SÀNG LỌC CÁC CHỦNG KHÁNG NẤM GÂY BỆNH THỰC VẬT VÀ MÔ TẢ CHI TIẾT CHỦNG *Streptomyces hydrogenans* VTCC 41117 CÓ HOẠT TÍNH CAO

LƯU TRẦN ĐÔNG [(1)], VŨ SƠN TÙNG [(1)], NGUYỄN THỊ VÂN [(1)],
ĐINH THỊ NGỌC MAI [(1)], NGUYỄN HỒNG MINH [(1)], NGUYỄN KIM NỮ THẢO [(1)]

1. MỞ ĐẦU

Nấm là tác nhân gây ra nhiều bệnh thực vật, làm giảm đáng kể năng suất cây trồng, đặc biệt ở các vùng khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới [1]. Mối lo ngại liên quan đến việc sử dụng các hóa chất nông nghiệp để kiểm soát bệnh nấm ngày càng tăng do những ảnh hưởng độc hại của thuốc diệt nấm đến môi trường và sức khỏe con người [2]. Nhiều nghiên cứu nhằm tìm kiếm các phương pháp kiểm soát và phòng trừ nấm gây bệnh thực vật đảm bảo và ít nguy hại hơn đến môi trường sinh thái đã được thực hiện [3, 4]. Trong đó, biện pháp khống chế sinh học sử dụng vi sinh vật đối kháng với nấm gây bệnh cho thấy vừa mang lại hiệu quả, vừa đảm bảo sự thân thiện với môi trường và đặc biệt là an toàn cho con người, phù hợp với nguyên tắc canh tác nông nghiệp hữu cơ hiện nay.

Xạ khuẩn được sử dụng hữu hiệu để chống nấm gây bệnh thực vật nhờ khả năng sinh chất kháng sinh và các chất có hoạt tính sinh học rất đa dạng. Xạ khuẩn là nguồn sản xuất các loại enzym như chitinase, protease, peptidase và cellulase, trong đó chitinase có vai trò quan trọng nhất trong kiểm soát bệnh nấm. Khả năng đối kháng nấm của xạ khuẩn được hình thành bởi hai yếu tố: chitin ở thành tế bào nấm bị phá hủy bởi enzym, sau đó chất kháng sinh và các chất có hoạt tính sinh học khác được hình thành sẽ tác động vào trong tế bào nấm, kìm hãm sự sinh trưởng của các loài nấm gây bệnh [5].

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về khả năng đối kháng của xạ khuẩn đối với một số loài nấm đã được công bố trong nhiều năm nay. Đỗ Thu Hà đã công bố kết quả nghiên cứu về chủng *Streptomyces globosus* ĐN-5 phân lập từ đất tỉnh Quảng Nam có hoạt tính kháng mạnh với nấm *Aspergillus niger* [6]. Trong nghiên cứu của Biền Văn Minh (2009), 62/145 chủng xạ khuẩn được phân lập biểu hiện hoạt tính kháng vi sinh vật, trong đó có 2 chủng cho hoạt tính kháng mạnh với cả nấm *Fusarium oxysporum*, vi khuẩn Gram dương *Staphylococcus aureus* và vi khuẩn Gram âm *Escherichia coli* [7]. Nguyễn Hoài Nam và cộng sự đã sàng lọc được 10 chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với nấm gây bệnh khô vằn lúa (*Rhizoctonia solani*) [8]. Nguyễn Thị Kim Cúc và cộng sự đã phân lập được một số chủng xạ khuẩn từ đất và rễ cây tiêu bị bệnh ở Quảng Trị có khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum,*

Fusarium solani, Phythophthora sp. [9]. Nguyễn Thị Phong Lan đã tuyển chọn được 6 chủng *Streptomyces* spp. có khả năng đối kháng nấm gây bệnh đạo ôn hại lúa *Pyricularia grisea* [10]. Việc sàng lọc, tìm kiếm các chủng xạ khuẩn hoạt tính đối kháng cao và ức chế được nhiều chủng nấm gây bệnh ở thực vật là mục tiêu của nhóm nghiên cứu. Kết quả sàng lọc 70 chủng xạ khuẩn phân lập từ Vườn quốc gia Cúc Phương và Ba Bể đối kháng đồng thời với 04 chủng nấm gây bệnh thực vật *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea, Colletotrichum gloeosporioides* và *Phytophthora capsici* đã được công bố [11]. Bài báo này trình bày kết quả sàng lọc của 245 chủng xạ khuẩn tiếp theo có khả năng đối kháng với nhiều chủng nấm gây bệnh thực vật. Đồng thời, một số đặc điểm sinh học, môi trường và điều kiện tối ưu cho sự sinh trưởng của chủng xạ khuẩn VTCC 41117 có hoạt tính đối kháng mạnh với cả 5 loại nấm gây bệnh thực vật cũng được mô tả trong nghiên cứu này.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

245 chủng xạ khuẩn được sử dụng để khảo sát hoạt tính kháng nấm được phân lập từ nhiều địa điểm khác nhau ở Việt Nam và được lưu trữ tại Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật (VTCC), Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội. Thông tin về các chủng này đã được công bố trên website vtcc.info.

05 chủng nấm gây bệnh thực vật *Phytophthora capsici* VTCC 31701, *Alternaria* sp. VTCC 31702, *Botrytis cinerea* VTCC 31703, *Collectotrichum gloeosporioides* VTCC 31705, *Fusarium* sp. VTCC 31704 cũng được cung cấp từ VTCC.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định tỷ lệ kháng nấm của các chủng xạ khuẩn

Các chủng xạ khuẩn được nuôi trên môi trường thạch YS (g/L: tinh bột- 10; cao men- 2; thạch- 16) trong 7 ngày ở 28°C. 05 chủng nấm được nuôi trên môi trường thạch PDA (Himedia) trong 7 ngày ở 25°C. Cắt thỏi thạch (Φ = 5 mm) của từng chủng nấm đặt vào tâm đĩa petri (Φ = 6 cm) chứa môi trường PDA. Sau đó, cắt thỏi thạch (Φ = 5 mm) của từng chủng xạ khuẩn đã sinh trưởng trên môi trường YS và đặt vào vị trí cách tâm đĩa 2 cm, ủ đĩa trong 2 ngày ở 25ºC. Tỷ lệ kháng nấm của các chủng xạ khuẩn tính theo công thức: S = (R-r)/R x 100%. Trong đó, S: Phần trăm ức chế, R: bán kính khuẩn lạc nấm ở phía đối diện vị trí đặt thỏi thạch xạ khuẩn, r: bán kính khuẩn lạc nấm ở phía đặt thỏi thạch xạ khuẩn. Mỗi thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần.

2.2.2. Định danh dựa trên so sánh trình tự 16S rDNA

Đoạn 16S rDNA được nhân lên bằng phản ứng PCR sử dụng mồi 27F và 1492R theo phương pháp của Tamura và cộng sự [12] và giải trình tự. Trình tự của đoạn 16S rDNA được sử dụng để tìm loài gần gũi nhất bằng công cụ EZ Taxon.

2.2.3. Nghiên cứu đặc điểm sinh học chủng xạ khuẩn

- Khảo sát sử dụng các nguồn cacbon khác nhau: Sử dụng môi trường cơ bản có thành phần: (g/L) Bacto yeast nitrogen base w/o amino acid- 6,7; Bacto casamino acid- 0,01; K_2HPO_4 - 10; thạch- 15 và bổ sung 1% từng loại hydrat cacbon khác nhau. Môi trường cơ bản bổ sung 1% D-glucose được dùng làm đối chứng dương và môi trường không bổ sung nguồn cacbon nào là đối chứng âm.

- Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của xạ khuẩn: chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trên môi trường thạch YS ở dải nhiệt độ: 20 - 25 - 30 - 37 và 45ºC, mức độ sinh trưởng được đánh giá sau 5 ngày.

- Ảnh hưởng của nồng độ muối đến sinh trưởng của xạ khuẩn: chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trên môi trường YS với nồng độ NaCl tương ứng 0 - 3 - 5 và 7%, mức độ sinh trưởng được đánh giá sau 5 ngày.

- Ảnh hưởng của pH khác nhau được kiểm tra bằng cách nuôi cấy chủng xạ khuẩn ở 30ºC sau 5 ngày nuôi trên môi trường YG (g/L: cao men- 10; Glucose- 10; thạch- 15) với các điều kiện pH thay đổi từ 3,0 đến 9,0. Thạch được thay bằng gellan gum (Wako) ở điều kiện pH 3,0.

- Khảo sát hoạt tính sinh enzym của chủng xạ khuẩn được kiểm tra bằng cách nuôi cấy xạ khuẩn trên môi trường thạch bổ sung 1% cơ chất: tinh bột, casein hoặc CMC. Sau 5 ngày ủ ở 30ºC, các đĩa thạch được nhuộm với thuốc thử Lugol 1% để kiểm tra hoạt tính amylase, thuốc thử Congo Red 0,1% để xác định hoạt tính cellulase và Amido black 0,1% đối với hoạt tính protease.

- Khả năng phân giải ure được quan sát qua khả năng đổi màu trên môi trường (g/l): KH_2PO_4-10, Na_2HPO_4- 9,5, cao men- 1, phenol red 0,04%- 20 ml, pH 7. Chủng có khả năng phân giải ure sẽ biến màu môi trường từ vàng sang hồng sau 5 ngày ở 30ºC.

- Khả năng hoá lỏng gelatin: chủng xạ khuẩn được cấy vạch trên môi trường (g/l): pepton- 5, gelatin- 100, pH 7, ủ ở 30ºC trong 5 ngày. Sau đó, ống thạch được giữ ở 4ºC trong 2 giờ. Chủng có khả năng hoá lỏng gelatin khi môi trường trong ống có dạng lỏng.

- Hình ảnh chuỗi bào tử của chủng xạ khuẩn nuôi trên môi trường YS trong 5 ngày được chụp trên kính hiển vi điện tử quét (JSM-5410 LV, JEOL, Nhật Bản).

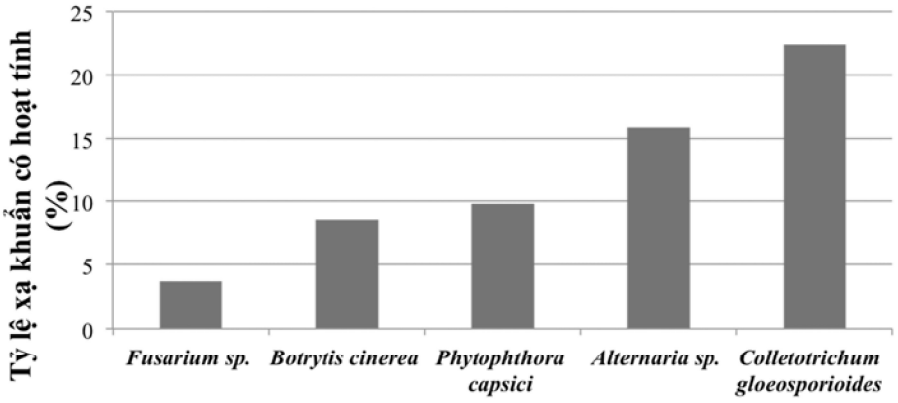
2.2.4. Khảo sát môi trường và thời gian để xạ khuẩn có khả năng kháng nấm

Sáu loại môi trường được khảo sát bao gồm: môi trường YS (g/L: tinh bột- 10, cao men- 2); SKS (g/L: tinh bột- 10, glucose- 10, soybean meal- 10, peptone- 5, $CaCO_3$- 3); môi trường ISP2 (g/L: cao malt- 10, cao men- 4, glucose- 4); môi trường 2M (g/L: tinh bột- 20, soybean meal- 15, cao men- 2, $CaCO_3$- 4); môi trường A16 (g/L: glucose- 20, Pharmamedia- 10, $CaCO_3$- 5); môi trường 301 (g/L: tinh bột- 20, glucose- 1, peptone- 3, cao thịt- 3, cao men- 5, $CaCO_3$- 4). Chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong các bình tam giác 250 mL chứa 75 mL của 06 môi trường dịch thể, tốc độ lắc 160 rpm, nhiệt độ 30°C trong 7 ngày. Dịch nuôi cấy xạ khuẩn từ 06 môi trường này được xác định hoạt tính kháng nấm theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, thời gian khảo sát với tần suất 01 lần/ ngày. Phương pháp này được thực hiện tương tự phương pháp xác định tỷ lệ kháng nấm của các chủng xạ khuẩn, trong đó, thỏi thạch chứa xạ khuẩn được thay bằng 50 µl dịch nuôi cấy xạ khuẩn sau ly tâm và được nhỏ vào trong giếng thạch (Φ = 5 mm).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sàng lọc hoạt tính kháng nấm của 245 chủng xạ khuẩn

Trong nghiên cứu này, 245 chủng xạ khuẩn được phân lập từ nhiều địa điểm khác nhau ở Việt Nam và đang được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật VTCC, đã được hoạt hoá. Hoạt tính đối kháng với 5 loại nấm gây bệnh thực vật bao gồm *P. capsici, Alternaria* sp., *B. cinerea*, *Fusarium* sp. và *C. gloeosporioides* đã được khảo sát trên 245 chủng xạ khuẩn này. Kết quả thí nghiệm được chỉ ra trên hình 1 cho thấy, xạ khuẩn có hoạt tính kháng *C. gloeosporioides* chiếm tỷ lệ cao nhất (22,5%), trong khi đó xạ khuẩn kháng *Fusarium* sp. có tỷ lệ thấp nhất (3,7%). Tỷ lệ xạ khuẩn kháng *Alternaria* sp., *P. capsici* và *B. cinerea* lần lượt là 15,9%, 9,8% và 8,6%.



Hình 1. Tỷ lệ xạ khuẩn được khảo sát có hoạt tính đối kháng với 5 chủng nấm gây bệnh

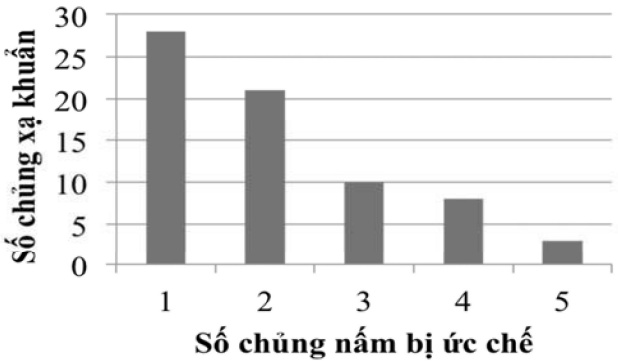
Mức độ kháng của các chủng xạ khuẩn với từng loài nấm gây bệnh cũng được kiểm tra và kết quả nghiên cứu được thể hiện trong bảng 1. Chỉ có 9 chủng xạ khuẩn được tìm thấy có khả năng kháng nấm *Fusarium* sp. Trong khi đó, 21 chủng xạ khuẩn được tìm thấy có khả năng kháng nấm gây bệnh thối xám *B. cinerea*. Đặc biệt có đến 7 chủng xạ khuẩn có khả năng kháng *B. cinerea* với tỷ lệ ức chế trên 50%. Tiếp theo, 24 chủng xạ khuẩn được tìm thấy có khả năng kháng *P. capsici* với 6 chủng ức chế trên 50%, 39 chủng xạ khuẩn có khả năng kháng nấm gây bệnh đốm vòng *Alternaria* sp. với 2 chủng ức chế trên 50%. Cuối cùng, 55 chủng xạ khuẩn được tìm thấy có khả năng kháng nấm gây bệnh thán thư *C. gloeosporioides* nhưng phần lớn (38 chủng) có tỷ lệ ức chế thấp dưới 30% và duy nhất 1 chủng có tỷ lệ ức chế trên 50%. Như vậy, từ 245 chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn được 11 chủng có khả năng kháng ít nhất 1 trong 5 chủng nấm gây bệnh với tỷ lệ ức chế trên 50%. Kết quả này là khá khả quan so với kết quả sàng lọc trước đây với 70 chủng xạ khuẩn, trong đó, chỉ tuyển chọn được 1 chủng xạ khuẩn có khả năng kháng nấm *P. capsci* với tỷ lệ ức chế 74% và không tìm được chủng nào có khả năng ức chế trên 50% đối với *Alternaria* sp., *B. cinerea* và *C. gloeosporioides* [11].

Bảng 1. Khả năng đối kháng nấm gây bệnh thực vật của các chủng xạ khuẩn được khảo sát.

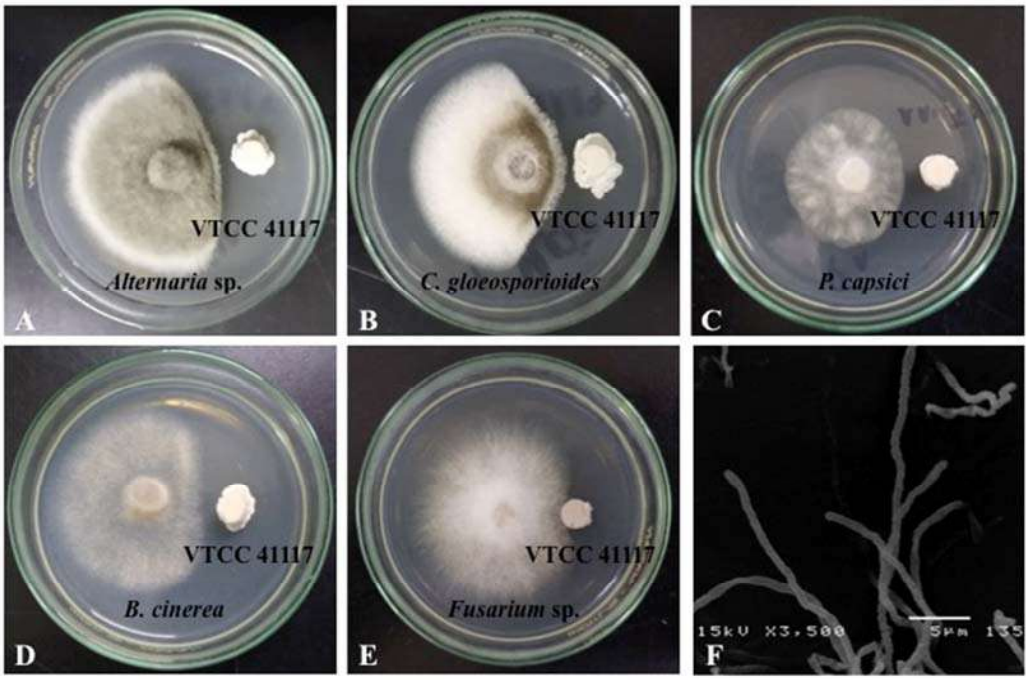
Chủng nấm gây bệnh thực vật	**Số chủng xạ khuẩn kháng nấm**	**Số lượng chủng có tỷ lệ ức chế ở các mức độ (%)**			
		1-30	31-40	41-50	>50
Fusarium sp. VTCC 31704	9	3	5	0	1
Botrytis cinerea VTCC 31703	21	3	5	6	7
Phytophthora capsici VTCC 31701	24	5	5	8	6
Alternaria sp. VTCC 31702	39	24	9	4	2
Collectotrichum gloeosporioides VTCC 31705	55	38	12	4	1
Tổng số	***148***	***73***	***36***	***22***	***17***

Số lượng chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng nấm được thể hiện trong hình 2. Trong đó, 28 chủng có khả năng kháng 1 loại nấm kiểm định, 21 chủng kháng được 2 loại nấm, 10 chủng kháng được 3 loại nấm, 8 chủng kháng được 4 loại nấm và đặc biệt, 3 chủng kháng được cả 5 loại nấm. Ba chủng xạ khuẩn kháng được đồng thời 5 loại nấm gây bệnh thực vật là các chủng VTCC 40895, VTCC 41117 và VTCC 43851. Tỷ lệ ức chế *P. capsici, Alternaria* sp., *B. cinerea*, *Fusarium* sp. và *C. gloeosporioides* của chủng VTCC 40895 lần lượt là 53, 44, 48, 53, 52%; của chủng VTCC 41117 là 42, 55, 55, 55, 40%; của chủng VTCC 43851 là 45, 20, 39, 56,

38%. Như vậy, kết quả sàng lọc cho thấy 2 chủng xạ khuẩn VTCC 40895 và VTCC 41117 có khả năng đối kháng mạnh nhất với 5 loại nấm gây bệnh, trong đó chủng VTCC 41117 có khả năng ức chế nấm *Alternaria* sp., *B. cinerea*, *Fusarium* sp. mạnh hơn chủng VTCC 40895. Chính vì vậy, trong bài báo này, chủng xạ khuẩn VTCC 41117 được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo. Khả năng đối kháng của chủng xạ khuẩn VTCC 41117 với 5 chủng nấm gây bệnh được thể hiện trong hình 3A, B, C, D và E.



Hình 2. Khả năng kháng 5 chủng nấm gây bệnh của 245 chủng xạ khuẩn



Hình 3. Khả năng đối kháng của chủng xạ khuẩn VTCC 4117 đối với *Alternaria* sp. *Fusarium* sp. (A), *C. gloeosporioides* (B), *P. capsici* (C), *B. cinerea* (D) và *Fusarium* sp. (E) và hình ảnh chuỗi bào tử của chủng VTCC 41117 chụp dưới kính hiển vi điện tử quét (F).

3.2. Đặc tính sinh lý, sinh hóa và định danh chủng xạ khuẩn VTCC 41117

Đoạn 16S rDNA của chủng VTCC 41117 đã được giải trình tự và kết quả tra cứu trên công cụ EzTaxon cho thấy chủng VTCC 41117 gần gũi nhất với loài *Streptomyces hydrogenans* với độ tương đồng 100%. Trình tự đoạn 16S rDNA của chủng VTCC 41117 đã được công bố trên ngân hàng dữ liệu DNA của Nhật Bản (DDBJ) với mã số LC493176. Chủng VTCC 41117 sinh nhiều aerial mycelium màu trắng ngà khi phát triển trên môi trường YS. Chuỗi bào tử của chủng 41117 có dạng thẳng, bề mặt bào tử nhẵn (Hình 3F). Trước đây, loài *S. hydrogenans* cũng đã được tìm thấy có khả năng kháng nấm, côn trùng cũng như có tiềm năng kích thích sinh trưởng thực vật [13,14]. Trong nghiên cứu của Manhas và cộng sự, chủng *S. hydrogenans* DH16 có khả năng kháng chủng nấm *Alternaria brassicicola* gây bệnh đốm vòng trên cải củ. Còn trong nghiên cứu của Kaur và cộng sự, chủng *S. hydrogenans* DH16 này được chứng minh có khả năng kháng nhiều loại nấm gây bệnh khác nhau bao gồm *Colletotrichum acutatum, Cladosporium herbarum, Alternaria brassicicola, Exserohilum* sp., *Alternaria mali, Colletotrichum gleospoiroides, Alternaria alternata, Cercospora* sp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* và *Fusarium moniliformae*. Ngoài ra dịch chiết ethyl acetate của chủng này còn có khả năng diệt côn trùng. Chủng xạ khuẩn này cũng sinh IAA, có khả năng kích thích sinh trưởng ở thực vật. Các kết quả trên cho thấy tiềm năng rất lớn của loài *S. hydrogenans* trong lĩnh vực bảo vệ thực vật.

Kết quả nghiên cứu đặc tính sinh lý, sinh hóa của chủng VTCC 41117 được trình bày trên bảng 2. Chủng VTCC 41117 có khả năng sinh trưởng tốt trên nguồn hydrat cacbon như L-Arabinose, D-Lactose, D-Raffinose, D-Galactose, L-Rhamnose, Maltose, D-Xylose, D-Fructose, D-Glucose, D-Mannitol, Cellulose và sinh trưởng yếu trên D-Sorbitol. Chủng sinh trưởng tốt ở nhiệt độ 25^{o}C - 37^{o}C, tối ưu ở 37^{o}C. Ngoài khoảng nhiệt độ này, chủng VTCC 41117 sinh trưởng kém. Chủng sinh trưởng ở điều kiện pH 7,0 đến pH 9,0; tối ưu ở điều kiện pH 7,0 và sinh trưởng yếu trong môi trường axit. Chủng VTCC 41117 sinh trưởng tối ưu nhất ở nồng độ muối 0%, sinh trưởng được ở nồng độ muối 3 và 5 %, sinh trưởng rất yếu ở nồng độ muối 7%. Ngoài ra, chủng VTCC 41117 còn có khả năng phân giải cellulose, tinh bột và urea; không có khả năng phân giải casein và gelatin. Trong công bố của Palla và cộng sự năm 2018, các đặc tính sinh lý, sinh hoá của chủng *S. hydrogenans* KMFA-1 cũng đã được nghiên cứu [15]. Chủng *S. hydrogenans* KMFA-1 có khả năng sử dụng nguồn hydrat cacbon như Arabinose, Fructose, Sucrose nhưng không có khả năng sử dụng Glucose, Galactose, Mannose, Meso-inositol, Rhamnose, Salicin, Raffinose, Xylose. Chủng này có khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ 25^{o}C - 40^{o}C, không sinh trưởng được ở nhiệt độ 12^{o}C; có khả năng sinh trưởng ở điều kiện pH 5,0 đến pH 10,0; chịu được nồng độ muối 2 - 7% nhưng không chịu được nồng độ muối 10%. Như vậy, hai chủng *S. hydrogenans* VTCC 41117 và *S. hydrogenans* KMFA-1 tương đồng về khả năng sinh trưởng ở các điều kiện nhiệt độ, pH và nồng độ muối nhưng có khả năng sử dụng nguồn hydrat cacbon khác nhau.

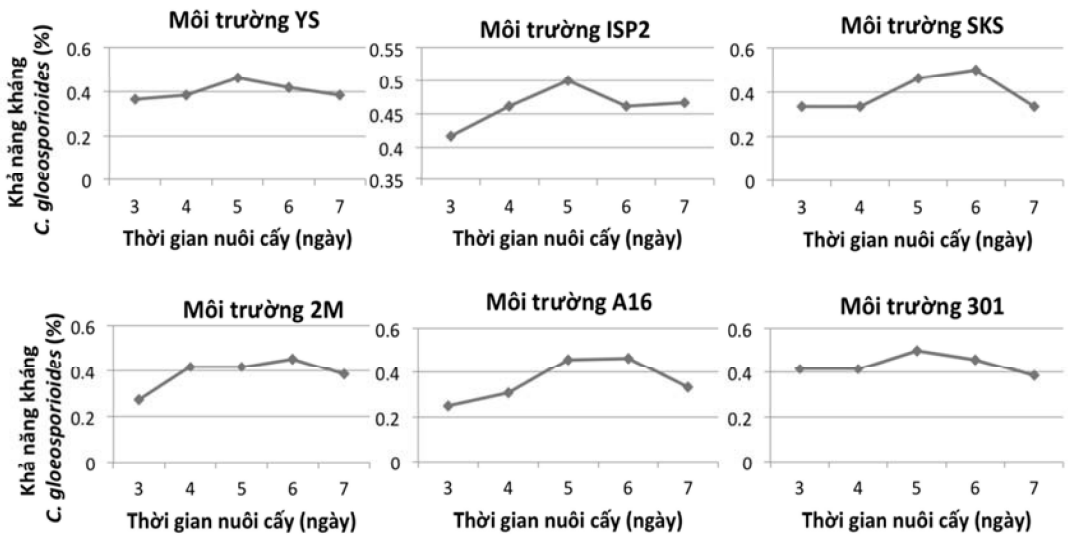
Bảng 2. Đặc tính sinh lý, sinh hóa của chủng VTCC 41117

	Điều kiện	**Khả năng sinh trưởng**
Nguồn hydrat cacbon	L-Arabinose	+
	D-Lactose	+
	D-Raffinose	++
	D-Galactose	++++
	D-Sorbitol	-
	L-Rhamnose	+
	Maltose	+++
	D-Xylose	++
	D-Fructose	+++
	D-Glucose	++++
	D-Mannitol	++++
	Cellulose	+++
pH	3	-
	5	-
	7	+++
	9	+
Nhiệt độ (ºC)	20	+
	25	++
	30	+++
	37	++
	45	-
Nồng độ muối NaCl (%)	0	++++
	3	++
	5	++
	7	+

***Ghi chú**: - không sinh trưởng; + sinh trưởng rất yếu; ++ sinh trưởng yếu; +++ sinh trưởng tốt; ++++ sinh trưởng rất tốt*

3.3. Khảo sát hoạt tính kháng nấm của chủng *S. hydrogenans* VTCC 41117 trong các môi trường và thời gian nuôi cấy khác nhau

Hoạt tính kháng nấm của chủng *S. hydrogenans* VTCC 41117 thể hiện mạnh nhất đối với chủng nấm *C. gloeosporioides.* Vì thế, để lựa chọn được môi trường và thời gian nuôi cấy thích hợp cho chủng VTCC 41117 sinh hoạt chất kháng nấm mạnh, hoạt tính của chủng VTCC 41117 được khảo sát thông qua hoạt tính kháng nấm *C. gloeosporioides*. Kết quả hoạt tính kháng *C. gloeosporioides* của chủng *Streptomyces* sp. VTCC 41117 khi nuôi cấy trong 6 loại môi trường và thời gian nuôi cấy khác nhau được thể hiện trên hình 4. Kết quả cho thấy, chủng VTCC 41117 có hoạt tính kháng *C. gloeosporioides* cao nhất đạt 50% khi được nuôi cấy trong môi trường ISP2, môi trường 301 ở ngày nuôi thứ 5 và môi trường SKS ở ngày nuôi cấy thứ 6. Mặt khác hoạt tính kháng *C. gloeosporioides* của chủng VTCC 41117 luôn được phát hiện ở cả 6 loại môi trường tại thời điểm từ 3 đến 7 ngày (đạt mức độ trong khoảng 25 đến 50%) đã cho thấy khả năng sinh hoạt chất kháng nấm sớm, ổn định và lâu dài của chủng xạ khuẩn này. Đây là một ưu điểm cho thấy khả năng phát triển chế phẩm sinh học phòng chống nấm gây bệnh thực vật từ chủng xạ khuẩn *S. hydrogenans* VTCC 41117 so với các chủng xạ khuẩn thường chỉ có hoạt tính tốt ở một số loại môi trường nhất định và hoạt tính bắt đầu giảm từ ngày nuôi cấy thứ 7.



Hình 4. Hoạt tính kháng *C. gloeosporioides* của chủng *Streptomyces* sp. VTCC 4117 khi nuôi cấy trong các môi trường và thời gian nuôi cấy khác nhau

4. KẾT LUẬN

- Đã sàng lọc được 148 chủng xạ khuẩn có khả năng kháng ít nhất một trong năm loại nấm gây bệnh thực vật từ 245 chủng xạ khuẩn đang được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Việt Nam. Tỷ lệ xạ khuẩn có khả năng kháng nấm *Fusarium* sp., *B. cinerea, P. capsici, Alternaria* sp. và *C. gloeosporioides* đạt lần lượt là 3,7%, 8,6%, 9,8%, 15,9% và 22,5%. Kết quả này có ý nghĩa quan trọng trong công tác bảo tàng giống, giúp bổ sung thêm nguồn gen vi sinh vật có tiềm năng khai thác phục vụ bảo vệ thực vật.

- Đã tuyển chọn và định danh được chủng xạ khuẩn *Streptomyces hydrogenans* VTCC 41117 có khả năng kháng đồng thời 5 chủng nấm gây bệnh. Chủng xạ khuẩn VTCC 41117 có khả năng sinh hoạt chất kháng nấm mạnh trên nhiều loại môi trường ngay sau 3 ngày nuôi cấy, cho thấy tiềm năng ứng dụng để phát triển chế phẩm sinh học phòng chống các bệnh do nấm gây ra trên thực vật. Đây là đóng góp mới cho VTCC nói riêng và cho các bộ sưu tập giống của cả nước nói chung, vì cho đến nay chưa có công bố nào về các xạ khuẩn kháng cả 5 loại nấm nêu trên.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Nhiệm vụ điều tra cơ bản năm 2018 "Điều tra tiềm năng hoạt tính sinh học của nguồn gen xạ khuẩn của Việt Nam nhằm khai thác phục vụ nền nông nghiệp hữu cơ: điều tra trên 200 chủng xạ khuẩn và xây dựng hồ sơ của 5 chủng xạ khuẩn có tiềm năng".

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Brimner T.A., Boland G.J.A., R*eview of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases,* Agriculture, Ecosystems and Environment, 2003, **100**:3-16.

2. Cardoso R.A., Pires L.T.A., Zucchi T.D., Zucchi F.D., Zucchi T.M.A.D., *Mitotic crossing-over induced by two commercial herbicides in diploid strains of the fungus Aspergillus nidulans*, Gen Mol Res., 2010, **9**:231-238.

3. Medeiros F.H.V., Martins S.J., Zucchi T.D., Melo I.S., Batista L.R., Machado J.C., *Biological control of mycotoxin-producing molds*, Ciênc. Agrotec., 2012, **36**:483-497.

4. Zucchi T.D., Moraes L.A., Melo I.S., *Streptomyces* sp. *ASBV-1 reduces aflatoxin accumulation by Aspergillus parasiticus in peanut grains*, J Appl Microbiol., 2008, **105**:2153-2160.

5. Gomes E.B., Dias L.R.L. and Miranda R.C.M., *Actinomycetes bioactive compounds: Biological control of fungi and phytopathogenic insect*, African Journal of Biotechnology, 2018, **17**(17):552-559.

6. Đỗ Thu Hà, *Định loại chủng xạ khuẩn Streptomyces ĐN-05 sinh chất kháng sinh có hoạt phổ rộng được phân lập từ đất tỉnh Quảng Nam,* Tạp chí Sinh học, 2002, **24**(1), tr.59-63.

7. Biền Văn Minh, Phạm Quang Chinh, *Nghiên cứu sự đa dạng sinh học của xạ khuẩn trong đất ở Bình Trị Thiên,* Hội thảo môi trường nông nghiệp - Nông thôn và đa dạng sinh học ở miền Trung Việt Nam, 2009.

8. Nguyễn Hoài Nam, Nguyễn Minh Trang, Đặng Phú Hoàng, Nguyễn Văn Hùng, Nguyễn Xuân Cảnh, Tống Văn Hải, Nguyễn Đức Bách, *Sàng lọc xạ khuẩn Actinomycetes sp. có khả năng đối kháng với nấm gây bệnh khô vằn lúa Rhizotonia solani,* Tạp chí Khoa học và Phát triển, 2015, **13**(8):1474-1480.

9. Nguyễn Thị Kim Cúc, Trần Thị Hồng, Phạm Thị Thuý Hoài, Phạm Việt Cường, *Phân lập vi sinh vật đối kháng một số nguồn bệnh nấm thực vật và đánh giá hoạt tính của chúng in vitro và invivo,* Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 2014, **52**(4):419-430.

10. Nguyễn Thị Phong Lan, Võ Thị Thu Ngân, Trần Phước Lộc, Trần Hà Anh, *Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn (Streptomyces spp.) đối kháng nấm Pyricularia grisea gây bệnh đạo ôn hại lúa,* Tạp chí Khoa học và Phát triển, 2015, **13**(8):1442-1451.

11. Nguyễn Thị Vân, Đinh Thị Ngọc Mai, Lê Thị Hoàng Yến, Nguyễn Hồng Minh, Nguyễn Kim Nữ Thảo, *Khảo sát khả năng đối kháng với bốn loại nấm gây bệnh trên thực vật của xạ khuẩn được phân lập từ Vườn quốc gia Cúc Phương và Ba Bể*, Tạp chí công nghệ sinh học, 2019, **17**(1), tr.1-9

12. Tamura T., Hayakawa M., Hatano K., *A new genus of the order Actinomycetales, Cryptosporangium gen. nov., with descriptions of Cryptosporangium arvum sp. nov. and Cryptosporangium japonicum sp. nov.*, Int. J. Syst. Bacteriol, 1998, **48**:995-1005.

13. Manhas R.K., Kaur T., *Biocontrol Potential of Streptomyces hydrogenans Strain DH16 toward Alternaria brassicicola to Control Damping Off and Black Leaf Spot of Raphanus sativus,* Front Plant Sci, 2016, **7**:1869.

14. Kaur T., Manhas R.K., *Antifungal, insecticidal, and plant growth promoting potential of Streptomyces hydrogenans DH16,* J Basic Microbiol, 2014, **54**(11):1175-85.

15. Palla M.S., Guntuku G.S., Muthyala M.K.K., Pingali S., Sahu P. K., *Isolation and molecular characterization of antifungal metabolite producing actinomycete from mangrove soil,* Beni-Suef University J Basic and Appl Sci, 2018, **7**:250-256.

SUMMARY

SCREENING FOR ANTAGONISTIC ACTINOMYCETES AGAINST FIVE PLANT PATHOGENIC FUNGI AND DESCRIPTION OF THE STRONG ACTIVITY STRAIN *Streptomyces hydrogenans* VTCC 41117

Diseases caused by fungi are a huge threat to agricultural production. Currently more than 8 000 species of fungi are known to cause plant diseases, greater than any other pathogen. Among them, there are 05 common fungal pathogens causing diseases on thousands of different plant species including *Phytophthora capsici*, *Alternaria* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium* sp. and *Botrytis cinerea*. Biological control approach using actinomycetes to control fungal diseases on plants are considered very potential and safe for the environment. However, for this method to be highly effective, it is necessary to have strains with strong antifungal activities. In this study, 245 actinomycete strains preserved at the Vietnam Type Culture Collection (VTCC) were screened for its antagonistic activity against 5 strains of fungal pathogens. The screening results showed that strain VTCC 41117 had a strong and stable antagonistic activity against all 5 strains *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea, Colletotrichum gloeosporioides, Phytophthora capsici* and *Fusarium* sp. with inhibitory effect of 40-55%. Results of identification by 16S rDNA sequence showed that VTCC 41117 strain is *Streptomyces hydrogenans*. Physiological, biochemical properties, cultivation conditions of VTCC 41117 were also identified in this study.

Keywords: Alternaria sp., *Botrytis cinerea, Colletotrichum gloeosporioides, Fusarium* sp., *Phytophthora capsici*, *actinomycetes, antifungal activity.*

Nhận bài ngày 03 tháng 7 năm 2019
Phản biện xong ngày 19 tháng 7 năm 2019
Hoàn thiện ngày 29 tháng 7 năm 2019

(1) Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội