

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 BÈ

Nguyễn Thị Vân, Đinh Thị Ngọc Mai, Lê Thị Hoàng Yến, Nguyễn Hồng Minh, Nguyễn Kim Nữ Thảo[✉]

Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

[✉] Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: thaonkn@vnu.edu.vn

Ngày nhận bài: 09.5.2018
Ngày nhận đăng: 22.8.2019

TÓM TẮT

Các bệnh do nấm là một vấn đề rất lớn trong nông nghiệp, gây thiệt hại nghiêm trọng đối với sản lượng cây trồng hàng năm. Để kiểm soát được dịch bệnh do nấm gây ra trên cây trồng, hướng tiếp cận sử dụng các chủng vi sinh vật đối kháng, đặc biệt là xạ khuẩn, được đánh giá là rất có tiềm năng và an toàn với môi trường. Với lợi thế về mức độ đa dạng sinh học cao, xạ khuẩn Việt Nam chính là một nguồn tài nguyên quý giá để tìm kiếm các chủng có khả năng kiểm soát các loại nấm gây bệnh trên thực vật. Trong nghiên cứu này, 70 chủng xạ khuẩn đã được phân lập từ Vườn Quốc gia Cúc Phương và Vườn Quốc gia Ba Bè bằng bốn phương pháp khác nhau. Đặc biệt, trong số này, 29 chủng phân lập được (chiếm 41,4%) thuộc các chi xạ khuẩn hiếm, ít được nghiên cứu ở Việt Nam. Sau đó, 70 chủng xạ khuẩn đã được sử dụng để khảo sát khả năng đối kháng với 4 loại nấm gây bệnh nghiêm trọng trên thực vật, gồm nấm gây bệnh đốm vòng *Alternaria* sp., nấm gây bệnh thối xám *Botrytis cinerea*, nấm gây bệnh thán thư *Colletotrichum gloeosporioides* và nấm gây bệnh thối rễ *Phytophthora capsici*. Kết quả nghiên cứu cho thấy 80,5% số chủng thuộc chi *Streptomyces* và 31% số chủng xạ khuẩn hiếm có hoạt tính kháng ít nhất 1 trong 4 chủng nấm gây bệnh. Bốn chủng xạ khuẩn (VTCC-A-828, VTCC-A-671, VTCC-A-605 và VTCC-A-69) có khả năng đối kháng mạnh nhất với 4 chủng nấm cũng đã được xác định, cho thấy tiềm năng ứng dụng của các chủng xạ khuẩn của Việt Nam trong lĩnh vực bảo vệ thực vật.

Từ khóa: *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, kháng nấm gây bệnh thực vật, *Phytophthora capsici*, xạ khuẩn

MỞ ĐẦU

Các bệnh do vi sinh vật gây ra trên cây trồng là một mối đe dọa rất lớn đối với sản xuất nông nghiệp, trong đó nguyên nhân do nấm chiếm đến 80% (El Hussein *et al.*, 2014). Bệnh do nấm gây ra trên thực vật có thể dẫn đến thiệt hại kinh tế lên tới trên 200 tỷ USD (Horbach *et al.*, 2011). Để kiểm soát được dịch bệnh do nấm gây ra trên cây trồng, các phương pháp thường được sử dụng bao gồm thay đổi phương pháp canh tác, tạo giống cây kháng bệnh, sử dụng các chất hóa học và sử dụng biện pháp sinh học. Nhiều loại chất hóa học đã được sử dụng để diệt nấm gây bệnh trên cây trồng nhưng các chất này lại thường có hại cho con người, vật nuôi cũng như các vi sinh vật có lợi khác, dẫn đến nguy cơ ô nhiễm môi trường, đe dọa sức khỏe con người và gây thiệt hại kinh tế do phát sinh chi phí liên quan đến xử lý môi trường (Nega, 2014). Chính vì vậy, rất nhiều nỗ lực đã được

thực hiện để tìm kiếm các chất kháng nấm an toàn hơn từ vi sinh vật như blasticidin S, polyoxin, kasugamycin, validamycin và miltiomycin (Wheeler, 2002). Đích tác động của các chất trên thường là quá trình tổng hợp protein, tổng hợp thành tế bào của nấm, hay mối tương tác giữa cây trồng và nấm gây bệnh. Tuy nhiên, ngày càng xuất hiện nhiều chủng nấm gây bệnh kháng các chất này, đồng thời còn rất nhiều bệnh chưa tìm được thuốc phòng và chữa. Với tiêu chí canh tác nông nghiệp hữu cơ hiện nay, biện pháp sinh học sử dụng các vi sinh vật đối kháng với nấm gây bệnh đang rất được quan tâm, nhằm đảm bảo tính an toàn với môi trường, tăng hiệu quả kinh tế và nâng cao chất lượng sản phẩm. Chính vì vậy, nhu cầu tìm kiếm các chủng vi sinh vật có tính đối kháng cao với các loại nấm gây bệnh trên cây trồng đang tăng cao.

Xạ khuẩn được biết là nguồn sinh chất kháng

sinh và các chất có hoạt tính sinh học lớn nhất trong số tất cả các nhóm vi sinh vật. Khoảng 45% tổng số các chất trao đổi thứ cấp có hoạt tính sinh học được tìm thấy từ xạ khuẩn (Berdy, 2005). Streptomycin được phân lập từ loài *Streptomyces griseus* là một trong số những loại thuốc kháng sinh được sử dụng đầu tiên và hiện tại vẫn đang được sử dụng rất phổ biến trong nông nghiệp. Ở Việt Nam, với lợi thế về mức độ đa dạng sinh học cao, nghiên cứu khảo sát khả năng kháng nấm ở xạ khuẩn đã được tiến hành trong nhiều phòng thí nghiệm (Đỗ Thu Hà, 2002; Bùi Thị Việt Hà *et al.*, 2007; Biền Văn Minh, Phạm Quang Chỉnh, 2009; Đỗ Thị Tuyền *et al.*, 2011). Tuy nhiên, các chủng xạ khuẩn được nghiên cứu chủ yếu thuộc chi *Streptomyces*. Đồng thời các nghiên cứu này chỉ được thực hiện trên các loại nấm phổ biến như *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinium sp.* và *Pyricularia sp.* Trong khi đó, một số loại nấm khác gây các bệnh nghiêm trọng trên cây trồng như nấm gây bệnh đốm vòng *Alternaria sp.*, nấm gây bệnh thối xám *Botrytis cinerea*, nấm gây bệnh thán thư *Colletotrichum gloeosporioides* và nấm gây bệnh thối rễ *Phytophthora capsici* chưa được quan tâm nghiên cứu ở Việt Nam.

Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, 70 chủng xạ khuẩn đã được phân lập từ Vườn Quốc gia Cúc Phương và Vườn Quốc gia Ba Bể và được khảo sát về khả năng đối kháng đối với 4 loại nấm gây bệnh nghiêm trọng trên thực vật còn chưa được nghiên cứu nhiều ở Việt Nam bao gồm *P. capsici*, *Alternaria sp.*, *B. cinerea* và *C. gloeosporioides*. Các chủng có hoạt tính đối kháng đáng chú ý là vật liệu để phát triển các chế phẩm sinh học bảo vệ thực vật, phục vụ cho nền nông nghiệp hữu cơ. Đồng thời, các thông tin chung về tiềm năng sở hữu hoạt tính kháng nấm đa dạng của các loài xạ khuẩn khác nhau có ý nghĩa tham khảo đối với các nghiên cứu trong lĩnh vực tìm kiếm hoạt tính kháng nấm ở đối tượng vi sinh vật này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Bốn chủng nấm gây bệnh thực vật *P. capsici* VTCC-F-1701, *Alternaria sp.* VTCC-F-1702, *B. cinerea* VTCC-F-1703 và *C. gloeosporioides* VTCC-F-1705 được cung cấp từ Bảo tàng Giống chuẩn Vi sinh vật (VTCC).

Phương pháp phân lập xạ khuẩn

Các chủng xạ khuẩn được phân lập từ mẫu đất

và lá mục bằng 4 phương pháp: phương pháp RC (Rehydration centrifugation), SDS-YE (Sodium dodecyl sulfate - Yeast extract), DH (Dry heating) và pha loãng (Hop *et al.*, 2011).

Đối với phương pháp RC để phân lập xạ khuẩn có khả năng di động, 0,5 g mẫu khô sau khi nghiền được ủ trong 50 mL đệm phosphate 10 mM và 5% cao nấm men (pH 7) ở 28°C trong 1,5 h. Sau đó, 8 mL lớp dịch phía trên được chuyển sang ống mới để ly tâm với tốc độ 1500 rpm trong 20 min, để tĩnh ở nhiệt độ phòng trong 30 min. Cuối cùng, 3 mL lớp dịch trên được chuyển sang ống khác để làm mẫu trải trên môi trường HV với độ pha loãng 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} .

Đối với phương pháp SDS-YS để phân lập tất cả các loại xạ khuẩn, 1 g mẫu khô sau nghiền được thêm vào 10 mL nước cất vô trùng (10^{-1}). Mẫu (1 mL) tiếp tục được pha loãng với 9 mL SDS-YE trong đệm phosphate (10^{-2}) (SDS 0,05%, cao nấm men 6%, đệm phosphate 5 mM, pH 7,0). Sau đó, mẫu được sốc nhiệt ở 40°C trong 20 min và trải trên môi trường HV với độ pha loãng 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} .

Đối với phương pháp DH để phân lập xạ khuẩn chịu nhiệt chủ yếu thuộc chi *Streptomyces*, mẫu đất và lá mục sau khi được làm khô tự nhiên trong 3-5 ngày được nghiền nhỏ bằng máy xay. Sau đó, mẫu được sấy ở 100°C trong 30 phút. Một lượng mẫu rất nhỏ được rắc lên môi trường HV (Humic acid-vitamin agar, Hayakama, Nonomura 1987).

Đối với phương pháp pha loãng để phân lập tất cả các loại xạ khuẩn, mẫu đất và lá mục khô được nghiền nhỏ và pha loãng trong nước muối 0,9 % và trải trên môi trường HV với độ pha loãng 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} .

Sau khi nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong 14-21 ngày, các khuẩn lạc với hình thái khác nhau được nhặt và ria lại trên môi trường HV. Cuối cùng, các khuẩn lạc khác nhau được cấy ria trên môi trường YS (g/L: tinh bột- 10; cao men- 2; thạch- 16), nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong 7-14 ngày và giữ ở lạnh sâu -80°C.

Định danh dựa trên so sánh trình tự 16S rDNA

Đoạn 16S rDNA (1300-1400 bp) được nhân lên bằng PCR sử dụng mồi 9F và 1541R theo phương pháp của Tamura, Hatano (1998) và sau đó được giải trình tự. Trình tự của đoạn 16S rDNA được so sánh với các trình tự khác bằng công cụ tìm kiếm BLAST.

Khảo sát hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp thoi thạch

Các chủng xạ khuẩn được nuôi trên môi trường

thạch YS trong 7 ngày ở 28°C. Các chủng nấm được nuôi trên môi trường thạch PDA (Himedia) trong 7 ngày ở 25°C. Thỏi thạch (Φ = 5 mm) của chủng nấm được đặt vào tâm đĩa petri (Φ = 6 cm) chứa môi trường PDA. Sau đó, một thỏi thạch (Φ = 5 mm) của từng chủng xạ khuẩn đã được nuôi cấy trên môi trường YS được đặt vào vị trí cách tâm đĩa 2 cm, ủ đĩa trong 2 ngày ở 25°C. Tỷ lệ kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm tính theo công thức: $S = (R-r)/R \times 100\%$. Trong đó, S: Phần trăm ức chế, R: Bán kính khuẩn lạc nằm ở phía đối diện vị trí đặt thỏi thạch xạ khuẩn, r: Bán kính khuẩn lạc nằm ở phía đặt thỏi thạch xạ khuẩn. Mỗi thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và định danh xạ khuẩn

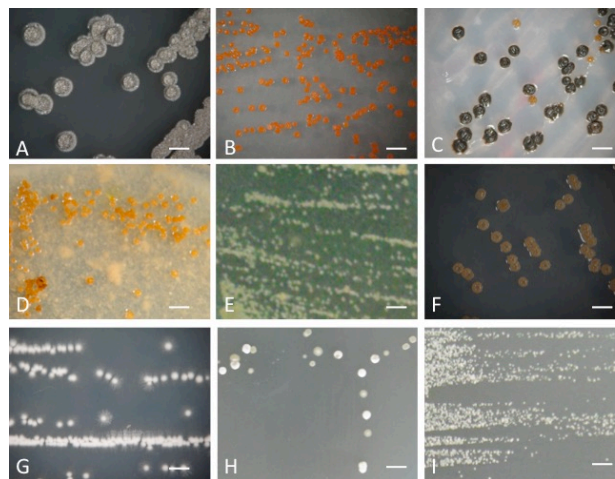
Trong nghiên cứu này, 70 chủng xạ khuẩn đã được phân lập từ Vườn Quốc gia Cúc Phương và Ba Bể bằng các phương pháp phân lập khác nhau. Vị trí phân loại của các chủng này được xác định sơ bộ tới mức độ chi dựa trên so sánh trình tự 16S rDNA (Bảng 1).

Đối với phương pháp pha loãng, 27 chủng xạ khuẩn đã được phân lập, trong đó có đến 26 chủng thuộc chi *Streptomyces* và chỉ 1 chủng thuộc chi *Dactylosporangium*. Kết quả này hoàn toàn hợp lý do trong phương pháp pha loãng đơn thuần, các khuẩn lạc thuộc chi *Streptomyces* sẽ mọc nhanh hơn

và chiếm ưu thế trên đĩa phân lập. Đối với phương pháp RC, 31 chủng xạ khuẩn đã được phân lập, trong đó có 7 chủng thuộc chi *Streptomyces* và 24 chủng thuộc các chi xạ khuẩn hiếm. Kết quả này cho thấy tính hiệu quả cao của phương pháp RC trong việc phân lập xạ khuẩn hiếm đặc biệt là các xạ khuẩn có bào tử có khả năng di động, phù hợp với kết quả của các nghiên cứu trước (Hayakawa *et al.*, 2000; Hop *et al.*, 2011). Ngoài ra, 5 chủng xạ khuẩn được phân lập bằng phương pháp DH, trong đó có 4 chủng thuộc chi *Streptomyces* và 7 chủng xạ khuẩn được phân lập bằng phương pháp SDS-YE, trong đó có 4 chủng thuộc chi *Streptomyces*. Hình ảnh khuẩn lạc của các chủng xạ khuẩn đại diện cho 9 chi phân lập được trong nghiên cứu này được thể hiện trong hình 1.

Bảng 1. Bảng kết quả phân loại đến chi của 70 chủng xạ khuẩn phân lập được.

Tên chi	Số lượng chủng
<i>Streptomyces</i>	41
<i>Actinoplanes</i>	21
<i>Micromonospora</i>	2
<i>Acrocarpospora</i>	1
<i>Dactylosporangium</i>	1
<i>Kineosporia</i>	1
<i>Nocardia</i>	1
<i>Nocardiopsis</i>	1
<i>Pseudonocardia</i>	1



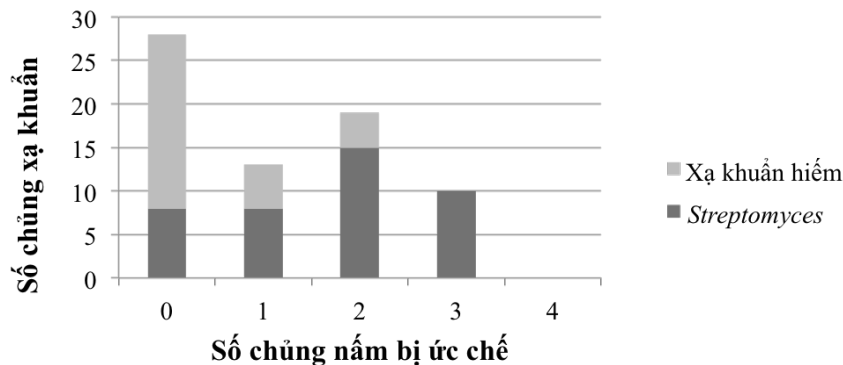
Hình 1. Hình ảnh khuẩn lạc đại diện của 9 chi xạ khuẩn phân lập được. A. VTCC-A-897 *Streptomyces* sp., B. VTCC-A-304 *Actinoplanes* sp., C. VTCC-A-845 *Micromonospora* sp., D. VTCC-A-421 *Acrocarpospora* sp., E. VTCC-A-185 *Dactylosporangium* sp., F. VTCC-A-342 *Kineosporia* sp., G. VTCC-A-816 *Nocardia* sp., H. VTCC-A-830 *Nocardiopsis* sp., I. VTCC-A-841 *Pseudonocardia* sp. Đơn vị thước đo là 3 mm.

Khảo sát các chủng xạ khuẩn có khả năng kháng nấm bằng phương pháp thổi thạch

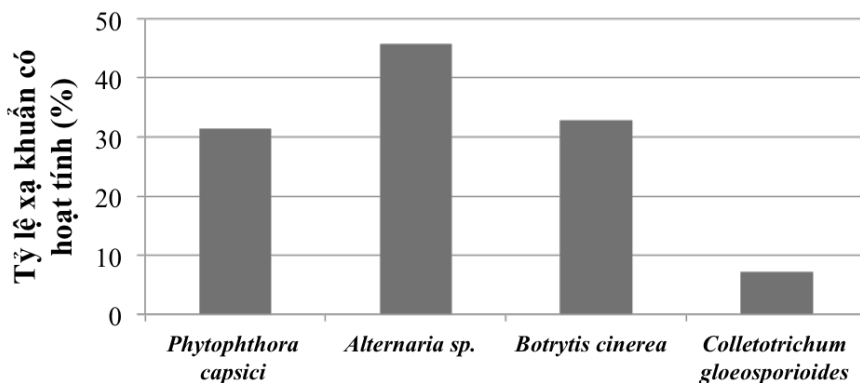
Hoạt tính đối kháng với 4 loại nấm gây bệnh trên cây trồng bao gồm *P. capsici*, *Alternaria* sp., *B. cinerea* và *C. gloeosporioides* đã được khảo sát trên 70 chủng xạ khuẩn phân lập được, trong đó có 41 chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* và 29 chủng xạ khuẩn thuộc các chi xạ khuẩn hiếm (Bảng 1). Đây cũng là một trong số ít các nghiên cứu ở Việt Nam khảo sát một số lượng lớn xạ khuẩn hiếm bên cạnh nghiên cứu của Bùi Thị Việt Hà *et al.*, (2007), thực hiện khảo sát trên 43 chủng xạ khuẩn hiếm phân lập được từ Trùng Khánh, Cao Bằng.

Kết quả khảo sát khả năng đối kháng của 70 chủng xạ khuẩn với 4 loại nấm gây bệnh được tóm tắt trong hình 2. Kết quả cho thấy 33/41 (80,5%) chủng *Streptomyces* và 9/29 (31%) chủng xạ khuẩn hiếm có hoạt tính kháng ít nhất 1 trong 4 chủng nấm gây bệnh. Kết quả này cho thấy tỷ lệ xạ khuẩn có hoạt tính kháng nấm khá cao so với các nghiên cứu

khác trên thế giới. Như trong nghiên cứu của El Hussein *et al.*, (2014), tỷ lệ chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng một trong bốn chủng nấm gây bệnh sử dụng trong nghiên cứu này chỉ đạt 54% trong tổng số 104 chủng *Streptomyces* được sàng lọc. Bên cạnh đó, kết quả của nghiên cứu này cũng giống như các nghiên cứu trước đây đã cho thấy khả năng sinh các hoạt chất kháng vi sinh vật của các loài thuộc chi *Streptomyces* thường cao hơn các loài xạ khuẩn hiếm (Heng, Hamzah, 2014; Singh *et al.*, 2016). Tuy vậy, các nhà khoa học cho rằng hiện nay xạ khuẩn hiếm là một nguồn sàng lọc các chất có hoạt tính sinh học mới rất có triển vọng do tốc độ tìm kiếm hoạt chất mới từ chi *Streptomyces* đã giảm đi đáng kể (Takahashi, Omura, 2003; Tiwari, Gupta, 2012). Trong 9 chủng xạ khuẩn hiếm có hoạt tính, 5 chủng có khả năng kháng 1 loại nấm và 4 chủng có khả năng kháng 2 loại nấm. Trong số các chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces*, 10 chủng có khả năng kháng đồng thời 3 chủng nấm gây bệnh. Tuy nhiên, không có chủng nào có khả năng kháng đồng thời cả 4 chủng nấm gây bệnh.



Hình 2. Khả năng kháng 4 chủng nấm *P. capsici*, *Alternaria* sp., *B. cinerea* và *C. gloeosporioides* của 70 chủng xạ khuẩn.

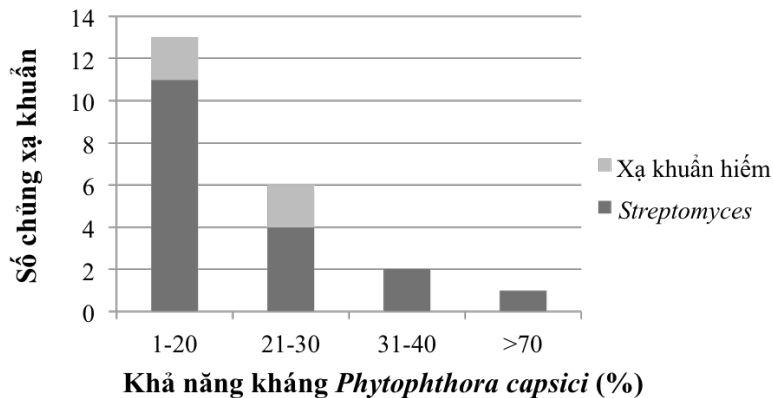


Hình 3. Tỷ lệ xạ khuẩn được khảo sát có hoạt tính đối kháng với 4 chủng nấm gây bệnh.

Khả năng đối kháng với 4 chủng nấm gây bệnh của 70 chủng xạ khuẩn được thể hiện trong Hình 3. Tỷ lệ cao nhất quan sát được là trong trường hợp đối kháng với nấm *Alternaria* sp. với 45,7% chủng xạ khuẩn có hoạt tính. Tiếp theo với 32,9% xạ khuẩn có hoạt tính kháng *B. cinerea* và 31,4% xạ khuẩn có hoạt tính kháng *P. capsici*. Chỉ 7,14% xạ khuẩn được khảo sát là có hoạt tính kháng *C. gloeosporioides*. Tuy nhiên, tỷ lệ này là khá cao nếu chỉ xét các chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces*, cụ thể tỷ lệ kháng lần lượt bốn chủng nấm *Alternaria* sp., *B. cinerea*, *P. capsici*, *C. gloeosporioides* là 65,8%, 48,7%, 41,4% và 9,7%. Đây là một kết quả khá tốt so với các nghiên cứu khác, cụ thể như 49% trong tổng số 104 chủng *Streptomyces* được sàng lọc có khả năng kháng *Alternaria alternata* và *Alternaria sesami*; 14,1% trong tổng số 106 chủng xạ khuẩn được sàng lọc có khả năng kháng *B. cinerea* (El Hussein *et al.*, 2014; Ganesan *et al.*, 2017).

Kết quả khảo sát khả năng ức chế nấm *P. capsici* của 70 chủng xạ khuẩn (Hình 4) cho thấy có 2 chủng *Streptomyces* có khả năng ức chế 31 và 32% sự phát triển của *P. capsici* và đặc biệt có 1 chủng *Streptomyces* sp. VTCC-A-828 có khả năng

ức chế lên đến 74% (Hình 7A). Chủng xạ khuẩn này còn có khả năng ức chế sự sinh trưởng của *Alternaria* sp. (23%) và *B. cinerea* (30%). Khả năng ức chế *P. capsici* này cũng có thể so sánh ngang bằng với các nghiên cứu khác trên thế giới như trong nghiên cứu sàng lọc từ 188 chủng xạ khuẩn của Kunova *et al.*, (2016), chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng *P. capsici* cao nhất được tìm thấy là chủng *Streptomyces* sp. MR01W với tỷ lệ ức chế đạt 67,4%. *P. capsici* không phải là một loại nấm điển hình mà thuộc lớp *Oomycetes*, gây rất nhiều bệnh nghiêm trọng trên cây trồng như héo lá, thối rễ ở cây ớt, ca cao, cao su, thối rễ và quả ở cây họ bầu bí, bệnh chết nhanh ở cây hồ tiêu... Bệnh do *P. capsici* rất khó kiểm soát do khả năng tồn tại lâu dài của bào tử trong đất. Một số nghiên cứu đã được thực hiện ở Việt Nam để tìm được giải pháp ức chế *P. capsici*, tuy nhiên, các nghiên cứu này tập trung vào các nấm *Trichoderma* sp. hoặc vi khuẩn *Pseudomonas putida* (Trần Thị Thuận *et al.*, 2004; Dương Minh *et al.*, 2006; Trần Thị Thu Ha, 2007). Chính vì vậy, với khả năng ức chế trên 70% sinh trưởng của *P. capsici*, chủng *Streptomyces* sp. VTCC-A-828 tiềm năng là một giải pháp hữu ích trong khống chế sinh học *P. capsici*.



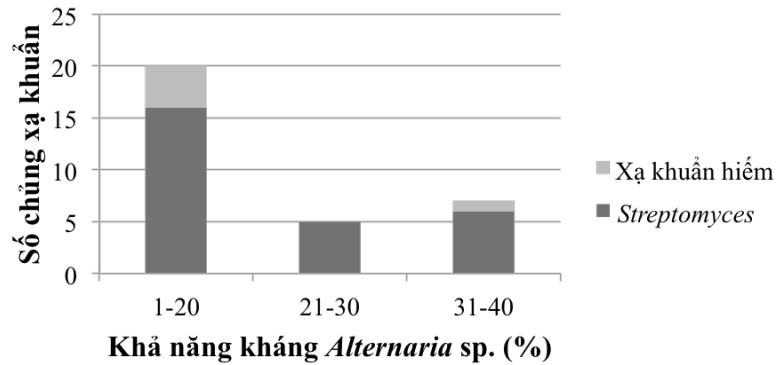
Hình 4. Khả năng ức chế *P. capsici* của các chủng xạ khuẩn được khảo sát.

Alternaria là một chi nấm với rất nhiều loài gây bệnh trên các cây trồng quan trọng như *A. solani* gây bệnh đốm vòng trên cà chua, *A. adwickii* gây bệnh đốm vòng hại lúa, *A. alternata* gây bệnh mốc đen trên quả. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã sử dụng các chủng nấm thuộc chi *Trichoderma* cũng như các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* để ức chế *Alternaria* (Uniyal, Singh, 2017; Arzanlou *et al.*, 2013; Catello, Massimo, 2015). Trong nghiên cứu này, khả năng đối kháng với chủng *Alternaria*

sp. VTCC-F-1702 đã được khảo sát ở 70 chủng xạ khuẩn (Hình 5), hoạt tính cao nhất được phát hiện ở chủng *Streptomyces* sp. VTCC-A-671 với mức độ ức chế đạt 35% (Hình 7B). Tỷ lệ ức chế này cũng tương tự với tỷ lệ ức chế của một số chủng *Trichoderma* đã công bố trước đây như 35% đối với *T. harzianum* và 33,4% đối với *T. viride* trong nghiên cứu của Uniyal và Singh (2017). Chủng xạ khuẩn này đồng thời còn kháng được hai loại nấm gây bệnh khác là *P. capsici* (16%) và *B. cinerea*

(8%), cho thấy VTCC-A-671 cũng là một chủng nên được lựa chọn trong các nghiên cứu tiếp theo. Tiếp sau *Streptomyces* sp. VTCC-A-671, chủng xạ khuẩn hiếm *Actinoplanes* sp. VTCC-A-832 có khả

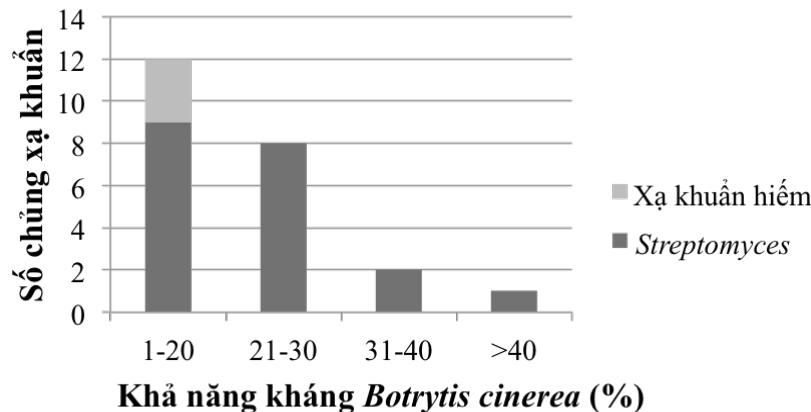
năng ức chế *Alternaria* sp. tốt (33%), là chủng có tiềm năng ứng dụng thực tế cũng như đối tượng cho các nghiên cứu sâu hơn về hoạt chất kháng nấm để đánh giá tính mới.



Hình 5. Khả năng ức chế *Alternaria* sp. của các chủng xạ khuẩn được khảo sát.

B. cinerea là nguyên nhân gây bệnh thối xám trên hơn 200 loại thực vật khác nhau và gây thiệt hại kinh tế rất nặng nề cho ngành nông nghiệp trên toàn thế giới (Williamson, 2007). Ở Việt Nam, *B. cinerea* được tìm thấy gây bệnh trên nhiều loại rau quả như ớt, dâu tây, cà chua, nho... Trong nghiên cứu này, khả năng ức chế nấm *B. cinerea* được khảo sát trên 70 chủng xạ khuẩn (Hình 6) cho kết quả chủng có khả năng ức chế tốt nhất là *Streptomyces* sp. VTCC-B-605 với tỷ lệ 47% (Hình 7C). Khả năng ức chế của chủng VTCC-B-605 qua bước đầu khảo sát là thấp hơn so

với hoạt tính của các chủng *Trichoderma* (lên đến 75%) đã được công bố trước đây (Bogumil *et al.*, 2013). Tuy nhiên, hoạt chất sinh ra bởi chủng VTCC-B-605 rất đáng được quan tâm do chủng này có khả năng đối kháng đặc hiệu đối với *B. cinerea* mà không ức chế các chủng nấm khác. Ngoài ra, cần lưu ý rằng, tỷ lệ ức chế trong nghiên cứu này được đánh giá bằng phương pháp đặt thối thạch. Vì vậy, tỷ lệ ức chế còn có thể cao hơn nhiều so với số liệu ban đầu khi hoạt tính của dịch nuôi cấy trong điều kiện tối ưu cũng như dịch tách chiết hay chất tinh sạch được đánh giá.



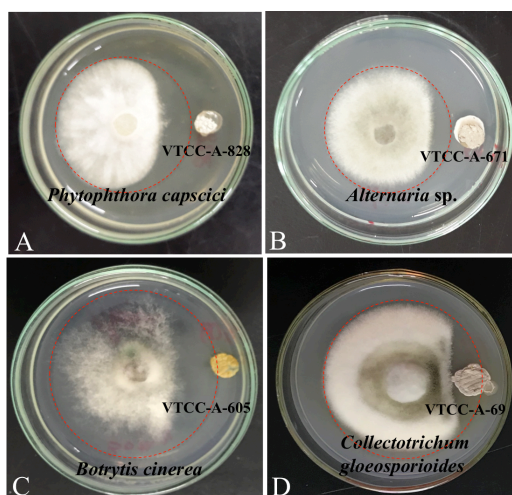
Hình 6. Khả năng ức chế *B. cinerea* của các chủng xạ khuẩn được khảo sát.

Trong số 70 chủng xạ khuẩn được khảo sát, chỉ có 5 chủng có khả năng ức chế *C. gloeosporioides*, loại nấm gây bệnh thán thư nghiêm trọng trên hàng trăm loài thực vật. Hoạt tính cao nhất được phát hiện ở chủng *Streptomyces* sp. VTCC-A-69 với khả năng ức chế là 38% (Hình 7D). Chủng xạ khuẩn này cũng có khả năng đối kháng khá tốt với *Alternaria* sp.

(33%) và *B. cinerea* (29%). Ngoài ra, trong 5 chủng có hoạt tính, một chủng xạ khuẩn hiếm *Dactylosporangium aurantiacum* VTCC-A-185 có khả năng ức chế 15% sự phát triển của nấm *C. gloeosporioides*. Khả năng kháng *C. gloeosporioides* của các chủng xạ khuẩn trong nghiên cứu này chưa cao so với các nghiên cứu trước đây, như tỷ lệ ức chế

có thể đạt đến 82% đối với *S. noursei* hoặc 69% đối với *S. natalensis* (Zikovic *et al.*, 2010). Tuy nhiên việc tìm thấy hoạt tính kháng *C. gloeosporioides* sinh ra từ loài *D. aurantiacum* là một phát hiện mới,

rất có tiềm năng trong việc nghiên cứu tìm kiếm hoạt chất kháng nấm mới và có ý nghĩa đặc biệt trong bối cảnh xuất hiện ngày càng nhiều chủng nấm có khả năng kháng các chất kháng nấm thông thường.



Hình 7. Khả năng ức chế của chủng xạ khuẩn VTCC-A-828 đối với *P. capsici* (A), VTCC-A-671 đối với *Alternaria* sp. (B), VTCC-A-605 đối với *B. cinerea* (C) và VTCC-A-69 đối với *C. gloeosporioides* (D). Đường đứt đoạn biểu diễn diện tích chủng nấm có thể mọc nếu không có mặt xạ khuẩn.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, 70 chủng xạ khuẩn đã được phân lập từ Vườn Quốc gia Cúc Phương và Ba Bể, được phân loại đến chi cũng như khảo sát hoạt tính đối kháng với 4 loại nấm gây bệnh quan trọng *P. capsici*, *Alternaria* sp., *B. cinerea* và *C. gloeosporioides*. Kết quả cho thấy 70 chủng phân lập được xếp vào 9 chi, gồm *Streptomyces* (41 chủng) và 8 chi xạ khuẩn hiếm, trong đó số lượng chủng cao nhất là chi *Actinoplanes* (21 chủng). Nghiên cứu đánh giá hoạt tính kháng đối với 4 loại nấm gây bệnh cho thấy 80,5% số chủng thuộc chi *Streptomyces* và 31% số chủng xạ khuẩn hiếm có hoạt tính kháng ít nhất 1 trong 4 chủng nấm gây bệnh, đặc biệt có 10 chủng có khả năng kháng đồng thời 3 chủng nấm gây bệnh. Bốn chủng xạ khuẩn (VTCC-A-828, VTCC-A-671, VTCC-A-605 và VTCC-A-69) trong số 70 chủng đã được khảo sát thể hiện khả năng đối kháng mạnh nhất với 4 chủng nấm đã được xác định. Đây là nguồn nguyên liệu quý cần được tiếp tục nghiên cứu để phát triển chế phẩm sinh học, ứng dụng trong thực tiễn. Bên cạnh đó, một số chủng xạ khuẩn hiếm có hoạt tính đối kháng tốt với các chủng nấm gây bệnh cũng là nguồn nguyên liệu tiềm năng để phát hiện các hoạt chất sinh học mới.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Nhiệm vụ điều tra cơ bản "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".

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arzanlou M, Khodaei S, Narmani A, Babai-Ahari A, Azar AM (2013) Inhibitory effect of *Trichoderma* isolates on growth of *Alternaria alternata*, the causal agent of leaf spot disease on sunflower, under laboratory conditions. *Arch Phytopathology Plant Protect* 47(13): 1592–1599.
- Berdy J (2005) Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* 58(1): 1–26.
- Bogumił A, Sas L, Lisek A, Trzcinski P, Harbuzov A (2013) Identification of new *Trichoderma* strains with antagonistic activity against *Botrytis cinerea*. *Folia Hort* 25: 123–132.
- Catello P, Massimo Z (2015) Evaluation of *Bacillus* strains isolated from solanaceous phylloplane for biocontrol of *Alternaria* early blight of tomato. *Biol Control* 84: 11–18.
- El Hussein AA, Alhasan REM, Abdelwahab SA, El Siddiq MA (2014) Isolation and identification of *Streptomyces rochei* strain active against phytopathogenic fungi. *Br Microbiol Res J* 4(10): 1057–1068.

- Ganesan P, Reegan AD, David RHA, Gandhi MR, Paulraj MG, Al-Dhabi NA, Ignacimuthu S (2017) Antimicrobial activity of some actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu, India. *Alexandria Med J* 53(2): 101–110.
- Bùi Thị Việt Hà, Mai Đàm Linh, Phạm Đức Ngọc (2007) Nghiên cứu đặc điểm sinh học của một số xạ khuẩn hiếm phân lập ở Việt Nam. *Hội nghị toàn quốc về Nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống* 692–695.
- Đỗ Thu Hà (2002) 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* 24(1): 59–63.
- Tran Thi Thu Ha (2007) Interaction between biosurfactant-producing *Pseudomonas* and *Phytophthora* species. Wageningen University, the Netherlands.
- Hayakawa M, Nonomura H (1987) Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol* 65:501–509.
- Hayakawa M, Otaguro M, Takeuchi T, Yamazaki T, Iimura Y (2000) Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78(2): 171–185.
- Heng JLS, Hamzah H (2014) Biological active compounds from actinomycetes isolated from soil of Langkawi Island, Malaysia. *Afr J Biotechnol* 13(49): 4523–4528.
- Hop DV, Sakiyama Y, Binh CT, Otaguro M, Hang DT, Miyadoh S, Luong DT, Ando K. (2011) Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: isolation and genus-level diversity. *J Antibiot (Tokyo)* 64(9): 599–606.
- Horbach R, Navarro-Quesada AR, Knogge W, Deising HB (2011) When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. *J Plant Physiol* 168: 51–62.
- Kunova A, Bonaldi M, Saracchi M, Pizzatti C, Chen X, Cortesi P (2016) Selection of *Streptomyces* against soil borne fungal pathogens by a standardized dual culture assay and evaluation of their effects on seed germination and plant growth. *BMC Microbiol* 16: 272–282.
- Biền Văn Minh, Phạm Quang Chính (2009) 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*.
- Dương Minh, Lê Phước Thành, Hồ Văn Thiệt, Lê Bảo Ti, Võ Thị Gương (2006) Tác động của các chủng nấm đối kháng *Trichoderma* nội địa trong việc phòng trị bệnh *Phytophthora palmivora* gây hại sầu riêng tại Cần Thơ và Bến Tre. *Tạp chí Nghiên cứu Khoa học* 6: 154–161.
- Nega A (2014) Review on concepts in biological control of plant pathogens. *J Biol Agric and Health* 4(27): 33–35.
- Oerke EC (2006) Crop losses to pests. *J Agric Sci* 144: 31–43.
- Singh V, Haque S, Singh H, Verma J, Vibha K, Singh R, Jawed A, Tripathi CK (2016) Isolation, screening, and identification of novel isolates of actinomycetes from India for antimicrobial applications. *Front Microbiol* 7: 1921.
- Takahashi Y, Omura S (2003) Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J Gen Appl Microbiol* 49(3): 141–154.
- Tamura T, Hayakawa M, Hatano K (1998) 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* 48: 995–1005.
- Trần Thị Thuần, Nguyễn Thị Ly, Phạm Ngọc Dung (2004) Nghiên cứu và sử dụng nấm đối kháng *Trichoderma* để phòng trừ nhóm nấm tồn tại trong đất gây hại cây trồng. *Tạp chí Bảo vệ thực vật* 4: 15–17.
- Tiwari K, Gupta RK (2012) Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Crit Rev Biotechnol* 32(2): 108–132.
- Đỗ Thị Tuyền, Lương Thị Hương Giang, Đào Thị Hằng, Nguyễn Thị Hương Liên, Vũ Thị Đoàn Chính (2011) Hoạt tính kháng sinh của xạ khuẩn trong đất tại các khu vực có hoạt động khai thác khoáng sản. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 86(10): 153–158.
- Uniyal K, Singh Y (2017) Evaluation of antagonist activity of *Trichoderma* species against *Alternaria alternata* isolated from *Populus deltooides*. *Int J Sci Res* 3: 1070–1074.
- Wheeler WB (2002) Role of research and regulation in 50 years of pest management in agriculture. *J Agric Food Chem* 50: 4151–4155.
- Williamson B, Bettina T, Tudzynski P, Van Kan JaL (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol* 8(5): 561–580.
- Zikovic S, Stojanovic S, Ivanovic Z, Gavrilovic V, Popovic T, Balaz J (2010) Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Collectotrichum acutatum* and *Collectotrichum gloeosporioides*. *Arch Biol Sci* 62 (3): 611–623.

INVESTIGATION OF ANTAGONISTIC ACTIVITIES OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM CUC PHUONG AND BA BE NATIONAL PARKS AGAINST FOUR PLANT PATHOGENIC FUNGI

Nguyen Thi Van, Dinh Thi Ngoc Mai, Le Thi Hoang Yen, Nguyen Hong Minh, Nguyen Kim Nu Thao

Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi

SUMMARY

Fungal diseases are a huge problem in agriculture, causing serious damage to annual crop yields worldwide. In order to control fungal pathogens in plants, using antagonistic microorganisms is a common approach, especially actinomycetes, as biocontrols considered to be very potential and safe for the environment. With the advantage of high levels of biodiversity, Vietnamese actinomycetes are of a valuable resource for finding strains that are capable of biocontrolling fungal pathogens in plants. Thus, in this study, 70 actinomycete strains were isolated from Cuc Phuong and Ba Be National Parks by four different isolation methods including rehydration centrifugation, sodium dodecyl sulfate – yeast extract, dry heating and dilution methods. Of these, 29 strains (41.4%) belong to rare actinomycete genera including *Actinoplanes*, *Acrocarpospora*, *Dactylosporangium*, *Kineosporia*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nocardiopsis* and *Pseudonocardia*, which are rarely studied in Vietnam. Subsequently, 70 actinomycete strains were subjected to antagonistic activity assays against four highly pathogenic fungi in plants including *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici*. The results showed that 80.5% of *Streptomyces* and 31% of rare actinomycetes could inhibit the growth of at least one of the four pathogenic fungal strains. Moreover, ten actinomycete strains were found to be able to inhibit three types of tested fungal pathogens, simultaneously. Especially, four actinomycete strains (VTCC-A-828, VTCC-A-671, VTCC-A-605, and VTCC-A-69), having the highest antagonistic activity against four fungal pathogens *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici*, respectively, were selected. The results in this study indicate the great potential application for Vietnam's microorganisms in the field of plant protection.

Keywords: *Actinomycetes*, *Alternaria* sp., *antifungal activities*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora capsici*