
- Ly trích thu DNA.
- Thực hiện phản ứng PCR khuếch đại vùng ITS1 – 5,8 – ITS2 bằng primer ITS4, ITS5 và khuếch đại vùng *tef1 – tef2* bằng primer ElongR, ElongF của các dòng nấm *Trichoderma* .
- Đọc trình tự sản phẩm PCR của dòng *Trichoderma* trên cả vùng khuếch đại bằng cặp primer ITS4, ITS5 và cặp primer Elong R, Elong F; so sánh với cơ sở dữ liệu (NCBI) để đánh giá mức độ tương đồng của vùng ITS1-5,8-ITS2 và vùng *tef1 – tef2* từ đó xác định chính xác tên loài của từng dòng nấm.

Kết quả đạt được:

- Tất cả 20 dòng nấm *Trichoderma* của Việt Nam và nước ngoài đều phục hồi và thu được sinh khối cần cho ly trích DNA nhân sợi nấm.
- Ly trích DNA tổng số.

- Chạy PCR bằng cặp primer ITS4, ITS5 và cặp primer Elong R, Elong F trên 4 dòng *T.harzianum* (T4), *T.koningii* (T6), *T.asperellum* (T19), *Trichoderma spp.* (2 – 41 – 2) và dòng *T.harzianum* (GJS 00-39 – mẫu *Trichoderma* của nước ngoài đã được định danh) dùng làm mẫu đối chứng
- Tiến hành khuếch đại vùng rDNA – ITS và vùng *Tef* với 2 cặp primer: ITS1-ITS2 thu được sản phẩm khuếch đại có kích thước 670 bp (căn cứ trên thang ladder), tương tự như trên đối với cặp primer: ElongR, ElongF thu được sản phẩm khuếch đại có kích thước 260 bp (căn cứ trên thang ladder) trên 4 dòng *Trichoderma* của Việt Nam và 1 dòng đối chứng của nước ngoài *Trichoderma harzianum*.
- Giải được trình tự vùng ITS1 – 5,8S – ITS2 và vùng *Tef* của dòng *Trichoderma harzianum* (T4)
- So sánh trình tự DNA vùng ITS1 – 5,8S – ITS2 giữa dòng *Trichoderma* nghiên cứu với những dòng *Trichoderma* trên cơ sở dữ liệu NCBI và dựa vào phần mềm CLUSTALX.
 - Khẳng định T4: *Trichoderma asperellum*.
 - Kích thước của vùng ITS1 – 5,8S – ITS2 là 54 5bp.
 - Kích thước vùng *Tef* là 223bp.
 - Trình tự nucleotid ở vùng ITS1 – 5,8S – ITS2 của dòng *Trichoderma asperellum* (T4) của Việt Nam so với dòng *Trichoderma asperellum* có mức độ tương đồng là 98%.
 - Trình tự nucleotid ở vùng *Tef1fw – Tef2rev* của dòng *Trichoderma asperellum* (T4) của Việt Nam so với dòng *Trichoderma asperellum* có mức độ tương đồng 98%.

MỤC LỤC

Trang tựa	
Lời cảm ơn.....	iii
Tóm tắt	iv
Mục lục	vi
Danh sách chữ viết tắt.....	x
Danh sách các bảng và hình	xi
<u>PHẦN 1: GIỚI THIỆU VÀ TỔNG QUAN TÀI LIỆU</u>	
1.1 Đặt vấn đề	1
1.2 Mục đích nghiên cứu	2
1.3 Yêu cầu.....	2
<u>PHẦN 2: TỔNG QUAN TÀI LIỆU</u>	
2.1 Giới thiệu về nấm <i>Trichoderma</i>	3
2.1.1 Phân loại	3
2.1.2 Nguồn gốc.....	3
2.1.3 Đặc điểm hình thái	3
2.1.4 Đặc điểm sinh thái	4
2.1.5 Cơ chế tác động của nấm <i>trichoderma</i> lên các nấm gây bệnh cho cây trồng	5
2.1.6 Cơ chế đối kháng của <i>trichoderma</i> :	6
2.1.6.1 Kháng sinh	6
2.1.6.2 Ký sinh	7
2.1.6.3 Cạnh tranh.....	7
2.1.7 Ứng dụng của nấm <i>Tricoderma</i> trong các lĩnh vực	8
2.1.7.1 Lương thực và nguyên liệu sợi.....	8
2.1.7.2 Chất sinh học	8

2.1.7.3	Chất giúp tăng sự phát triển của cây	9
2.1.7.4	Như là nguồn trao đổi thông tin di truyền.	10
2.2	TỔNG QUAN VỀ ITS – rDNA	10
2.2.1	Giới thiệu về vùng rDNA và vùng ITS	10
2.2.2	Lịch sử nghiên cứu rDNA	12
2.2.3	Sử dụng vùng rDNA để nghiên cứu sự đa dạng di truyền	13
2.2.4	Nghiên cứu trên vùng rDNA-ITS và vùng <i>Tef</i> của nấm <i>Trichoderma</i>	13
2.3.	GIỚI THIỆU KỸ THUẬT PCR	14
2.3.1	Giới thiệu sơ lược về phản ứng PCR	14
2.3.1.1	Khái niệm.....	15
2.3.1.2	Nguyên tắc	15
2.3.2	Các yếu tố ảnh hưởng	17
2.3.2.1	DNA khuôn	17
2.3.2.2	Enzyme.....	17
2.3.2.3	Primer và nhiệt độ lai	17
2.3.2.4	Các thành phần khác trong phản ứng PCR.....	18
2.3.2.5	Số lượng chu kỳ phản ứng	18
2.3.2.6	Thiết bị và dụng cụ phản ứng PCR.....	18
2.3.3	Ứng dụng của PCR.....	18
2.4.	GIỚI THIỆU SƠ LƯỢC VỀ KỸ THUẬT DNA SEQUENCING	20
2.5.	TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG NƯỚC	21
2.6	TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU THẾ GIỚI.....	22
2.7	HƯỚNG PHÁT TRIỂN TƯƠNG LAI TRÊN CÁC DÒNG NẤM <i>TRICHODERMA</i> (HARMAN 2000)	22
<u>PHẦN 3 : VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</u>		
3.1	THỜI GIAN, ĐỊA ĐIỂM, ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	24
3.1.1	Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	24
3.1.2	Đối tượng nghiên cứu	24

3.2 HOÁ CHẤT VÀ TRANG THIẾT BỊ THÍ NGHIỆM.....	26
3.2.1 Hóa chất.....	26
3.2.1.1 Môi trường để lưu trữ nguồn nấm.....	26
3.2.1.2 Môi trường để phục hồi nhanh dòng nấm.....	26
3.2.1.3 Hoá chất cần cho dung dịch nhân sinh khối nấm.....	26
3.2.1.4 Hoá chất cần cho tách chiết DNA sợi nấm.....	26
3.2.1.5 Hoá chất sử dụng trong điện di.....	27
3.2.1.6 Hoá chất cho phản ứng PCR.....	27
3.2.1.7 Hoá chất trong tinh sạch sản phẩm PCR.....	27
3.2.2 Dụng cụ và thiết bị.....	27
3.3 PHỤC HỒI CÁC DÒNG NẤM <i>TRICHODERMA</i>.....	28
3.4 NHÂN SINH VÀ THU SINH KHỐI NẤM.....	28
3.5 LY TRÍCH DNA TỪ NẤM ĐÃ ĐƯỢC NGHIÊN MỊN.....	29
3.6 KIỂM TRA KẾT QUẢ LY TRÍCH DNA VÀ PHA LOÃNG DNA.....	30
3.7 THỰC HIỆN PHẢN ỨNG PCR KHUẾCH ĐẠI VÙNG ITS-rDNA, <i>TEF</i> CÁC DÒNG NẤM <i>TRICHODERMA</i>.....	31
3.7.1 Vật liệu và thành phần hoá chất cho phản ứng PCR.....	31
3.7.2 Chu kỳ nhiệt phản ứng PCR (Wang C. Z., 2002).....	33
3.7.3 Đánh giá kết quả PCR.....	33
3.8 ĐỌC TRÌNH TỰ SẢN PHẨM PCR.....	35
3.8.1 Chuẩn bị DNA khuôn.....	35
3.8.1.1 Tinh sạch sản phẩm PCR.....	35
3.8.1.2 Định lượng sản phẩm PCR đã tinh sạch.....	38
3.8.2 Chạy điện di và ghi nhận tín hiệu trên máy sequencer.....	38
<u>PHẦN 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</u>	
4.1 Kết quả phục hồi nấm <i>Trichoderma</i> từ những ống nghiệm chứa những bào tử nấm.....	39
4.2. Kết quả ly trích thu DNA từ các dòng nấm <i>Trichoderma</i>.....	40

4.3	Kết quả khuếch đại vùng ITS1 – 5,8S – ITS2.....	41
4.4	Pha loãng sản phẩm PCR đã được tinh sạch.....	42
4.5	Sản phẩm PCR tinh sạch của dòng <i>Trichoderma harzianum</i>	43
4.6	Kết quả giải trình tự vùng ITS-rDNA và vùng <i>Tef</i>	43
4.6.1	So sánh trình tự nucleotid giữa vùng ITS – rDNA và vùng <i>Tef</i>	43
4.6.2	Kết quả giải trình tự vùng ITS1 – 5,8S – ITS2.....	48
4.6.3	Kết quả giải trình tự vùng <i>Tef1fw</i> – <i>Tef2rev</i> của dòng T4.....	50
<u>PHẦN 5: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ</u>		
5.1	Kết luận	51
5.2	Đề nghị.....	52
5.3	Hạn chế đề tài	52
	Tài liệu tham khảo.....	53
	Phụ lục	55

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

dNTP: 2' – dideoxynucleotide – 5' – triphosphate.

dATP: 2' – dideoxyadenine – 5' – triphosphate.

dCTP: 2' – dideoxycytosine – 5' – triphosphate.

dGTP: 2' – dideoxyguanine – 5' – triphosphate.

dTTP: 2' – dideoxyadenine – 5' – triphosphate.

EDTA: Ethylene Diamin Tetracetic Acid.

ETS: External Transcribed Spacer.

ITS: Internal Transcribed Spacer.

LSU: Large Subunit.

NCBI: National Center for Biotechnology Informatic.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

rDNA: ribosomal DNA.

RAPD: Random Amplified Polymorphism DNA.

RNA: Ribonucleic acid.

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism.

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate.

SSU: Small Subunit.

Taq: *Thermus aquaticus*..

TAE: Tricacetic ethylene diamine tetra acetate.

TE: Tris ethylene diamine tetra acetate.

T_m: Melting Temperature.

DANH SÁCH CÁC HÌNH VÀ BẢNG

Hình 2.1 Khuẩn ty và cơ quan sinh bào tử	4
Hình 2.2 Sợi nấm phát triển trên môi trường PDA	4
Hình 2.3 Hệ sợi nấm <i>Trichoderma</i> trên khuẩn ty nấm <i>Rhizoctonia Solani</i>	5
Hình 2.4 Sợi nấm <i>Trichoderma</i> ăn mòn vách tế bào và tạo nên lỗ hổng trên sợi nấm <i>Rhizoctonia Solani</i>	5
Hình 2.5 <i>Trichoderma</i> ký sinh trên <i>Pythium</i> gây bệnh trên rễ cây họ đậu	6
Hình 2.6 Sự xâm chiếm của vi khuẩn gây bệnh lên rễ cây bắp và tiêu diệt vi khuẩn của <i>Trichoderma</i>	6
Hình 2.7 Sự tăng trưởng của bộ rễ cây họ đậu khi xử lý nấm <i>Trichoderma</i> và khi không sử dụng.....	9
Hình 2.8 Sự gia tăng sản lượng và phát triển của cây trồng có xử lý <i>Trichoderma</i> dòng T22.....	9
Hình 2.9 Sơ đồ vùng rDNA – ITS của nấm	11
Hình 3.1. Ứng dụng kỹ thuật PCR để khuếch đại trình tự đoạn gene <i>tef1 fw – tef2rev</i>	31
Hình 3.2 Quy trình khuếch đại vùng ITS – rDNA bằng primer ITS4 và ITS5, Elong R và Elong F.....	34
Hình 3.3 Sơ đồ tóm tắt quy trình đọc trình tự sản phẩm PCR	38
Hình 4.1 Kết quả ly trích DNA tổng số từ các dòng <i>Trichoderma</i>	40
Hình 4.2 DNA tổng số được pha loãng trước khi chạy PCR	41
Hình 4.3 Sản phẩm PCR khi khuếch đại bằng cặp primer Elong R – Elong F.....	42
Hình 4.4 Sản phẩm PCR khi khuếch đại bằng cặp primer ITS4 và ITS5	42
Hình 4.5 Sản phẩm PCR được tinh sạch trước khi đọc trình tự DNA	43
Bảng 4.1: Các nguồn nấm <i>Trichoderma</i> trên genebank được dùng để so sánh vùng ITS1 – 5,8S – ITS2	44
Bảng 5.2 Các nguồn nấm <i>Trichoderma</i> trên genebank được dùng để so sánh vùng <i>Tef</i>	47

PHẦN 1: MỞ ĐẦU

1.1 Đặt vấn đề

Ngày nay những vấn nạn về môi trường sinh thái, môi trường sống của con người vật nuôi cũng như những vấn đề về an toàn thực phẩm và sức khoẻ cộng đồng ngày càng được quan tâm nhiều hơn, khi mà những ca cấp cứu vì ngộ độc do ăn phải rau quả chứa dư lượng thuốc trừ sâu và thuốc kích thích sinh trưởng ngày một tăng lên.

Công nghệ hoá học phát triển kéo theo việc sản xuất hàng loạt thuốc bảo vệ thực vật từ các loại hoá chất tổng hợp. Chúng ta không thể phủ nhận khả năng diệt trừ sâu bệnh, côn trùng, nấm, vi khuẩn gây bệnh trên cây trồng của những sản phẩm thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc hoá học là rất nhanh và hiệu quả. Thuốc kích thích sinh trưởng có nguồn gốc hoá học cũng tác động nhanh chóng lên sự sinh trưởng của: củ, quả, thân, lá cây trồng. Nhưng hệ lụy của thuốc bảo vệ thực vật và thuốc kích thích sinh trưởng có nguồn gốc hóa học đó là sự tàn phá nhanh chóng môi trường sinh, gây tình trạng ô nhiễm đất đai, nguồn nước và cả không khí, từ đó gây hại cho sức khoẻ cho con người và vật nuôi, tiêu diệt cả những loài thiên địch có lợi cho đất đai và cây trồng, làm phá vỡ cân bằng sinh thái giữa các giống loài, gây tình trạng ngộ độc có thể dẫn đến chết người.

Hơn thế nữa, xu hướng của thời đại đòi hỏi nghiêm ngặt hơn những chỉ tiêu về an toàn thực phẩm nói chung và an toàn khi sử dụng rau quả nói riêng. Vì thế cần phải tìm ra những giải pháp vừa giải quyết những vấn đề sau: một là: vấn nạn về môi do những loại thuốc hoá học rồi sẽ tác hại ngày một nhiều hơn đến môi sinh và sức khoẻ cộng đồng; hai là: để đảm bảo chỉ tiêu an toàn cho môi trường sống; ba là: tìm đầu ra cho nông sản Việt Nam trở nên cần thiết và cấp bách, khi Việt Nam gia nhập WTO.

Vì vậy hướng phát triển nông nghiệp bền vững là giải pháp tối ưu để giải quyết những vấn đề nêu trên. Bước đầu tiên là cần thay dần thuốc bảo vệ thực vật có

nguồn gốc hoá học sang việc dùng những chế phẩm có nguồn gốc sinh học. Nấm *Tricoderma* là loại nấm đối kháng mạnh, có phổ đối kháng rộng lớn đối với các loại nấm gây bệnh và sâu bệnh hại cây trồng. Ngoài ra, nấm *Tricoderma* còn có khả năng kích thích sự phát triển của bộ rễ cây trồng khi có xử lý *Trichoderma*; vì thế nấm *Tricoderma* trở thành nguồn sinh vật tự nhiên hữu ích và hiệu quả trong việc tạo ra những chế phẩm sinh học phòng trừ nấm bệnh cho cây trồng và những sản phẩm kích thích sự phát triển của bộ rễ nhờ vào khả năng loại bỏ mầm bệnh ở bộ rễ cây của nấm *Tricoderma* giúp cho cây khoẻ mạnh hơn thì khả năng hấp thu chất dinh dưỡng của cây cũng tối ưu hơn.

Tuy nhiên những nghiên cứu về hình thái học, về các phản ứng sinh hoá hay qua phương pháp tuyển chọn các dòng nấm theo phương pháp cổ điển cần thời gian dài mà kết quả không chính xác. Cùng với sự phát triển vượt bậc của công nghệ sinh học và sinh học phân tử với nhiều kỹ thuật hiện đại như PCR, RFLP, AFLP, RAPD đã được xem như công cụ hữu ích vì thời gian tiến hành thí nghiệm cho đến lúc cho ra kết quả cần thời gian ngắn, chính xác trong nghiên cứu tính đa dạng di truyền, biểu hiện của gen liên quan đến cơ chế tác động của sinh vật.

1.2 Mục đích nghiên cứu

Khuếch đại vùng gen ITS – rDNA và vùng *Tef* các nguồn nấm *Trichoderma* từ đó giải trình tự đoạn DNA khuếch đại, định danh các dòng nấm *Trichoderma.spp*.

1.3 Yêu cầu

- Phục hồi các dòng nấm *Trichoderma* từ những ống nghiệm chứa bào tử.
- Nuôi cấy và nhân sinh khối các dòng nấm.
- Thu sinh khối và nghiền mẫu nấm.
- Ly trích DNA của các dòng nấm.
- Thực hiện quy trình PCR: khuếch đại vùng gen ITS1 – 5,8 S – ITS2 và vùng *Tef1fw – Tef2rev* của các dòng nấm *Trichoderma*.
- Đọc trình tự vùng gen ITS1 – 5,8 S – ITS2 và vùng *Tef1fw – Tef2rev* trực tiếp từ sản phẩm PCR và so sánh các thông tin từ cơ sở dữ liệu NCBI để đối chiếu xác định tên loài.

PHẦN 2: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1 Giới thiệu về nấm *Trichoderma*

2.1.1 Phân loại

Giới : Fungi

Ngành : Ascomycota

Lớp: Euascomycetes

Bộ: Hypocreacea

Giống: *Trichoderma*

2.1.2 Nguồn gốc

Trichoderma là một loại nấm đất. Chúng được tìm thấy khắp mọi nơi trừ những vĩ độ cực Nam và cực Bắc. Nấm *Trichoderme* phổ biến trong những khu rừng nhiệt đới ẩm hay cận nhiệt đới, chúng trên rễ cây, trong đất hay sống trên xác sinh vật đã chết, xác bã hữu cơ hay kí sinh trên những loại nấm khác. Mỗi dòng nấm *Trichoderme* spp. khác nhau sẽ yêu cầu nhiệt độ và độ ẩm khác nhau (Gary E. Harman 2000).

Trichoderma phát triển ở trong đất có độ pH từ 3,5 cho đến 7 nhưng không thể phát triển trong điều kiện pH nhỏ hơn 3,5, phát triển tốt ở độ pH trung tính.

2.1.3 Đặc điểm hình thái

Trichoderma là một loại nấm bất toàn, sinh sản vô tính bằng đính bào tử từ

❖ **Khuẩn ty:** Khuẩn ty của vi nấm không màu, cuống sinh bào tử phân nhánh nhiều, ở cuối nhánh phát triển thành một khối tròn mang các bào tử trần không có vách ngăn, không màu, liên kết nhau thành chùm nhỏ ở đầu cành nhờ chất nhầy. Bào tử hình cầu, hình elip hoặc hình thuôn. Khuẩn lạc nấm có màu trắng hoặc từ lục trắng đến màu lục, vàng, xanh. Các chủng nấm *Trichoderma* phát triển rất nhanh, chúng có thể đạt đường kính khuẩn lạc từ 2-9 cm sau 4 ngày nuôi cấy (Bùi Xuân Đồng, 1982. Nhóm nấm Hyphomyces ở Việt Nam. Tập I. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội).



Hình 2.1 Khuẩn ty và cơ quan sinh bào tử (Gary.J. Semuels).



Hình 2.2 Sợi nấm phát triển trên môi trường PDA (vùng xanh chứa bào tử, vùng trắng không chứa bào tử).(Gary. J. Semuels)

❖ Bào tử: Có màu xanh đặc trưng, nhưng cũng có thể có màu trắng như *T.virens* hay vàng hay xanh xám tùy thuộc vào dòng nấm. Bào tử luôn đơn bào, hình elip, ovan, hình cầu, hay hình chữ nhật và đa số các bào tử thì trơn láng. Kích thước bào tử của nấm *Trichoderma* không quá 5 μm .

❖ Bào tử chống chịu – chlamydospores (theo Gary J.Samuels 2004):

Chlamydospores là những cấu trúc dạng ngủ làm tăng khả năng sống sót trong đất- môi trường sống nguyên thủy của *Trichoderma*. Chlamydospores có thể được dùng để điều chế chất kiểm soát sinh học do khả năng sống sót mạnh mẽ của chúng trong môi trường không được cung cấp chất dinh dưỡng. Chlamydospores của nấm *Trichoderma harzianum* có thể tồn tại 110 -130 ngày dù không cung cấp chất dinh dưỡng.

2.1.4 Đặc điểm sinh thái

Điều kiện phát triển tối ưu của nấm 25- 30⁰C. Một vài loại phát triển tốt ở 35⁰C. Một số ít phát triển tốt ở 40⁰C (Gary J. Samuels, 2000). Tuy nhiên, theo Prasun K. Mukherjee và Kanthadai Ragh (1997) thì đa số các loài *Trichoderma* phát triển mạnh ở 25- 30⁰C, phát triển chậm ở 35⁰C -37⁰C. Hình thái khác nhau khi ở những nhiệt độ khác nhau. Ở 35 ⁰C chúng tạo ra những khuẩn lạc rắn dị thường với sự hình thành bào tử nhỏ và ở mép bất thường, ở 37 ⁰C không tạo ra bào tử sau 7 ngày nuôi cấy.

2.1.5 Cơ chế tác động của nấm *Trichoderma* lên nấm gây bệnh cây trồng

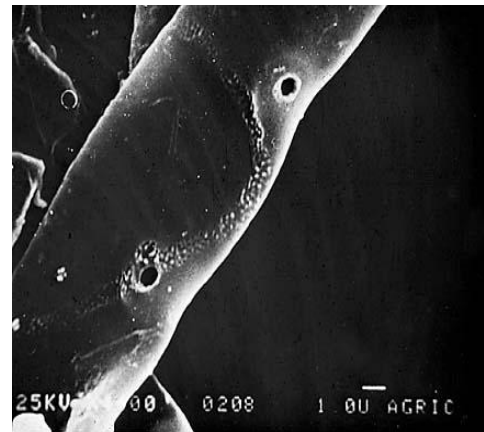
Nấm *Trichoderma* được sử dụng để bảo vệ cây trồng chống các bệnh do nấm hại (*Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinium*, *Botrytin*, *Fuaorium*) gây bệnh trên các loại cây trồng như: Bông, nho, bắp, đậu nành, mận. Nấm *Trichoderma* không những ảnh hưởng trực tiếp lên mầm bệnh mà còn ảnh hưởng gián tiếp lên hệ rễ giả bằng khả năng loại bỏ mầm bệnh hay hỗ trợ cung cấp chất dinh dưỡng cho cây (theo Gary J.Samuels 2004).

Harman .E. Gary (2000) : mô tả hiện tượng *Trichoderma* ký sinh trên nấm gây bệnh là hiện tượng “giao thoa sợi nấm”. Hiện tượng giao thoa gồm 3 giai đoạn:

- (1) Sợi nấm *Trichoderma* bao vây lấy sợi nấm gây bệnh.
- (2) Sợi nấm *Trichoderma* thắt chặt lấy sợi nấm gây bệnh.
- (3) Sợi nấm *Trichoderma* đâm xuyên làm thủng sợi nấm gây bệnh làm cho chất nguyên sinh trong sợi nấm gây bệnh bị phân huỷ và dẫn đến sợi nấm gây bệnh sẽ chết.



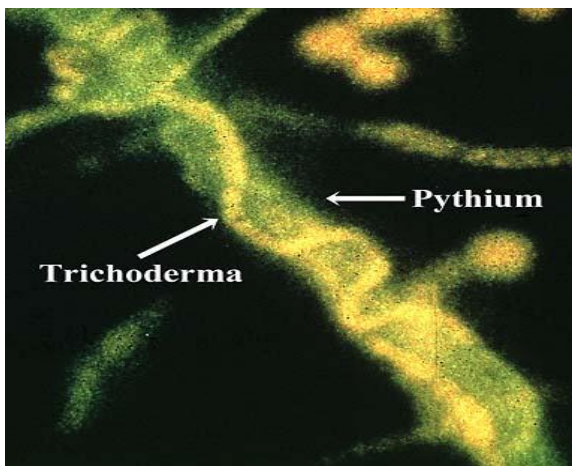
Hình 2.3 Hệ sợi nấm *Trichoderma* ký sinh trên khuẩn ty nấm *R.solani*.
(Harman, 2000)



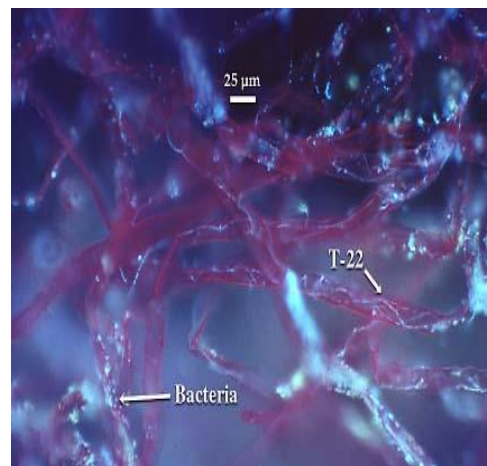
Hình 2.4 Sợi nấm *Trichoderma* ăn mòn vách tế bào tạo lỗ hổng trên sợi nấm *R .solani* (Harman, 2000)

Theo Gary J.Samuels 2000: Khi cộng sinh trên rễ, nấm *Trichoderma* ăn mòn ký sinh và mặt khác dành chất dinh dưỡng từ những loài nấm khác. Chúng phát triển mạnh cho cả hai cơ chế ký sinh vào các loại nấm khác và tăng sự phát triển của cây và rễ. Nó bao gồm các cơ chế sau:

- Nấm kí sinh
- Sự kháng sinh
- Sự cạnh tranh dinh dưỡng
- Chịu đựng sự căng thẳng, tăng cường phát triển của rễ cây.
- Hoà tan, cô đọng dinh dưỡng vô cơ.
- Gây ra sự đối kháng.
- Enzyme làm mất hoạt tính của các mầm bệnh.



Hình 2.5 *Trichoderma* ký sinh trên *Pythium* gây bệnh trên rễ cây họ đậu (*Trichoderma* nhuộm màu vàng *Pythium* nhuộm màu lục) (Harman, 2000)



Hình 2.6 sự xâm chiếm của vi khuẩn gây bệnh lên rễ cây bắp và mức độ tiêu diệt vi khuẩn của nấm *Trichoderma* (Harman, 2000)

2.1.6 Cơ chế đối kháng của *Trichoderma* được mô tả như sau

2.1.6.1 Kháng sinh

- Gliotoxin và gliovirin: được sản xuất bởi *T.virens* và chúng kiềm hãm sự phát triển của các loài *Rhizoctonia* và *Pythium*.
- Alkynpyroses (hương dừa) được sản xuất bởi: *T.atroviride*, *T.konigii*, *T.hamatum*. Hoạt động của Phytotoxin có thể ngăn cản sự nảy mầm của những noãn bào tử của nấm gây bệnh *Phytophthora cinnamomea* và bào tử của *Botrytis cinerea*.

- Isonitriles được sản xuất bởi *T.hamatum*, *T.harzianum*, *T.viride*, *T.konigii*, *T.Polysprum* hạn chế sự phát triển của những nấm bệnh.
- Peptalols: được sản xuất từ *T.polysporum*, *T.harzianum*, *T.konigii*, hoạt động trên màng để ngăn cản sự tổng hợp enzyme membrane associated trong sự hình thành tế bào, đồng thời hoạt động hỗ trợ enzyme phá huỷ thành tế bào ngăn chặn sự phát triển của mầm bệnh.
- Viridin được sản xuất bởi *T.virens* hạn chế sự nảy mầm của bào tử, nó cũng có khả năng như một độc tố thực vật có hiệu lực như một loại thuốc diệt cỏ.

2.1.6.2 Ký sinh

- Tính hướng hoá chất: *Trichoderma* có thể nhận ra vật chủ của nó. Nấm ký sinh phân nhánh hướng về những nấm đã được định trước. Mặc dù tính hướng hoá chất được cho là thuận lợi cho đối kháng nhưng nó vẫn không được cho là biện pháp kỹ thuật thiết yếu đối với nấm ký sinh.
- Sự thừa nhận về mặt sinh học phân tử: đó là sự sắp xếp bởi lectin trên bề mặt tế bào của mầm bệnh và vật đối chứng.
- Tấn công trực tiếp: *Trichoderma* gắn vào và cuộn quanh sợi nấm vật chủ thông qua hình thành các dạng móc hay dạng giác bám rồi bài tiết enzyme chitinase, glucanase, protease. Những enzyme này có khả năng bào mòn thành tế bào của vật bị bám giữ hay tiết ra những loại kháng sinh gây thủng sợi nấm bệnh.

2.1.6.3 Cạnh tranh

- Sự khai thác cạnh tranh: nấm *Trichoderma* làm suy kiệt và sau đó hút hết dưỡng chất của nấm gây bệnh một cách thụ động và dai dẳng bằng những bào tử chống chịu (chlamydospores).
- Sự cạnh tranh đối với mô chết hoại: nấm gây bệnh *Botrytis* và *Sclerotinia* xâm nhập vào những mô già hay chết như là một nền tảng để từ đó xâm nhập vào những mô khoẻ. Nấm *Trichoderma* sử dụng những mô già và mô chết của cây chủ, bằng cách đó nấm *Trichoderma* cạnh tranh và làm mất đi sự xâm nhiễm của nấm *Botrytis* và *Sclerotinia* trên bề mặt lá.

- Sự cạnh tranh dịch tiết của cây: dịch tiết của cây kích thích sự nảy mầm những túi bào tử nấm *Phytium* (nấm gây bệnh cho cây), từ đó hình thành nên sợi nấm và lây nhiễm vào cây. Nấm *Trichoderma* làm giảm sự nảy mầm của nấm *Phytium* bằng cách sử dụng dịch tiết đó vì thế mà các bào tử *Phytium* không thể nảy mầm.
- Sự xâm nhiễm những vị trí bị thương: ngăn cản sự lây nhiễm của nấm bệnh bằng cách chiếm vị trí bị thương đó.

2.1.7 Ứng dụng của nấm *trichoderma* trong các lĩnh vực

2.1.7.1 Lương thực và nguyên liệu sợi

Nấm *Trichoderma* có hiệu lực cao trong sản xuất nhiều loại enzyme ngoại bào. Chúng được sử dụng cho sản xuất cellulose và những enzyme khác để làm giảm tính phức tạp của polysaccharide. Polysaccharide là chất được sử dụng nhiều trong lương thực và trong công nghiệp sợi. Chẳng hạn, cellulose của những sợi nấm này được sử dụng để làm tăng độ mềm và tăng độ trắng của vải bông.

Những loại enzyme này cũng được sử dụng trong thức ăn gia cầm để tăng sự tiêu hoá hemicellulose từ lúa mạch hay từ những loại thực phẩm khác (Gary E. Harma, Cornell University, Geneva, NY14456).

2.1.7.2 Chất sinh học

Nấm *Trichoderma* thường được sử dụng để kiểm soát bệnh cây trong công trình nghiên cứu của Well và cộng sự (1972) thông báo: ở điều kiện ngoài đồng, nấm *Trichoderma harzianum* đã ngăn chặn được bệnh ở thân và rễ cây gây ra bởi *Sclerotium rolfsii*.

Theo Backman, Rddriquer (1975) cho biết sử dụng phân bón từ nấm *Trichoderma harzianum* dạng hạt (140kg/ha) cho phép ngăn chặn được bệnh do nấm *Sclerotium rolfsii*, *Phytium*, *Rhizoctonae solani* ngoài đồng, ức chế *Phytium*, *Rhizoctonae solani* và bảo vệ các cây họ đậu và củ cải tránh được bệnh chết ẻo trên đồng ruộng.

Emxep V.T (1989) cho biết nấm *Trichoderma* không chỉ tiêu diệt nấm gây bệnh cây trồng còn có tác dụng cải thiện cấu trúc và thành phần hoá học của đất, đẩy

mạnh sự phát triển của những vi khuẩn nốt sần cố định đạm có ích cho đất và kích thích sự sinh trưởng phát triển của cây trồng.

2.1.7.3 Chất giúp tăng sự phát triển của cây

Khả năng của nấm *Trichoderma* là làm tăng sự nảy mầm và phát triển của cây, giúp cho bộ rễ phát triển mạnh hơn. Giúp cho những vụ mùa như bắp, cây cải trở nên kháng tốt với khô hạn khi sử dụng những chế phẩm từ nấm *Trichoderma*.

Theo G. E. Harman, Cornell University, Geneva, NY14456 nghiên cứu trên cây bắp cho thấy khi bón vào rễ cây dòng nấm *Trichoderma harzianum* T-22 thì giảm 40% lượng phân đạm cần bón cho cây.



Hình 2.7 Sự phát triển của bộ rễ cây họ đậu khi sử dụng nấm *Trichoderma* và không sử dụng .

With T-22: có sử dụng nấm *Trichoderma*.

Without T-22: không sử dụng nấm *Trichoderma*.



Hình 2.8 Sự gia tăng sản lượng và phát triển của cây trồng có xử lý *Trichoderma* dòng T-22

RootShield: có sử dụng nấm *Trichoderma*

Untreated: không sử dụng nấm *Trichoderma*

2.1.7.4 Như là nguồn trao đổi thông tin di truyền

Một số gene của *Trichoderma* được tách dòng có triển vọng lớn như sự trao đổi thông tin di truyền để sản xuất vụ mùa, tạo tính kháng với bệnh cây (Gary E. Harman, Corel University, Geneve, NY14456).

Nghiên cứu cơ chế tạo ra các loại enzyme phân huỷ lớp cellulose hay lớp chitin như cellulase, chitinase, beta – 1,3 glucanase và từ đó có thể xác định thông tin về gene và đáp ứng cho nghiên cứu tạo dòng và hiệu quả loại bỏ những gen hay gia tăng những bản sao của gene và bằng cách tăng lượng enzyme sản sinh ra. Ngoài ra những thông tin nghiên cứu về gene của nấm *Trichoderma* mã hoá chitin được biến nạp vào trong cây làm gia tăng khả năng kháng bệnh cho cây.

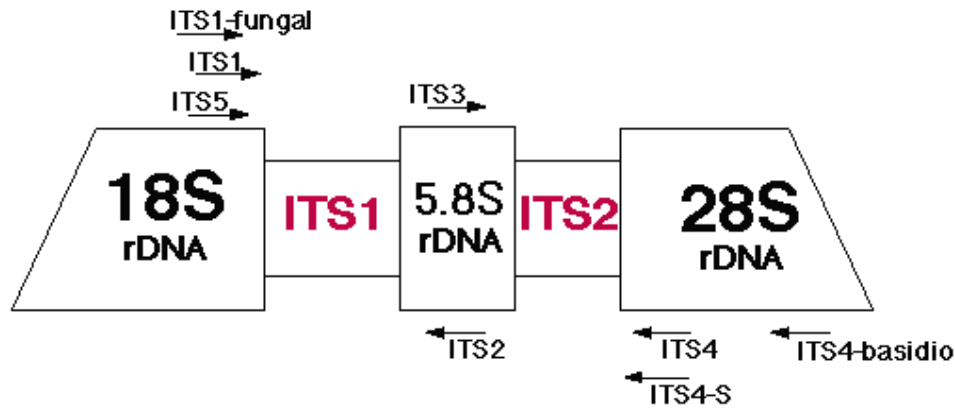
2.2 Tổng quan về ITS-rDNA

2.2.1 Giới thiệu về vùng rDNA và vùng ITS

- rDNA là nhóm gene mã hoá rRNA của ribosome và đóng vai trò quan trọng trong các nghiên cứu quan hệ phát sinh loài. rDNA được nghiên cứu vì nó là gen có nhiều bản sao và đặt biệt không mã hoá cho bất kỳ protein nào. Các bản sao của gen nằm liên tiếp trên một locus và liên quan mật thiết tới quá trình tiến hoá. Ribosome hầu như tồn tại trong mọi sinh vật và có cùng nguồn gốc. Phần lớn phân tử rDNA tương đối bảo tồn nên được xem là cơ sở để tìm ra sự tương đồng và các khác biệt khi so sánh các sinh vật khác nhau. Các primer thiết kế dựa trên những Oligonucleotide có tính bảo tồn cao được sử dụng cho tất cả sinh vật nhằm khuếch đại các vùng tương đương dùng trong so sánh. Ngoài ra, nhiều primer và probe cũng được thiết kế dựa trên các vùng không bảo tồn dùng trong phát hiện và định danh vi sinh vật (Van de peer và cộng sự, 1996).

- rDNA chứa vùng 18S, ITS1, 5,8S (một tiểu đơn vị ribosome nhỏ hơn trở thành một phần của LSU), ITS2, 28S và vùng IGS (intergenic spacer). Vùng phiên mã 18S kết thúc tiểu đơn vị nhỏ (SSU), trong khi 28S cộng với 5,8S và một gen 5S thêm vào từ những phần khác của genome hình thành tiểu đơn vị lớn (LSU) của ribosome RNA. Những vùng ITS được phiên mã (tổng hợp từ RNA), nhưng bị cắt trước khi rRNA hoàn thiện được hình thành, tuy nhiên ITS lại có chức năng trong sự hình thành

ribosome (Albert và cộng sự 1994). Ở đầu kết thúc 5' của 18S và đầu kết thúc 3' của 28S, cũng có một vùng được biết đến là ETS (external transcribed spacer). IGS (intergenic spacer) là vùng kém bảo tồn nhất của rDNA. Tuy nhiên vùng không gian không phiên mã của những rDNA chứa trình tự kết thúc phiên mã của những gene rRNA .



Hình 2.9: Sơ đồ vùng rDNA-ITS của nấm

- Các rDNA 5,8S; 18S; 28S phiên mã thành các tiền rRNA riêng rẽ, nằm xen kẽ với các vùng phiên mã bên trong (ITS) và các vùng phiên mã bên ngoài (ETS). Giữa các nhóm gen gồm nhiều bản sao lặp lại là vùng không phiên mã. Có một rDNA 5S thường không có vị trí cố định và có chiều sao mã ngược với các gen còn lại, rDNA 5S thường chỉ có ở nhân, không có ở ty thể của một số loài nấm (Guarro, 1999).
- rDNA 18 S thường được quan tâm nghiên cứu, rDNA 5,8 S có kích thước rất nhỏ và ít có sự biến đổi song rRNA 5 S là thành phần không thể thiếu của nu-LSU-rRNA, có vai trò ổn định cấu trúc ribosome và thúc đẩy quá trình tổng hợp protein (Szymanski và cộng sự, 2001)
- Vùng ITS là vùng có rất nhiều biến đổi, mặc dù vùng ITS thường được sử dụng trong nghiên cứu tiến hoá của sinh vật tuy nhiên phần lớn các so sánh trên vùng này chỉ thường sử dụng ở mức độ xác định các biệt hoá trong cùng loài (Guarro, 1999).
- Những gene rRNA ở sinh vật có nhân điển hình (ribosome DNA hay rDNA) được tìm thấy như những phần đơn vị lặp lại được sắp xếp thành từng cặp.

- Mỗi đơn vị lặp lại chứa một vùng phiên mã (ETS1, ETS2, 18S, 25S và 5,8S) và một vùng không phiên mã (NTS). Trong vùng phiên mã, ITS được tìm thấy trên gen 5,8S rRNA bao gồm ITS1 và ITS2.

2.2.2 Lịch sử nghiên cứu rDNA

- Nghiên cứu rDNA để xác định mối quan hệ trong phát sinh loài của động vật đa bào (Field và cộng sự 1988). rDNA nhân mã hoá rRNA 18S có thể dùng làm cơ sở để giải quyết vấn đề liên quan đến lịch sử phát sinh động vật đa bào (Halanych Kenneth M., 1998).
- rDNA được quan tâm nghiên cứu từ rất sớm. Bằng cách tách gen, nhân dòng và đọc trình tự. Tuy nhiên phương pháp đọc trình tự DNA trực tiếp từ sản phẩm PCR ra đời tạo rất nhiều thuận lợi cho các nghiên cứu liên quan đến vùng rDNA (White và cộng sự, 1989). Ngoài ra phương pháp PCR được cải tiến thay vào đó là phương pháp RFLP, RAPD, AFLP được đưa vào để nghiên cứu tính đa dạng di truyền của sinh vật dựa vào vùng rDNA thay vì đọc trình tự vùng rDNA.
- Thực vật cũng được quan tâm nghiên cứu vùng rDNA. Palmer và cộng sự (1990) đã so sánh trình tự SSU-rDNA của nhân, ty thể và lục lạp của thực vật hạt kín. Kết quả cho thấy trình tự rDNA 18S của nhân là có nhiều biến đổi nhất.
- Trên nấm, các nghiên cứu trên rDNA để phân loại nấm, nhận biết tính đa dạng di truyền, mối quan hệ di truyền của những loài nấm sợi khi so sánh thay đổi của nu-SSU-rDNA (18S) (Bruns và cộng sự 1991,1992).

Những năm gần đây , ngoài ý nghĩa phân loại, rDNA và vùng ITS rất được quan tâm nghiên cứu ở cấp độ phân tử. Christian P. Kubicek, John Bissett, Irina Druzhinina, Cornelia Kullnig- Gradinger, George Szakacs (2002) ứng dụng kỹ thuật PCR, giải mã trình tự vùng ITS1, ITS2 của rDNA, nghiên cứu này trên 96 mẫu *nấm Trichoderma* (nấm đối kháng với nấm gây bệnh cho cây trồng). Trên cơ sở nghiên cứu này xác định sự tương quan của các dòng *Trichoderma* được phân lập từ những địa điểm khác nhau.

2.2.3 Sử dụng vùng rDNA để nghiên cứu sự đa dạng di truyền

- Việc phân loại nấm dựa vào đặc điểm hình thái, cơ chế trao đổi chất, cấu trúc vách tế bào và thành phần protein nên kết quả phân loại thường không chính xác và cần khoảng thời gian dài. Việc so sánh dựa trên trình tự nucleotid được giải mã của vùng ITS – rDNA được xem là cơ sở chính xác để phân loại nấm cũng như xác định tính đa dạng di truyền của sinh vật cũng như các dòng nấm (Guarro, 1999).
- Nhờ những phân tích trên nu-SSU-rDNA có thể chia giới nấm thành 4 lớp Acrasiomycota, Myxomycota, Oomycota, và Fungi (Bruns và cộng sự, 1991).
- rDNA chứa những vùng bảo tồn (18S, 28S, 5,8S) cũng như những vùng ít bảo tồn (ITS) và những vùng biến động hơn (IGS). Những vùng này có thể được sử dụng để phân tích sự phát sinh loài và sự đa dạng di truyền của sinh vật. (Carbone và Kohn, 1993; Rehner và Uecker, 1994; Lloyd-MacGilp và ctv., 1996; Hallenberg và ctv., 1996; Hirata và Takamatsu, 1996; Sreenivasaprasad và ctv., 1996).
- Vùng ITS1 và ITS2 được tìm thấy giữa gen của tiểu đơn vị ribosome nhỏ (18S) và tiểu đơn vị ribosome lớn (28S) chỉ ra sự biến thiên trong cùng loài. Khuếch đại vùng ITS này sau đó phân tích bằng các enzyme cắt giới hạn, được sử dụng để khám phá sự khác nhau của các loại nấm (Bernier và ctv., 1994; Fabre và ctv., 1995; Arora và ctv., 1996; Buscot và ctv., 1996; Gac và tv., 1996; Redeckera và ctv., 1997). Vùng ITS2 khám phá sau vùng ITS1, vùng ITS2 có tính bảo toàn cao hơn ở một vài vùng 18S (Hershkovitz và ctv., 1999).
- Chiều dài và trình tự của những vùng ITS của rDNA được cho rằng vùng tiến hoá nhanh nhất và vì vậy có thể rất biến đổi. Vùng ITS được nghiên cứu về sự tiến hoá và phát sinh loài, đa dạng di truyền.

2.2.4 Nghiên cứu trên vùng rDNA-ITS và vùng *Tef* của nấm *Trichoderma*

Nghiên cứu trên vùng rDNA-ITS để xác định chính xác từng dòng chưa thiết thực và còn xảy ra nhầm lẫn do đó nghiên cứu thêm vùng *Tef* thì khả năng nhận diện chính xác từng loài được tăng thêm.

Bước đầu tiên là phân lập 35 dòng *Trichoderma* trong tự nhiên, nhận diện các dòng nấm thu được là các dòng *Trichoderma*, tiến tới đọc trình tự vùng rDNA-ITS, trình tự đọc được này đối chiếu với trình tự có trong cơ sở dữ liệu lưu trữ trước đó trong ngân hàng gene của các loài nấm. Từ đó xác định tên loại của từng dòng nấm chính xác hơn cách định danh bằng hình thái (John Bissett, 1991).

Định danh lại tên gọi chính xác của dòng *G.virens*. Phương pháp định danh bằng các công cụ trong sinh học phân tử, chạy PCR khuếch đại vùng bảo tồn rDNA-ITS rồi tiến tới đọc trình tự đoạn gene được khuếch đại đó. Dựa trên cơ sở dữ liệu, xác định dòng *G.virens* là dòng *Trichoderma virens* chứ không phải là *Gliocladium virens* (John Bissett, 1991).

Nghiên cứu trên 83 dòng nấm. Dựa trên kiểu hình và xác định hình thái học nhận diện 72 dòng là *Trichoderma* và 19 dòng chưa xác định chính xác có phải đó là dòng *Hypocrea*. Phương pháp định danh bằng hình thái học chưa thể phân biệt giống, loài giữa *Trichoderma* và *Hypocrea*. Phương pháp định danh trên phân tử là những đoạn gene chuyên biệt hay chức năng mang đặc trưng của loài sinh vật trở nên cần thiết và hiệu quả. Trước tiên, có được đoạn DNA mục tiêu để cần cho phản ứng khuếch đại vùng ITS1 – 5,8S – ITS2. Bước kế tiếp là đọc trình tự vùng ITS1-5,8S-ITS2 và so sánh với cơ sở dữ liệu NCBI để xác định tên loài. Tuy nhiên, dựa vào vùng rDNA-ITS ko hoàn toàn chính xác vì các loài vẫn có sự tương đồng về trình tự trong vùng rDNA-ITS. Do đó việc xác định vùng gen chuyên biệt hơn như vùng gene mã hoá actin, calmodulin, endochitinase, vùng *Tef* sẽ chính xác hơn. Phân biệt được những giữa các nhóm với nhau hay giữa loài cùng nhóm. Vùng *Tef* được nghiên cứu nhiều hơn vì chứa trình tự DNA đặc trưng cho từng nhóm loài. Trong phòng thí nghiệm, vùng *Tef* được quan tâm và khuếch đại đoạn gene có kích thước khoảng 600 bp (Gary J. Semuels).

2.3 Giới thiệu kỹ thuật PCR

2.3.1 Giới thiệu sơ lược về phản ứng PCR

Kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) được mô tả bởi Kary Mullis và các cộng sự (1985).

2.3.1.1 Khái niệm

Đây là phương pháp *in vitro* để tổng hợp DNA dựa trên khuôn là một trình tự đích DNA ban đầu, khuếch đại, nhân số lượng bản sao của khuôn này thành hàng triệu bản sao nhờ hoạt động của enzyme polymerase và cặp primer đặc hiệu cho đoạn DNA cần được khuếch đại.

- Tất cả các DNA polymerase khi hoạt động tổng hợp một mạch DNA mới từ mạch khuôn đều cần sự hiện diện của những primer chuyên biệt.
- Mạch khuôn thường là một trình tự DNA của bộ gen (gọi là trình tự DNA mục tiêu) đặc trưng cho từng loại vi sinh vật mục tiêu hoặc gen quy định việc tổng hợp một loài độc tố chuyên biệt của vi sinh vật.
- Primer là những đoạn oligonucleotide có khả năng bắt cặp bổ sung vào đầu 3' của khuôn, DNA polymerase sẽ nối dài primer để hình thành mạch mới (Bùi Trang Việt, 2002).

2.3.1.2 Nguyên tắc

Sự khuếch đại được thực hiện nhờ chu trình nhiệt lặp lại.

Phản ứng PCR gồm nhiều chu kỳ lặp lại nối tiếp nhau. Mỗi chu kỳ gồm 3 giai đoạn:

- Giai đoạn 1 (giai đoạn biến tính: tách sợi đơn DNA, denaturation): ở điều kiện nhiệt độ cao phân tử DNA từ mạch đôi tách ra thành dạng mạch đơn cần thiết để biến tính hoàn toàn DNA thường là 94-95⁰C trong 30-60 giây.
- Giai đoạn 2 (giai đoạn bắt cặp giữa primer và khuôn, anealation): khi nhiệt độ hạ thấp hơn nhiệt độ nóng chảy T_m của primer, primer sẽ bắt cặp với mạch khuôn tại vị trí có trình tự bổ sung với primer. Nhiệt độ cho giai đoạn này 50-64⁰C.
- Giai đoạn 3 (giai đoạn tổng hợp, kéo dài, elongation): nhiệt độ tăng lên 72⁰C, ở nhiệt độ này *Taq* DNA polymerase hoạt động tối ưu. Trong khoảng 30 giây cho đến vài phút tùy theo kích thước cần khuếch đại. Khi đó *Taq* DNA polymerase tổng hợp mạch DNA mới dựa trên trình tự của mạch khuôn, độ dài đoạn khuếch đại là khoảng cách giữa hai primer đơn đã bắt cặp với 2 DNA khuôn mạch đơn, các nucleotid lần

lượt được gắn vào mỗi đầu DNA khuôn sợi đơn, gắn kế tiếp các nucleotid của primer và chiều bổ sung là 5' ở trên cả 2 DNA sợi đơn.

Trong phản ứng PCR một chu kỳ gồm 3 giai đoạn trên sẽ được lập đi lập lại nhiều chu kỳ và làm gia tăng số lượng DNA theo cấp số nhân. Sự khuếch đại này được tính như sau:

Tổng số DNA khuếch đại = $m \times 2^n$.

Trong đó:

- n là số chu kỳ thực hiện.
- m là số bản sao của chuỗi trình tự DNA cần nhân ra.

Yếu tố quan trọng nhất trong phản ứng PCR là nhiệt độ nóng chảy của primer T_m . Trong số 3 giai đoạn trên, giai đoạn 2 quan trọng nhất bởi vì trong giai đoạn này sự lai DNA-DNA giữa primer và khuôn xảy ra. Nếu nhiệt độ chọn cho phản ứng quá thấp thì việc lai DNA sẽ bị nhiều lỗi. Nếu nhiệt độ chọn cho phản ứng quá cao thì không lai được DNA. Vì thế để thiết lập nhiệt độ cho phản ứng PCR người ta xác định nhiệt độ nóng chảy T_m với từng nhóm primer như sau:

$$T_m = 4 \times (G+X) + 2(A+T)^0C.$$

2.3.2 Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả phản ứng PCR

2.3.2.1 DNA khuôn

DNA khuôn dùng trong phản ứng PCR phải thật tinh sạch nhưng đôi khi kỹ thuật này cũng cho phép khuếch đại DNA thu được trực tiếp từ dịch trích tế bào mà vẫn cho kết quả tốt, thông thường phương pháp này được áp dụng trong chẩn đoán. Lượng DNA khuôn dùng trong phản ứng PCR phải thật nhỏ khoảng 1 μ g. Nếu lượng DNA khuôn quá cao có thể tạo ra những sản phẩm phụ không như mong muốn hay còn gọi là dương tính giả.

2.3.2.2 Enzyme

DNA polymerase dùng trong phản ứng PCR phải là enzyme chịu nhiệt cao: *Taq* polymerase được tách chiết từ vi khuẩn *Thermus aquaticus* (vi khuẩn suối nước nóng).

Taq polymerase quá cao chúng ta sẽ thấy hiện tượng tổng hợp DNA do phản ứng giả của primer trên dây đơn, đây là những kết quả không chuyên tính sẽ làm sai lệch kết quả, còn nếu nồng độ *Taq* polymerase quá thấp chúng ta sẽ không có đủ số lượng enzyme để xúc tác tạo ra sản phẩm PCR theo ý muốn.

2.3.2.3 Primer và nhiệt độ lai

Primer có vai trò rất quan trọng trong tiến trình khuếch đại của phản ứng PCR. Việc thiết kế và chọn primer phải đáp ứng đủ các yêu cầu sau:

- Trình tự primer được chọn sao cho không có sự bắt cặp bổ sung giữa primer “xuôi” và primer “ngược”, không có những cấu trúc “primer dimer” do sự bắt cặp bổ sung giữa các thành phần khác nhau của một primer.
- Nhiệt độ nóng chảy T_m của primer xuôi và primer ngược không được cách biệt quá xa. Thành phần nucleotid của các primer phải cân bằng tránh lặp đi lặp lại nhiều lần.
- Các primer phải đặt trung cho trình tự DNA cần khuếch đại, không trùng với trình tự lặp lại trên gen.

2.3.2.4 Các thành phần khác trong phản ứng PCR

- Bốn loại nucleotid (dNTP) thường được sử dụng ở nồng độ là 200nM/ mỗi loại nucleotid. Nếu nồng độ cao hơn dễ dẫn đến sự khuếch đại sản phẩm dương tính giả hay tạp nhiễm. Sự mất cân bằng trong thành phần các nucleotid lại làm tăng các lỗi sao chép của polymerase.
- Nồng độ Mg^{2+} cao hay thấp đều tạo ảnh hưởng rất khác nhau trong phản ứng PCR.

2.2.3.5 Số lượng chu kỳ phản ứng

Số chu kỳ trong phản ứng thông thường không được vượt quá 40 chu kỳ. Do phản ứng PCR diễn tiến qua hai giai đoạn đầu số lượng bản sao tăng theo cấp số nhân tỉ lệ với lượng mẫu ban đầu, sau đó hiệu quả khuếch đại giảm hẳn vì những nguyên nhân sau: sự phân huỷ và cạn kiệt các thành phần của phản ứng, sự xuất hiện các sản phẩm phụ làm ức chế phản ứng khuếch đại, các bản sao vừa được tổng hợp không bắt

cặp với mỗi mà chúng tự bắt cặp với nhau. Số chu kỳ cho một phản ứng còn phụ thuộc vào số lượng mẫu ban đầu.

2.3.2.6 Thiết bị và dụng cụ phản ứng PCR

Máy PCR cần đáp ứng được yêu cầu thay đổi nhiệt độ thật nhanh, thật chính xác, tránh tối đa sự bốc hơi nước trong quá trình phản ứng PCR.

Eppendorf dùng cho phản ứng PCR phải là loại có vách mỏng và có khả năng truyền nhiệt tốt.

2.3.3 Ứng dụng của PCR:

Hiện nay thành tựu của PCR mở ra nhiều triển vọng cho sinh học phân tử với nhiều ứng dụng trong sinh học, y khoa, nông nghiệp, kiểm nghiệm vi sinh vật gây bệnh: thực phẩm, bệnh phẩm, mỹ phẩm, nước, trong phát hiện pháp y, điều tra tội phạm. Ứng dụng PCR để sản xuất những mẫu dò dùng trong phương pháp lai phân tử, xác định các trình tự acid nucleic, tạo các đột biến điểm định hướng.

Hơn thế nữa PCR còn được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác như:

- Trong nghiên cứu genome học:
 - Nhân bản vô tính với PCR.
 - Recombinant PCR.
 - Kỹ thuật footprinting DnaseI.
 - Multiplex PCR.
 - HLA DNA (các kháng nguyên bạch cầu người) .
- Phát hiện DNA có tính đa hình nhờ PCR:

PCR là kỹ thuật chuẩn và từ đó cải tiến để tăng thêm hiệu quả nghiên cứu cho những gene có tính đa hình cao hay lập bản đồ di truyền, bản đồ vật lý. Tính đa hình của gene được ứng dụng rất nhiều trong di truyền và chọn giống.

PCR chuẩn cần phải biết trước trình tự đầu tiên của gen để thiết kế các primer đặc hiệu. Tuy nhiên có những nghiên cứu thực hiện trên những vùng thông tin về các chuỗi mã di truyền trên vùng genome một số đối tượng chưa biết trước. Cho nên để phát hiện tính đa hình của DNA trên những vùng chưa biết trước đó ta phải cải tiến

kỹ thuật PCR để có thể ứng dụng vào những nghiên cứu đa hình hay những trình tự DNA ngắn hay tính lặp lại của một vùng nào đó của genome.

Dựa trên nguyên tắc cơ bản của PCR các marker phân tử sau được đưa ra để phục vụ cho mục đích trên:

Marker	Thuật ngữ bằng tiếng Anh	Tác giả
A AS-PCR	Aribitrarily primer PCR	Welsh et al.1990
P-PCR	Allele sp eccific PCR	Sarkar et al 1990
AFLP	Amplified fragment length polymorphism	Vos et al 1995
RADP	Random amplified polymorphic DNA	William et al 1991
RFLP	Restriction fragment length polymorphism	Botsein et al 1980
STS	Sequence tagged site	Fukuoka.et.al 1994

- Những năm gần đây người ta có xu hướng xây dựng nên các thư viện DNA của genome và thư viện cDNA trên cơ sở PCR.
- Gần đây những nghiên cứu để giải mã bộ gen người cũng dựa vào những đóng góp của PCR.
- Kỹ thuật PCR là công cụ hữu ích để khuếch đại trình tự của đoạn gen chứa vùng ITS1-5,8S-ITS2 và vùng *Tef* qua sử dụng các cặp primer ITS4 và ITS5 và primer ELONG R và ELONG F và từ sản phẩm khuếch đại này ta có thể đọc trình tự chuỗi mã DNA trực tiếp bằng máy sequencer

2.4 Giới thiệu sơ lược về Kỹ thuật DNA sequencing

Kỹ thuật DNA sequencing là công trình được công bố bởi Maxam và Gilbert (1977). Tuy nhiên hơn 20 năm qua kỹ thuật này được cải tiến rất nhiều. Đặc biệt với sự trợ giúp của computer, kỹ thuật huỳnh quang, tiến bộ của phương pháp PCR và kỹ thuật điện di, kỹ thuật DNA sequencing trở thành công cụ rất có giá trị, làm nền tảng cho phân tích genome.

Khái niệm: Kỹ thuật DNA sequencing là kỹ thuật xác định tất cả những hợp phần do nucleotid hình thành nên phân tử DNA (Alphey 1997).

2.5 Tình hình nghiên cứu trong nước

Ở Việt Nam việc nghiên cứu nấm *Trichoderma* được tiến hành từ những năm 1987- 1990. Bộ môn bệnh cây Viện Bảo Vệ Thực Vật tiến hành phân lập các chủng nấm *Trichoderma* từ các nguồn gốc khác nhau và xác định khả năng ức chế của nấm *Trichoderma* đối với một số nấm gây bệnh. Tìm phương pháp nuôi cấy, tạo chế phẩm rồi tiến dần đưa ra sản xuất với qui mô lớn. Các chủng *Trichoderma* đã thu thập được có hiệu quả ức chế cao từ 67,7- 85,5% đối với các loại nấm gây bệnh : *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Fisarium* , *Aspergillus* (Nguyễn Văn Lâm, 1995).

Nguyễn Xuân Thành (2003) nấm *Trichoderma* dùng để phân giải rác sinh hoạt và các phế thải nông nghiệp nhờ khả năng tiết ra hệ thống enzyme cellulose, enzyme này bền nhiệt hơn vi khuẩn.

Nhóm nghiên cứu Cao Cường, Nguyễn Đức Lượng (trường Đại học Bách Khoa TPHCM 2003) đã khảo sát quá trình cảm ứng của enzyme chitinase, cellulase của *T. harzianum* có tác động phân hủy vách khuẩn ty của nấm *Sclerotium rolfsii* làm khuẩn ty nấm gây bệnh nhăn nheo đứt vụn và biến dạng.

Gần đây viện Nghiên Cứu mía đường miền Nam đang tiến hành thử nghiệm nhân nấm *Trichoderma* trên môi trường bã mía, bón lót hom mía để hạn chế một số bệnh xảy ra trên gốc mía gây ra do *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* (Cao Anh Đường, 2005).

Công trình nghiên cứu đem lại kết quả tốt trong việc dùng nấm *Trichoderma* chống bệnh cho cây bông, khoai tây và một số cây trồng khác. Kết quả cho thấy có sự cạnh tranh với các tác nhân gây bệnh: thối rễ cây hoà thảo, thối đen rễ cây bắp cải, dưa leo, cà chua, bầu bí, bệnh chết ẻo trên cây họ đậu, bệnh chết rạp trên cây thuốc lá, bệnh héo cây ở cây bông, dưa hấu, cây ăn trái và hàng loạt các bệnh do nấm gây ra (Nguyễn Ngọc Tú, Nguyễn Cửu Hương Giang 1997).

Đỗ Tấn Dũng và cộng tác viên (2001) đã khảo sát đặc tính sinh học và khả năng chống chịu một số nấm hại rễ cây trồng cạn của nấm đối kháng *T.virides*. Kết quả thu được cho thấy chế phẩm từ nấm *T.virides* có thể sử dụng như một biện pháp sinh học trong phòng chống nhóm bệnh nấm gây hại vùng rễ cây trồng trên các bệnh

lở cổ rễ, héo rũ trắng gốc cà chua, dưa chuột, đậu tương trong giai đoạn hạt và cây con. Trong điều kiện chậu vại cho thấy khi nấm *T.virides* có mặt trước thì hiệu quả cạnh tranh, ức chế và tiêu diệt sâu bệnh mật độ cao nhất so với khi chúng có mặt cùng hay sau nấm gây bệnh.

Nhóm Phan Thị Thanh Hoài và cộng tác viên (Đại học Tây Nguyên 2004) nấm *Trichoderma* khi phối hợp với vỏ cà phê, vôi, phân urê, phân chuồng và xạ khuẩn sẽ thành phân hữu cơ vi sinh giúp tăng năng suất đậu phụng, cải ngọt lên đến 30%, giảm sâu bệnh, giảm chi phí phân bón, giảm vấn đề ô nhiễm môi trường do vỏ cà phê gây nên.

2.6 Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Ngày nay việc nghiên cứu phòng trừ bệnh bằng phương pháp sinh học trong bảo vệ thực vật đã được nhiều nước trên thế giới quan tâm.

- Ở Hungary, Liên Xô (cũ), Philippin, Thái Lan đã nghiên cứu nấm *Trichoderma* và sản xuất chế phẩm sinh học từ nấm để hạn chế sự tồn tại trong đất của nấm hại gây bệnh cho cây trồng nói chung và *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium*, *Verticillium* và *Botrytis* (Nguyễn Văn Tuất và Lê Văn Thuyết 2001).
- S.V.Badai (1980) đã sử dụng 30 – 40 g/m³ chế phẩm từ nấm *Trichoderma lignorum* (7-8 tỷ bào tử) chế phẩm bón vào các hố nông khi cấy cây con. Kết quả cho thấy giảm được số cây trồng bị nhiễm bệnh, trong đó bệnh thối rễ giảm 2 – 2,3 lần và thu hoạch tăng thêm 1,6 – 2 kg/m². Khi có nấm bệnh cao trong đất (9 – 10 khuẩn lạc nấm gây bệnh /gam) cần phải bón thêm chế phẩm *Trichoderma* vào thời kỳ sinh trưởng, tưới vào đất dịch huyền phù từ 5 g chế phẩm 250 ml nước/1cây.
- Guilia V.V và cộng sự (1982) *Trichoderma lignorum* đối kháng được với nhiều loại nấm gây bệnh như *Fusarium*, *Alternaria tenuis*, *Phomabetae*, *Sclerotium*, *Botrytis cinerea*, *Verticillum*, *Helminthosporium sativum* chế phẩm được bón vào đất và xử lý hạt.
- Emxep. V. T (1989) nấm *Trichoderma* không chỉ tiêu diệt rất nhiều loài nấm gây bệnh cây trồng trong đất mà còn có tác dụng cải thiện cấu trúc và thành phần hoá

học của đất, đẩy mạnh sự phát triển các vi khuẩn nốt sần cố định đạm có ích trong đất và kích thích sinh trưởng, phát triển của cây trồng.

- Well và cộng sự (1972): ở điều kiện ngoài đồng nấm *Trichoderma harzianum* ngăn chặn được bệnh ở thân và rễ do nấm *Sclerotium rolfsii*, nếu bón vào đất với số lượng 1:10 theo thể tích.
- Backman, Rddriquer (1975): cho biết khi sử dụng phân từ nấm *Trichoderma Harzianum* dạng hạt (140 kg/ha) ngăn chặn do nấm *Sclerotium rolfsii* ở ngoài đồng. Với những bệnh *Pythium .spp*, *Rhizoctonia solani* nấm *Trichoderma harzianum* có tác dụng ức chế, bảo vệ hạt họ đậu và củ cải tránh bệnh chết ẻo.
- Nhật Bản: *Trichoderma lignorum* trừ bệnh thối thân thuốc lá do *Corticium rolfsii* và đăng ký chế phẩm thương mại (1995).
- Genecor (2000): đã khai thác thông tin về trình tự DNA để nhận biết những gen mới quan trọng trong những tổ chức của sinh vật. Sự tổng hợp và điều hoà lượng enzyme tiết ra do nấm *Trichoderma reesei*, nghiên cứu những ưu thế trong việc tạo ra những vật liệu sinh học và những loại thuốc có nguồn gốc sinh học. Genecor đề cập đến việc thúc đẩy quá trình hoàn thành việc đọc trình tự genome của nấm *Trichoderma*, những thông tin thu thập từ việc đọc trình tự DNA của nấm *Trichoderma reesei* cho kết quả rất quan trọng trong việc tổng hợp và điều tiết để tạo nên các enzyme quan trọng. Từ đó làm tăng khả năng hình thành những sản phẩm sinh học và hướng nghiên cứu chuyên sâu, ứng dụng.

2.7 Hướng phát triển tương lai trên các dòng nấm *Trichoderma* (Harman, 2000)

1. Protein phân huỷ chitin (thành phần cấu tạo nên lớp vỏ bọc bảo vệ kiên cố của nấm gây bệnh và sâu hại), nghiên cứu, xác định những gen có khả năng kiểm soát việc sản sinh ra enzyme. Từ đó điều khiển được sự điều tiết enzyme và định hướng sản xuất sản phẩm protein như chất kiểm soát sinh học tham dự vào tiến trình phòng trừ sâu bệnh mà bước đầu tiên phân huỷ vách tế bào của chúng.

2. Chất kiểm soát sinh học và kháng sinh: nghiên cứu cơ chế và sự hình thành chất kiểm soát sinh học hay kháng sinh chống lại sâu bệnh của những dòng *Trichoderma*. Từ đó sản xuất với quy mô lớn lượng chất kiểm soát sinh học có hiệu lực cao.
3. Tạo ra những dòng *Trichoderma* đột biến có khả năng tạo ra những enzyme ngoại bào như cellulose, glucanase, endoglucanase có hoạt tính enzyme gấp 2-4 lần so với hoạt tính enzyme của những dòng *Trichoderma* hoang dại tiết ra.
4. Cây trồng được chuyển nạp gene từ những gene biểu hiện tính tiêu diệt sâu bệnh tốt như những gene mã hoá enzyme chitinase, cellulosa, glucanase, protease, pectinase của nấm *Trichoderma*: nghiên cứu, thao tác cắt ghép lai tạo dựa vào những công cụ trong sinh học phân tử, các loại enzyme giới hạn.

PHẦN 3 : VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

3.1 Thời gian, địa điểm, đối tượng nghiên cứu

3.1.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian thực hiện đề tài 20/2/2006 đến 5/2006.
- Tại phòng Bảo vệ thực vật, Khoa nông học trường Đại học Nông Lâm và trung tâm phân tích thí nghiệm – phòng công nghệ sinh học Thực vật Đại Học Nông Lâm- TPHCM.

3.1.2 Đối tượng nghiên cứu

- Các mẫu nấm của nước ngoài:

1. DaOm 172827: *T.stritipile*
2. DaOm 230010: *T. sossicum*
3. GJS 95-7: *T.clonostachysrosa*
4. GJS 00-101: *T.atroviside*
5. GJS 91-162: *T.virede*
6. GJS 90-18: *T.konigii*
7. GJS 00-39: *T.harzianum*
8. Tri 3: *T.asperellum*
9. Dis 7: *T.erinaceum*
10. CBS 34293: *T.minutisporum.*

- Các dòng nấm *Trichoderma* của Việt Nam

Các dòng *Trichoderma* được định danh dựa vào cách thức phân biệt hình thái học của sợi nấm dưới kính hiển vi điện tử: khuẩn ty, bào tử và các chỉ tiêu sinh hóa.

STT	Ký hiệu	Các dòng nấm <i>Trichoderma</i>	Địa điểm phân lập	Tính đối kháng
1	T3	<i>T.koningii</i>	Đồng Nai (sầu riêng)	<i>Collectotrichum</i> <i>Pythium</i> <i>Corticum salmonicolor</i>
2	T4	<i>T.harzianum</i>	Củ Chi – TPHCM (đất)	
3	T6	<i>T.koningii</i>	Tiền Giang (dứa)	<i>Collectotrichum</i> <i>Pythium</i>
4	T11	<i>T.koningii</i>	Bạc Liêu (dứa)	
5	T16	<i>T.asperellum</i>	Trại khoa Nông Học trường ĐH Nông Lâm TPHCM.(đất)	<i>Collectotrichum</i> <i>Pythium</i> <i>Corticum salmonicolor</i>
6	T19	<i>T.asperellum</i>	Tây Ninh (đậu phụng)	
7	T20	<i>T.asperellum</i>	Trại khoa Nông Học trường ĐH Nông Lâm TPHCM (đất)	
8	T41	<i>T.virens</i>	Trại khoa Nông Học trường ĐH Nông Lâm TPHCM (đất)	<i>Phytophthora</i>
9	2-41-2	Chưa xác định	Bình Phước (cao su)	<i>Corticum salmonicolor</i>
10	L35-5	Chưa xác định	Bình Phước (cao su)	

3.2 Hoá chất và trang thiết bị thí nghiệm

3.2.1 Hoá chất

3.2.1.1 Môi trường để lưu trữ nguồn nấm: môi trường CAM .

Thành phần cho 1 lít môi trường:

- Bột bắp: 30g.
- Đường dextrose: 20g.
- Agar 15 g.
- Nước cất cho đủ 1 lít.

3.2.1.2 Môi trường để phục hồi nhanh dòng nấm: môi trường PGA

- Khoai tây: 200g.
- Glucose: 20g.
- Agar: 15g.
- Nước cất cho đủ 1 lít.

3.2.1.3 Hoá chất cần cho dung dịch nhân sinh khối nấm

- Yeast Extrax: 1,5g
- Mật ri: 30g.
- Nước cất để đủ 1 lít môi trường .

3.2.1.4 Hoá chất cần cho tách chiết DNA sợi nấm

- Nitor lỏng (nghiền mẫu nấm).
- Lysis buffer.
- Phenol/chloroform/ isoamyl alcohol (25:24:1)
- Chloroform/ isoamyl alcohol (24:1)
- Isopropanol
- Ethanol 70%
- Dung dịch TE

3.2.1.5 Hoá chất sử dụng trong điện di

Gel agarose dùng để phân tích DNA qua điện di thường dùng có nồng độ 1% agarose.

Dung dịch đệm TAE 1X dùng để pha gel và chạy điện di với các thành phần sau:

+ Tris HCl	4,48 g
+ Na ₂ EDTA 0,5M (pH 8,0)	2ml
+ Glacial acetic acid	1,14ml
+ Nước cất vừa đủ	1lít

Dung dịch nhuộm trên gel: 1% ethidium bromide

3.2.1.6 Hoá chất cho phản ứng PCR

- *Taq* DNA polymerase.
- Đệm 10X PCR: đi kèm với *Taq* polymerase.
- dNTP 10 mM
- MgCl₂ 25mM
- Forward primer, reverse primer.

3.2.1.7 Hoá chất trong tinh sạch sản phẩm PCR

- Agar polyacrylamid dùng cho điện di để thu sản phẩm PCR.
- Bộ kit GFX gồm: cột GFX, capture buffer, wash buffer, elution buffer.

3.2.2 Dụng cụ và thiết bị

- Bình tam giác: 250ml, 500ml
- Nồi nắp khử trùng Tommy (Mỹ).
- Cân điện tử (Ohaus, Mỹ)
- Tủ sấy.
- Tủ ấm.
- Tủ cấy nấm
- Máy lắc.
- Ống nghiệm với dung tích 15 ml.
- Bộ cối chày nghiền mẫu (Đức)
- Micropipette: 10 µl, 100 µl, 1000 µl.

- Máy ly tâm.
- Tủ giữ mẫu: tủ lạnh (-70°C , 20°C), tủ mát (-4°C).
- Bộ chạy điện di.
- Máy cất nước 2 lần.
- Máy đo pH.
- Máy PCR (biorad).
- Máy chụp hình gel.

3.3 Phục hồi các dòng nấm *trichoderma* từ những ống nghiệm chứa các bào tử nấm *trichoderme* bằng môi trường PGA

Chuẩn bị cho 1 lít môi trường PGA :

- Chuẩn bị phần dịch tiết của khoai tây: 200 khoai tây được gọt vỏ cắt nhỏ và đun sôi, chỉ lấy phần nước.
- Bổ sung các thành phần cần thiết: thêm vào đó lượng glucose, agarose như trên và lượng nước cho vừa đủ 1 lít.
- Đun hỗn hợp trên cho đến khi agarose và glucose tan ra.
- Môi trường PGA được cho vào bình tam giác
- Hấp môi trường PGA bằng nồi nắp Autoclave ở 121°C trong 20 phút để khử trùng môi trường không bị nhiễm khuẩn.
- Để môi trường nguội bớt rồi đổ môi trường từ những bình tam giác vào đĩa petri sạch (9cm) khoảng 15ml môi trường.
- Đĩa petri có chứa môi trường để nguội, đông cứng lại thì ta có thể cấy những bào tử nấm *Trichoderma* vào. Sau 4 ngày các khuẩn ty của nấm sẽ mọc bên trên bề mặt đĩa.

3.4 Nhân sinh khối nấm và thu lấy các mẫu nấm

❖ Nhân sinh khối nấm

Nấm *trichoderma* được tăng sinh trong môi trường lỏng. Môi trường molas.

Chuẩn bị môi trường Molas:

- 30 g mật rỉ được hoà chung vào nước cất lọc qua tấm vải lọc được khử trùng.

– Tất cả được cho vào một chiếc cốc với lượng nước cất vừa đủ dung lượng cần thiết. Dùng máy khuấy từ hoà tan các chất. Cho vào mỗi bình tam giác 100ml môi trường. Hấp khử trùng trong 20 phút ở 121°C để diệt những loại vi sinh vật khác có thể làm tạp nhiễm môi trường nhân sinh khối nấm *Trichoderma*.

- Những sợi nấm mọc trên môi trường thạch được thu lấy cho vào môi trường lỏng trong những bình tam giác. Đặt những bình tam giác vào máy lắc, điều chỉnh ở mức 200 vòng/phút lắc liên tục khoảng 5 ngày không để cho những sợi nấm mọc bào tử. Dùng lại và thu lấy khối sợi nấm.

❖ Cách thu lấy khối sợi nấm:

Vải lọc và phễu lọc phải được khử trùng sấy khô dùng để lọc thu lấy phần sợi nấm. Ép khô rồi đặt trên giấy bạc. Rồi cất giữ vào tủ lạnh ở -70°C .

3.5 Ly trích DNA từ nấm đã được nghiên mìn

Lượng mẫu cần ly trích trong mỗi ống nghiệm chiếm 1/6 thể tích ống.

Bước 1: Nghiền mẫu nấm trong dung dịch nitơ lỏng. Mẫu nấm được nghiền mịn cho vào các ống nghiệm có thể tích 15 ml. Trong quá trình nghiền cho nitơ lỏng vào liên tục để mẫu nấm không bị tan.

Bước 2: Thêm vào 4ml lysis buffer vào trong ống nghiệm. Trộn đều, ủ ấm ở 65°C trong vòng 1 giờ.

Bước 3: Thêm vào 3 ml phenol / chloroform / isoamylalcohol (25:24:1). Lắc đều, nhẹ. Ly tâm 10 phút với tốc độ 3000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng.

Bước 4: Hút lấy phần dịch nổi ở trên (3 – 5 ml). Cho vào ống nghiệm có dung tích 15ml khác.

Bước 5: Thêm vào ống ly tâm mới 3ml chloroform / isoamylalcohol (24:1). Trộn đều, ly tâm với tốc độ 3000 vòng/ phút trong 10 phút.

Bước 6: Hút lấy phần dịch nổi ở trên (3-5 ml). Cho vào ống nghiệm có dung tích 15ml khác.

Bước 7: Thêm vào isopropanol lượng chất : 0.6 tổng thể tích của ống nghiệm. Lắc nhẹ, để ở nhiệt độ phòng 5' - 10', ly tâm.

Bước 8: Dùng que thu DNA tủa ở đáy ống

Bước 9: Dùng ethanol 70% để rửa tủa DNA. Rửa lại nhiều lần 3-4 lần.

Bước 10: Phơi khô mẫu (khoảng 2-3 giờ). Mẫu DNA khô, thì thêm vào 200 μ l TE 1X.

3.6 Kiểm tra kết quả ly trích DNA và pha loãng DNA

- Bước 1: Chuẩn bị gel agarose 1% (w/v) : Cân 0,125 g agarose cho vào 12,5 ml TAE 0,5X, lắc nhẹ cho agarose phân tán đều, đun nóng trong lò viba ở 650W trong 2 phút. Để nhiệt độ trong chai giảm xuống dần, đổ vào khuôn có gắn lược với số giếng mong muốn. Chờ gel đông (thường 30 phút), lấy lược ra và bắt đầu tiến hành nạp mẫu.
- Bước 2: Nạp mẫu, xác định các thông số điện di và đọc kết quả:
 - Đối với DNA tổng số:

Dùng micropipette hút lấy 2 μ l mẫu, trộn đều với 2 μ l loading buffer 6X, hút tổng lượng thể tích là 4 μ l bơm vào giếng tương ứng đã bố trí sẵn. Lần lượt bơm các mẫu khác đã được trộn đều với thuốc nhuộm vào tất cả các giếng còn lại. Tiến hành điện di trên gel agarose 1% trong dung dịch đệm TAE 0,5X, hiệu điện thế là 100V, cường độ dòng điện 250A trong khoảng 15 - 20 phút. Kết thúc quá trình điện di, bảng gel được chuyển vào thuốc nhuộm ethidium bromide (1%) trong khoảng 15 - 20 phút, rửa sạch gel và đọc kết quả bằng phần mềm Quality One của máy Gel doc 2000 (Biorad).

Kết quả điện di thể hiện qua chương trình của máy đọc gel ta có thể dự đoán được độ pha loãng cần thực hiện đối với từng mẫu DNA tổng số.

- Đối với DNA được pha loãng, mỗi nồng độ lấy 4 μ l với 2 μ l loading buffer 6X, thao tác tiến hành tương tự như trên. Kết quả thu được qua chương trình của máy gel doc cho ta xác định được nồng độ cần thiết để chọn lấy và thực hiện phản ứng PCR.
- Đối với sản phẩm PCR, kiểm tra kết quả phản ứng PCR và lượng DNA được khuyết đại lên trong phản ứng cũng thông qua quá trình nạp mẫu lượng mẫu cần lấy 4 μ l, điện di trong dung dịch đệm TAE 0,5X, hiệu điện thế là 50V khoảng 90 phút, nhuộm gel trong ethidium bromide (1%) và đọc kết quả trên máy chụp hình gel doc bằng chương trình Quality One. Band xuất hiện trên

miếng gel cho ta kết quả dương tính, chỉ một band duy nhất cho kết quả kiểm tra sản phẩm DNA trong phản ứng PCR.

3.7 Thực hiện phản ứng PCR khuếch đại vùng ITS – rDNA các dòng nấm *Trichoderma*

3.7.1 Vật liệu và thành phần hoá chất cho phản ứng PCR

❖ Primer:

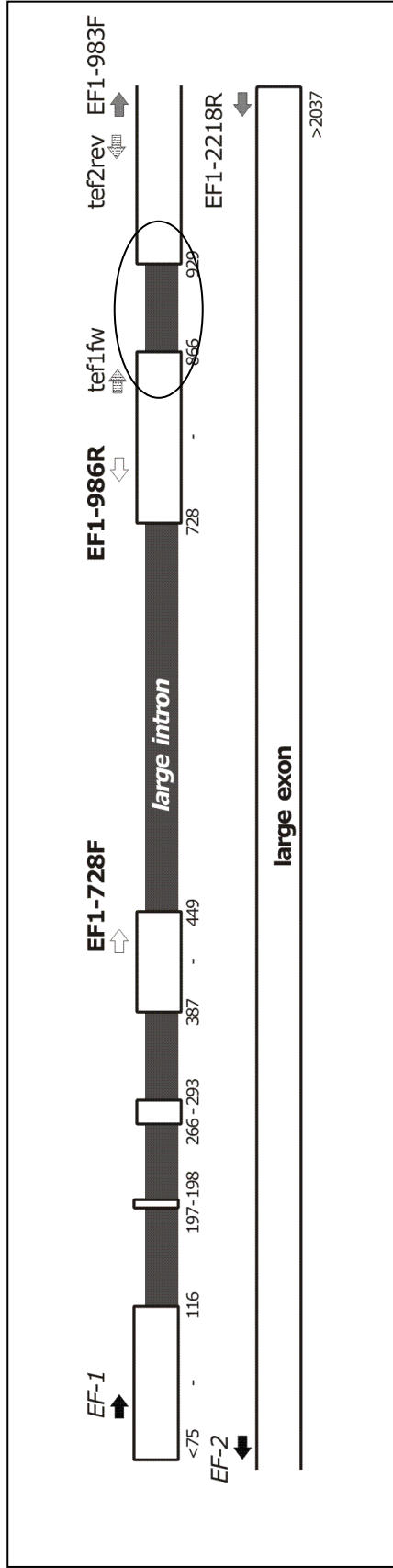
Primer	Trình tự primer theo chiều 5'- 3'
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G
ElongR	GCC ATC CTT GGA GAC CGA
Elong F	GTG AGC GTG GTA TCA CCA TCG

❖ DNA khuôn được thu nhận qua quá trình ly trích DNA và pha loãng kiểm tra nồng độ DNA thích hợp phản ứng PCR.

Các dòng *Trichoderma* làm khuôn mẫu để chạy PCR: *Trichoderma asperellum* dòng của nước ngoài để làm đối chứng cho 4 dòng nấm *trichoderma* của Việt Nam: T4., T6, T19 và 2-41-2 (*Trichoderma*).

Thành phần phản ứng PCR và lượng cần dùng đủ cho một phản ứng:

Thành phần	Liều lượng (µl)	Nồng độ cuối
PCR buffer 10X	2,5	1X
MgCl ₂	0,75	1,5mM
dNTP	0,5	0,2 mM
Primer 1	1	10 pmol/µl
Primer 2	1	10 pmol/µl
Khuôn DNA	1	20 ng/µl
Taq polymerase	0,2	
Nước cất	18,05	
Tổng cộng		25



Hình 3.1. Ứng dụng kỹ thuật PCR để khuếch đại trình tự đoạn gen tef1fw- tef2rev

3.7.2 Chu kỳ nhiệt phản ứng PCR (Wang C. Z., 2002)

◆ Cho primer ITS4 và ITS5:

- Giai đoạn 1: 94⁰C trong 3 phút
- Giai đoạn 2:

Bước 1: 94 ⁰ C trong 1 phút	}	30 chu kỳ
Bước 2: 58 ⁰ C trong 45 giây		
Bước 3: 72 ⁰ C trong 1 phút		
- Giai đoạn 3: 72⁰C trong 5 phút

◆ Cho primer Elong R và Elong F:

- Giai đoạn 1: 94⁰C trong 3 phút
- Giai đoạn 2:

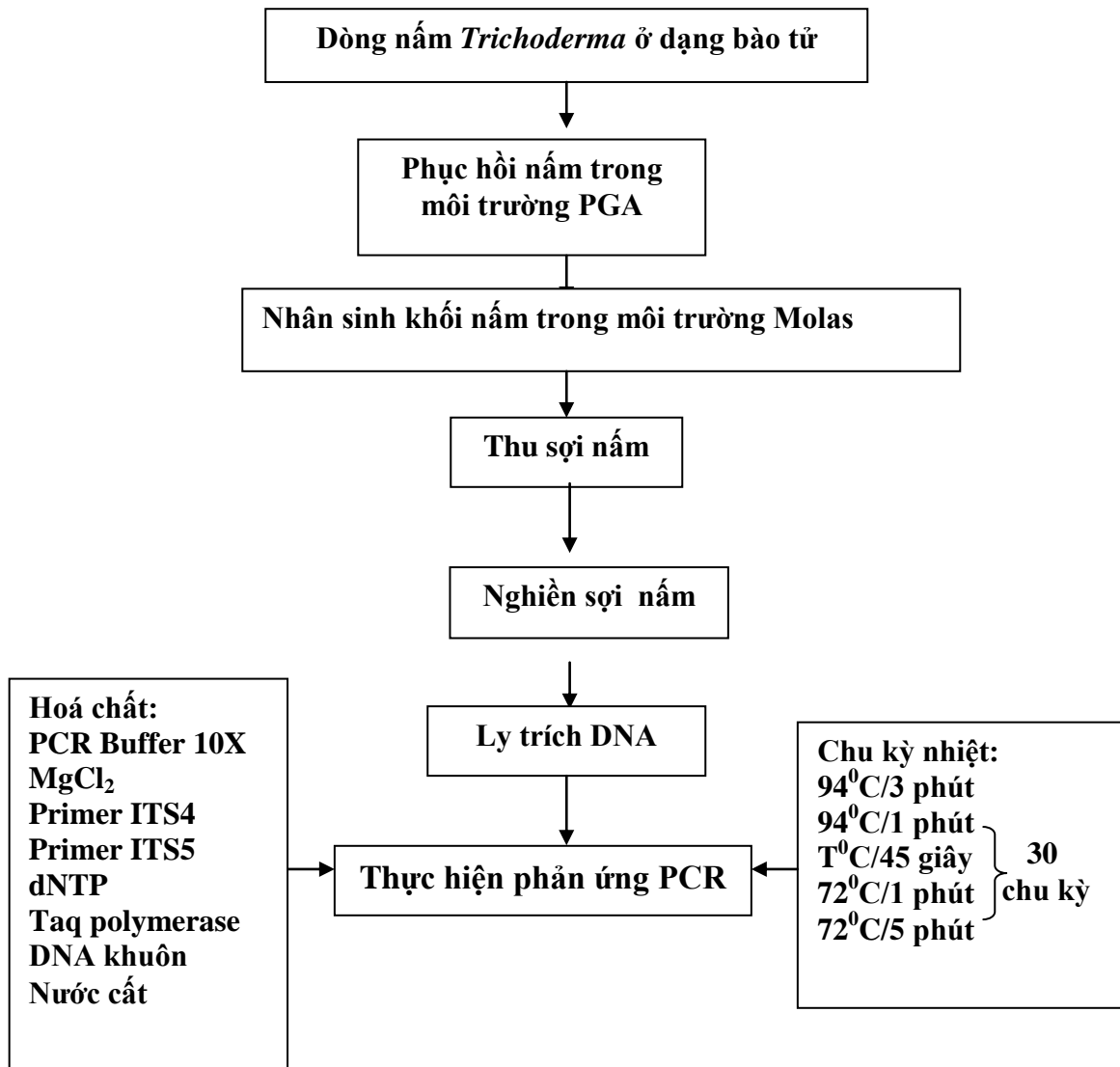
Bước 1: 94 ⁰ C trong 1 phút	}	30 chu kỳ
Bước 2: 56 ⁰ C trong 45 giây		
Bước 3: 72 ⁰ C trong 1 phút		
- Giai đoạn 3: 72⁰C trong 5 phút

Trong chu trình nhiệt phản ứng PCR: khác biệt duy nhất là nhiệt độ bắt cặp của 2 cặp primer khác nhau vì kích thước và nhiệt độ T_m của 2 cặp primer khác nhau.

3.7.3 Đánh giá kết quả PCR

- Sản phẩm PCR được điện di trên agarose gel 0,8 %, dịch đệm TAE 0,5 X.
- Chạy điện di: 100 V, 250 mA, 25 phút.
- Nhuộm gel bằng dung dịch ethidium bromide từ trong vòng 15 phút
- Kết quả được ghi lại nhờ đọc tia UV và chụp ảnh bằng phần mềm Quality One của máy Gel Doc 2000 (Biorad).

Bảng tóm tắt quy trình khuếch đại vùng ITS-rDNA bằng primer ITS4 và ITS5; primer Elong R và Elong F:



Hình 3.2 Quy trình khuếch đại vùng ITS-rDNA bằng primer ITS4 và ITS5 và Elong R và Elong F (với T= 56⁰C đối với cặp primer ITS4 và ITS5
 T=58⁰C với cặp primer Elong R và Elong F

3.8 Đọc trình tự sản phẩm PCR

3.8.1 Chuẩn bị DNA khuôn

3.8.1.1 Tinh sạch sản phẩm PCR

Nguồn DNA dùng làm khuôn để đọc trình tự là sản phẩm PCR: thực hiện khuếch đại bằng 2 cặp primer ITS 4, ITS 5 và Elong R, Elong F trên dòng nấm *Trichoderma Harzianum* (phân lập từ đất Củ Chi – Thành phố Hồ Chí Minh – Việt Nam) .

Thực hiện bước tinh sạch sản phẩm PCR bằng cột GFX (Amersham).

Phương pháp này cho phép tinh sạch trực tiếp từ dung dịch DNA hay tinh sạch DNA từ gel. Lượng DNA thu lại sau khi tinh sạch từ dung dịch khoảng 80% và từ gel là 60% so với lượng DNA ban đầu. Đối với sản phẩm PCR những thành phần còn dư như primer hay DNTP có thể được loại bỏ hoàn toàn sau khi tinh sạch.

- Biến tính protein: capture buffer có tác dụng biến tính protein và tăng cường khả năng liên kết chuỗi DNA với cột GFX.
- Thu giữ DNA: cột GFX giữ DNA bám dính vào cột.
- Rửa: DNA được rửa bằng dung dịch wash buffer để loại bỏ muối và các thành phần khác.
- Hoà tan DNA: DNA tinh sạch được hoà tan trong TE (elution buffer).

➤ Cách 1: Quy trình tinh sạch từ dung dịch DNA (Amersham):

1. Đặt cột GFX vào 1 eppendorf 1,5ml.
2. Dùng micropipette hút capture buffer cho vào cột GFX. Sau đó cho dung dịch DNA cần tinh sạch vào cột GFX chứa capture buffer.
3. Trộn nhẹ hỗn hợp bằng micropipette khoảng 4-6 lần.
4. Ly tâm 10.000 vòng/phút trong 30 giây, lấy cột GFX ra đặt vào eppendorf 1,5 ml mới.
5. Hút lấy 500 µl wash buffer nhỏ vào cột GFX, ly tâm 10.000vòng/phút trong 30 giây. Chuyển cột GFX vào eppendorf 1,5 ml mới.
6. Hút 50 µl elution buffer nhỏ vào cột GFX, ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút.

7. Ly tâm tốc độ 10.000 vòng/phút trong 1 phút, lấy cột GFX ra, thu lấy dung dịch DNA.

➤ Cách 2: Quy trình tinh sạch DNA sản phẩm PCR bằng phương pháp cắt gel (Amersham):

▪ Bước 1: Điện di sản phẩm PCR và cắt gel có chứa band DNA cần tinh sạch:

Mẫu cần được tinh sạch là sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel agarose 0,8% tan ở nhiệt độ thấp. Gel sau khi chạy điện di được nhuộm ngắn (2 – 3 phút) trong ethidium bromide nồng độ thấp. Bảng gel được nhuộm xong được rửa sạch bằng nước cất vô trùng, gel được đặt trên máy chiếu tia UV đã được bọc kỹ bằng saran wrap và phủ lên trên lớp giấy bạc được cắt lỗ có kích thước bằng kích thước miếng gel.

Bật UV, định vị band cần cắt lấy, dùng dao lam cắt gel có chứa band DNA cần tinh sạch cho vào eppendorf 1,5 ml. Dùng cân điện tử để xác định trọng lượng của gel chứa band vừa cắt trên.

Mảnh gel được cắt có chứa band DNA cần tinh sạch có thể được cất giữ trong tủ -70°C nếu như chưa thể tinh sạch ngay được.

▪ Bước 2: thao tác tinh sạch DNA từ gel được cắt lấy ở trên.

1. Dùng tấm tre đã được khử trùng để phân nhỏ phần gel có chứa band DNA cần tinh sạch ở trong eppendorf 1,5 ml.
2. Dùng micropipette hút capture buffer theo tỷ lệ khối lượng / thể tích (10 mg trọng lượng gel chứa DNA cần 10 µl capture buffer, đầy nắp eppendorf, vortex nhẹ, ủ ở 60°C cho đến khi agarose có chứa DNA cần tinh sạch tan hết.
3. Sau khi agarose tan hoàn toàn, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 30 giây để tập trung mẫu ở đáy eppendorf.
4. Dùng micropipette hút mẫu cho vào cột GFX, ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút.
5. Ly tâm 10.000 vòng/phút trong 30 giây, lấy cột GFX ra đặt vào eppendorf.
6. Hút 500 µl wash buffer nhỏ vào cột GFX, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 30 giây.
7. Lấy cột ra và đặt vào eppendorf 1,5 ml mới.

8. Hút 50 µl elution buffer nhỏ vào cột GFX, ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút.
9. Ly tâm tốc độ 10.000 vòng/phút trong 1 phút, lấy cột GFX ra, thu lấy dung dịch DNA.

➤ Những điều cần lưu ý khi tinh sạch sản phẩm từ gel:

- Bồn điện di cần phải được vệ sinh sạch trước khi chạy điện di.
- Dung dịch dùng cho chạy điện di mới, không bị cạn bản.
- Sử dụng loại agarose: low melting agar.
- Dòng điện chạy trong điện di 50V, mục đích: giúp cho độ phân tách DNA với các phân tạp tốt hơn.
- Cân eppendorf trước và sau khi tiến hành cắt gel. Để xác định trọng lượng phân gel có chứa sản phẩm DNA.
- Trong quá trình nhuộm gel bằng ethidium bromide nồng độ sử dụng để nhuộm là 15 µl ethidium bromide + 300ml TAE 0,5 M, nồng độ này loãng hơn $\frac{1}{2}$ so với nồng độ thường dùng trong nhuộm gel để đọc bằng máy đọc gel với chương trình gel doc.
- Thời gian nhuộm gel từ 2- 3 phút.
- Bảng gel sau khi nhuộm cần phải được rửa sạch bằng nước cất vô trùng.
- Thời gian mẫu tiếp xúc dưới tia UV trong quá trình cắt gel phải ngắn (<40 giây), mục đích là tránh tình trạng tia UV gây mất lượng DNA.
- Các dụng cụ dùng cho việc tinh sạch DNA như: bồn điện di, lọ nấu agarose, eppendorf, dao cắt, giấy lót ...phải tuyệt đối đảm bảo sạch, vô trùng.
- Sau quá trình ủ 60⁰C agarose phải tan hết.
- Khi nhỏ dung dịch capture buffer, hay dung dịch rửa cột wash buffer phải nhỏ từ từ trên thành của cột GFX.
- Khi nhỏ elution buffer phải nhỏ ngay giữa cột GFX, từng giọt một.

Trong suốt quá trình tinh sạch DNA phải đảm bảo các dụng cụ sạch, vô trùng và thao tác nhanh, chính xác để không bị xâm nhiễm từ những tác nhân bên ngoài.

3.8.1.2 Định lượng sản phẩm PCR đã tinh sạch

Sau khi tinh sạch DNA, chạy điện di với hiệu điện thế 50 V và cường độ dòng điện 250A, trong khoảng 60 phút. Thu nhận kết quả thông qua phương pháp nhuộm gel trong ethidium bromide (1%) và đọc kết quả trên máy chụp hình gel dọc bằng chương trình Quality One (Biorad).

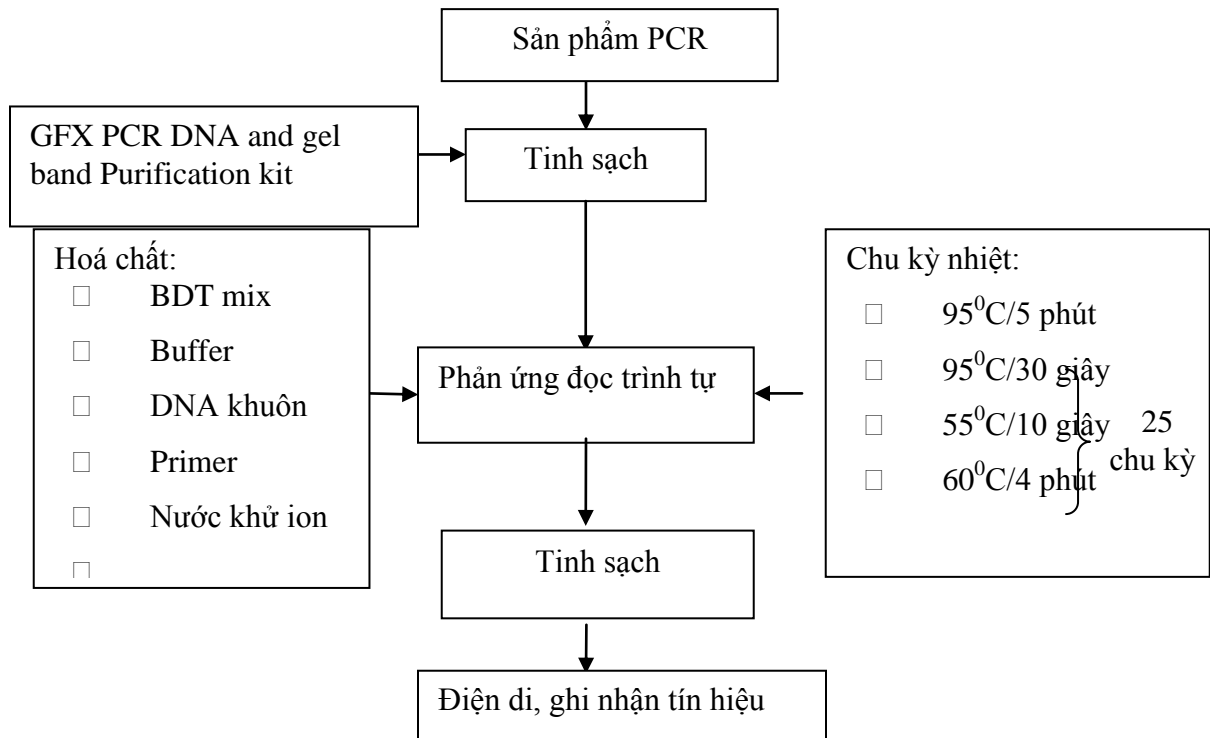
Kết quả điện di trên được phân tích và dựa vào đó pha loãng 2, 4, 6 lần. Ở độ pha loãng ra 4 lần cho nồng độ DNA thích hợp cho việc đọc trình tự.

3.8.3 Chạy điện di và ghi nhận tín hiệu trên máy sequencer

Sản phẩm DNA sau khi khuếch đại được load vào các cột mao dẫn chứa polymer để điện di phân tích kết quả.

Kết quả thu được từ tín hiệu huỳnh quang sẽ được ghi nhận bằng phần mềm của máy sequencer.

Quy trình tóm tắt các bước đọc trình tự



Hình 3.3 Sơ đồ tóm tắt quy trình đọc trình tự sản phẩm PCR.

PHẦN 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1 Kết quả phục hồi nấm *Trichoderma* từ những ống nghiệm chứa những bào tử nấm

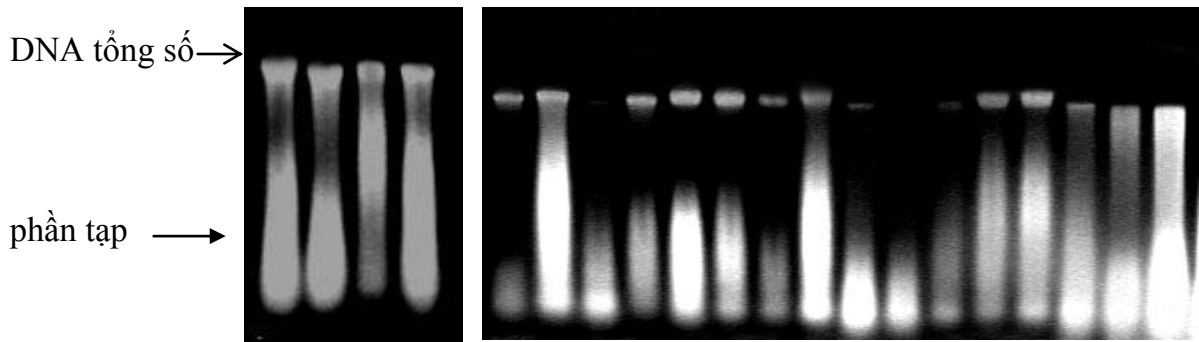
➤ Sau khi cấy những bào tử lên trên phần thạch của đĩa petri chứa môi trường PGA phục hồi nấm và trên phần thạch nghiêng trong ống nghiệm chứa môi trường CAM để giữ nấm. Đậy kín và giữ trong điều kiện ở nhiệt độ phòng, ở nơi mát. Sau 4 – 6 ngày khuẩn ty và đỉnh bào tử nấm *Trichoderma* mọc ở mặt trên của phần thạch nghiêng và đĩa petri. Khuẩn ty của nấm *Trichoderma* có màu trắng còn bào tử có màu xanh đặc trưng của dòng nấm *Trichoderma*. Các dòng nấm cần phải được lưu giữ để cho những nghiên cứu sau và là nguồn dự trữ cho những nghiệm thức sau nếu như các kết quả thực hiện chưa đạt yêu cầu.

➤ So với môi trường CAM lưu trữ nấm thì trên môi trường PGA nấm *Trichoderma* phát triển mạnh và nhanh hơn, sự hình thành bào tử sớm hơn vì trên môi trường PGA nấm *Trichoderma* sẽ sử dụng trực tiếp ngay thành phần glucose bổ sung và lượng glucose trong khoai tây nên sợi nấm *Trichoderma* phát triển mau chóng. Trong môi trường CAM nấm *Trichoderma* phải qua giai đoạn phân giải đường Dextrose thành 2 phân tử Glucose và tinh bột từ bột bắp phân giải thành n-glucose cho nên thời gian nấm *Trichoderma* phát triển chậm hơn, bù lại thì có thể giữ nấm được lâu hơn (có thể 2-3 năm), còn đối với môi trường PGA chỉ có thể giữ nấm không quá 4 tháng.

➤ Kết quả nhân sinh khối sau khi cấy sợi nấm có hoặc không có đỉnh bào tử vào những bình tam giác có chứa môi trường nhân sinh khối lỏng (MOLAS – YEAST EXTRAX) giữ ở nhiệt độ 27⁰C, đặt vào máy lắc điều chỉnh với tốc độ 200 vòng/phút. Sau 4-5 ngày, kết quả thu được từ 10 dòng nấm *Trichoderma* của Việt Nam được phân lập từ những địa điểm khác nhau và 10 dòng nấm *Trichoderma* của nước ngoài. Tất cả các dòng *Trichoderma* của Việt Nam và nước ngoài đều có khả năng tạo ra sợi nấm trong môi trường MOLAS.

4.2. Kết quả ly trích thu DNA từ các dòng nấm *Trichoderma*

Ly trích 10 dòng nấm *Trichoderma* của Việt Nam và 10 dòng nấm *Trichoderma* của nước ngoài. Kết quả ly trích thể hiện qua hình sau:



Hình 4.1 kết quả ly trích DNA tổng số từ các dòng *Trichoderma*

Kết quả ly trích cho thấy DNA tổng số không tinh sạch hoàn toàn. Ngoài DNA tổng số còn có thêm những đoạn DNA bị đứt gãy mà quá trình ly trích không thể loại bỏ được.

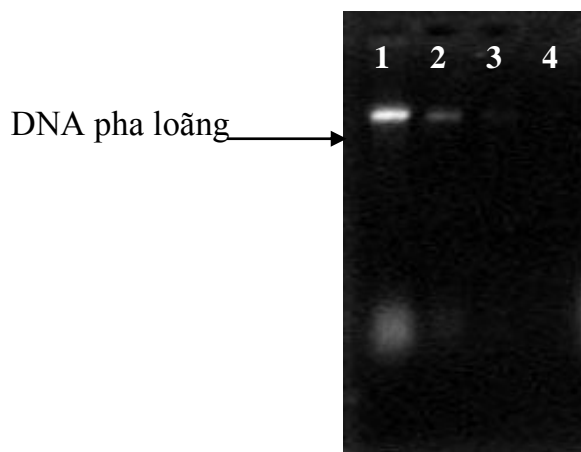
Nguyên nhân tạo ra những đoạn DNA đứt gãy:

- Quá trình nghiền chưa tốt hoặc do hoá chất như Phenol, chloroform.
- Thời gian cho phenol để phá huỷ lớp vỏ, lớp màng nhân, loại bỏ protein. Nếu như thời gian quá dài sẽ gây nên sự đứt gãy DNA một lượng rất đáng kể.
- Ly tâm (tốc độ, thời gian, thao tác):
 - Ly tâm với thời gian ngắn, tốc độ thấp thì sự phân lớp chưa tốt giữa phần dịch chứa DNA, lớp xác tế bào, lớp phenol.
 - Ly tâm với thời gian quá dài thì phenol phá huỷ nhiều DNA hơn gây ra nhiều đoạn đứt gãy
 - Ly tâm với tốc độ quá cao và thời gian dài thì DNA sẽ bị gãy rất nhiều.
- Nguyên nhân thu lượng DNA tổng số ít là do:
 - Mẫu nghiền chưa mịn.

- Thời gian và nhiệt độ ủ chưa đủ để phá vỡ vách tế bào.
- Sự phân lớp chưa tốt ở các bước ly tâm.
- Thực hiện càng nhiều bước ly tâm thì lượng DNA đứt gãy càng nhiều cho nên bước tủa DNA không cần phải ly tâm để tập trung lượng DNA mà để lắng khoảng 30 phút sẽ thu được DNA tinh hơn.
- Như vậy mức độ DNA tinh sạch có hoặc không có bị đứt gãy, lượng DNA tổng số thu được nhiều hay ít là do việc nghiền nấm và quá trình ly trích.
- Các dòng *Trichoderma* được chọn để chạy PCR: *T.harzianum* (T4), *T.Koningii* (T6), L35.5 (chưa định danh), 2-41-2(chưa định danh), và một dòng của nước ngoài làm đối chứng: *Trichoderma harzianum* (GJS 00-39). Tiến hành pha loãng các mẫu trên với độ pha loãng thích hợp.

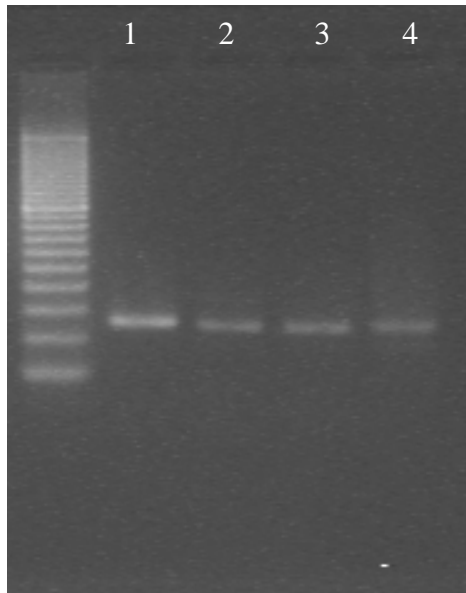
DNA pha loãng trước khi chạy PCR

Dựa vào band DNA thu nhận được từ kết quả điện di sản phẩm ly trích DNA, tiến hành pha loãng các nguồn DNA tổng số xuống nồng độ thấp hơn, dựa vào đó chọn lựa thang biểu thị nồng độ DNA thích hợp cho quá trình chạy PCR. Kết quả điện di ở hình 4.2 cho thấy band thứ 2 được chọn làm chuẩn để tiến hành chạy PCR

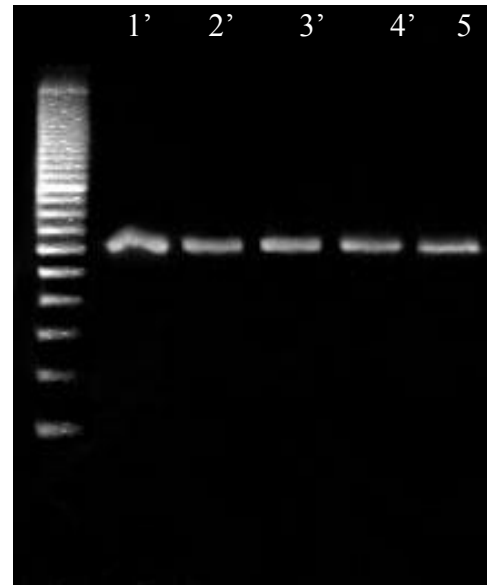


Hình 4.2 DNA tổng số được pha loãng trước khi chạy PCR.

4.4 Kết quả khuếch đại vùng ITS1 – 5,8S – ITS2



Hình 4.3 Sản phẩm PCR khi khuếch đại bằng cặp primer Elong R-Elong F.



Hình 4.4 Sản phẩm PCR khi khuếch đại bằng cặp primer ITS4 & ITS5.

Với: 1,1': T4 , 2,2': T6, 3,3': T19, 4,4': L35.5, 5: GJS 00-39 (dòng *Trichoderma .harzianum* của nước ngoài được dùng làm mẫu đối chứng)

- Dựa vào thang ladder, cho thấy các dòng nấm *Trichoderma* chạy với primer ITS4 - ITS5 có kích thước khoảng 670 bp. Tương tự với primer ElongR - ElongF so sánh với ladder thì kích thước vùng elong khoảng 260 bp.
- Primer là đoạn môi có tính đặc hiệu khác với tính ngẫu nhiên do primer ITS4 - ITS5 thực hiện trên vùng ITS1 – 5,8S – ITS2.
- Nếu quá trình ly trích tốt ít DNA bị đứt gãy, không bị tạp, sản phẩm DNA trước khi chạy PCR cần tinh sạch thì kết quả PCR tốt hơn. Cần phải tinh sạch sản phẩm PCR vì theo nguyên tắc và thực nghiệm thì trong ống eppendorf chứa hàng triệu DNA được nhân lên nhờ vào quá trình khuếch đại thì vẫn còn sót lại lượng hoá chất cần để chạy PCR cũng như lượng DNA đứt gãy có lẫn trong lượng DNA mẫu ban đầu. Do đó cần phải tinh sạch sản phẩm PCR trước khi đọc trình tự DNA.

- Sau khi tinh sạch sản phẩm PCR. Chuẩn bị pha loãng để có thể đọc trình tự DNA vùng ITS1 – 5,8S – ITS2 và vùng *Tef*.

4.5 Sản phẩm PCR tinh sạch của dòng *Trichoderma harzianum*

Trong số các sản phẩm PCR được khuếch đại, chọn lấy dòng *Trichoderma harzianum* (T4). Band 1: sản phẩm PCR khuếch đại với cặp primer Elong R và ElongF. Band 2: sản phẩm PCR khuếch đại với cặp primer ITS 4 và ITS 5 của cùng dòng nấm *Trichoderma harzianum*.

Pha loãng sản phẩm PCR làm ở mức độ 2, 4, 6, lần.

Độ pha loãng 4 có thể sử dụng để tiến hành đọc trình tự vùng gene cần thiết.



Band 1: Với cặp primer ElongR - ElongF
Band 2: Với cặp primer ITS4 – ITS5

Hình 4.5 Sản phẩm PCR được tinh sạch trước khi đọc trình tự DNA.

4.6 Kết quả giải trình tự vùng ITS-rDNA và vùng *Tef*

4.6.1 So sánh trình tự nucleotid giữa vùng ITS – rDNA và vùng *Tef*

Sản phẩm khuếch đại vùng bảo tồn ITS – rDNA và vùng chức năng *Tef* của dòng nấm *Trichoderma* được đọc trực tiếp bằng máy Sequencer. Trình tự vùng ITS – rDNA và vùng *Tef* được đối chiếu trên nguồn gen (dữ liệu NCBI). Chọn những dòng *Trichoderma* đối chiếu có trình tự DNA tương đồng là cao nhất trong hàng loạt những dòng khác nhau .

❖ So sánh vùng trình tự ITS – rDNA dòng T4 (mẫu nấm *Trichoderma harzianum* - Việt Nam) với các dòng *Trichoderma* trên ngân hàng gene (GeneBank): kết quả thể hiện như sau:

Bảng 4.1: Các nguồn nấm *Trichoderma* trên genbank được dùng để so sánh vùng ITS1 – 5,8S – ITS2

Tên <i>Trichoderma</i> Năm	Tác giả	Địa điểm
<i>T.asperellum</i> .TUB 2004	Nyla N.	Ấn Độ
<i>T.asperellum</i> .RRLF-20 1998	Hermosa M.R	Nhật
<i>T.harzianum</i> .THAJ4020 1998	Hermosa M.R	Nhật
<i>T.viride</i> .GJS90-95 2000	Gary J.Semuels	Mỹ
<i>T.viride</i> .TVRRNATR3 1996	Kula N.	Đức
<i>T.viride</i> .TVAJ3773 1998	Hermosa M.R	Nhật
<i>T.hamatum</i> .GJS 2000	Gary J.Semuels	Mỹ
<i>T.hamatum</i> .MA 2000	Wuczkowsd N.	Úc
<i>T.atroviride</i> .BBA 1998	Lieckfeldt E.	Đức

So sánh trình tự nucleotid vùng ITS – rDNA dòng T4 với các dòng *Trichoderma* khác trên geneBank. Sử dụng phần mềm CLUSTAL.

```
DQ315455-T.viride.GJS90-95          -----TCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAA
AY857218-T.asperellum.TUB          -----AGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAA
X93981-T.viride.TVRRNATR3          TCCGTTGGTGAACCGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAA
AJ230660-T.atroviride.BBA          TCCGTTGGTGAACCGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAA
AJ223773-T.viride.TVAJ3773          -----AGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAA
AJ224020-T.harzianum.THAJ4020      -----AGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAA
AJ849895-T.asperellum.RRLF-20      -----CCGTGAACCATGGGGATCAT-ACCGAGTTTACAACCTCCCAA
DQ109530-T.hamatum.GJS             -----CTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAA
AJ507086-T.hamatum.MA              -----CCGAGTTTACAACCTCCCAA
T4-ITS5                             ----NAAAGCTATGGAGCGGAGGATATTAC-GAGTTTACAACCTCCCAA
                                     * *****
```

```
DQ315455-T.viride.GJS90-95          CCCAATGTGAACCATACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGG
AY857218-T.asperellum.TUB          CCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGG
X93981-T.viride.TVRRNATR3          CCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGG
AJ230660-T.atroviride.BBA          CCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGG
AJ223773-T.viride.TVAJ3773          CCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGG
AJ224020-T.harzianum.THAJ4020      CCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGG
AJ849895-T.asperellum.RRLF-20      CCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGG
DQ109530-T.hamatum.GJS             CCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGG
AJ507086-T.hamatum.MA              CCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGG
T4-ITS5                             *****
```



```

DQ315455-T.viride.GJS90-95      GCGTTGGGGACTTCGGGAACCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCTAAATAC
AY857218-T.asperellum.TUB      GCGTTGGGGG--TCGGGACCCCTCACAC--GGGTGCCGGGCCCTAAATAC
X93981-T.viride.TVRRNATR3      GCGTTGGGGG--TCGGGACCCCTCACAC--GGGTGCCGGGCCCTAAATAC
AJ230660-T.atroviride.BBA      GCGTTGGGGG--TCGGGACCCCTCACAC--GGGTGCCGGGCCCTAAATAC
AJ223773-T.viride.TVAJ3773     GCGTTGGGGG--TCGGGACCCCTCACAC--GGGTGCCGGGCCCTAAATAC
AJ224020-T.harzianum.THAJ4020  GCGTTGGGGG--TCGGGACCCCTCACAC--GGGTGCCGGGCCCTAAATAC
AJ849895-T.asperellum.RRLF-20  GCGTTGGGGG--TCGGGACCCCTCACAC--GGGTGCCGGGCCCGAATAC
DQ109530-T.hamatum.GJS        GCGTTGGGGG--TCGGGACCCCTCACAC--GGGTGCCGGGCCCTGAAATAC
AJ507086-T.hamatum.MA        GCGTTGGGGG--TCGGGACCCCTCACAC--GGGTGCCGGGCCCTGAAATAC
T4-ITS5                       GTGGCGGAAA--CCGAGACCCACATGC--GAATTCTTTTCTTACATCC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

DQ315455-T.viride.GJS90-95      AGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGT-TTGACAACACTCG
AY857218-T.asperellum.TUB      AGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGT-TTGACAACACTCG
X93981-T.viride.TVRRNATR3      AGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGT-TTGACAACACTCG
AJ230660-T.atroviride.BBA      AGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGT-TTGACAACACTCG
AJ223773-T.viride.TVAJ3773     AGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGT-TTGACAACACTCG
AJ224020-T.harzianum.THAJ4020  AGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGT-TTGACAACACTCG
AJ849895-T.asperellum.RRLF-20  AGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGT-TTGACAACACTCG
DQ109530-T.hamatum.GJS        AGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGT-TTGACAACACTCG
AJ507086-T.hamatum.MA        AGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGT-TTGACAACACTCG
T4-ITS5                       GTTACCTCTTTACACCTACACCTCACAAAGTAATAGAGTCTTGCAAAAGCC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

DQ315455-T.viride.GJS90-95      CACCGGGAGCGCGGGCGGTCCACG---TCCGTAAAACA---CCCAACTT-
AY857218-T.asperellum.TUB      CACCGGGAGCGCGGGCGGTCCACG---TCCGTAAAACA---CCCAACTTT
X93981-T.viride.TVRRNATR3      CACCGGGAGCGCGGGCGGTCCACG---TCCGTAAAACA---CCCAACTTT
AJ230660-T.atroviride.BBA      CACCGGGAGCGCGGGCGGTCCACG---TCCGTAAAACA---CCCAACTTT
AJ223773-T.viride.TVAJ3773     CACCGGGAGCGCGGGCGGTCCACG---TCCGTAAAACA---CCCAACTTT
AJ224020-T.harzianum.THAJ4020  CACCGGGAGCGCGGGCGGTCCACG---TCCGTAAAACA---CCCAACTTT
AJ849895-T.asperellum.RRLF-20  CACCGGGAGCGCGGGCGGTCCACG---TCCGTAAAACA---CCCAACTTT
DQ109530-T.hamatum.GJS        CACCGGGAGCGCGGGCGGTCCACG---TCCGTAAAACA---CCCAACTT-
AJ507086-T.hamatum.MA        CACCGGGAGCGCGGGCGGTCCACG---TCCGTAAAACA---CCCAACTT-
T4-ITS5                       TTCCAGTCAACTGCTGAGCCAATAAAATCTACCAACCTGTTTCCCCCCTT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

DQ315455-T.viride.GJS90-95      CTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA--ATACCCGCTGA-ACTTAA-
AY857218-T.asperellum.TUB      CTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA--ATACCCGCTGA-ACTTAAAG
X93981-T.viride.TVRRNATR3      CTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA--ATACCCGCTGA-ACTTAAAG
AJ230660-T.atroviride.BBA      CTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA--ATACCCGCTGA-ACTTAAAG
AJ223773-T.viride.TVAJ3773     CTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA--ATACCCGCTGA-ACTTAA-
AJ224020-T.harzianum.THAJ4020  CTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA--ATACCCGCTGA-ACTTAA-
AJ849895-T.asperellum.RRLF-20  CTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA--ATACCCGCTGA-ACTTAAAG
DQ109530-T.hamatum.GJS        CTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA--ATACCCGCTGA-ACTTAAAG
AJ507086-T.hamatum.MA        CTGAAATG-----
T4-ITS5                       CGCACATATGGGTGTGATTGATGAATTATGATACGTGCTCATGCCCCC
* * * *

DQ315455-T.viride.GJS90-95      -----
AY857218-T.asperellum.TUB      C-----
X93981-T.viride.TVRRNATR3      CATATCAATAA
AJ230660-T.atroviride.BBA      CATATCAATAA
AJ223773-T.viride.TVAJ3773     -----
AJ224020-T.harzianum.THAJ4020  -----
AJ849895-T.asperellum.RRLF-20  CATATCAATAG
DQ109530-T.hamatum.GJS        CATATCA----
AJ507086-T.hamatum.MA        -----
T4-ITS5                       CCTTTCAAATA

```

Trình tự vùng ITS1 – 5,8S – ITS2 của dòng T4 (mẫu nấm *Trichoderma harzianum* -Việt Nam) so với các dòng *Trichoderma* trên ngân hàng gene (geneBank) cho thấy mức độ tương đồng ở vùng ITS – rDNA là 98%.

Kết quả so sánh vùng bảo tồn ITS – rDNA giữa các dòng nấm *Trichoderma* vẫn chưa thể khẳng định chính xác T4 thuộc dòng nấm nào trong số các dòng nấm trên.

Vì thế, việc khuếch đại vùng *Tef* (vùng chức năng). Sau đó, giải mã trình tự vùng *Tef1fw – Tef2rev* trở nên cần thiết hơn để định danh dòng T4 (*trichoderma harzianum*- định danh dựa vào hình thái học, Việt Nam).

❖ so sánh vùng *tef1fw – tef2rev* của dòng nấm *Trichoderma* (T4) với các dòng nấm *Trichoderma* trên ngân hàng gen (geneBank). Kết quả thể hiện qua bảng sau:

Bảng 5.2 Các nguồn nấm *Trichoderma* trên genbank được dùng để so sánh vùng *Tef*

Tên <i>Trichoderma</i>	Tác giả	Địa điểm
<i>T.asperellum</i> .TUBF-106	Druzhinina T.S	Úc
<i>T.asperellum</i> .TUB	Druzhinina T.S	Úc
<i>T.hamatum</i> .	Zhang C.C	Trung Quốc
<i>T.hamatum</i> .T-382	Gary J. semuel	Mỹ
<i>T.viride</i> .ATCC	Kulling G.M	Úc

So sánh trình tự nucleotide vùng *tef1fw – tef2rev* dòng T4 với các dòng *Trichoderma* trên genbank. Sử dụng phần mềm CLUSTAL.

```

AY857292-T. asperellum. TUBF-106      GAAGTTCGAGAC---TCCCAAGTACTAT-GTCACCGTCATTGGTATGTTT
AY857299-T. asperellum. TUB          GAAGTTCGAGAC---TCCCAAGTACTAT-GTCACCGTCATTGGTATGTTT
AY298863-T. hamatum.                 GAAGTTCGAGAC---TCCCAAGTACTAT-GTCACCGTCATTGGTATGTTT
DQ151582-T. hamatum. T-382           GAAGTTCGAGAC---TCCCAAGTACTAT-GTCACCGTCATTGGTATGTTT
AF400992-T. viride. ATCC              -----AAGTACTAT-GTCACCGTCATTGGTATGTTT
T4-Sequence_tef_                      ----TTCACCCCTTCCCAAGTACTATAGTCACCGTCATTGGTATGTTT
                                         *****

```

```

AY857292-T. asperellum. TUBF-106      TGGA-CTCTTCTCTCTAGCTATCGACATTCCAAGTCCGCCATTCTAACAT
AY857299-T. asperellum. TUB          TGGA-CTCTTCTCTCTAGCTATCGACATTCCAAGTCCGCCATTCTAACAT
AY298863-T. hamatum.                 TCAG-TCCGACTG-----GTCACTATCCCAACATCATCATGCTAACGT
DQ151582-T. hamatum. T-382           TCAG-TCCGACTG-----GTCACTATCCCAACATCATCATGCTAACGT
AF400992-T. viride. ATCC              TCGC-TTTTCTCTC-----ATTGATACTGGAGACCAAGATTCTAACGT
T4-Sequence_tef_                      TGGACTCCTTCTCTCTAGCTATCGACATTCCAAGTCCGCCATTCTAACAT
*                **                *                *                *                *                **        *****

```

```

AY857292-T. asperellum. TUBF-106      GCTCTTCCCACAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGAT
AY857299-T. asperellum. TUB          GCTCTTCCCACAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGAT
AY298863-T. hamatum.                 GCGACTCC-ACAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGAT
DQ151582-T. hamatum. T-382           GCGACTCC-ACAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGAT
AF400992-T. viride. ATCC              GCCGCTCT-GTAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGAT
T4-Sequence_tef_                      GCTCTTCCCACAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGAT
**        **        *****

```

```

AY857292-T. asperellum. TUBF-106      CACTGGTACCTCCCAGGCTGACTGCGCTATCCTGATTATCGCTGCCGGTA
AY857299-T. asperellum. TUB          CACTGGTACCTCCCAGGCTGACTGCGCTATCCTGATTATCGCTGCCGGTA
AY298863-T. hamatum.                 CACTGGTACCTCCCAGGCCGATTGCGCTATCCTCATTATCGCTGCCGGTA
DQ151582-T. hamatum. T-382           CACTGGTACCTCCCAGGCCGATTGCGCTATCCTCATTATCGCTGCCGGTA
AF400992-T. viride. ATCC              CACTGGTACTTCCCAGGCTGACTGCGCTATCCTGATTATCGCTGCCGGTA
T4-Sequence_tef_                      CACTGGTACCTCCCAGGCTGACTGCGCTATCCTGATTATCGCTGCCGGTA
*****

```

```

AY857292-T.asperellum.TUBF-106      CTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCAC
AY857299-T.asperellum.TUB          CTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCAC
AY298863-T.hamatum.                CTGGTGAGTTCGAGGCTGGTCTCCAAGG-----
DQ151582-T.hamatum.T-382           CTGGTGAGTTCGAGGCTGGTAT-----
AF400992-T.viride.ATCC              CTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAG-----
T4-Sequence_tef_                    CTGGTGAGTTCGAGGCTGGTCTC--CAAGGATGGCAAAGGCGAGGGGGAT
***** *

AY857292-T.asperellum.TUBF-106      GCTCTGCTCGCCTACACCCCTGGGTGTCAAGCAGCTCATCGTTGCCATCAA
AY857299-T.asperellum.TUB          GCTCTGCTCGCC-----
AY298863-T.hamatum.                -----
DQ151582-T.hamatum.T-382           -----
AF400992-T.viride.ATCC              -----
T4-Sequence_tef_                    TGTC AATGGAGTACATACGGTGTCTCGGGAGGTCTGTGCGGAGAGATGTAAA

AY857292-T.asperellum.TUBF-106      CAAGATGGACA
AY857299-T.asperellum.TUB          -----
AY298863-T.hamatum.                -----
DQ151582-T.hamatum.T-382           -----
AF400992-T.viride.ATCC              -----
T4-Sequence_tef_                    AGGGG-----

```

Trình tự so sánh trên vùng *Tef* giữa các dòng *Trichoderma* cho thấy mức độ tương đồng của dòng nấm *T.asperellum.TUBF-106*, *T.asperellum.TUB*, *T.viride.ATCC* là 98% , dòng *T.hamatum*, *T.hamatum.T-382* có mức độ tương đồng là 96%, vùng *Tef* không tìm ra sự tương đồng của dòng T4 với dòng *Trichoderma harzianum* trong dữ liệu geneBank .

Trên cơ sở đối chiếu vùng ITS1-5,8S-ITS2 kết hợp vùng *tef1fw-tef2rev* . Ta xác định dòng nấm T4 là dòng *Trichoderma asperellum*.

Qua đó cho thấy định danh bằng hình thái không chính xác vì môi trường sống của các giống loài ở những điều kiện khác nhau thì hình thái cũng có sự thay đổi dần để thích nghi, tồn tại và phát triển. Cho nên, định danh phân tử hiệu quả hơn, chính xác hơn định danh bằng hình thái học các dòng nấm. Công cụ trong sinh học phân tử như: kỹ thuật khuếch đại các vùng bảo tồn giống loài và những vùng chức năng khác, các probe đánh dấu và giải trình tự sản phẩm khuếch đại cung cấp những thông tin chính xác hơn về giống loài.

4.6.2 Kết quả giải trình tự vùng ITS1 – 5,8S – ITS2

❖ T4 là dòng *Trichoderma asperellum*, kết quả đọc trình tự vùng ITS-rDNA của dòng nấm T4 được 758 nucleotid, trong đó:

```

#18S
NAAAGCTATG GAGCGGAGGA TATTACGAGT TTACAACCTCC
CAAACCCAAT GTGAACGTTA CCA

```

#ITS1

```
GCAGCCCCGG AACCAGGCGC CCGCCGGAGG AACCAACCAA
ACTCTTTCTG TAGTCCCCTC GCGGACGTAT TTCTTACAGC
TCTGAGCAAA AATTCAAAAT GAATCAAAAC TTTCAACAAC
GGATCTCTTG GTTCTGGCAT CGATGAAGAA CGCAGCGAAA TGCGATA
```

#5.8S

```
CATAATCATT GAACGCACGT TGCGCCCGTC AATACACTGA
CTGGCTTGCC TGTCTACCG ACTTTACTAC CCTCACATCT
TTCCCCTGGA ACGGTGGCGG AAACCGAGAC CCCACATGCG AATT
```

#ITS2

```
CACCTACACC TCACAAGTAA TAGAGTCTTG CAAAAGCCCT
TCCAGTCAAC TGCTGAGCCA ATAAAATCTA CCAACCTGTT
TCCCCCCTTC GCACATATGG GTGTTGATTG ATGAATTATG
ATACGTGCTC ATGCCCCCCC CTTTCAAATA GTAAGTGTA
TAAACGACTC AACCCACCTC CGTACTATTC ATAATATA
```

#28S

```
GTAAGTGTA TAAACGACTC AACCCACCTC CGTACTATTC
ATAATATACA TGTGCCCCCC CCAAAGTACC CCTAAGAAAC
CTTCTACTAT TTTTTCACAC AAGGCTGACA AACCTTACCT
TTTTTGATTT CCCTTTAAAT CCGCCACTCC CTTACCAA
```

❖ So sánh sự tương đồng trình tự nucleotide trong vùng ITS-rDNA của dòng T4 (*Trichoderma asperellum* của Việt Nam) và dòng *T.Asperellum*.RRLF-20 (Úc).

- So sánh vùng ITS1 cho thấy trình tự nucleotid của dòng T4 và dòng *T.Asperellum*.RRLF-20 (Úc) có độ tương đồng 100%, không có bất kỳ sự sai khác nào trong trình tự DNA vùng ITS1. Sử dụng phần mềm CLUSTAL.

```
ITS1-T.Asperellum.RRLF-20 ---AAACTGTTGCCTCGGGGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCG
T4-ITS5 ACCAAACTGTTGCCTCGGGGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCG
*****

ITS1-T.Asperellum.RRLF-20 GAACCAGGCGCCCGCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCT
T4-ITS5 GAACCAGGCGCCCGCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCT
*****

ITS1-T.Asperellum.RRLF-20 CGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCA---
T4-ITS5 CGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAA
*****

ITS1-T.Asperellum.RRLF-20 -----
T4-ITS5 CTTTCAACAAC
```

- So sánh vùng 5,8S cho thấy trình tự nucleoted của dòng T4 và dòng *T.Asperellum*.RRLF – 20 (Úc) có 15 nucleoted sai khác trong tổng số 205 nucleoted. Độ tương đồng giữa hai dòng *Trichoderma* này ở vùng 5,8S là 93%,. Sử dụng phần mềm CLUSTAL.

```

T4-ITS5                TCGATGAAGAACGCGAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
5.8S-T.Asperellum.RRLF-20  ---ATGAAGAACGCGAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
                        *****

T4-ITS5                ATGTGAATCATCATAATCATTGAACGCGACGTTGCGCCCGTCAATACACTG
5.8S-T.Asperellum.RRLF-20  A-GTGAATCATCG-AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTG
                        * ***** **** ***** ***** ** ** ***

T4-ITS5                ACTGGCTTGCCTGTCCTACCGACTTTACTAC
5.8S-T.Asperellum.RRLF-20  GCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTT----
                        * *** ***** * ** * **

```

- So sánh vùng ITS2 cho thấy trình tự nucleoted của dòng T4 và dòng *T.Asperellum*.RRLF-20 (Úc) có 76 nucleoted sai khác trong tổng số 172 nucleoted. Độ tương đồng giữa hai dòng *Trichoderma* này ở vùng ITS2 là 55%,. Sử dụng phần mềm CLUSTAL

```

T4-ITS5                GACTTTACTACCCTCACATCTTTCCCTGGAACGGTGGCGGAAACCGAGA
ITS2-T.asperellum.RRLF-20  -----CAACCCCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGA
                        * ***** * * *** ** ** * ** * ** *

T4-ITS5                CCCCACATGCGAATTCCTTTTCTTACATCCGTTACCTCTTTCACCTACAC
ITS2-T.asperellum.RRLF-20  CCCCTCACACGGGTGCCGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACG
                        **** ** * * * * * * * * * * * * * * * *

T4-ITS5                CTCACAAGTAATAGAGTCTTGCAAAAGCCCTTCCAGTCAACTGTGAGCC
ITS2-T.asperellum.RRLF-20  CTCCTCCTGCG-CAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGGGCGCGTC
                        *** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

T4-ITS5                AATAAAATCTACCAACCTGTTTCCCCCTTCGCACATATGG
ITS2-T.asperellum.RRLF-20  CACG---TCCGTAAAAC---ACCCAACCTTCTGAAATG---
                        * ** * * * * * * * * * *

```

Kết quả so sánh giữa các vùng cho thấy mức độ tương đồng của vùng ITS1 là 100% , vùng ITS2 cho thấy sự sai khác rất nhiều dù xét trên cả vùng rITS – rDNA trình tự nucleoted có sự tương đồng là 98%. Qua đó cho thấy vùng ITS2 có sự biến đổi nhiều nhất trong vùng ITS – rDNA.

4.6.3 Kết quả giải trình tự vùng *Tef1fw* – *Tef2rev* của dòng T4

```

TTCCACCCCTTCCCAAGTACTATAGTACCGTCATTGGTATGTTTTGGACTCCTTCTCTAGCTATCGACATTCCAAG
TCCGCCATTCTAACATGCTCTTCCCACAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCCC
AGGCTGACTGCGCTATCCTGATTATCGCTGCCGACTGGTGAGTTTCGAGGCTGGTCTCCAAGGATGGCAAAGGCGAGGG
GGATTGTCAATGGAGTACATACGGTGTCCGGAGGCTGTGCGGAGAGATGTAAAAGGGG

```

PHẦN 5: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1 Kết luận

- Phục hồi các dòng nấm *Trichoderma* và từ đó tiến hành nhân sinh khối ly trích các dòng nấm qua các bước khác nhau và sử dụng các loại hoá chất cũng như tác nhân cơ học để nghiên cứu sợi nấm thu DNA tổng số.
- Tiến hành khuếch đại vùng gene rDNA-ITS và *Tef* với 2 cặp primer: ITS1-ITS2 thu được sản phẩm khuếch đại có kích thước 670 bp (căn cứ trên thang ladder), tương tự như trên đối với cặp primer: ElongR, ElongF thu được sản phẩm khuếch đại có kích thước 260 bp (căn cứ trên thang ladder) trên 4 dòng *Trichoderma* của Việt Nam và 1 dòng đối chứng của nước ngoài *Trichoderma harzianum*.
- Tiến hành đọc trình tự vùng ITS1 – 5,8S – ITS2 và vùng *Tef* của dòng *Trichoderma harzianum* (T4)
- So sánh trình tự DNA vùng ITS1 – 5,8S – ITS2 giữa dòng *Trichoderma* nghiên cứu với cơ sở dữ liệu NCBI và dựa vào phần mềm CLUSTALX chưa khẳng định T4 là *T.harzianum* hay *T. asperellum*.
- Qua đó cho thấy, định danh bằng hình thái không chính xác, trình tự DNA vùng ITS1 – 5,8S – ITS2 đối chiếu trên cơ sở dữ liệu NCBI cũng chưa thật sự đáng tin cậy khi mà chỉ dựa trên mỗi trình tự vùng ITS1 – 5,8S – ITS2 (vùng bảo tồn của sinh vật). Do đó phải phân tích thêm trình tự DNA vùng *Tef* (vùng có chức năng chuyên biệt và đặc trưng cho từng loài).
- So sánh kết quả đọc trình tự các vùng ITS1 – 5,8S – ITS2 kết hợp vùng *Tef*
 - Định danh T4: *Trichoderma asperellum*.
 - Kích thước của vùng ITS1 – 5,8S – ITS2 là 54 5bp.
 - Kích thước vùng *Tef* là 223bp.
 - Trình tự nucleotid ở vùng ITS1 – 5,8S – ITS2 của dòng *Trichoderma asperellum* (T4) của Việt Nam so với dòng *Trichoderma asperellum* có mức độ tương đồng là 98%.

- Trình tự nucleotid ở vùng *Tef1fw – Tef2rev* của dòng *Trichoderma asperellum* (T4) của Việt Nam so với dòng *Trichoderma asperellum* có mức độ tương đồng 98%.

5.2 Đề nghị

- Tiếp tục tìm kiếm thêm những dòng *Trichoderma* hoang dại từ tự nhiên.
- Nghiên cứu khả năng đối kháng cao và những điều kiện phát triển tối ưu.
- Đưa những các dòng *Trichoderma* spp nghiên cứu ở mức độ phân tử: vùng bảo tồn của các dòng nấm ITS1 – 5,8S – ITS2, và những vùng chức năng khác. Từ đó phục vụ cho những nghiên cứu chuyên sâu .

5.3 Hạn chế đề tài

- Chưa tìm ra mối liên hệ giữa khả năng kháng bệnh của nấm với trình tự vùng rDNA- ITS và vùng *Tef*.
- Chưa so sánh được trình tự vùng rDNA-ITS giữa các dòng *Trichoderma* được phân lập từ những địa điểm khác nhau ở Việt Nam.
- Chưa xác định trình tự DNA biểu hiện tính độc của nấm *Trichoderma* với sâu bệnh hại trồng.
- Chưa xác định trình tự vùng chức năng kiểm soát sinh học của *Trichoderma* với sâu bệnh hại trồng, và sự thay đổi trình tự của từng dòng ảnh hưởng lên mức độ kháng lại sâu bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Di truyền phân tử (TS Nguyễn Thị Lang- GSTS Bùi Chí Bửu,2004). Nhà xuất bản Nông nghiệp TPHCM.
2. Sinh học phân tử – giới thiệu phương pháp và ứng dụng (Nguyễn Thị Lang- Bùi Chí Bửu,2005). Nhà xuất bản Nông nghiệp TPHCM.
3. Sinh học phân tử (Hồ Huỳnh Thuỳ Dương- chuyên ngành Sinh học phân tử – Khoa Sinh - Đại học Khoa học Tự Nhiên thuộc Đại học Quốc gia TPHCM). Nhà xuất bản giáo dục
4. Giáo trình Sinh học phân tử 2002 (Bùi Trang Việt – Khoa Sinh - Đại học Khoa học Tự Nhiên thuộc Đại học Quốc gia TPHCM).
5. Cơ sở di truyền phân tử và kỹ thuật gen (Khuất Bửu Thanh,2003). Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật.
6. Nhóm nấm Hyphomyces ở Việt Nam. Tập I (Bùi Xuân Đông, 1982). Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
7. Nguyễn Ngọc Tú - Nguyễn Cửu Thị Hương Giang, 1997. Bảo vệ cây trồng bằng các chế phẩm từ vi nấm. Nhà xuất bản Nông nghiệp, TPHCM.
8. Nguyễn Xuân Thành. 2003. Giáo trình công nghệ vi sinh vật trong sản xuất nông nghiệp và xử lý ô nhiễm môi trường. Nhà xuất bản nông nghiệp Hà Nội. Việt Nam.
9. Nguyễn Văn Tuất – Lê Văn Thuyết. 2001. Sản xuất chế biến và sử dụng thuốc bảo vệ thực vật thảo mộc và sinh học. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.

TIẾNG NƯỚC NGOÀI

10. Papavizas, 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopath.* 23: 23-54.

11. Gary J. Samuels. *Trichoderma* a guide to identification and biology. RM. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service Systematic Botany and Mycology Laboratory 304, B-011A Beltsville, MD 20705-2350 USA.
12. Gary J. Samuels, 9-2005. *Trichoderma*: Systematic, the Sexual State, and Ecology. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service Systematic Botany and Mycology Laboratory 304, B-011A Beltsville, MD 20705. Accepted for publication.
13. Kerstin Voigt, Johannes Wostemeyer, 2001. Phylogeny and origin of 82 Zygomycetes from all genera of the Mucorales and Mortierellales based on combined analysis of actin and translation elongation factor EF-1 genes.
14. Christian P. Kubicek - et.al, 2002. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolation.
15. Priscilla Chaverri, Lisa A. Castlebury, Gary J. Samuels, David M. Geiser, 2002. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/ *Hypocrea lixii* complex.

TRANG WEB

16. <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/bio-logi-s.map>: *Trichoderma* spp, including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, Moniliales, 2000 (Gary. E. Harman Cornell University, Geneva, NY 14456)
17. http://www.isthinfo.com/tools/blast/show_all_seq.php. (Gary. J. Samuels).

PHỤ LỤC

Cách pha và tác dụng của các hoá chất dùng trong quá trình ly trích DNA từ nấm:

- Tris-HCl 1M ($C_4H_{12}ClNO_3$, $M=157,60g/ml$):

Cách pha: Dùng 39,4g bột Tris – HCl 1M pha với 200ml nước cất 2 lần và vô trùng. Chỉnh pH đạt 8,0 sau đó hấp trong nồi Autoclave ở 121^0C trong 20 phút trước khi dùng.

Tác dụng: Tris- HCl 1M là dung dịch đệm, bảo quản môi trường ly trích mẫu là 8,0 vì ở pH này DNA ổn định. Nếu trong môi trường acid, các acid nucleotid rất dễ bị loại thải và cầu nối phosphodiester dễ bị phá vỡ thì cấu trúc DNA không bền vững.

- EDTA 0,5M($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_3$, $M=372,54g/ml$)

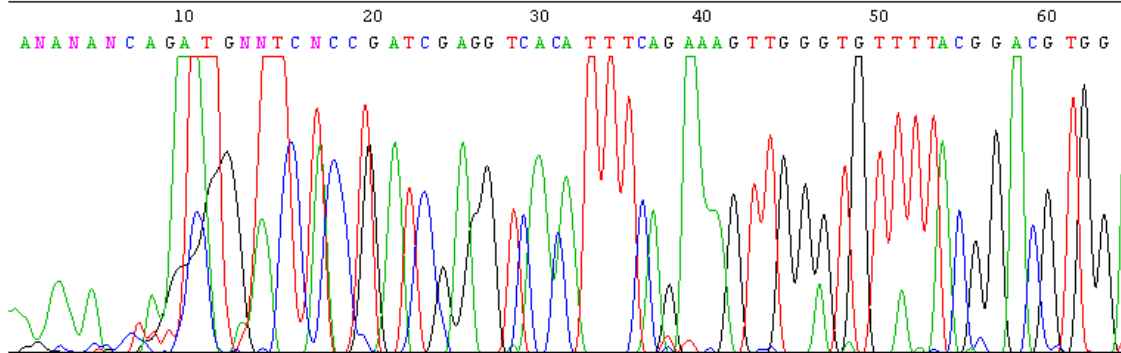
Cách pha : Dùng 37,244g bột EDTA pha với với 200ml nước cất 2 lần và vô trùng. Chỉnh pH đạt 8,0 sau đó hấp trong nồi Autoclave ở 121^0C trong 20 phút trước khi dùng.

Tác dụng:EDTA gắn nối các ion có hoá trị II (như Mg^{2+} , Ca^{2+}) có trong dịch trích mẫu, ngăn chặn sự hoạt động của các enzyme phân huỷ DNA, vì các enzyme này hoạt động rất mạnh nếu có mặt của các ion hoá trị II nhất là sự có mặt của Mg^{2+}

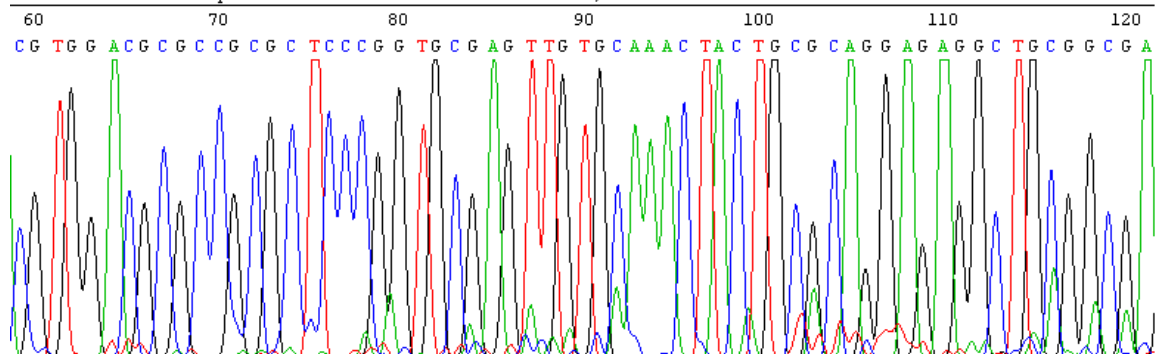
- Mercapto ethanol: Có tác dụng bảo vệ DNA.
- Phenol: Có tác dụng phá vỡ hoàn toàn lớp vỏ tế bào và màng nhân, làm biến tính protein, ngoài ra phenol còn có tác dụng tách lớp sau khi ly tâm.
- Chloroform: Làm biến tính protein và các sắc tố có sẵn trong mẫu, ngoài ra chloroform còn có tác dụng tách lớp sau khi ly tâm, DNA được giải phóng tồn tại trong pha nước nằm ở lớp trên.
- Isoamyl Alcohol: Giúp mẫu không bị sủi bọt trong quá trình vortex hay ly tâm với tốc độ cao.
- Isopropanol: Giúp tủa DNA.
- TE: Dung dịch bảo quản DNA.

Kết quả đọc trình tự vùng ITS – rDNA dòng T4, kết quả đọc được mạch DNA bắt cặp với primer ITS4

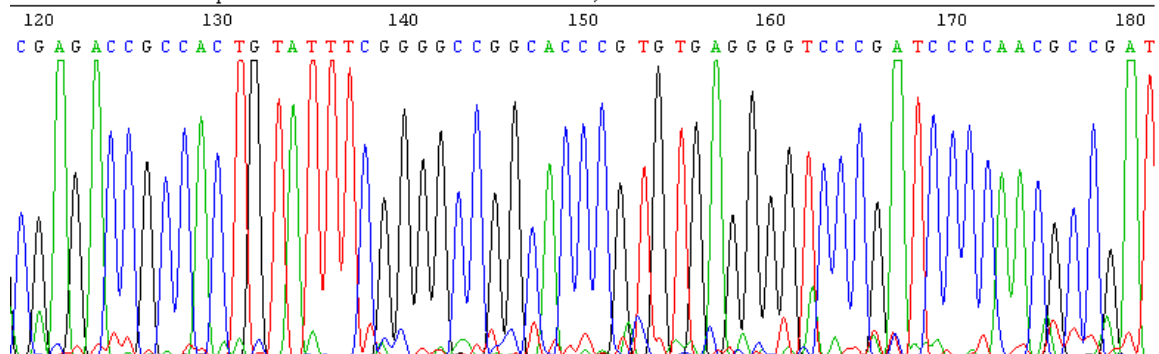
File: T4-ITS4.ab1 Sequence Name: T4-ITS4 Run ended: Jun 14, 2006



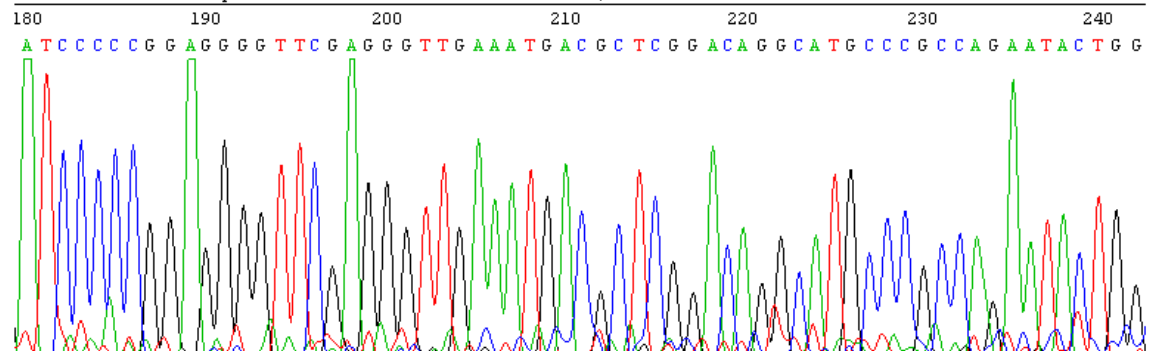
File: T4-ITS4.ab1 Sequence Name: T4-ITS4 Run ended: Jun 14, 2006



File: T4-ITS4.ab1 Sequence Name: T4-ITS4 Run ended: Jun 14, 2006

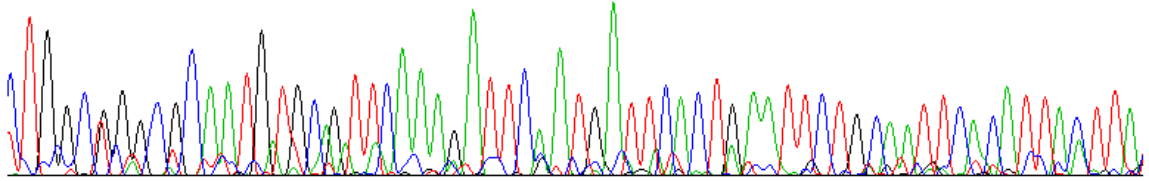


File: T4-ITS4.ab1 Sequence Name: T4-ITS4 Run ended: Jun 14, 2006



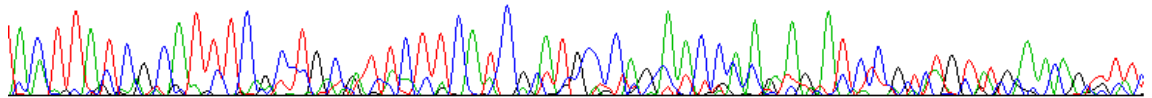
File: T4-ITS4.ab1 Sequence Name: T4-ITS4 Run ended: Jun 14, 2006

240 250 260 270 280 290 300
 T G G C N G G C G C A A T G T G C G T T C A A A G A T T C A A T G A T T C A C T G A A T T C T G C A A T T C A C A T T A C T T A



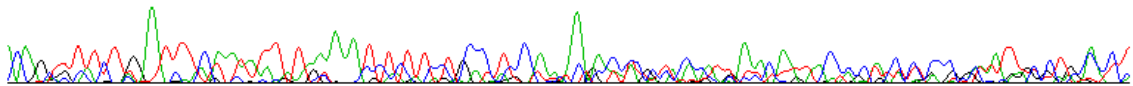
File: T4-ITS4.ab1 Sequence Name: T4-ITS4 Run ended: Jun 14, 2006

300 310 320 330 340 350 360
 A C T T A T C G C A T T T C G C T G C N T T C T T C A T C G A T G C C A G A A C C N A N A G A T C C G T C T G T T G A A A G T T T



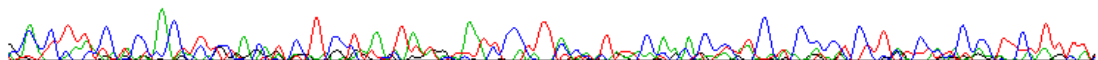
File: T4-ITS4.ab1 Sequence Name: T4-ITS4 Run ended: Jun 14, 2006

360 370 380 390 400 410 420
 A G T T T T G A T T C A A A T T A A A T T T T C T C C T C A A A A C N G N N A T A A A T C N C N C N C C N N A T G C T G N C



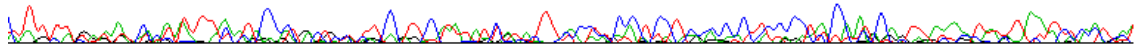
File: T4-ITS4.ab1 Sequence Name: T4-ITS4 Run ended: Jun 14, 2006

420 430 440 450 460 470 480
 N C T N C N C A C T N N A C T C T C T A T A T G A T T C T T N C N T T C A A A C N N C N C N C T C T T N C N T C C N T C T T T



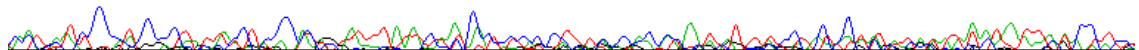
File: T4-ITS4.ab1 Sequence Name: T4-ITS4 Run ended: Jun 14, 2006

480 490 500 510 520 530 540 550
 TTTT N NA NCA N TTAATC N GCGNTT CNTCNATTNN A T NCM CCTC TN NCC T CCTACAA CA T A AATN TAANNNA A



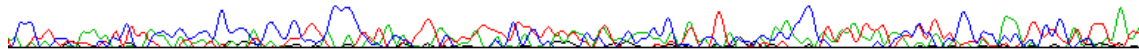
File: T4-ITS4.ab1 Sequence Name: T4-ITS4 Run ended: Jun 14, 2006

550 560 570 580 590 600 610 620
 NA ATCC NT CCCT TN C C C N NGA TTAA CNA C N NCCCTNTN CAC NCA T NT T NCC NN CNN ATNNNNNATANTAN CCT C



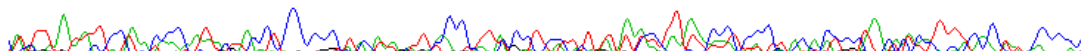
File: T4-ITS4.ab1 Sequence Name: T4-ITS4 Run ended: Jun 14, 2006

620 630 640 650 660 670 680 690
 CCTC AAA T N T N NCC CAC C T A C T TAA TTA TA N N N T N N N A A C C A N T A N N A A C C T A A T T A N N T T C N C A A T C C N T T A N



File: T4-ITS4.ab1 Sequence Name: T4-ITS4 Run ended: Jun 14, 2006

690 700 710 720 730 740 750 760
 N T T A N T C A A C C C A T A T A C T C C C T N A A A T A C C N T A C T C N T T N T A N N T T A A C N C C C T A C C T A N N C T T C C N T C C C C



File: T4-ITS4.ab1 Sequence Name: T4-ITS4 Run ended: Jun 14, 2006

760 770 780 790 800 810 820

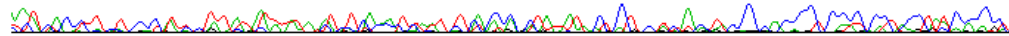
NT CCCC T N TC A NNANANANC TCNNANTANAATNCNT T CCNNNTTA NNNA T TA ATN T TANNCA NTNTCTNT



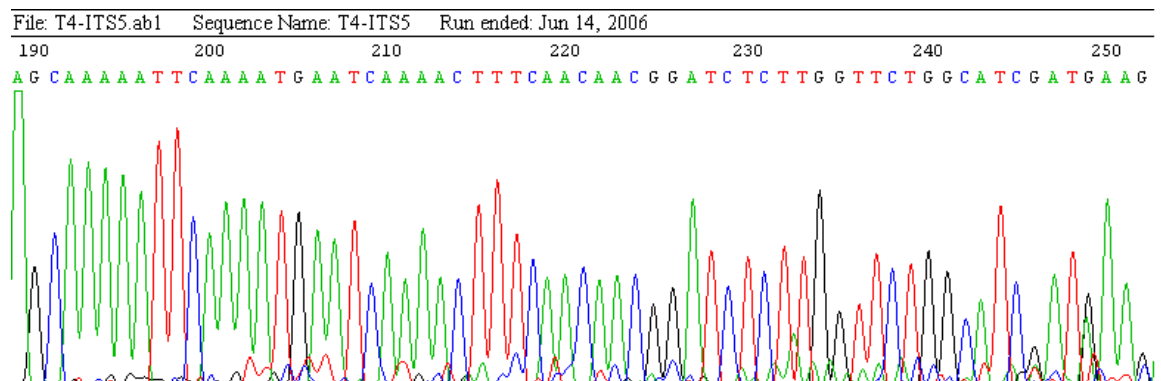
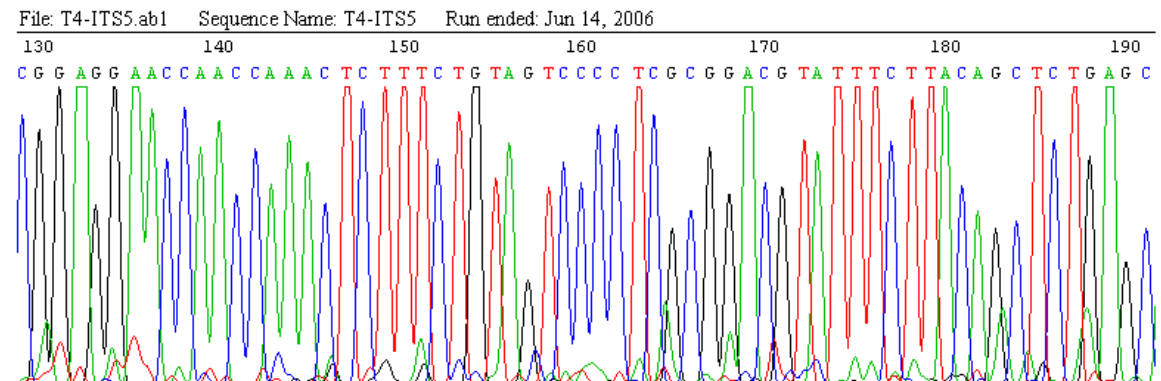
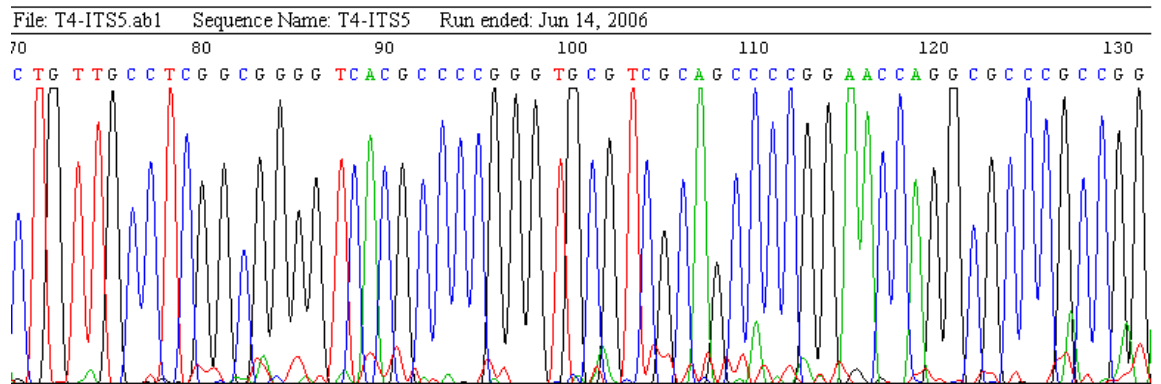
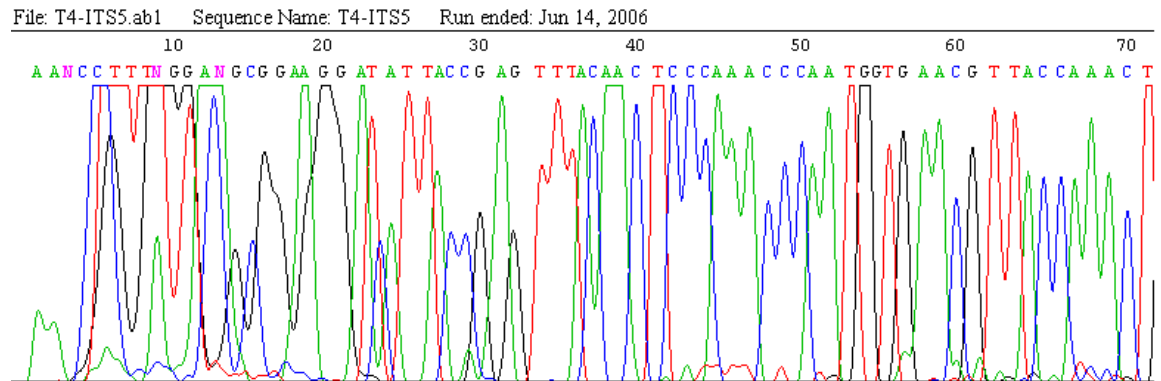
Sequence Name: T4-ITS4 Run ended: Jun 14, 2006

790 800 810 820 830 840 850

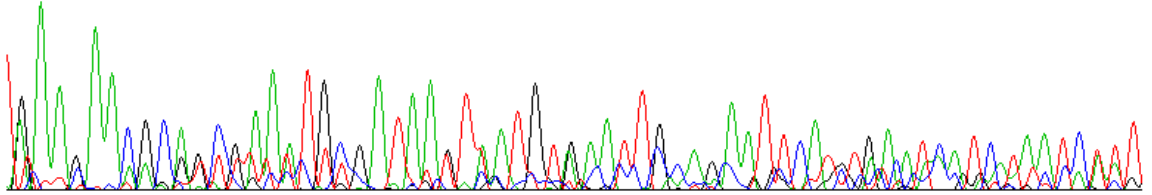
ATNCNT T CCNNNTTA NNNA T TA ATN T TANNCA NTNTCTNT ANTC CCM CCC CCC CNACTTCNCCM



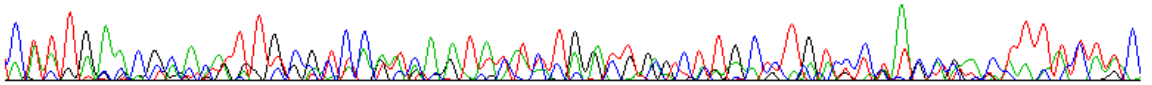
Kết quả đọc trình tự vùng ITS – rDNA dòng T4, kết quả đọc được mạch DNA bắt cặp với primer ITS5



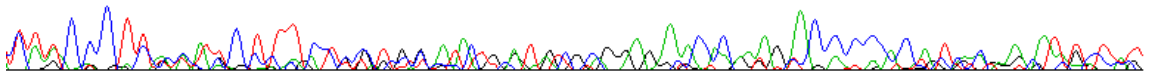
File: T4-ITS5.ab1 Sequence Name: T4-ITS5 Run ended: Jun 14, 2006
 250 260 270 280 290 300 310
 G A A G A A C G C N G C G A A N T G C G A T A A N T N A T G T G A A T T G C A G A A T T C A T N T G A A T C A T C T A A T C M T T



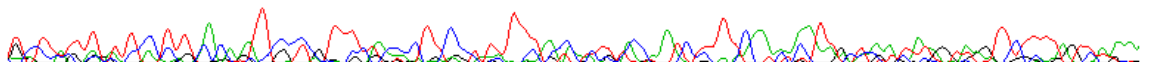
File: T4-ITS5.ab1 Sequence Name: T4-ITS5 Run ended: Jun 14, 2006
 310 320 330 340 350 360 370
 C N T T T G A A C G C A C N T T G N G T C C N T N A N T A N T N T G N N N G G C T T G C C T G T C N N A N N N A C T T T N N T N C



File: T4-ITS5.ab1 Sequence Name: T4-ITS5 Run ended: Jun 14, 2006
 370 380 390 400 410 420 430
 N T N C C C T T N N N N C T T T C N N T G N A A T G N T G C G C G A G A A C C N A G A C C C C A C A T N C N N A T N N T A T



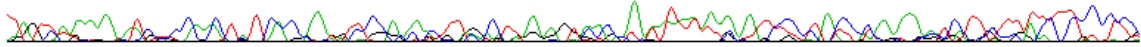
File: T4-ITS5.ab1 Sequence Name: T4-ITS5 Run ended: Jun 14, 2006
 430 440 450 460 470 480 490
 N N T A T T N T C T T A C A A T N C G T T C A C C T C C T T T N A C C T A C A C N T C A N N T G T A A T A G A G T C T T N G T A A A



File: T4-ITS5.ab1 Sequence Name: T4-ITS5 Run ended: Jun 14, 2006

490 500 510 520 530 540 550

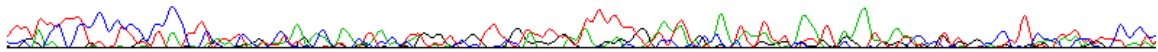
NGTAAAANTC CC CT TCC ANGNCA ACNTGCT AAGTN C AN TANAAA ATTCNACCNA AAATC T N TTT C N C CC



File: T4-ITS5.ab1 Sequence Name: T4-ITS5 Run ended: Jun 14, 2006

550 560 570 580 590 600 610

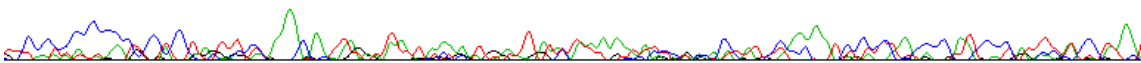
TTT C N C C C C C N T N N G CAANA T CTGGT G T G T G T T T T T G A N G A T T T A T N A T A C G T G N C T C N T T C C



File: T4-ITS5.ab1 Sequence Name: T4-ITS5 Run ended: Jun 14, 2006

610 620 630 640 650 660 670

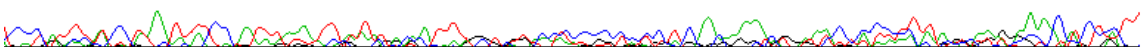
T C C C C C C C N C T N T T N A A C A T G N N A T A A A T G A T A N N N A A T N C G N A C T T N A A T C C N N A C C A T C C A T N N C N A



File: T4-ITS5.ab1 Sequence Name: T4-ITS5 Run ended: Jun 14, 2006

670 680 690 700 710 720 730 740

C C A T N N C N A T T C C A T T A A T T N T T A C A T T N G T G N C C C C C C N N C T C A C A A A C N N A C N C C T T A N N N G N A A C N C T N T



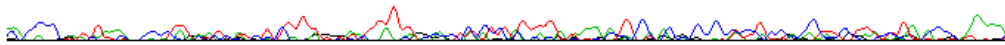
File: T4-ITS5.ab1 Sequence Name: T4-ITS5 Run ended: Jun 14, 2006

740 750 760 770 780 790 800 810
 T N T T T N N T N C T A A T T T T T N T T C N N T A A A N A N N N N N T N N N N N N A A N N C C N N T N A N N C T N N T N N T N T T N N N T T T N N N N C

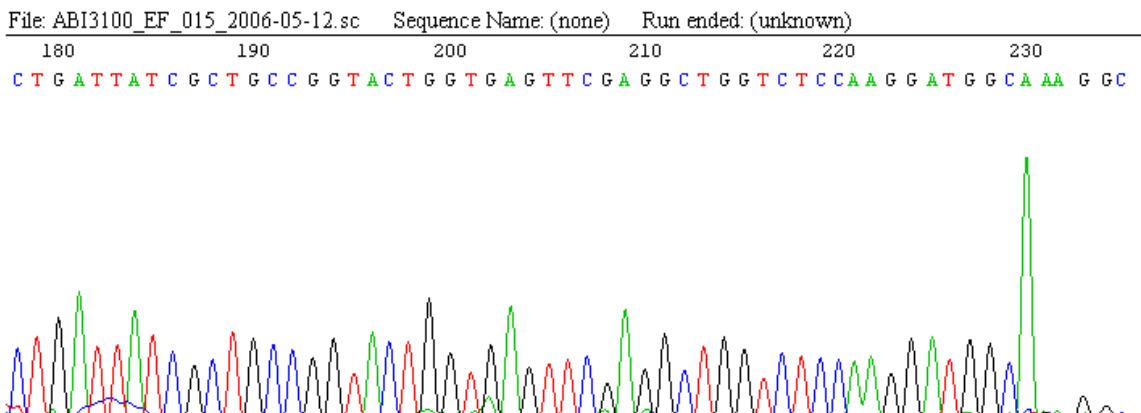
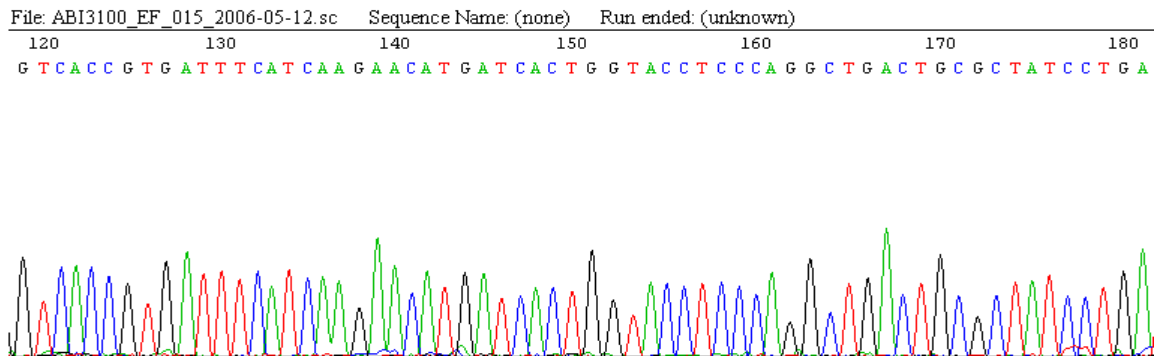
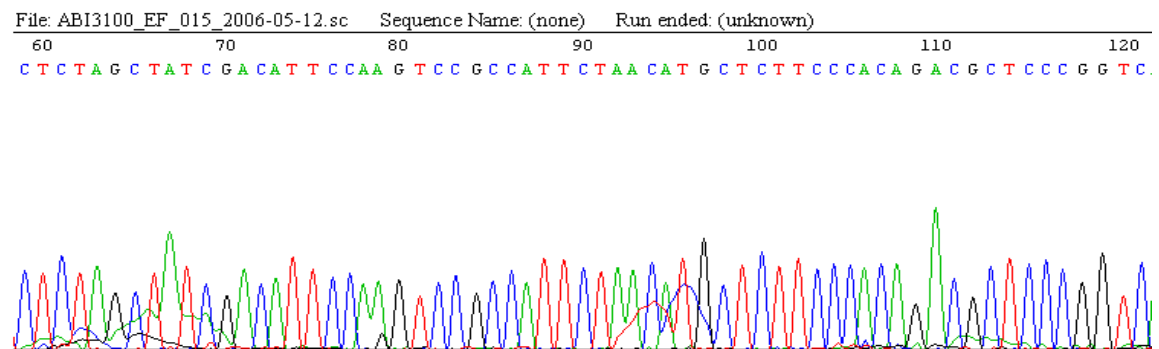


Sequence Name: T4-ITS5 Run ended: Jun 14, 2006

790 800 810 820 830 840 850
 N N C C N N T N A N N C T N N T N N T N T T N N N T T T N N N C C N T T T A N A A A T C N N C N C T C C N C N C T N N T A A C N N A A T



Kết quả đọc trình tự vùng *Tef1fw* – *Tef2rev* dòng T4, kết quả đọc được mạch DNA bắt cặp với primer ElongF



Kết quả đọc trình tự vùng *Tef1fw* – *Tef2rev* dòng T4, kết quả đọc được mạch DNA bắt cặp với primer ElongR

