

## Phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn tại tỉnh Lâm Đồng có hoạt tính kháng *Pythium vexans* gây bệnh thối rễ trên rau ăn lá họ thập tự

### Screening and identification *Streptomyces* spp. of Lam Dong Province, which can suppress root rot *Pythium vexans* fungus in cruciferous vegetables

Đinh Anh Hòa<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Ánh Nguyệt<sup>1</sup>, Lê Thị Mai Châu<sup>1</sup>, Trần Thùy Trang<sup>1</sup>,  
Trần Thị Phần<sup>1</sup>, Hà Thị Loan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

\*Tác giả liên hệ, Email: dinhanhhoa.ahi@gmail.com

#### THÔNG TIN

DOI:10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.16.1.1727.2021

Ngày nhận: 24/03/2021

Ngày nhận lại: 23/04/2021

Duyệt đăng: 29/04/2021

#### TÓM TẮT

Nấm *Pythium vexans* là một trong những tác nhân lớn gây ra bệnh thối rễ và ức chế cây rau phát triển. Hiện nay, nghiên cứu ứng dụng chế phẩm sinh học trong kiểm soát, phòng trừ nấm gây hại đang ngày càng được quan tâm trong chiến lược phát triển một nền nông nghiệp sạch và bền vững. Nhiều loài xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* được đánh giá là an toàn cho con người cũng như cây trồng, có khả năng ức chế sự phát triển của nhiều loại nấm gây bệnh ở cây trồng nhờ tiết ra một số hoạt chất sinh học. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập được 20 chủng xạ khuẩn từ 15 mẫu đất tại các vườn trồng rau ở tỉnh Lâm Đồng. Trong đó, chủng *Streptomyces* LD5.4 được đánh giá có hiệu quả ức chế cao nhất đối với nấm *Pythium vexans* (51.80%), sau 48h bằng phương pháp khuếch tán đĩa trên môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) ở nhiệt độ phòng. Dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự 16S rRNA, chủng xạ khuẩn LD5.4 được xác định thuộc loài *Streptomyces filamentosus*. Với những đặc tính này, chủng *Streptomyces filamentosus* LD5.4 có tiềm năng ứng dụng vào sản xuất chế phẩm sinh học ức chế bệnh thối rễ trên rau ăn lá họ thập tự do nấm *Pythium vexans* gây ra.

#### ABSTRACT

Từ khóa:

hoạt chất sinh học; pythium vexans; streptomyces; streptomyces filamentosus; thối rễ

*Pythium vexans* fungus is one of the major causes of root rot and reduces crop growth. Currently, research on the application of biological products in controlling and preventing harmful fungus is increasingly concerned with the strategy of developing clean and sustainable agriculture. Many Actinomycetes species of the genus *Streptomyces* are considered safe for humans as well as plants, capable of inhibiting the growth of many plant pathogenic fungi by secreting a number of bioactive compounds. In this study, from 15 soil samples of vegetable gardens in Lam Dong Province, 20 strains of *Streptomyces* spp. were isolated. Of 20

**Keywords:**

bioactive compounds; pythium vexans; streptomyces; streptomyces filamentosus; root rot

isolates, the strain *Streptomyces* LD5.4 was rated with the highest inhibitory effect on the fungus, which can suppress root rot *Pythium vexans* fungus in cruciferous vegetables, reached 51.80%, after 48 hours by disc diffusion method on Potato Dextrose Agar (PDA) environment at room temperature. Based on morphological characteristics and 16S rRNA sequence, *Streptomyces* sp. LD5.4 was determined to belong to the species *Streptomyces filamentosus*. With these properties, strain *Streptomyces filamentosus* LD5.4 has the potential to be used in the production of probiotics against root rot in Cruciferous vegetables, which is caused by *Pythium vexans*.

## 1. Giới thiệu

Việt Nam là một nước nông nghiệp, có khí hậu nhiệt đới nóng ẩm, mưa nhiều rất thuận lợi cho các Vi Sinh Vật (VSV) phát triển, trong đó có các VSV và nấm gây hại trên nông phẩm nói chung và rau màu nói riêng. Hiện nay, Lâm Đồng là tỉnh trồng rất nhiều hoa màu khác nhau, phổ biến nhất là cây họ rau họ thập tự cung cấp thực phẩm xanh cho các chợ đầu mối lớn như TP Đà Lạt, TP. HCM, Nha Trang, Đồng Nai và các chợ nhỏ lân cận. Tuy nhiên, rau họ thập tự có chu kỳ sống ngắn, cộng với điều kiện phát triển có ẩm độ cao nên rất dễ bị vi sinh vật xâm nhiễm và gây bệnh. Trong đó, nguyên nhân gây hại nghiêm trọng nhất là bệnh thối rễ do nấm *Pythium vexans*. Bệnh rất khó phòng trừ, cây có thể chết vài ngày sau khi nhiễm bệnh bởi vì tác nhân gây bệnh có thể lây lan theo nguồn nước, côn trùng và các dụng cụ trồng trọt. Để phòng trừ các bệnh thối rễ do nấm bệnh gây nên, người nông dân thường sử dụng thuốc hóa học với liều lượng cao. Điều này một mặt sẽ dẫn đến việc kháng thuốc ở các loài VSV gây bệnh, mặt khác sẽ làm ô nhiễm môi trường, làm mất cân bằng sinh thái, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người và các động vật khác. Do an toàn cho con người và cho môi trường, nên biện pháp sử dụng các tác nhân sinh học thay thế các tác nhân hóa học được xem là một chiến lược của Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên Hiệp Quốc FAO (FAO, 1992). Một trong số đó là sử dụng các VSV có khả năng đối kháng với các VSV gây bệnh trên cây trồng. Hiện nay, xạ khuẩn là nhóm VSV được quan tâm nghiên cứu nhiều nhất vì chúng có khả năng tiết ra các hoạt chất đối kháng và đặc biệt là các chất kháng mạnh với nhiều loại nấm gây bệnh trên thực vật (Le, Dinh, Vu, & Nguyen, 2014). Từ những lí do trên, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu: “Phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn tại tỉnh Lâm Đồng có hoạt tính kháng nấm *Pythium vexans* gây bệnh thối rễ trên rau ăn lá họ thập tự”.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Phân lập và kiểm tra khả năng gây bệnh thối rễ của nấm *Pythium* sp. trên rau ăn lá họ thập tự

#### 2.1.1. Phương pháp phân lập nấm bệnh

Theo Akter, Hossain, Nahar, Meah, và Hossain (2007), quy trình phân lập nấm *Pythium* sp. gây bệnh thối rễ trên rau ăn lá họ thập tự được thực hiện như sau: Cân 10g mẫu rau bị bệnh được cắt thành từng mảnh nhỏ cho vào hộp nhựa, che một miếng vải trắng lên phía trên mẫu. Đổ nước cất vô trùng vào hộp nhựa sao cho mực nước cao hơn so với miếng vải khoảng 01 - 02cm. Sau đó, đặt 05 cánh hoa hồng vào hộp, giữ trong điều kiện tối, ở nhiệt độ phòng. Sau 02 - 03 ngày, chọn các cánh hoa hồng bị chuyển màu, khử trùng bề mặt cánh hoa với cồn 70 độ, sau đó cắt thành từng miếng nhỏ có kích thước 05 x 05mm, rồi đặt lên bề mặt đĩa môi trường Potato Carrot Agar (PCA)

có bổ sung kháng sinh (Chloramphenicol, nồng độ 0.1g/l), ủ ở nhiệt độ phòng. Khi thấy có sợi nấm phát triển từ mẫu cánh hoa thì tiến hành cấy truyền và làm thuần (Akter et al., 2007).

### 2.1.2. Kiểm tra khả năng gây bệnh của chủng nấm theo quy tắc Koch

**Chuẩn bị dịch huyền phù du động bào tử nấm:** Nấm *Pythium* sp. được nuôi cấy trên môi trường PCA ở nhiệt độ 25°C trong 05 ngày, cắt sinh khối nấm thành từng mảnh nhỏ rồi chuyển vào các bình Erlen chứa 100ml nước cất vô trùng, để tĩnh ở nhiệt độ phòng trong 02 ngày. Sau đó, đặt các bình Erlen vào tủ mát (4°C) trong 45 phút. Sau đó, các bình Erlen sẽ được lọc qua bốn lớp vải để thu được huyền phù du động bào tử. Pha loãng huyền phù du động bào tử đến mật độ  $10^4$  động bào tử/ml. Phương pháp này được thực hiện dựa theo phương pháp của Mohammad và cộng sự (2015) và Shouan và cộng sự (2010) có cải tiến.

**Cách thực hiện:** thử nghiệm kiểm tra được thực hiện theo phương pháp của Shouan và cộng sự (2010) có cải tiến trên rau cải ngọt. Đầu tiên, các bộ rễ rau cải ngọt (bao gồm cả phần cổ rễ) được rửa sạch dưới vòi nước chảy, khử trùng bộ rễ với dung dịch javel 10%, rửa sạch lại bằng nước vô trùng và làm khô trên giấy thấm vô trùng. Sau đó, đặt các bộ rễ ngập trong dịch huyền phù có chứa mật độ  $10^4$  du động bào tử/ml, để yên trong một giờ ở điều kiện phòng. Sau đó, lấy bộ rễ ra và đặt trong các hộp nhựa chứa giấy ẩm được vô trùng, giữ trong điều kiện tối, ủ ở 25°C trong 04 ngày. Quan sát biểu hiện của rễ và đánh giá khả năng gây bệnh của chủng nấm *Pythium* sp. phân lập được.

### 2.1.3. Định danh nấm bệnh phân lập được bằng sinh học phân tử

Sau khi chọn được chủng nấm nghi ngờ là *Pythium* sp. có khả năng gây bệnh thối rễ trên rau họ thập tự, tiến hành tách DNA và khuếch đại vùng gen *COI* bằng phản ứng PCR với cặp mồi chuyên biệt OomCoxI-Levup (5'-AAAAGAGAAGGTGTTTTTATGGA-3') và OomCoxI-levlo (5'-GCAAAAGCACTAAAAATTAAATATAA-3'). Kiểm tra kết quả điện di của sản phẩm sau PCR trên gel agarose 1% với thang DNA 01kb, theo nhóm nghiên cứu của Gregg và cộng sự (2011) thì kích thước đoạn DNA mong muốn phải đạt khoảng 680bp. Sau đó, tiến hành tinh sạch sản phẩm sau PCR và giải trình tự vùng gen *COI* để định danh nấm bệnh thông qua so sánh sự tương đồng với các trình tự khác trên ngân hàng gen vi sinh vật (NCBI).

## 2.2. Phương pháp thu thập và sàng lọc các mẫu đất trồng rau tại Lâm Đồng có tiềm năng đối kháng nấm *Pythium vexans*

### 2.2.1. Phương pháp thu mẫu

Mẫu dùng để phân lập xạ khuẩn được thu thập từ 15 vườn trồng rau họ thập tự ở tỉnh Lâm Đồng. Mẫu được lấy theo mô tả của nhóm nghiên cứu của Amin, Ashraf, và Khosrow (2014). Đối với mỗi vườn, thu mẫu ở năm điểm khác nhau (bốn điểm xung quanh vườn và một điểm chính giữa vườn), Mẫu đất sẽ được lấy phía dưới vùng xung quanh rễ của cây rau không bị bệnh với các độ sâu khác nhau từ 05 - 10cm, rồi trộn lại thành một mẫu, cho vào bao zipper có dán nhãn. Bảo quản ở 4°C cho tới khi làm thí nghiệm.

Ký hiệu: XYi, trong đó: XY là chữ cái đầu của vùng được thu mẫu, i là số thứ tự vườn được thu mẫu.

### 2.2.2. Phương pháp sàng lọc nhanh các mẫu đất chứa các chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng nấm *Pythium vexans*

**Cách thực hiện:** Nuôi cấy nấm *Pythium vexans* trên đĩa Petri chứa môi trường PDA trong 05 ngày. Dùng khoan thạch đường kính 05mm ấn nhẹ lên bề mặt tản nấm rồi đặt mẫu cấy sang đĩa Petri chứa môi trường PDA ở tâm đĩa. Sau đó dùng khoan đục thạch đường kính 05mm đục ba giếng xung quanh khoan nấm *Pythium vexans* và cách tản nấm 03cm. Pha loãng 10g mẫu

đất với 90ml nước muối sinh lý vô trùng, lắc 200 vòng/phút trong 30 phút, hút 10 $\mu$ l dịch vào mỗi giếng khoan. Đồng nuôi cấy dịch đất với nấm bệnh, theo dõi tốc độ lan tở của tán nấm sau 24h, 48h và 72h. Mỗi mẫu đất được lặp lại ba lần, đối chứng là đĩa Petri có chứa nấm bệnh, dịch đất được thay thế bằng nước cất vô trùng. Lựa chọn những mẫu đất có khả năng đối kháng nấm *Pythium vexans* để tiến hành phân lập xạ khuẩn.

### 2.3. Phân lập xạ khuẩn và chuẩn bị mẫu nấm *Pythium vexans* gây bệnh thối rễ trên rau

Sau khi đã có được kết quả sàng lọc các mẫu đất có tiềm năng đối kháng nấm bệnh, tiến hành phân lập xạ khuẩn từ các mẫu đất này.

**Cách thực hiện:** Sử dụng phương pháp pha loãng thập phân để phân lập chủng xạ khuẩn trên các nồng độ  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ . Cụ thể là cân 10g mẫu pha trong 90ml nước cất đã vô trùng để mẫu có nồng độ  $10^{-1}$ , tiếp đó hút 1ml mẫu đó trong 09ml nước cất vô trùng và tiếp tục pha loãng tới các nồng độ tiếp theo. Sau khi các mẫu đã được pha loãng, hút 100 $\mu$ l dịch mẫu ở nồng độ khảo sát trải trên đĩa thạch chứa môi trường Gause I. Nuôi trong tủ ẩm 30°C sau 07 ngày, quan sát khuẩn lạc và đánh dấu các khuẩn lạc nghi ngờ là *Streptomyces* spp. để cấy truyền và làm thuần trên môi trường Grause I (Mansour, Mohamedin, Esmaeel, & Huda, 2008). Ký hiệu chủng theo tên mẫu thu thập được.

Xác định hình thái cơ quan mang bào tử, bào tử và cách sắp xếp của bào tử dưới kính hiển vi huỳnh quang có vật kính 40X và 100X theo nghiên cứu của Pridham, Hesseltine, và Benedict (1958). Kết hợp với đặc điểm khuẩn lạc trên môi trường Gause I để xác định hình thái *Streptomyces* spp.

Nấm *Pythium vexans* được nuôi cấy trên môi trường PDA ở nhiệt độ 25°C trong 05 ngày.

### 2.4. Khảo sát khả năng ức chế *Pythium vexans* của dịch nuôi cấy loại bỏ tế bào của các chủng xạ khuẩn được phân lập tại Lâm Đồng

**Cách thực hiện:** Nấm gây bệnh được nuôi trên đĩa Petri chứa môi trường PDA trong 05 ngày. Các chủng xạ khuẩn được nuôi trên môi trường Gause lỏng ở điều kiện lắc 200 vòng/phút, nhiệt độ  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . Sau 05 ngày, tiến hành ly tâm dịch nuôi cấy xạ khuẩn ở 10,000 vòng/phút trong 15 phút. Thu hoạch dịch nổi, loại bỏ tế bào bên dưới ống li tâm. Dịch nổi sau đó được đem lọc qua màng lọc 0.2 $\mu$ m để loại bỏ các tế bào còn sót lại được dịch chiết 1. Chuẩn bị môi trường PDA, đem hấp tiệt trùng, để nguội xuống 45°C - 50°C rồi bổ sung 10% các dịch chiết 1 vào môi trường, lắc đều rồi phân phối ra các đĩa Petri (10ml/đĩa). Dùng khoan thạch đường kính 05mm ấn nhẹ lên bề mặt nuôi cấy nấm gây bệnh rồi đặt mẫu cấy sang giữa đĩa Petri, ba lần lặp lại cho mỗi loại dịch chiết của các chủng xạ khuẩn, ủ ở nhiệt độ  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 05 ngày. Đối chứng: cấy nấm vào giữa đĩa Petri chứa môi trường PDA không bổ sung dịch chiết (Harpreet & Leena, 2010; Simi, Sajjalaguddam, Vijay, Rajeev, & Hari, 2015).

**Chỉ tiêu theo dõi:** đường kính khuẩn lạc nấm bệnh sau 24h, 48h và 72h ủ. Sàng lọc các chủng xạ khuẩn dựa vào:  $H = (D1 - D2) / D1 \times 100$  (1)

H: Phần trăm ức chế nấm bệnh trên đĩa Petri (%);

D1: Đường kính khuẩn lạc nấm bệnh trong công thức đối chứng (mm);

D2: Đường kính khuẩn lạc nấm bệnh khi được nuôi cùng với xạ khuẩn (mm).

### 2.5. Định danh sinh học phân tử chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng mạnh nhất nấm *Pythium vexans*

Chọn lọc chủng *Streptomyces* sp. có khả năng đối kháng mạnh nhất nấm *Pythium vexans*. Xạ khuẩn sẽ được nuôi cấy trên môi trường Gause I ở 30°C. Sau 05 ngày, thu hoạch sinh khối xạ

khuẩn để tách chiết DNA tổng số.

Thu hoạch DNA tổng số để thực hiện phản ứng PCR. Cặp mồi được sử dụng để khuếch đại đoạn gen 16S-rRNA của các chủng xạ khuẩn trong nghiên cứu là: 20F (AGAGTTTGATCATGGCTCAG) và 1500R (GGTTACCTTGTTACGACTT) theo Kawuri và Darmayasa (2019).

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0.8% với thang DNA 1kb (Nhà sản xuất Fermentas, Đức) để kiểm tra kết quả. Sau đó, tinh sạch sản phẩm PCR bằng kit Isolate II PCR. Chu trình phản ứng thiết lập: 01 chu kỳ ở 95°C - 04 phút; 30 chu kỳ gồm có: 94°C - 01 phút, 54°C - 45 giây và 72°C - 01 phút 45 giây; 01 chu kỳ ở 72°C - 10 phút; tổng thể tích phản ứng là 25µl. Sản phẩm sau khi tinh sạch được giải trình tự. Kết quả thu được sẽ xử lý bằng phần mềm ATGC, BLAST trình tự đã xử lý lên NCBI để so sánh sự tương đồng với trình tự các chủng đã có sẵn. Xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm MEGA7.

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Kết quả phân lập và kiểm tra khả năng gây bệnh thối rễ của nấm *Pythium* sp. trên rau ăn lá họ thập tự

Từ ba mẫu rau ăn lá họ thập tự có triệu chứng bệnh thối rễ do nấm *Pythium* sp. gây ra tại vườn rau ở Lâm Đồng. Sau 02 ngày quan sát bằng kính hiển vi, cho thấy có hai mẫu rau làm chuyển màu cánh hoa như ở Bảng 1. Kết quả phân lập nấm *Pythium* sp. từ những cánh hoa đã chuyển màu này trên môi trường PCA có bổ sung kháng sinh thu được hai chủng nấm ký hiệu RR1 và RR2 có đặc điểm hình thái đại thể và vi thể như Bảng 1. Sau 05 ngày nuôi cấy trên môi trường PCA, các tản nấm này đều có hình dáng đặc trưng của nấm *Pythium* sp. như hình cánh hoa hồng, ngôi sao, ... Bên cạnh đó, kết quả quan sát hình thái vi thể dưới kính hiển vi cũng cho thấy, cả 2 chủng RR1 và RR2 đều có túi bào tử hình tròn và chứa nhũ trong suốt (Bảng 1), giống với mô tả của Hon (2018) về các loài nấm trong *Pythium* sp. trong họ Pythiaceae.

Từ các kết quả trên, tiến hành đánh giá khả năng gây bệnh nhân tạo của cả hai chủng phân lập này trên bộ rễ rau cải ngọt. Sau 04 ngày thử nghiệm chủng bệnh nhân tạo theo quy tắc Koch, kết quả cho thấy bộ rễ ở chủng RR1 đã biểu hiện những dấu hiệu của bệnh thối rễ, đặc biệt là các rễ tơ gần như đã bị thối đen hết toàn bộ. Còn bộ rễ ở chủng RR2 vẫn chưa biểu hiện rõ triệu chứng bệnh. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước đó của nhóm nghiên cứu của Lester, Burgess, Knight, và Phan (2009). Trong khi đó, bộ rễ ở nghiệm thức đối chứng vẫn không biểu hiện bệnh, các rễ tơ hầu như không bị thối đen (Hình 1). Sau đó, tiến hành tái phân lập lại nấm từ bộ rễ ở nghiệm thức RR1. Kết quả cho thấy chủng nấm tái phân lập này có hình thái giống với hình thái của chủng ban đầu. Từ những kết quả này cho thấy, chủng nấm RR1 có tiềm năng gây bệnh thối rễ trên rau họ thập tự.



Đối chứng

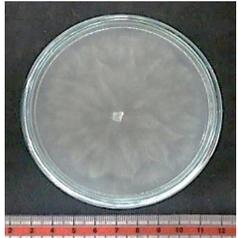
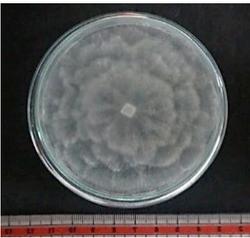
RR1

RR2

**Hình 1.** Kết quả chủng bệnh nhân tạo theo quy tắc Koch trên rễ rau cải của chủng RR1 và RR2 sau 04 ngày

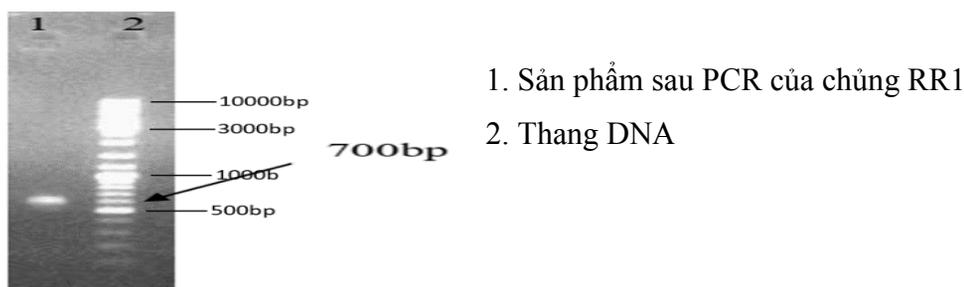
**Bảng 1**

Kết quả bẫy cánh hoa hồng và hình ảnh đại thể, vi thể của các chủng nấm RR1 và RR2

Tên chủng	RR1	RR2
Cánh hoa hồng bị mất màu		
Đại thể		
Vi thể		

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Sau đó, tiến hành tách chiết DNA của chủng RR1, khuếch đại vùng trình tự gen *COI* của chủng nấm RR1 bằng phản ứng Polymerase Chain Reaction (PCR) với cặp mồi đặc hiệu là OomLevup (5'-AAAAGAGAAGGTGTTTTTTATGGA-3') và Oomlevlo (5'-GCAAAAGCACTAAAAATTAAATATAA-3'). Kết quả điện di ở Hình 2 cho thấy, đoạn trình tự được khuếch đại có kích thước khoảng 680bp phù hợp với kết quả của Gregg và cộng sự (2011). Tiến hành tinh sạch và giải trình tự sản phẩm PCR thu được, xử lý trình tự bằng phần mềm ATGC và BLAST so sánh với trình tự gen của các chủng thuộc ngân hàng gen NCBI. Kết quả so sánh cho thấy, chủng RR1 có độ tương đồng 99.14% với chủng *Pythium vexans* STE-U6712 được trình bày ở Bảng 2.



**Hình 2.** Kết quả điện di DNA của chủng nấm RR1 gây bệnh thối rễ rau cải

**Bảng 2**

Kết quả BLAST vùng gen *COI* của chủng RR1

Tên chủng	Mã số chủng so sánh	Độ tương đồng (%)	Độ phủ	Tên loài
RR1	GU133471.1	99.14	99	<i>Pythium vexans</i>

Nguồn: Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

Trình tự gen *COI* của chủng RR1 được khuếch đại bằng cặp mồi OomCoxI-Levup và OomCoxI-levlo:

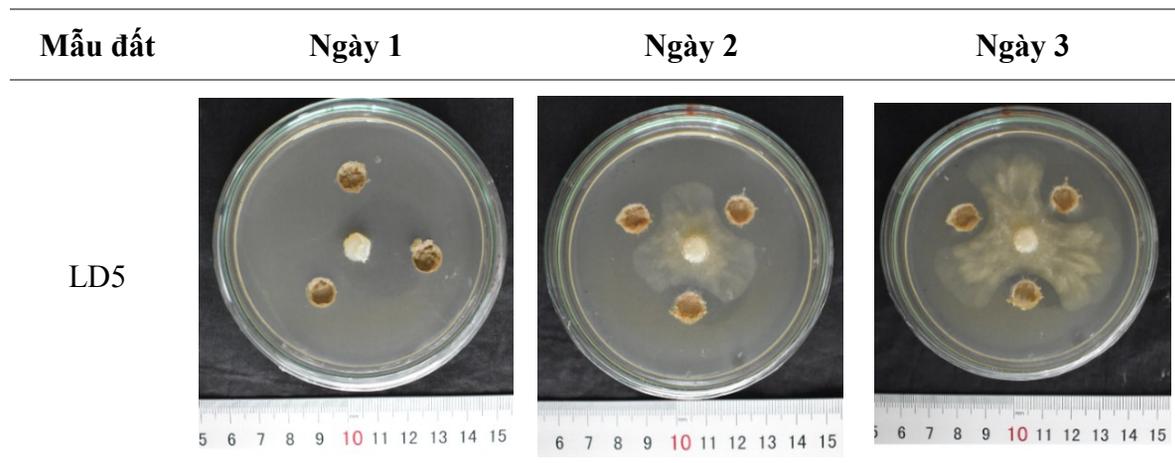
```

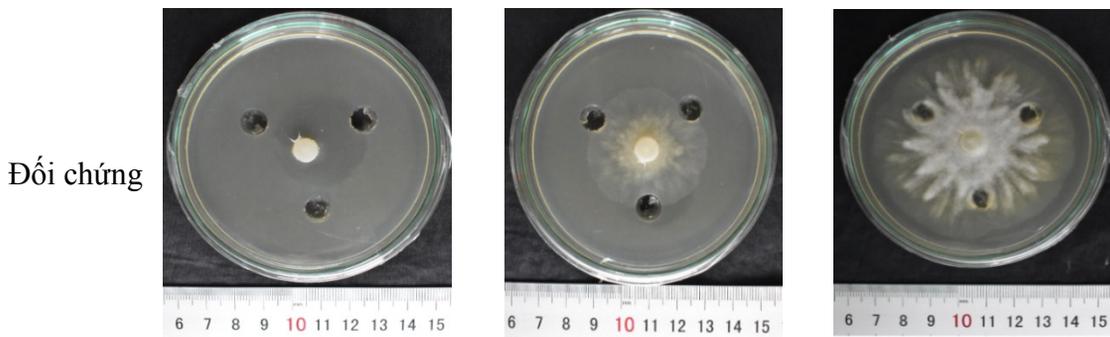
CTTTTTTCAACAAATCATAAAGATATTGGTACTTTATATTTAATTTTTGGTGCT
TTTTTCAGCAATAGTTGCAACTGTAATGTCTGTATTAATTAGAATTGAATTAGCACAA
CCAGGTAATCAAATTTTTATGGGAAACCATCAAGTATATAATGTTATGATTACAGCA
CACGGTTTATTAATGATATTTTTGTGGTTATGCCTATATTAGTTGGTGGTTTTGGTA
ACTGGTTTGTACCTATAATGGTAGGAGCACCTGATATGGCTTTTCCTCGTTTAAATA
ATATTAGTTTTTGGTTATTACCACCATCTTTATTACTATTAGTATCTTCTGCTTTAGTT
GAATCAGGTGCAGGTACCGGTTGGACAGCTTATCCACCATTATCAAGTGTAGCTGCA
CATTACAGGACCTTCAATAGATTTAGCTATTTTTAGTTTACATTTATCAGGTATTTCTT
CATTATTAGGTGCAATTAATTTTATTGTTACTATTTTTAATATGAGAGCTCCTGGATT
AAGTATGCATAGAATGCCTTTATTTGTATGGTCTCTTTTAATTACAGCTTTTCTTTTA
GTTATAACTTTACCAGTATTTTCAGGTTCAATAACTATGTTATTAAGTATAGAAATT
TTAATACTTCTTTTTATGACCCAGCAGGAGGAGGAGATCCAGTATTATCCAACATT
TATTTTGGTTTTTCG

```

### 3.2. Kết quả thu thập và sàng lọc các mẫu đất trồng rau tại Lâm Đồng có tiềm năng đối kháng nấm *Pythium vexans*

Từ 15 mẫu đất thu thập được tại các vườn trồng rau họ thập tự ở Lâm Đồng. Sau khi sàng lọc thì 10/15 mẫu đất thu thập được có dấu hiệu đối kháng với *Pythium vexans*, được ký hiệu từ LD1 đến LD15 (Hình 3).





**Hình 3.** Kết quả sàng lọc mẫu đất LD5 và đối chứng trên môi trường thạch PDA

Từ kết quả Hình 1, cho thấy trong 10/15 mẫu đất xuất hiện dấu hiệu đối kháng với *Pythium vexans*, mẫu đất LD5 là có dấu hiệu đối kháng nấm bệnh tốt nhất so với các mẫu đất còn lại. Điều này chứng tỏ, mẫu đất LD5 có tiềm năng chứa hệ vi sinh vật có khả năng đối kháng tốt với nấm gây bệnh thối rễ trên rau họ thập tự như *Streptomyces* spp., *Bacillus* spp., ...

**3.3. Phân lập xạ khuẩn và chuẩn bị mẫu nấm *Pythium vexans* gây bệnh thối rễ trên rau**

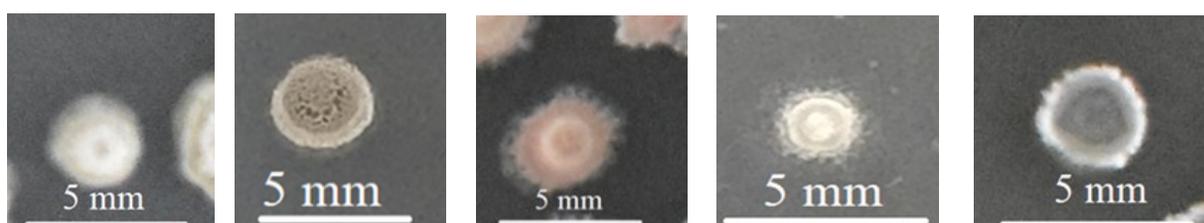
Từ các mẫu đất này, 20 chủng xạ khuẩn đã được phân lập trên môi trường Gause I với các đặc điểm màu sắc và khuẩn lạc khác nhau. Hình dạng khuẩn lạc, bào tử và hệ sợi khí sinh dựa trên bảng màu chi *Streptomyces* của tác giả Tresner và Backus (1963). Trong số 20 chủng *Streptomyces* sp. phân lập được có năm nhóm màu xuất hiện với số lượng và tỷ lệ khác nhau (Hình 4 và Bảng 3).

**Bảng 3**

Sự phân bố theo nhóm màu của các chủng xạ khuẩn

STT	Nhóm màu	Số chủng	Tỷ lệ (%)
1	Trắng	11	55
2	Đen	1	5
3	Nâu đất	4	20
4	Xám	3	15
5	Xanh	1	5

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu



Khuẩn lạc màu trắng      Khuẩn lạc màu đen      Khuẩn lạc màu nâu đất      Khuẩn lạc màu xám      Khuẩn lạc màu xanh

**Hình 4.** Hình ảnh màu sắc khuẩn lạc đại diện cho năm nhóm màu xạ khuẩn phân lập được tại các vườn rau ở lâm đồng trên môi trường Gause I sau khi sàng lọc

### 3.4. Kết quả khảo sát khả năng ức chế *Pythium vexans* của dịch nuôi cấy loại bỏ tế bào của các chủng xạ khuẩn được phân lập tại Lâm Đồng

Khả năng ức chế tốc độ lan tơ nấm *Pythium vexans* của dịch nuôi cấy loại bỏ tế bào của các chủng *Streptomyces* spp. sau 48 giờ. Kết quả thể hiện ở Bảng 4 và Hình 5.

**Bảng 4**

Hiệu quả ức chế tốc độ lan tơ của chủng nấm *Pythium vexans* của các chủng *Streptomyces* spp. phân lập ở tỉnh Lâm Đồng sau 48 giờ

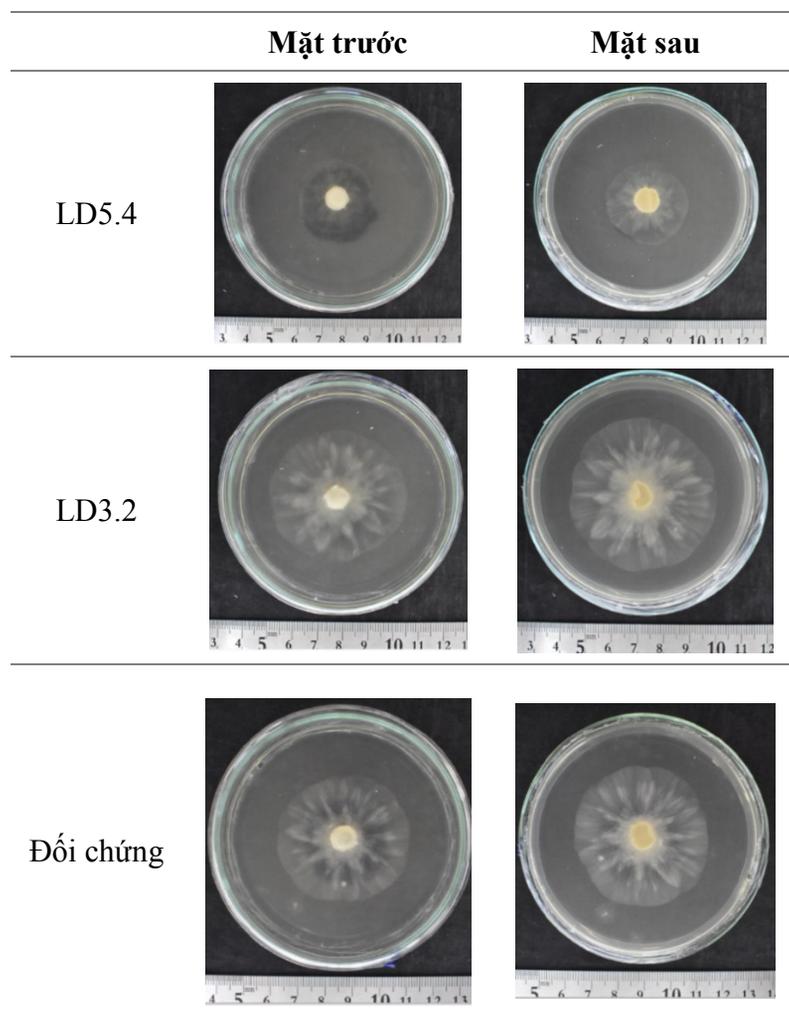
Phần trăm ức chế tốc độ lan tơ nấm (%)

STT	Tên chủng	Sau 48 giờ
1	LD1.1	14.29 <sup>cd</sup>
2	LD1.2	23.12 <sup>c</sup>
3	LD2.1	13.20 <sup>cd</sup>
4	LD2.2	0.00 <sup>e</sup>
5	LD3.1	14.30 <sup>cd</sup>
6	LD3.2	0.00 <sup>e</sup>
7	LD4.1	18.07 <sup>cd</sup>
8	LD5.2	12.95 <sup>cd</sup>
9	LD5.4	51.80 <sup>a</sup>
10	LD6.1	8.53 <sup>de</sup>
11	LD6.4	39.60 <sup>b</sup>
12	LD7.1	24.90 <sup>c</sup>
13	LD7.2	13.79 <sup>cd</sup>
14	LD8.1	14.46 <sup>cd</sup>
15	LD8.2	20.72 <sup>cd</sup>
16	LD9.1	17.73 <sup>cd</sup>
17	LD9.2	17.97 <sup>cd</sup>
18	LD10.1	23.79 <sup>c</sup>
19	LD10.2	14.30 <sup>cd</sup>
20	LD10.3	17.56 <sup>cd</sup>
<b>Trung bình</b>		18.06
<b>CV (%)</b>		36.98
<b>P</b>		< .0001

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0.05$ ).

Dựa vào kết quả đối kháng ở Bảng 4 cho thấy, Phần trăm ức chế sự lan tơ nấm của 20 chủng *Streptomyces* sp. có sự khác nhau giữa các chủng (sự khác biệt giữa các nghiệm thức có ý nghĩa về mặt thống kê). Sau 48 giờ nuôi cấy có 18/20 dịch nuôi cấy loại bỏ tế bào của các chủng xạ khuẩn *Streptomyces* spp. biểu hiện khả năng ức chế sự lan tơ của nấm bệnh chiếm 90%. Khuẩn lạc nấm bị ức chế sẽ có đường kính nhỏ hơn so với khuẩn lạc ở nghiệm thức đối chứng (Hình 5). Trong đó, phần trăm ức chế tơ nấm đạt từ 8.53% đến 51.8%. Trong đó, chủng xạ khuẩn LD5.4 có hiệu quả ức chế nấm bệnh sau 48 giờ đạt 51.8%. Thấp nhất là chủng LD2.2 (0%) và LD3.2 (0%) (Hình 5). Phần trăm ức chế nấm giữa các chủng đều có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê sau 48 giờ nuôi cấy. Kết quả này cao hơn nhóm nghiên cứu của Lê và cộng sự (2014) khi khảo sát chủng xạ khuẩn NA1 và HN6 đối kháng với nấm gây hại thực vật. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Trinh (2014) cũng cho thấy khả năng sinh chất kháng nấm *Pythium* sp. của các chủng xạ khuẩn được phân lập. Từ những kết quả trên cho thấy chủng *Streptomyces* sp. LD 5.4 có khả năng kiểm soát tốt đối với sự phát triển nấm *Pythium vexans* gây bệnh thối rễ trên rau.

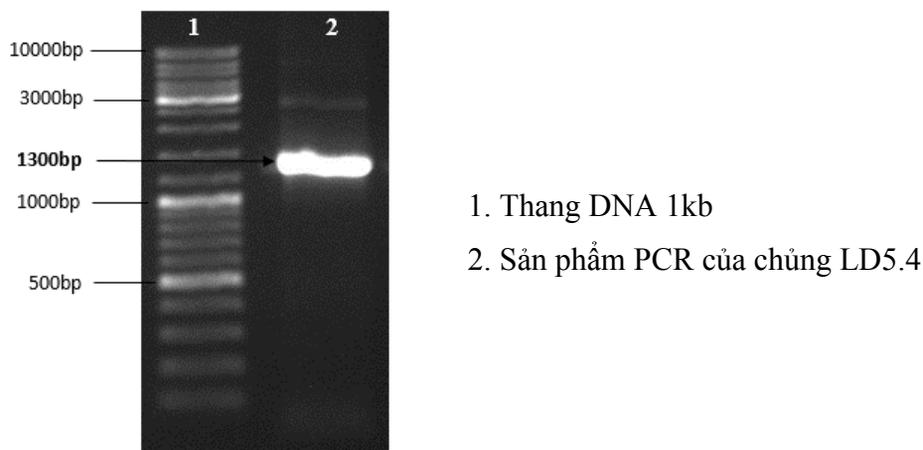


**Hình 5.** Khuẩn lạc nấm *Pythium vexans* ở nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức nuôi cùng dịch chiết từ chủng LD5.4 và LD3.2 sau 48 giờ

### 3.5. Định danh sinh học phân tử chủng xạ khuẩn LD5.4 có khả năng đối kháng mạnh nhất nấm *Pythium vexans*

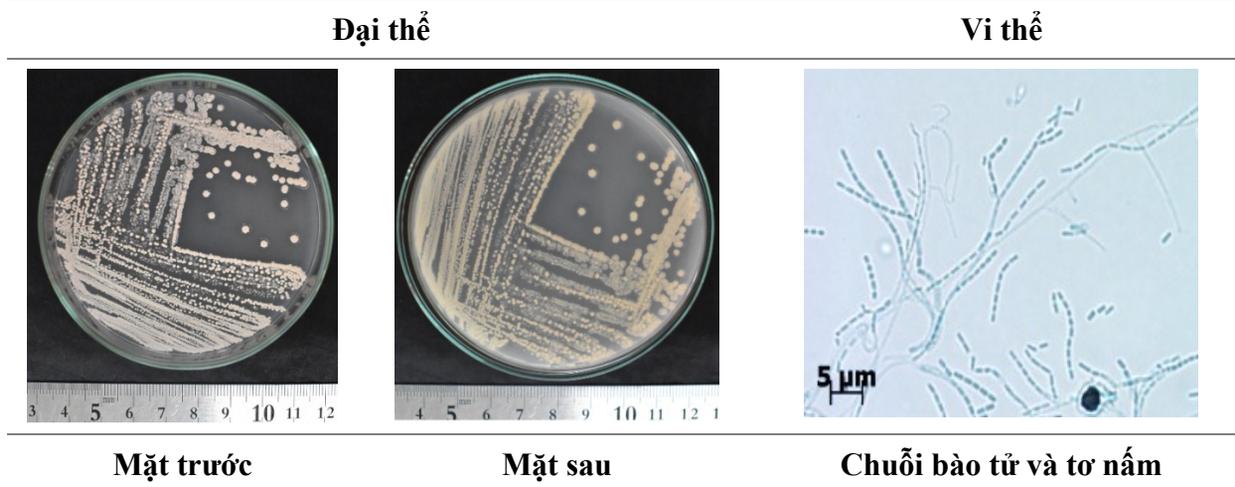
Từ kết quả sàng lọc trên, lựa chọn được chủng *Streptomyces* LD5.4 là chủng có tiềm năng kiểm soát nấm *Pythium vexans* gây bệnh thối rễ trên rau nhờ tiết hoạt chất thứ cấp. Tiến

hành tách DNA tổng số các chủng LD5.4 và thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi 20F, 1500R. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, chủng LD5.4 xuất hiện vạch có kích thước khoảng 1,300bp, phù hợp với kết quả nghiên cứu của Kawuri và Darmayasa (2019) (Hình 6). Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng bộ Isolate II PCR và Gel Kit (Bioline) và tiến hành giải trình tự. Sau khi đọc trình tự bằng phần mềm ATGC và BLAST so sánh với ngân hàng gen NCBI. Kết quả so sánh cho thấy, chủng LD5.4 có độ tương đồng 100% với trình tự gen của chủng *Streptomyces filamentosus* AY999878.1 về trình tự vùng 16S-rRNA cụ thể như ở Bảng 5.



**Hình 6.** Kết quả điện di DNA của chủng *Streptomyces* LD5.4

Đặc điểm hình thái của chủng LD5.4 được cấy trên môi trường Gause I và nuôi cấy trong 07 ngày ở 30°C tạo khuẩn lạc có dạng tròn, bề mặt hơi xù xì. Màu khuẩn lạc thay đổi theo thời gian nuôi cấy, ở 01 - 05 ngày đầu nuôi cấy khuẩn lạc có màu trắng, hình tròn, kích thước 01 - 02mm, bề mặt mịn và lồi lên. Từ ngày 05 trở đi khuẩn lạc bắt đầu chuyển dần sang màu nâu nhạt hay nâu đỏ với đường kính khoảng 02 - 03mm, phía xung quanh khuẩn lạc có những tơ mọc mọc ra xung quanh. Mặt dưới khuẩn lạc phẳng, khuẩn ty cơ chất có màu trắng hồng. Khi quan sát hình thái hệ sợi và bào tử của chủng LD5.4 bằng kính hiển vi quang học có độ phóng đại 1,000 lần, kết quả cho thấy sau 05 ngày bắt đầu hình thành bào tử. Chuỗi bào tử dạng chuỗi thẳng, chuỗi bào tử dài 06 - 09 bào tử ở mỗi chuỗi có đặc điểm giống với chi *Streptomyces* phù hợp với khóa phân loại của nhóm nghiên cứu Pridham và cộng sự (1958) (Hình 7).



**Hình 7.** Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và vi thể của chủng LD5.4 nuôi trên môi trường Gause I

**Bảng 5**

Kết quả BLAST vùng gen 16S rRNA của chủng LD5.4

Tên chủng	Mã số chủng so sánh	Độ tương đồng (%)	Độ phủ	Tên loài
LD5.4	FJ792560	100	99.57	<i>Streptomyces filamentosus</i>

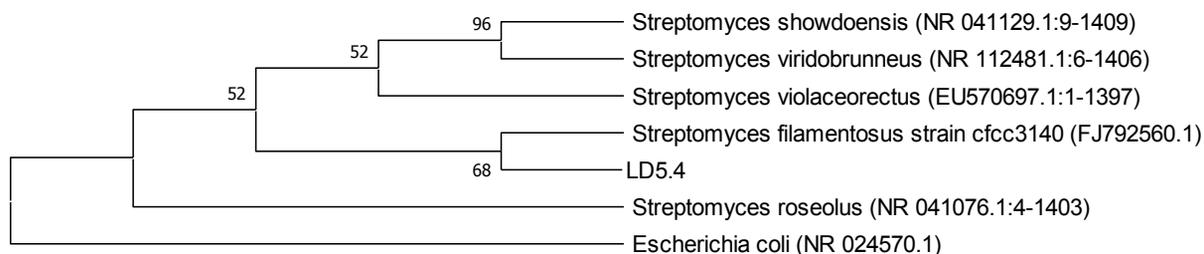
Nguồn: Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

Trình tự đoạn DNA được khuếch đại bằng cặp mồi 20F và 1500R của chủng LD5.4:

GCTTACCATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGG  
 TGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGT  
 CTAATACCGGATACGACTTGTCTGAGGCATCTTGAGGGGTGGAAAGCTCCGGCGGTG  
 AAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGA  
 CGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC  
 AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATG  
 CAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGG  
 AAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGC  
 AGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGAGC  
 TCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGGTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCA  
 TCCGATACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGG  
 TGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCAT  
 TACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG  
 TCCACGCCGTAAACGTTGGGAAGTGGTGTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCG  
 CAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAA  
 AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAAC  
 GCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAAGCGCCAGAGATGGTGCCCC  
 CCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGT  
 TGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCG  
 GGGTGTGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGAC  
 GACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGG  
 TACAAAGAGCTGCGATGCCGCGAGGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTT  
 CGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATC  
 AGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACGTCACG  
 AAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGTCCCAACCCCTCGGGGAGGGAGC

Kết quả khi phân tích cây phát sinh loài của chủng xạ khuẩn LD5.4 với các loài tham khảo bằng phần mềm MEGA8, cho thấy chủng LD5.4 gần với xạ khuẩn *Streptomyces filamentosus* và không có tương đồng với loài gây bệnh (*Escherichia coli*), tương tự như kết quả BLAST trên NCBI (Bảng 4 và Hình 8).

Từ các kết quả này cho phép kết luận chủng xạ khuẩn LD5.4 là chủng xạ khuẩn *Streptomyces filamentosus*. Theo Bavya, Mohanapriya, Pazhanimurugan, và Balagurunathan (2011) cũng đã cho thấy nhiều lợi ích và an toàn của chủng *Streptomyces filamentosus* trong đối kháng vi sinh vật gây hại.



**Hình 8.** Cây phát sinh loài của chủng xạ khuẩn LD5.4 với các loài xạ khuẩn có quan hệ họ hàng gần dựa trên phân tích trình tự 16S rRNA

#### 4. Kết luận và kiến nghị

Từ 15 mẫu đất thu được tại các vùng trồng rau họ thập tự tại Lâm đồng, đã phân lập được 20 chủng *Streptomyces* spp. và 1 chủng nấm *Pythium vexans* từ mẫu rau bệnh thối rễ trên rau họ thập tự. Kết quả sàng lọc được 1 chủng *Streptomyces* sp. (LD5.4) có khả năng sinh hoạt chất ức chế nấm *Pythium vexans* gây bệnh thối rễ trên rau đạt 51.80% sau 48 giờ bằng dịch môi trường nuôi cấy đã loại bỏ tế bào và cao hơn các chủng *Streptomyces* sp. còn lại. Kết quả định danh sinh học phân tử cho thấy, chủng LD5.4 tương đồng 100% với chủng *Streptomyces filamentosus* FJ792560. Tuy nhiên, hiệu quả ức chế nấm của chủng LD5.4 cần được tiến hành khảo sát thêm một số điều kiện nuôi cấy, thời gian, khả năng ức chế *Pythium vexans* trong điều kiện in vivo để tăng cao hiệu lực ức chế bệnh thối rễ trên rau.

#### Tài liệu tham khảo

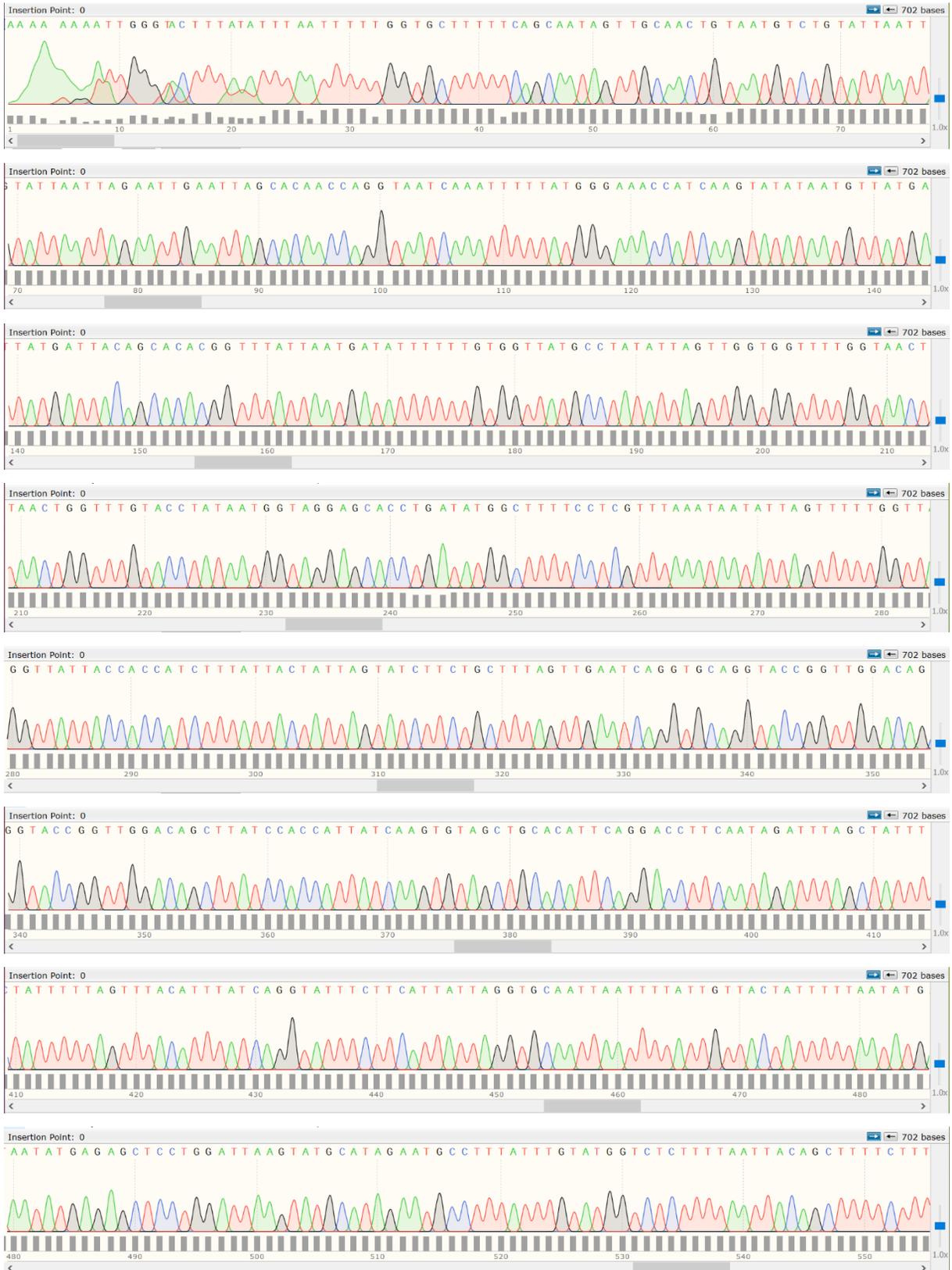
- Akter, M. K., Hossain, M. D., Nahar, K., Meah, M. B., & Hossain, M. A. (2007). Isolation and identification of *Phytophthora capsici* and its mating type determination. *Journal of Agroforestry and Environment*, 1(2), 89-92.
- Amin, H., Ashraf, K., & Khosrow, I. (2014). Streptomyces: Characteristics and their antimicrobial activities. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(1), 63-75.
- Bavya, M., Mohanapriya, P., Pazhanimurugan, R., & Balagurunathan, R. (2011). Potential bioactive compound from marine actinomycetes against biofouling bacteria. *Indian of Geo-Marine Sciences*, 40(4), 578-582.
- Food and Agriculture Organization (FAO). (1992). *The state of food and agriculture 1992*. Retrieved January 10, 2021, from [fao.org/3/t0656e/t0656e.pdf](http://fao.org/3/t0656e/t0656e.pdf)
- Gregg, P. R., Arthur, W. A. M. D. C., Michael, D. C., Hermann, V., Henk, B., Kanak, B., . . . Andre, L. V. C. (2011). DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidasesubunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources*, 11(6), 1002-1011.
- Harpreet, S., & Leena, P. (2010). Antifungal activity of extracts obtained from actinomycetes. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 1(10), 197-200.
- Hon, H. H. (2018). The taxonomy and biology of *Phytophthora* and *pythium*. *Journal Bacteriol Mycol Open Access*, 6(1), 40-45.
- Kawuri, R., & Darmayasa, I. B. G. (2019). Bioactive compound of *streptomyces capoamus* as biocontrol of bacterial wilt disease on banana plant. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 347(2019), 1-8. doi:10.1088/1755-1315/347/1/012054

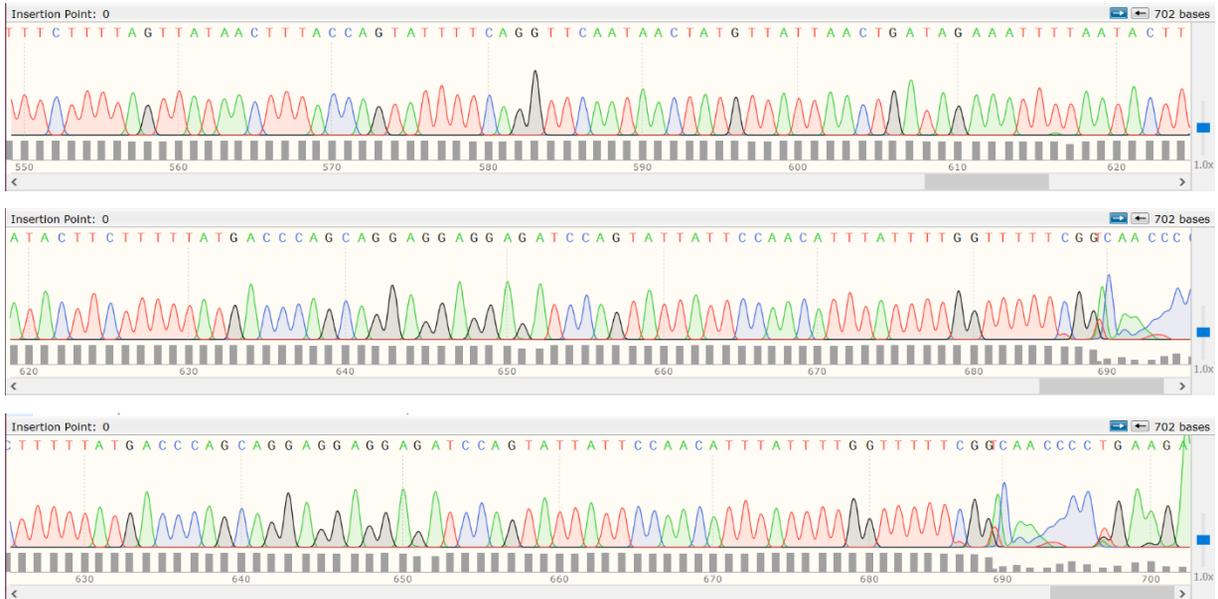
- Le, H. T., Dinh, L. V., Vu, V. T., & Nguyen, G. V. (2014). Phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn (*Streptomyces spp.*) đối kháng nấm gây bệnh thực vật [Isolation and selection of actinomycete strains (*Streptomyces spp.*) antagonistic to plant pathogenic fungi nấm]. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 2014, 12(5), 656-664.
- Lester, W., Burgess, T. E., Knight, L. T., & Phan, H. T. (2009). *Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam [Diagnostic manual for tree diseases in Vietnam]*. Canberra, Australia: Trung tâm nghiên cứu nông nghiệp quốc tế Australia (ACIAR).
- Mansour, F. A., Mohamedin, A. H., Esmaeel, A. E., & Huda, H. B. (2008). Control of potato bacterial soft rot disease caused by erwinia carotovora subsp. carotovora with streptomyces sioyaensis and cinnamon oil. *Egyptian Journal of Microbiology*, 43, 1-20.
- Mohammad, Z. R., Seiji, U., Etsuo, K., Takeshi, K., Mikio, K., Keiichi, M., . . . Koji, K. (2015). Two plant pathogenic species of Phytophthora associated with stem blight of Easter lily and crown rot of lettuce in Japan. *Mycoscience*, 56(4), 419-433.
- NCBI. (n.d.). Retrieved January 10, 2021, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
- Nguyen, D. L., & Nguyen, K. T. N. (2006). *Các nhóm vi khuẩn chủ yếu - Phân loại vi sinh vật [Major groups of bacteria - Classification of microorganisms]*. Hanoi, Vietnam: NXB Giáo Dục.
- Pridham, T. G., Hesseltine, C. W., & Benedict, R. G. (1958). A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups. Placement of strains in morphological sections. *Journal of Applied Microbiology*, 6(1), 52-79.
- Shouan, Z., Thomas, L. W., Miriam, C. M., John, A. M., Joseph, W. K., & Waldemar, K. (2010). Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for control of Phytophthora blight on squash under greenhouse conditions. *Biological Control*, 53(1), 129-135.
- Simi, J., Sajjalaguddam, R. R., Vijay, K. K., Rajeev, V., & Hari, K. S. (2015). Assessing the prospects of Streptomyces spp. RP1A-12 in managing groundnut stem rot disease caused by Sclerotium rolfsii. *Journal of General Plant Pathology*, 2(6), 23-31.
- Tresner, H. D., & Buckus, E. J. (1963). System of color wheels for *Streptomyces* taxonomy. *Journal of Applied Microbiology*, 11(4), 335-338.
- Trinh, A. T. (2014). Phân lập và tuyển chọn xạ khuẩn có khả năng sinh chất kháng nấm Pythium sp [Isolation and selection of actinomycetes capable of producing antifungal agents Pythium sp]. *Tạp chí khoa học Đại học Sư phạm Tp.HCM*, 61(2014), 113-121.

## PHỤ LỤC

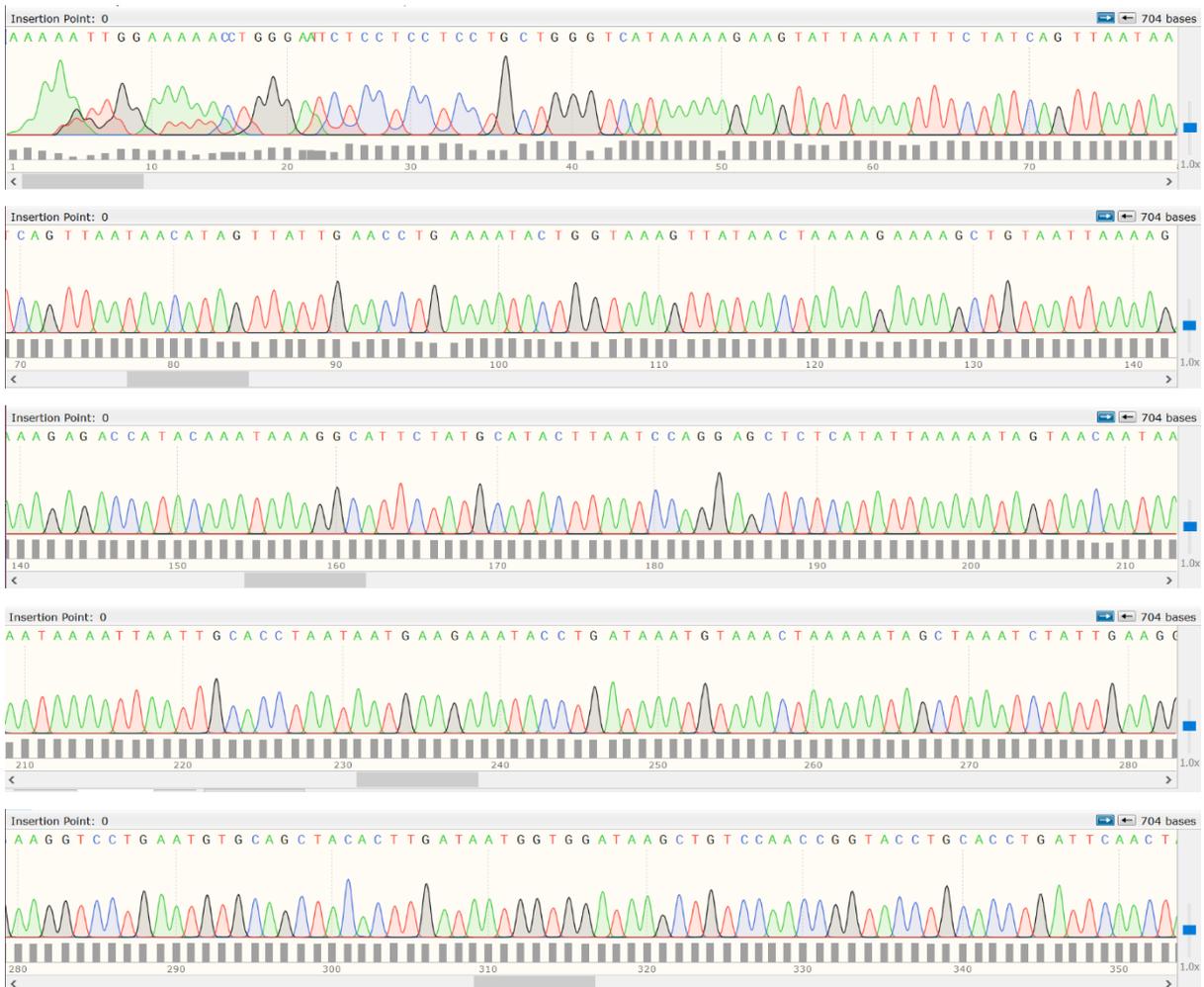
### A. Kết quả phổ giải trình tự chủng RR1

#### A.1. Phổ giải trình tự bằng môi OomCoxI-Levup





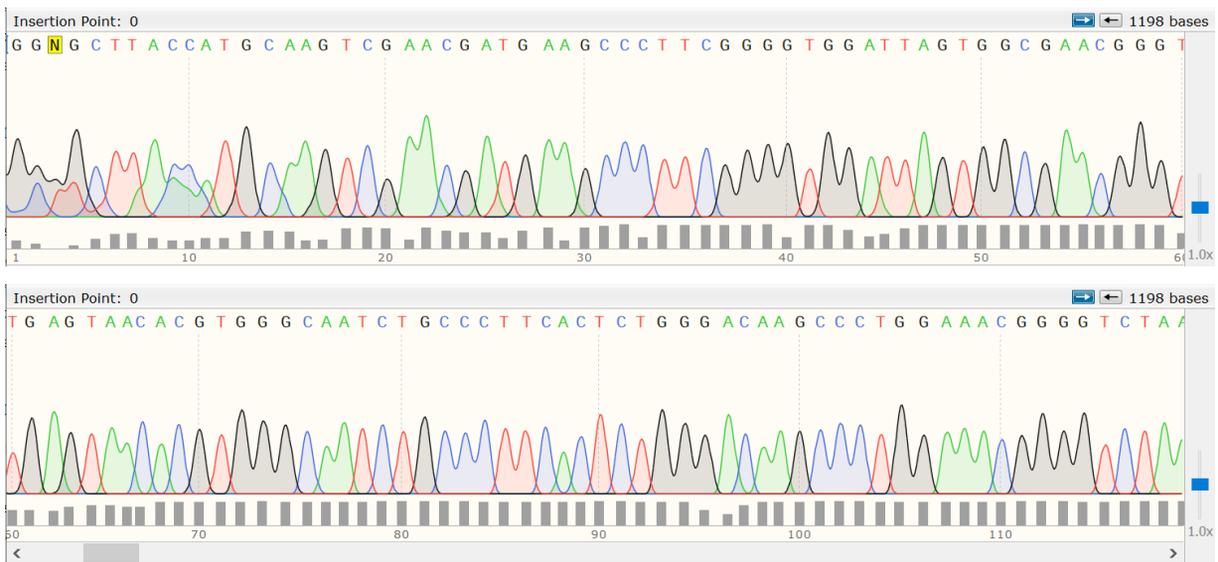
*A.2. Phổ giải trình tự bằng môi OomCoxI-levlo*

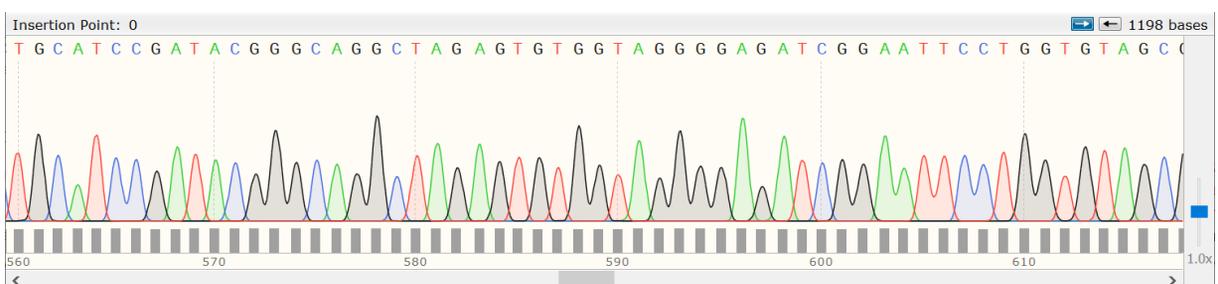
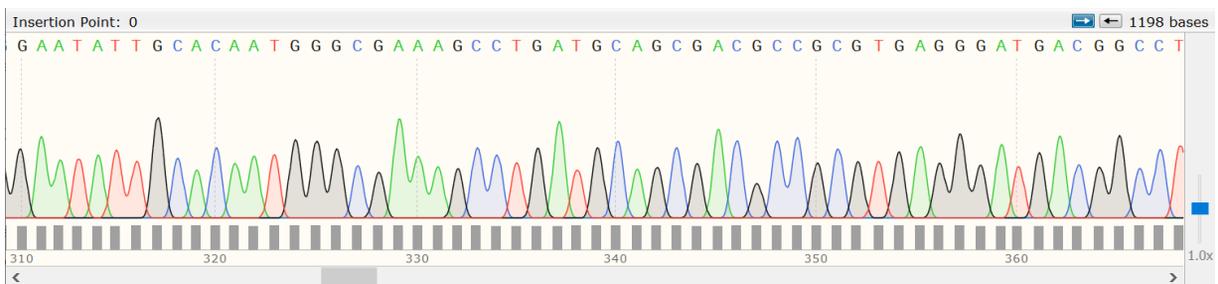
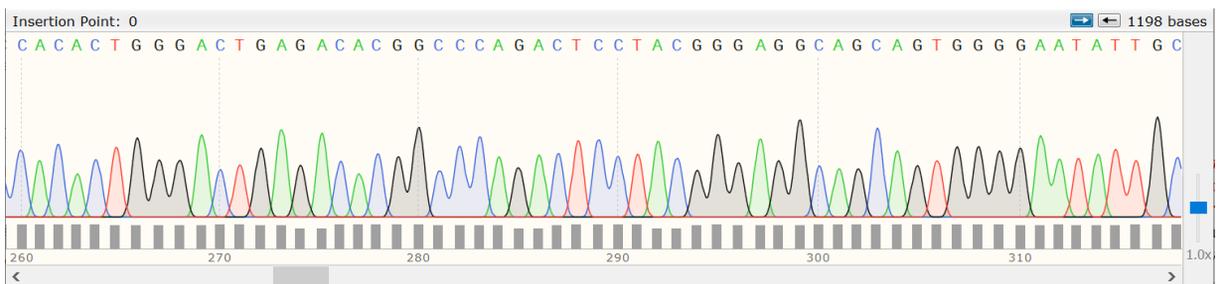
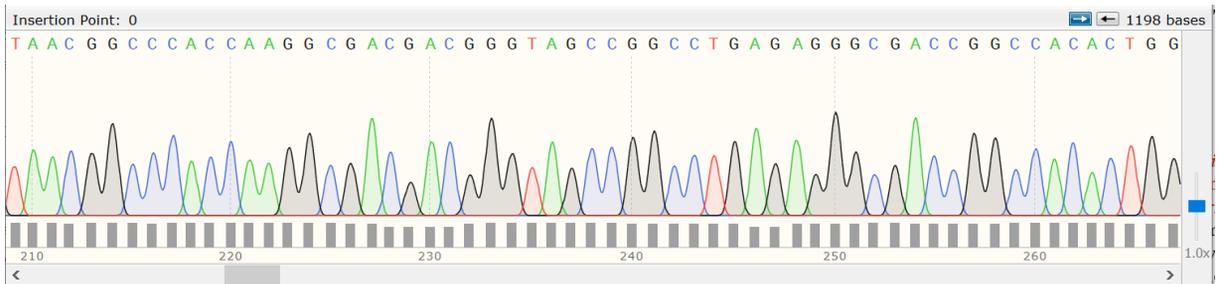
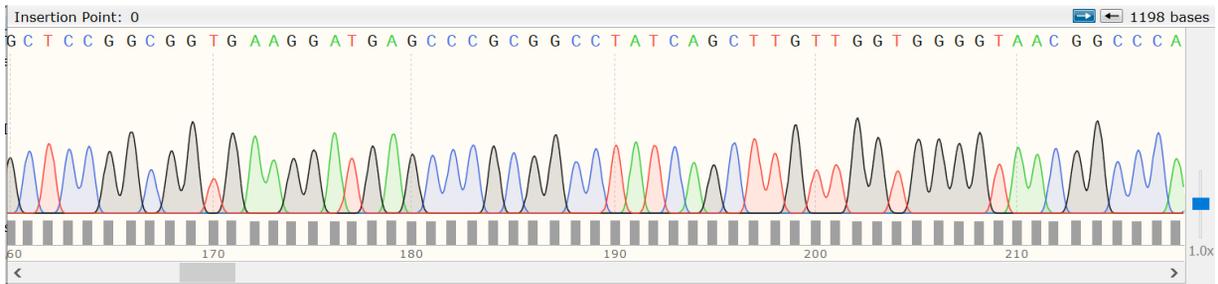
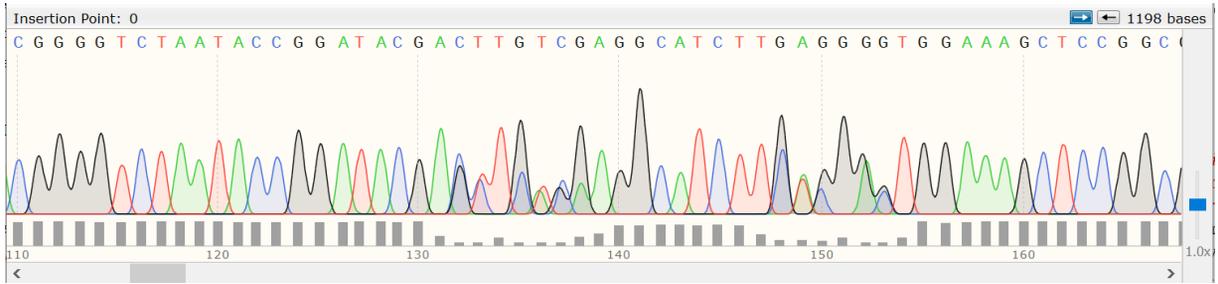


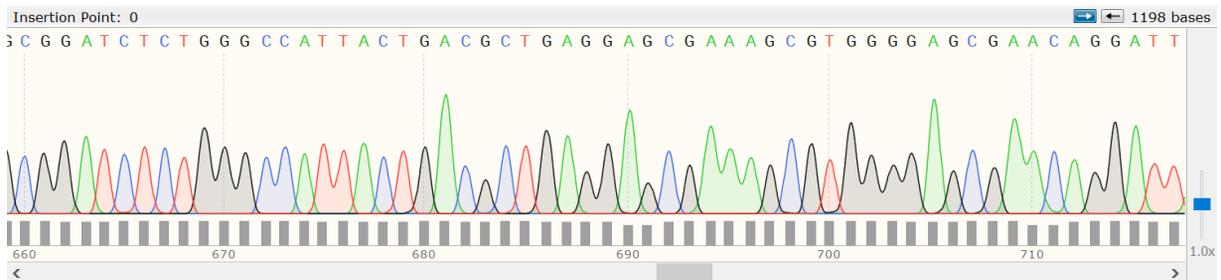
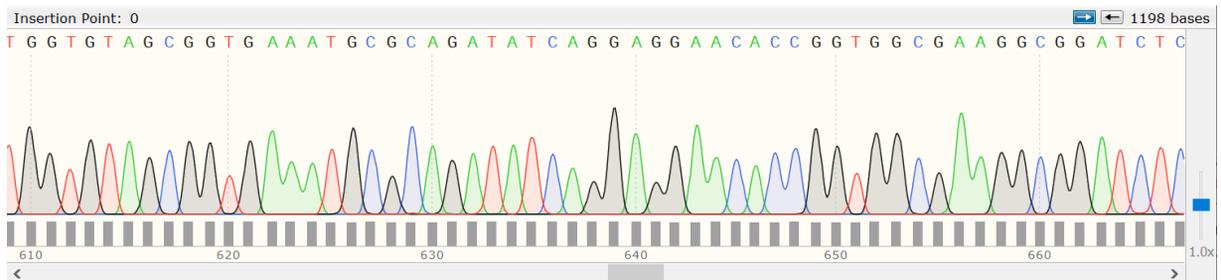
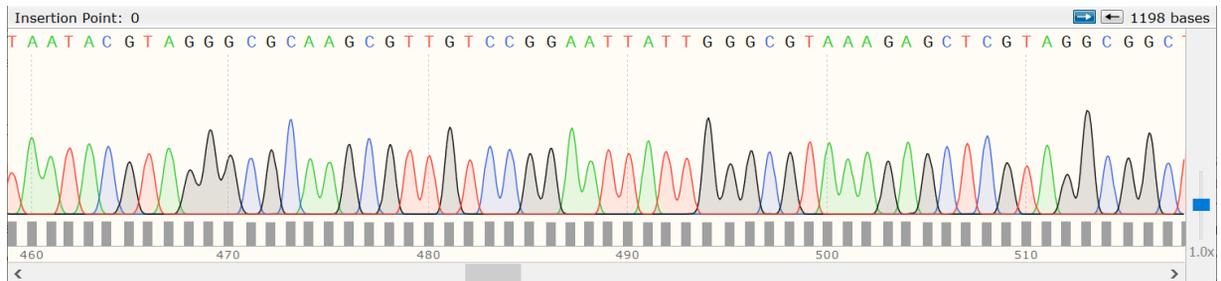
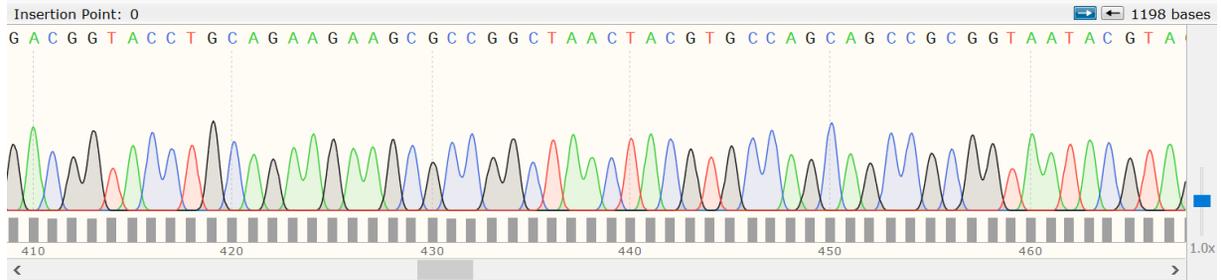
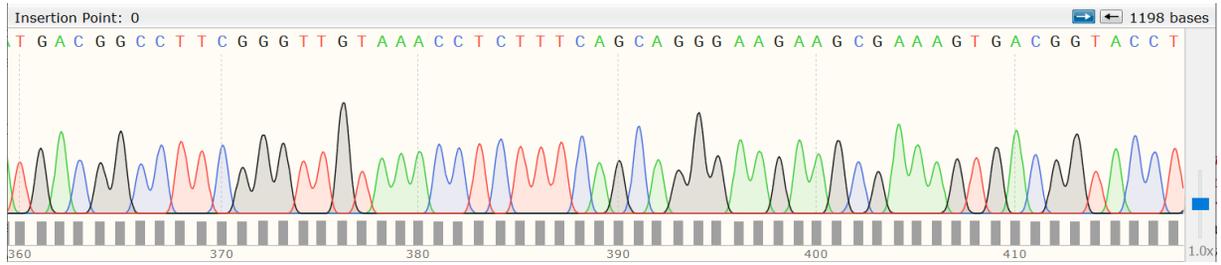


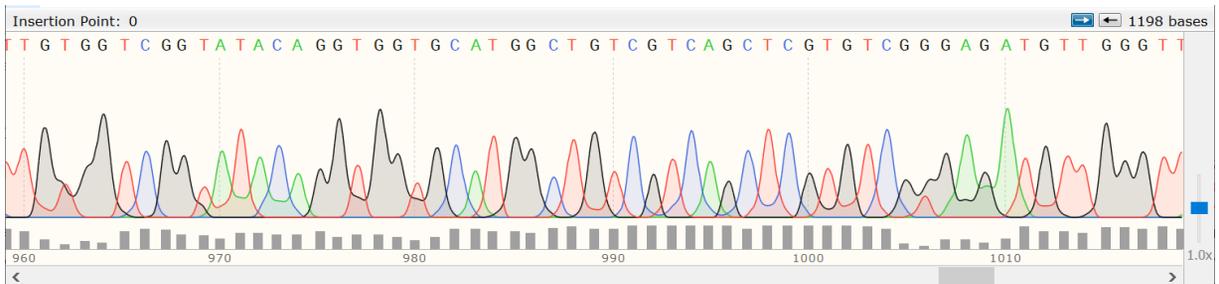
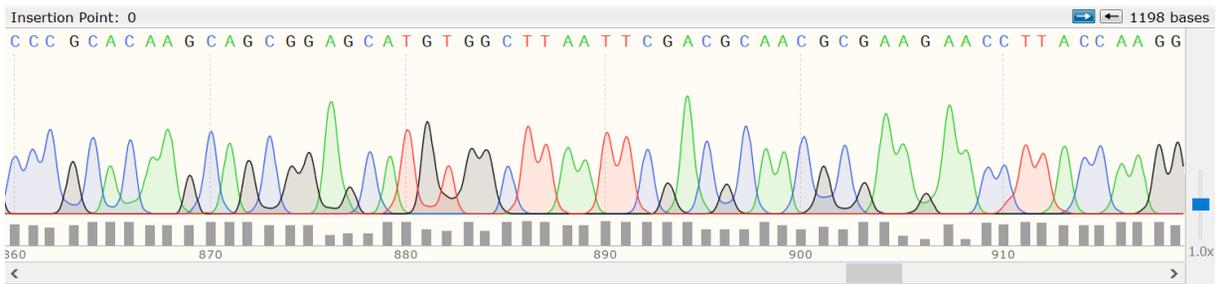
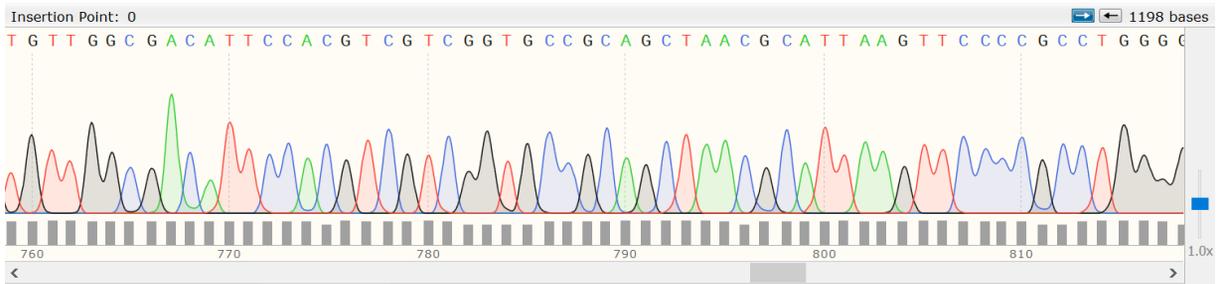
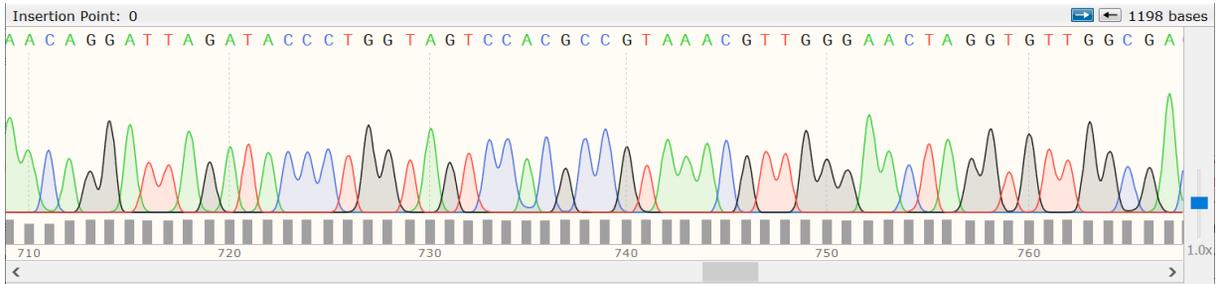
**B. Kết quả phổ giải trình tự chủng LD5.4**

**B.1. Phổ giải trình tự bằng môi 20F**











**B.2. Phổ giải trình tự bằng môi 1500R**

