

Đánh giá khả năng kháng một số nấm bệnh thực vật của chủng xạ khuẩn *Streptomyces murinus* XKH6 phân lập từ đất trồng nghệ tại Hưng Yên

Chu Thanh Bình^{1*}, Nguyễn Việt Hà^{2,3}, Nguyễn Hữu Thắng^{2,3}, Đào Ngọc Ánh², Trần Bảo Trâm²

¹Viện Y học Dự phòng Quân đội, 21 Trung Liệt, phường Trung Liệt, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Trung tâm Sinh học thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, C6, phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

³Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 30/7/2024; ngày chuyển phân biện 2/8/2024; ngày nhận phân biện 16/8/2024; ngày chấp nhận đăng 19/8/2024

Tóm tắt:

Xạ khuẩn *Streptomyces* được đánh giá có hoạt tính kháng nhiều loài vi nấm gây bệnh cây trồng. Các loài xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* thường được ứng dụng tạo chế phẩm sinh học dùng kiểm soát bệnh hại trong nông nghiệp. Trong bài báo này, từ 6 chủng xạ khuẩn phân lập từ đất trồng nghệ tại Hưng Yên đã lựa chọn được chủng xạ khuẩn XKH6 có hoạt tính kháng đồng thời 5 loài nấm bệnh thực vật gồm *Penicillium digitatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* và *Aspergillus flavus*. Đặc biệt, dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn XKH6 kiểm soát 100% khả năng gây bệnh của 3 loài nấm *P. digitatum*, *C. gloeosporioides*, *A. niger* khi lây nhiễm nhân tạo trên quả cam và táo. Chủng XKH6 được định danh thuộc loài *Streptomyces murinus* dựa vào đặc điểm về hình thái và phân tích trình tự gen 16S rRNA. XKH6 có độ tương đồng là 100% khi so sánh trên GenBank. Chủng *S. murinus* XKH6 có triển vọng trong phát triển chế phẩm vi sinh kiểm soát *P. digitatum*, *A. niger*, *C. gloeosporioides* gây bệnh cây trồng.

Từ khóa: *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides*, đối kháng, *P. digitatum*, *Streptomyces murinus*, xạ khuẩn.

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.6

Assessment of the antifungal activity against plant pathogens of the *Streptomyces murinus* XKH6 strain isolated from soil growing *Curcuma longa* in Hung Yen province

Thanh Binh Chu^{1*}, Viet Ha Nguyen^{2,3}, Huu Thang Nguyen^{2,3}, Ngoc Anh Dao², Bao Tram Tran²

¹Military Institute of Preventive Medicine, 21 Trung Liet Street, Trung Liet Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

²Center for Experimental Biology, National Center for Technological Progress, C6, Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

³Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trãi Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 30 July 2024; revised 16 August 2024; accepted 19 August 2024

Abstract:

Streptomyces are evaluated to have strong antagonistic abilities against many species of plant pathogenic fungi. Species of the *Streptomyces* genus are commonly applied in the creation of biological products used in the control of agricultural diseases. In this article, from 6 actinomycete strains isolated from turmeric-growing soil in Hung Yen province, the XKH6 strain was selected for its simultaneous antifungal activity against five plant pathogenic fungi: *Penicillium digitatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, and *Aspergillus flavus*. Notably, the broth cultures of the XKH6 strain 100% effectively controlled the *P. digitatum*, *C. gloeosporioides*, and *A. niger* on artificial infection of orange and apple. Based on morphological characteristics and 16S rRNA sequence, the XKH6 strain was identified as belonging to the species *Streptomyces murinus*. XKH6 has 100% similarity with *S. murinus* on GenBank. The *S. murinus* XKH6 strain has the potential for application in the development of biological products for the control of the *P. digitatum*, *C. gloeosporioides*, and *A. niger* that cause crop diseases.

Keywords: actinomycete, antagonistic, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *P. digitatum*, *Streptomyces murinus*.

Classification numbers: 1.6, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: chuthanhbinhvn@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Nấm là một trong những tác nhân gây bệnh nghiêm trọng ở thực vật. Bào tử các loài nấm bệnh thường được phát tán nhờ gió, nước hoặc côn trùng, sau đó bám vào bề mặt của cây. Khi điều kiện thuận lợi, chu kỳ lây nhiễm của nấm gây bệnh thực vật bắt đầu bằng sự nảy mầm của bào tử và hình thành hệ sợi nấm. Hệ sợi nấm phát triển dọc theo bề mặt cây chủ, chúng tiết enzyme phá hủy cấu trúc tế bào thực vật và xâm nhiễm gây ra các triệu chứng bệnh khác nhau [1]. Nhiều loài nấm đã được ghi nhận là tác nhân gây bệnh nghiêm trọng trên các loại cây trồng khác nhau. Trên cây có múi, *Penicillium digitatum* và *Colletotrichum gloeosporioides* là hai loài nấm gây bệnh phổ biến. *P. digitatum* là loài nấm gây bệnh mốc xanh và thối rụng quả trên cây có múi. Nấm *Colletotrichum* cũng được ghi nhận là tác nhân gây khô cành, khô cuống quả, thối cuống quả rụng quả trên cây có múi [2, 3]. *Aspergillus niger* là một trong số các nguyên nhân phổ biến gây thối hồng táo ở cả hai giai đoạn trước và sau thu hoạch, gây tổn thất lớn về kinh tế [4, 5]. *Aspergillus flavus* là loài nấm gây mốc hồng nông sản phổ biến, chúng có khả năng sinh độc tố aflatoxin gây ung thư [6]. *Fusarium oxysporum* là tác nhân gây bệnh héo rũ trên nhiều loài thực vật, loài nấm này thường xâm nhiễm vào rễ cây trồng [7]...

Nhằm kiểm soát các nấm bệnh gây hại thực vật, nông dân thường sử dụng các loại thuốc hóa học. Tuy nhiên, việc lạm dụng các loại thuốc bảo vệ thực vật hóa học có thể gây ra một số hệ quả trong nông nghiệp, tác động xấu tới môi trường và đặc biệt tạo ra nhiều nguy cơ tiềm ẩn về sức khỏe cho con người. Do vậy, việc phát triển các chế phẩm sinh học dùng trong kiểm soát bệnh hại trên cây trồng nhằm hướng tới nền nông nghiệp xanh đang được quan tâm nghiên cứu. Nhiều loài xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* được sử dụng trong kiểm soát sinh học đối với các loại nấm bệnh trong nông nghiệp. Các loài xạ khuẩn này có khả năng tiết các chất chuyển hóa thứ cấp như kháng sinh hay một số độc tố có hoạt tính ức chế sinh trưởng, ngăn chặn hoặc tiêu diệt các loài vi sinh vật khác [8]. Đây là cơ chế chính trong việc kiểm soát các loài vi nấm gây bệnh trên thực vật của xạ khuẩn *Streptomyces*. Việc tìm kiếm các chủng xạ khuẩn có khả năng kiểm soát các loài vi nấm gây bệnh thực vật phục vụ nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học là cần thiết. Các kết quả bước đầu của nghiên cứu này cho thấy tiềm năng ứng dụng chủng xạ khuẩn *Streptomyces murinus* XKH6 phân lập từ đất trồng nghệ trong kiểm soát nhiều loài vi nấm gây bệnh trên thực vật, đặc biệt với một số vi nấm gây hỏng quả sau thu hoạch.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Các mẫu đất vùng rễ cây nghệ vàng (*Curcuma longa*) sinh trưởng tốt, trồng tại huyện Khoái Châu, tỉnh Hưng Yên được thu thập sử dụng để phân lập các chủng xạ khuẩn.

Chủng nấm *P. digitatum* PdVN1, *C. gloeosporioides* HGC201, *A. niger* N402, *F. oxysporum* SH01, *A. flavus* NRRL3357 gây bệnh trên thực vật, được cung cấp bởi Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ.

Quả cam V2 (Việt Nam) và táo Gala (Canada) được mua tại một siêu thị ở Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập xạ khuẩn từ mẫu đất thu thập

Mẫu đất được thu cách mặt đất 10-15 cm và lấy khoảng 100 g đất xung quanh vùng rễ của các cây nghệ khỏe mạnh, phát triển tốt. Mẫu đất được bảo quản trong túi nilon vô trùng, ghi đầy đủ các thông tin về mẫu. 10 g đất được đưa vào bình tam giác đựng 90 ml nước cất vô trùng, lắc 250 vòng/phút trong 1-2 giờ thu được dung dịch 10^{-1} , dung dịch tiếp tục được pha loãng đến nồng độ 10^{-5} . Các mẫu dịch pha loãng được cấy trên môi trường ISP4 có bổ sung cyclohexamide và nystatin (60 $\mu\text{g/ml}$) để ức chế vi khuẩn gram âm và nấm. Các đĩa được nuôi ở 26-28°C trong thời gian 5-7 ngày [9]. Các khuẩn lạc xạ khuẩn xuất hiện được thuần khiết để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2.2. Phương pháp thu bào tử nấm gây bệnh thực vật

Các chủng nấm *P. digitatum* PdVN1, *C. gloeosporioides* HGC201, *A. niger* N402, *F. oxysporum* SH01, *A. flavus* NRRL3357 được nuôi cấy trên môi trường Potato dextrose agar (PDA) trong 5 ngày ở 25-28°C để tiến hành thu dịch bào tử theo quy trình của K.T. Nguyen và cs (2016) [10]. Mật độ bào tử được xác định trên buồng đếm Thoma và sau đó được pha loãng về 10^6 bào tử/ml để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.3. Xác định hoạt tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn phân lập bằng phương pháp đặt thoi thạch và khuếch tán trên đĩa thạch

Để sàng lọc nhanh các chủng xạ khuẩn có khả năng kháng nấm bệnh, các thoi thạch xạ khuẩn (đường kính 9 mm, xạ khuẩn được nuôi trên môi trường ISP4 trong 3 ngày) được đặt trên bề mặt đĩa môi trường PDA đã cấy trái 50 μl dịch bào tử nấm (10^6 bào tử/ml). Các đĩa thử được ủ ở nhiệt độ 25-28°C (nhiệt độ mà chủng nấm bệnh sinh trưởng tốt) trong 3-5 ngày. Đường kính vòng kháng nấm = $D - d$; trong đó: D là đường kính vòng kháng (vòng không có nấm sinh trưởng); d là đường kính thoi thạch [11].

Để xác định khả năng kháng nấm bệnh của dịch nuôi xạ khuẩn, chủng xạ khuẩn đã lựa chọn được nuôi lắc trong môi trường MT2, lắc 200 vòng/phút ở 30°C. Dịch nuôi sau 7 ngày được tiến hành ly tâm 12000 vòng/phút (10 phút), loại bỏ sinh khối và thu phần dịch trong (dịch thu được sử dụng cho thí nghiệm đánh giá khả năng kháng nấm bệnh trên mô hình lây nhiễm nấm bệnh nhân tạo cho quả và khuếch tán trên thạch). 50 μl dịch sau ly tâm được bổ sung vào mỗi giếng trên đĩa môi trường PDA đã cấy 50 μl dịch bào tử nấm (10^6 bào tử/ml).

Khả năng kháng nấm được xác định sau 5 ngày ủ ở 25-28°C. Đường kính vòng kháng nấm = D - d trong đó: D là đường kính vòng kháng (vòng không có nấm sinh trưởng); d là đường kính giếng thạch [11].

2.2.4. *Xác định khả năng kiểm soát P. digitatum, C. gloeosporioides gây bệnh trên quả cam và A. niger gây bệnh trên quả táo của dịch nuôi chủng xạ khuẩn tuyển chọn*

Quá trình đánh giá khả năng kiểm soát nấm bệnh trên mô hình quả được tiến hành theo T.X. Vu và cs (2023) [2]. Quả cam và táo được làm sạch bằng nước cất vô trùng và ethanol 70%, sau đó để khô tự nhiên trong vòng 2-3 giờ ở nhiệt độ phòng. Cam và táo được tạo vết thương xâm nhiễm bằng tăm nhọn vô trùng (vết thương xâm nhiễm có kích thước dài 10 mm và sâu 2 mm). Chủng nấm *P. digitatum* PdVN1, *C. gloeosporioides* HGC201 được sử dụng cho thí nghiệm lây nhiễm trên cam, *A. niger* N402 được sử dụng cho thí nghiệm lây nhiễm trên táo. Thí nghiệm được chia làm 2 nhóm: nhóm lây nhiễm nấm và nhóm không lây nhiễm nấm. Trong mỗi nhóm có 3 lô thí nghiệm: ở lô thí nghiệm 1, quả được ngâm trong nước cất vô trùng; lô thí nghiệm 2, quả được ngâm trong dịch nuôi xạ khuẩn và lô thí nghiệm 3, quả được ngâm trong mancozeb 0,25% trong 30 phút và để khô tự nhiên. Nhóm lây nhiễm nấm: các vết thương đã tạo trên vỏ quả được nhiễm 10 µl dịch bào tử nấm bệnh (nồng độ 10⁶ bào tử/ml). Thí nghiệm được bố trí trong hộp kín vô trùng ở 25°C. Quan sát, chụp ảnh và xác định tỷ lệ quả bị thối hỏng hoặc không thối hỏng ở các lô thí nghiệm để đánh giá khả năng kháng nấm của dịch nuôi xạ khuẩn sau 5-7 ngày. Mỗi lô thí nghiệm gồm 10 quả và lặp lại 3 lần.

2.2.5. Phương pháp định danh chủng XKH6

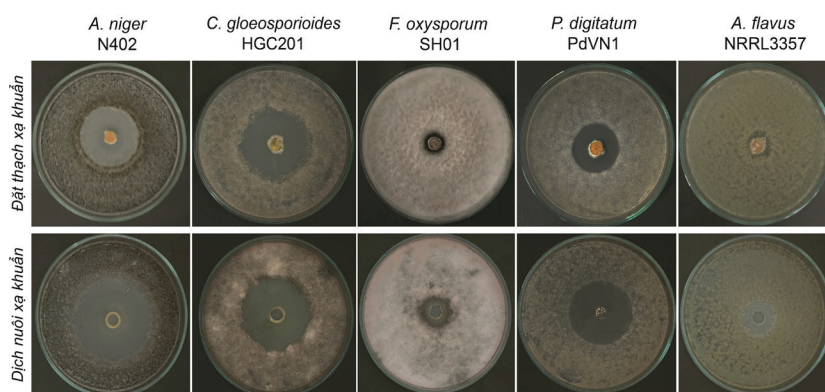
Chủng XKH6 được xác định đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên đĩa môi trường ISP4. Đặc điểm hệ sợi được xác định bằng cách đặt lamên nghiêng một góc 45° với bề mặt môi trường và vuông góc với đường cấy, sau 5 ngày ở nhiệt độ 26-28°C, lamên được quan sát dưới kính hiển vi. Ngoài các đặc điểm hình thái, chủng xạ khuẩn XKH6 được định danh dựa trên trình tự 16S rRNA. Chủng XKH6 được tách chiết DNA theo quy trình của V.T. Tran và cs (2017) [12]. Mẫu DNA được sử dụng để khuếch đại trình tự 16S rRNA của chủng XKH6 bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho trình tự 16S rRNA là fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')/rP1 (5'-ACGGTTACCTTGTTACG ACTT-3') [13]. Sản phẩm sau xét nghiệm sinh học phân tử (PCR) được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose (0,7%) và tiến hành tinh sạch bằng bộ kit của hãng Promega. Sản phẩm sau tinh sạch được giải trình tự bởi Công ty 1st BASE. Phân tích và so sánh trình tự gen thu được với các trình tự trong cơ sở dữ liệu của GenBank và xây dựng cây phát sinh loài sử dụng chương trình MEGA6 [14].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập, tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng kháng một số nấm bệnh thực vật

Nghiên cứu đã tiến hành thu thập các mẫu đất vùng rễ cây nghệ vàng sinh trưởng tốt trồng tại Khoái Châu, Hưng Yên và từ đó đã phân lập được 6 chủng xạ khuẩn. Khảo sát hoạt tính kháng nấm *A. niger*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *P. digitatum* và *A. flavus* bằng phương pháp đặt thoi thạch cho thấy, chủng XKH6 có khả năng kháng cả 5 loài nấm bệnh nghiên cứu với kích thước vòng kháng trung bình đạt tương ứng là 30, 33, 4, 20, 5 mm. Hơn nữa, dịch nuôi chủng xạ khuẩn XKH6 trên môi trường MT2 sau 7 ngày cũng thể hiện hoạt tính kháng cả 5 loài nấm bệnh, trong đó thể hiện hoạt tính kháng mạnh nhất đối với nấm bệnh *A. niger*, *C. gloeosporioides* và *P. digitatum* với kích thước vòng kháng trung bình đạt tương ứng là 40, 35, 30 mm (hình 1).

Việc tìm kiếm, đánh giá khả năng kháng nấm bệnh trên cây trồng của các chủng xạ khuẩn nhằm phát triển các biện pháp hiệu quả trong kiểm soát bệnh hại nông nghiệp luôn được các nhóm nghiên cứu trên thế giới cũng như ở Việt Nam quan tâm. Nhóm nghiên cứu của X.F. Li và cs (2020) [15] đã xác định được khả năng kháng nấm *F. oxysporum* của các chủng xạ khuẩn được phân lập từ đất vùng rễ cây mướp đắng *Momordica charantia* trồng tại Trung Quốc. Việc ứng dụng chủng xạ khuẩn này đã thúc đẩy sự tăng trưởng và phát triển của rễ và thân, đồng thời cải thiện năng suất mướp đắng ngoài đồng ruộng [15]. W. Shen và cs (2024) [16] đã tuyển chọn được chủng xạ khuẩn *S. graminearum* STR-1 từ đất vùng rễ cây lúa có khả năng kháng đồng thời các vi nấm gây bệnh thực vật *Magnaporthe oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *F. graminearum*, *Ustilaginoidea virens* và *Bipolaris maydis*. B.T. Tran và cs (2021) [11] đã phân lập, tuyển chọn được chủng xạ khuẩn *S. albulus* XK1 từ đất vùng rễ cây cam có hoạt tính kháng nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* gây bệnh thối rụng quả trên cây cam. Chủng xạ khuẩn *S. albulus* XK1 được đánh giá tiềm năng cho phát triển chế phẩm sinh học kiểm soát vi nấm gây bệnh thối rụng quả trên cây có múi [11]. Như vậy, kết quả đánh giá sơ bộ cho thấy, chủng XKH6 kháng mạnh 3 loài nấm *P. digitatum*, *C. gloeosporioides* và *A. niger*, đây là căn cứ khoa học quan trọng để định hướng ứng dụng



Hình 1. Khả năng kháng một số vi nấm gây bệnh thực vật của chủng xạ khuẩn XKH6.

chúng xạ khuẩn XKH6 trong nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ nấm bệnh hại cây trồng.

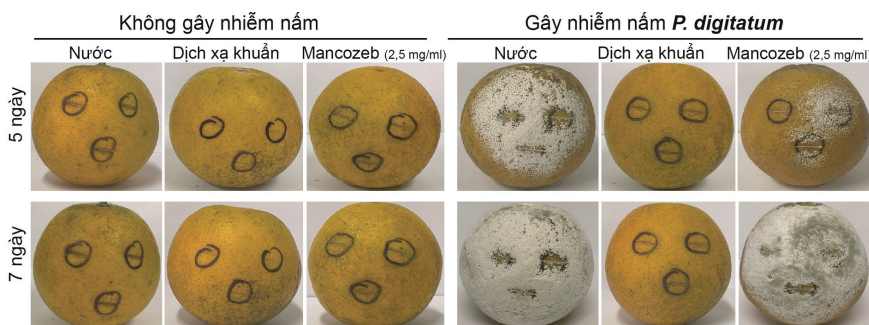
3.2. Khả năng kiểm soát nấm *P. digitatum*, *C. gloeosporioides* gây bệnh trên cam và nấm *A. niger* gây bệnh trên táo của dịch nuôi chủng xạ khuẩn XKH6

Nấm *P. digitatum* đã được nhiều nghiên cứu ghi nhận là nguyên nhân gây bệnh thối mốc xanh, nấm *C. gloeosporioides* là tác nhân gây thối cuống quả gây rụng quả trên cây có múi [2]; *A. niger* là một trong số các loài nấm gây thối hồng táo ở cả hai giai đoạn trước và sau thu hoạch [4, 5]. Dịch nuôi sau ly tâm của chủng XKH6 có hoạt tính kháng với *P. digitatum*, *C. gloeosporioides* và *A. niger* khi thử nghiệm trên môi trường thạch PDA. Việc đánh giá hoạt tính kháng các loài nấm này trên quả là rất cần thiết để định hướng sử dụng chủng XKH6 để tạo chế phẩm phòng trừ bệnh do 3 loài vi nấm trên gây ra trên nông sản.

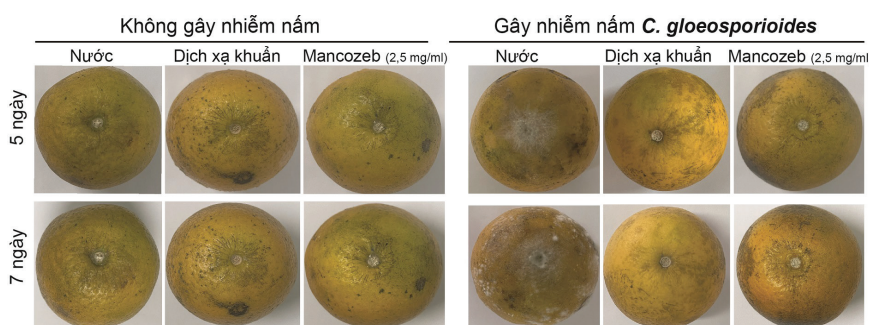
Nghiên cứu tiến hành đánh giá khả năng kiểm soát *P. digitatum* gây thối mốc xanh trên quả cam của dịch nuôi cây chủng XKH6. Sau 5-7 ngày, ở nhóm thí nghiệm không lây nhiễm bào tử nấm *P. digitatum* cho thấy, cam được ngâm với nước cất, dịch nuôi cây chủng XKH6 và dung dịch Mancozeb (2,5 mg/ml) không xuất hiện hiện tượng mốc (100% số cam thử nghiệm không xuất hiện nấm mốc gây hỏng thối quả). Như vậy, nước cất, dịch nuôi cây chủng XKH6 và dung dịch Mancozeb không làm ảnh hưởng tới cam. Ở nhóm thí nghiệm có lây nhiễm bào tử nấm *P. digitatum*, 100% số cam được ngâm với nước cất đã xuất hiện thối mốc sau 5 ngày và sau 7 ngày toàn bộ bề mặt cam đã bị thối mốc. Ở mẫu cam ngâm với dung dịch Mancozeb (2,5 mg/ml) và có lây nhiễm nấm *P. digitatum*, cam cũng đã xuất hiện hiện tượng thối mốc, tuy nhiên quá trình thối mốc chậm hơn so với mẫu cam xử lý với nước cất. Mancozeb là thuốc hóa học diệt nấm hại trong nông nghiệp, loại thuốc này đã có những nghiên cứu ghi nhận những ảnh hưởng nhất định tới sức khỏe con người [17]. Trong khi đó, cam được ngâm với dịch nuôi cây chủng XKH6 không bị thối mốc (100% số cam thử nghiệm đều không bị thối mốc) (hình 2). Từ đó cho thấy, dịch nuôi cây chủng XKH6 có khả năng kiểm soát hiệu quả sự gây bệnh của nấm *P. digitatum* trên cam sau thu hoạch.

Tương tự, khi đánh giá khả năng kiểm soát nấm *C. gloeosporioides* gây bệnh thối cuống quả cam cho thấy, dịch nuôi chủng XKH6 có khả năng kiểm soát hiệu quả nấm *C. gloeosporioides*. Sau 5-7 ngày gây nhiễm nấm *C. gloeosporioides* trên lô quả cam được xử lý với dịch nuôi chủng xạ khuẩn XKH6 và dung dịch Mancozeb không thấy xuất hiện triệu chứng bệnh cũng như sự sinh trưởng của nấm *C. gloeosporioides*. Trong khi đó sau 5-7 ngày, 100% số quả cam tại lô xử lý với nước cất, nấm *C. gloeosporioides* đã sinh trưởng gây thối từ phần cuống quả và lan rộng vị trí thối trên quả (hình 3). Dịch nuôi chủng xạ khuẩn XKH6 hoàn toàn có thể thay thế thuốc diệt nấm hóa học Mancozeb trong kiểm soát nấm *C. gloeosporioides*.

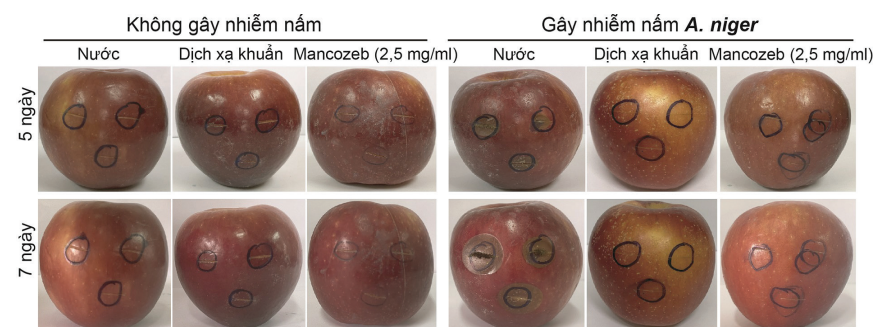
Dịch nuôi cây chủng XKH6 cũng thể hiện khả năng kiểm soát hiệu quả nấm *A. niger* gây bệnh thối hồng táo. Ở lô thí nghiệm lây nhiễm nấm *A. niger*, táo được ngâm với dịch nuôi cây chủng XKH6 không bị thối hồng do nấm *A. niger* gây ra (100% số quả táo thử nghiệm không xuất hiện vết thối) (hình 4). Khả năng kiểm soát hiệu quả các loài nấm



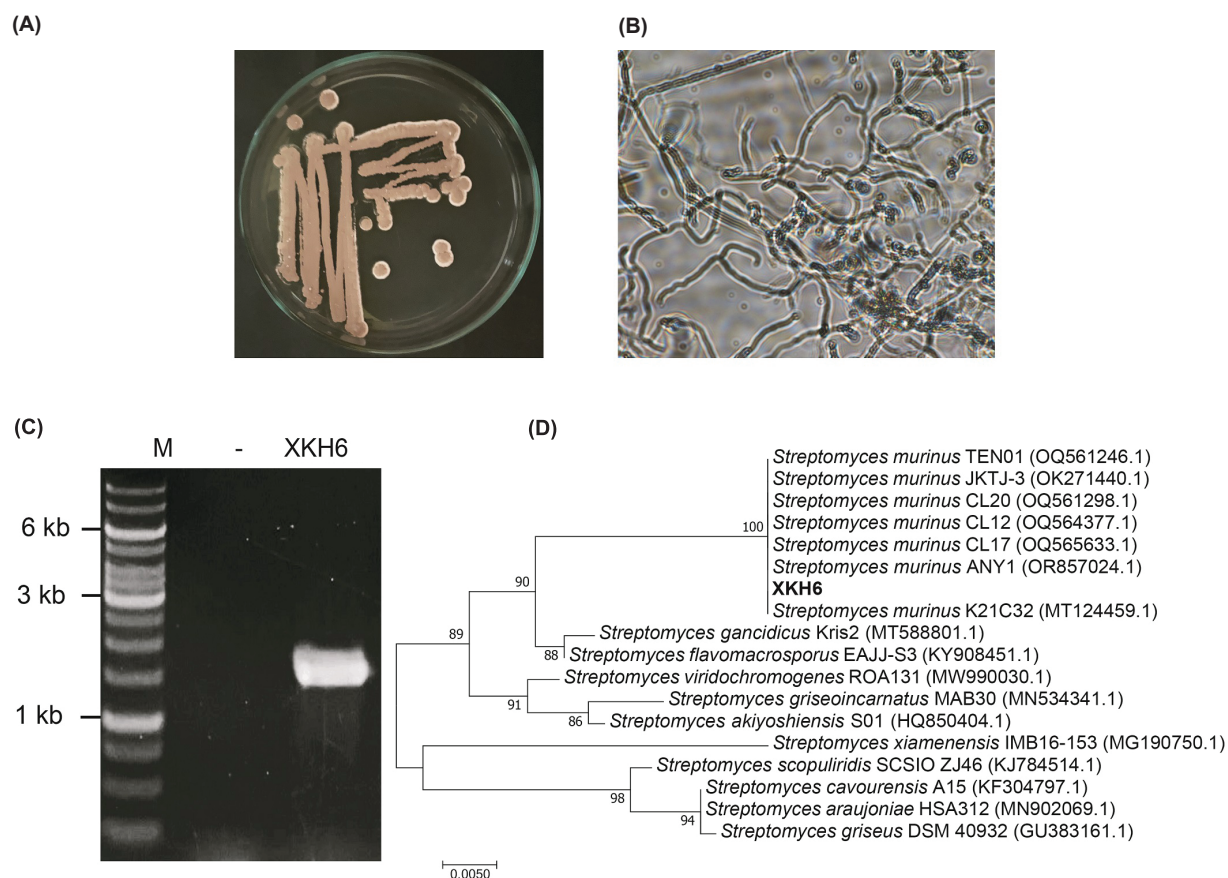
Hình 2. Hoạt tính kháng nấm *P. digitatum* của dịch nuôi chủng XKH6 trên quả cam.



Hình 3. Hoạt tính kháng nấm *C. gloeosporioides* của dịch nuôi chủng XKH6 trên quả cam.



Hình 4. Hoạt tính kháng nấm *A. niger* của dịch nuôi chủng XKH6 trên quả táo.



Hình 5. Định danh chủng XKH6. (A) Hình thái khuẩn lạc trên môi trường ISP4; (B) Khuẩn ty và cấu trúc sinh bào tử; (C) Kết quả điện di sản phẩm PCR; (D) Cây phát sinh chủng loại; M: marker (1 kb).

bệnh *P. digitatum*, *C. gloeosporioides* và *A. niger* có thể do chủng xạ khuẩn XKH6 đã sinh tổng hợp các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp như kháng sinh, một số độc tố... có khả năng diệt nấm [8]. Việc sử dụng xạ khuẩn để phòng trừ vi nấm *P. digitatum*, *C. gloeosporioides* và *A. niger* gây bệnh trên cây trồng tại Việt Nam chưa có nhiều. Trong khi đó, các loài nấm này là tác nhân gây bệnh cây trồng rất phổ biến. Với các kết quả thu được về khả năng kiểm soát hiệu quả nấm *P. digitatum*, *C. gloeosporioides* và *A. niger* trên môi trường thạch và trên mô hình quả của dịch nuôi XKH6 cho thấy, chủng XKH6 có tiềm năng để tạo chế phẩm phòng trừ nấm bệnh thực vật.

3.3. Định danh chủng XKH6

Để có thể sử dụng chủng xạ khuẩn XKH6 trong sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng trong nông nghiệp thì việc định danh chính xác chủng XKH6 là cần thiết. Trên môi trường ISP4, chủng XKH6 hình thành khuẩn lạc lồi, đường kính khuẩn lạc từ 3-3,5 mm (sau 3-5 ngày), khuẩn lạc có các nếp nhăn, từ màu trắng chuyển sang màu nâu... Khi quan sát tiêu bản dưới kính hiển vi, chủng XKH6 hình thành khuẩn ty cơ chất phân nhánh. Khuẩn ty khí sinh hình thành cuống sinh bào tử, chuỗi bào tử dạng lượn sóng (hình 5A). Đây là những đặc điểm điển hình của chi xạ khuẩn *Streptomyces* [18].

Kết quả PCR khuếch đại trình tự 16S rRNA của chủng XKH6 sử dụng cặp môi fD1/rP1 cho một băng DNA duy nhất (khoảng 1500 bp) (hình 5C). Sản phẩm sau PCR được tinh sạch, giải trình tự, so sánh với dữ liệu trên GenBank và sử dụng phần mềm MEGA6 để xây dựng cây phát sinh loài cho thấy, chủng XKH6 được định danh là *Streptomyces murinus* XKH6 (trình tự 16S rRNA có độ tương đồng là 99,9%) (hình 5D).

Xạ khuẩn *S. murinus* đã được ghi nhận có khả năng kháng nhiều loài nấm bệnh thực vật. B. Dhillon và cs (2023) [19] đã giải và phân tích trình tự toàn bộ hệ gen của loài xạ khuẩn *S. murinus*. Bộ gen được xác định có kích thước 8,3 Mb, với hàm lượng GC 71,96% và chứa 37 cụm chất chuyển hóa thứ cấp (SMC). Trong các chất chuyển hóa thứ cấp, nghiên cứu đã xác định chủng *S. murinus* sinh chất kháng nấm pentamycin (fungichromin) và do sự quy định của gen SPC1 [19]. M. Ge và cs (2023) [20] đã cho thấy tiềm năng của loài xạ khuẩn *S. murinus* trong phát triển chế phẩm kiểm soát nấm *Pythium aphanidermatum* gây bệnh hại dưa hấu. Tại Việt Nam, các nghiên cứu về loài xạ khuẩn *S. murinus* không có nhiều. T.T.T. Nguyen và cs (2022) [21] đã phân lập và tuyển chọn được chủng *S. murinus* kháng nấm *C. acutatum* gây bệnh thán thư trên thanh long. Chưa ghi nhận nghiên cứu nào đề cập tới khả năng kháng nấm *P. digitatum*, *C. gloeosporioides*, *A. niger*, *F. oxysporum* và *A. flavus* của xạ khuẩn *S. murinus*, đặc biệt là khả năng kiểm soát nấm

P. digitatum, *C. gloeosporioides* và *A. niger* trên mô hình quả. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở quan trọng để sử dụng chủng xạ khuẩn *S. murinus* XKH6 trong sản xuất chế phẩm phòng trừ vi nấm hại cây trồng.

4. Kết luận

Chủng xạ khuẩn XKH6 được phân lập và tuyển chọn từ đất vùng rễ cây nghệ trồng ở Hưng Yên có khả năng kháng các loài nấm bệnh thực vật gồm *A. niger*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *P. digitatum* và *A. flavus* với kích thước vòng kháng nấm xác định theo phương pháp đặt thạch đạt trung bình tương ứng là 30, 33, 4, 20, 5 mm. Đặc biệt, dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn XKH6 có khả năng kiểm soát hoàn toàn sự gây bệnh của 3 loài nấm *P. digitatum*, *C. gloeosporioides*, *A. niger* trên mô hình lây nhiễm nấm bệnh nhân tạo ở quả cam và táo. Chủng XKH6 được định danh thuộc loài *Streptomyces murinus* dựa trên một số đặc điểm về hình thái và phân tích trình tự gen 16S rRNA. Chủng *S. murinus* XKH6 có triển vọng trong phát triển chế phẩm vi sinh dùng trong kiểm soát nấm bệnh *P. digitatum*, *A. niger*, *C. gloeosporioides* trên cây trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] G. Doehlemann, B. Ökmen, W. Zhu, et al. (2017), "Plant pathogenic fungi", *Microbiology Spectrum*, **5**(1), pp.1-23, DOI: 10.1128/microbiolspec.funk-0023-2016.

[2] T.X. Vu, T.B. Tran, M.B. Tran, et al. (2023), "Efficient control of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium digitatum* infecting citrus fruits by native soilborne *Bacillus velezensis* strains", *Heliyon*, **9**(2), pp.1-11, DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e13663.

[3] R. Kaur, H. Rewal, A. Sethi (2007), "Pre-harvest stem-end rot in citrus cultivars due to *Colletotrichum gloeosporioides*", *European Journal of Horticultural Science*, **72**(1), pp.20-25.

[4] Y. Zheng, X. Jia, Y. Ran, et al. (2022), "Inhibition effect of *Aspergillus niger* and quality preservation of apple by in-package sterilization medium flow of circulating", *Scientia Horticulturae*, **293**, DOI: 10.1016/j.scienta.2021.110708.

[5] J.R.A. Obaidi, N. Rahmad, N.M. Hanafi (2023), "*Aspergillus niger* causing fruit rot disease on rose apple in Malaysia", *New Disease Reports*, **48**(1), pp.1-2, DOI: 10.1002/ndr2.12216.

[6] L. Antiga, S.R.L. Starza, C. Miccoli, et al. (2020), "*Aspergillus flavus* Exploits maize kernels using an "orphan" secondary metabolite cluster", *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(21), pp.1-17, DOI: 10.3390/ijms21218213.

[7] Y.C. Chen, C.L. Wong, F. Muzzi, et al. (2014), "Root defense analysis against *Fusarium oxysporum* reveals new regulators to confer resistance", *Scientific Reports*, **4**(1), pp.1-10, DOI: 10.1038/srep05584.

[8] M.E. Hibbing, C. Fuqua, M.R. Parsek, et al. (2010), "Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle", *Nature Reviews Microbiology*, **8**(1), pp.15-25, DOI: 10.1038/nrmicro2259.

[9] A.K. Passari, V.K. Mishra, R. Saikia, et al. (2015), "Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their *in vitro* antimicrobial biosynthetic potential", *Frontiers in Microbiology*, **6**, pp.1-13, DOI: 10.3389/fmicb.2015.00273.

[10] K.T. Nguyen, Q.N. Ho, T.H. Pham, et al. (2016), "The construction and use of versatile binary vectors carrying pyrG auxotrophic marker and fluorescent reporter genes for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus oryzae*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **32**, pp.1-9, DOI: 10.1007/s11274-016-2168-3.

[11] B.T. Tran, T.H. Nguyen, B.M. Tran, et al. (2021), "Studying on the antifungal activity of the actinomycete XK1 isolated from growing orange's soil against pathogenic fungi causing disease in citrus", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **63**(5), pp.41-45, DOI: 10.31276/VJST.63(5).41-45 (in Vietnamese).

[12] V.T. Tran, T.B.X.L. Do, T.K. Nguyen, et al. (2017), "A simple, efficient and universal method for the extraction of genomic DNA from bacteria, yeasts, molds and microalgae suitable for PCR-based applications", *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, **59**(4), pp.66-74, DOI: 10.31276/VJSTE.59(4).66-74.

[13] W.G. Weisburg, S.M. Barns, D.A. Pelletier, et al. (1991), "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study", *Journal of Bacteriology*, **173**(2), pp.697-703, DOI: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991.

[14] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, et al. (2013), "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, **30**(12), pp.2725-2729, DOI: 10.1093/molbev/mst197.

[15] X.F. Li, Y.H. Tian, H.Y. Peng, et al. (2020), "Isolation, screening and identification of antagonistic actinomycetes to control *Fusarium* wilt of *Momordica charantia*", *The Journal of Applied Ecology*, **31**(11), pp.3869-3879, DOI: 10.13287/j.1001-9332.202011.036.

[16] W. Shen, R. Liu, J. Wang, et al. (2024), "Characterization of a broad-spectrum antifungal strain, *Streptomyces graminearus* STR-1, against *Magnaporthe oryzae*", *Frontiers in Microbiology*, **15**, pp.1-12, DOI: 10.3389/fmicb.2024.1298781.

[17] A.V.A. Pirozzi, A. Stellavato, A.L. Gatta, et al. (2016), "Mancozeb, a fungicide routinely used in agriculture, worsens nonalcoholic fatty liver disease in the human HepG2 cell model", *Toxicology Letters*, **249**, pp.1-4, DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.03.004.

[18] Q. Li, X. Chen, Y. Jiang, et al. (2016), "Morphological identification of actinobacteria", *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, BoD - Books on Demand, pp.59-86, DOI: 10.5772/61461.

[19] B. Dhillon, S. Chakrabarti (2023), "Draft genome sequence of *Streptomyces murinus* strain SPC1 with antimicrobial potential against fungal pathogens of palms", *Microbiology Resource Announcements*, **12**(12), pp.1-3, DOI: 10.1128/MRA.00826-23.

[20] M. Ge, X. Cai, D. Wang, et al. (2023), "Efficacy of *Streptomyces murinus* JKTJ-3 in suppression of *Pythium* damping-off of watermelon", *Microorganisms*, **11**(6), pp.1-20, DOI: 10.3390/microorganisms11061360.

[21] T.T.T. Nguyen, H.T. Nguyen, T.D.H. Nguyen, et al. (2022), "Evaluation antifungal ability of *Streptomyces* sp. against *Collectotrichum* causing anthracnose on dragon fruit", *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, **20**(12), pp.1591-1598 (in Vietnamese).