

Nghiên cứu hoạt tính kháng nấm gây bệnh trên cam của chủng xạ khuẩn XK1 phân lập từ đất trồng cam

Trần Bảo Trâm¹, Nguyễn Thị Hiền¹, Trần Bình Minh¹, Nguyễn Thị Thùy Linh², Hoàng Thị Vân Anh², Thái Hạnh Dung², Trần Văn Tuấn², Vũ Xuân Tạo^{1*}

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ

²Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 22/2/2021; ngày chuyển phản biện 24/2/2021; ngày nhận phản biện 28/3/2021; ngày chấp nhận đăng 6/4/2021

Tóm tắt:

Xạ khuẩn *Streptomyces* được đánh giá là chi xạ khuẩn có tiềm năng trong việc tạo chế phẩm vi sinh dùng trong nông nghiệp do chúng an toàn và có khả năng đối kháng mạnh với nhiều loài vi khuẩn và vi nấm gây bệnh thực vật. Trong nghiên cứu này, 18 chủng xạ khuẩn đã được phân lập từ đất trồng cam tại tỉnh Hà Giang, trong đó chủng xạ khuẩn XK1 được đánh giá là có khả năng kháng mạnh với nấm *Penicillium digitatum* và *Colletotrichum gloeosporioides* gây thối và rụng quả cam. Dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự 16S rRNA, chủng xạ khuẩn XK1 được xác định thuộc loài *Streptomyces albulus*. Trên môi trường MT2 với pH=6, sau 5 ngày nuôi lắc ở 30°C, dịch nuôi cấy chủng *S. albulus* XK1 thể hiện hoạt tính kháng *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* mạnh nhất. Đồng thời, dịch nuôi cấy chủng *S. albulus* XK1 thể hiện hoạt tính ức chế khả năng gây bệnh của nấm *P. digitatum* trên cam. Như vậy, nghiên cứu này đã tuyển chọn được chủng xạ khuẩn *S. albulus* XK1 có khả năng kháng nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* mạnh và có tiềm năng ứng dụng trong việc sản xuất chế phẩm sinh học dùng trong phòng trừ bệnh thối và rụng quả trên cây cam.

Từ khóa: cây cam, *Colletotrichum gloeosporioides*, hoạt tính kháng nấm, *Penicillium digitatum*, xạ khuẩn.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Tại Việt Nam có nhiều vùng trồng cam nổi tiếng như Tuyên Quang, Hà Giang, Bắc Giang, Yên Bái... Trong những năm gần đây, diện tích và sản lượng cây có múi, trong đó đặc biệt là cây cam của cả nước tăng nhanh. Việc tăng nhanh diện tích trồng cây có múi cũng kèm theo diện tích bị sâu, dịch hại tăng mạnh. Trên cây có múi ở Việt Nam phát hiện được khoảng 40 loại bệnh hại, trong đó vi nấm là một trong số những đối tượng gây hại nghiêm trọng. Vi nấm gây bệnh có thể bùng phát thành dịch và gây tổn thất nặng nề cho ngành trồng cây có múi. *Penicillium digitatum* là nguyên nhân gây bệnh thối mốc xanh và rụng quả ở cây có múi. *P. digitatum* nhiễm qua vết xước trên vỏ quả do côn trùng hoặc tác nhân vật lý gây ra. Nếu nấm nhiễm vào quả ở giai đoạn trước khi thu hoạch thì sẽ gây hiện tượng thối và rụng quả. Bào tử nấm từ quả thối hỏng, có thể rơi xuống đất và được phát tán bởi gió nên dễ lây nhiễm tới các quả khác [1]. Nấm *Colletotrichum* cũng được ghi nhận là tác nhân gây rụng quả trên cây có múi. *C. gloeosporioides* chủ yếu gây bệnh thán thư [2], nhưng loài nấm này cũng được báo cáo là gây ra các triệu chứng bệnh ở giai đoạn trước khi thu hoạch như khô cành, khô cuống quả, thối cuống gây rụng quả [3, 4].

Hiện nay, để đặc trị các bệnh do vi nấm gây ra trên cây

có múi, người dân vẫn chủ yếu dùng các loại thuốc bảo vệ thực vật hóa học. Sử dụng nhiều loại hóa chất bảo vệ thực vật trong kiểm soát vi nấm gây hại đã để lại nhiều hậu quả cho sản xuất và môi trường. Do vậy, vấn đề nghiên cứu ứng dụng chế phẩm sinh học trong kiểm soát, phòng trừ vi nấm gây hại đang ngày càng được quan tâm trong chiến lược phát triển nông nghiệp bền vững. Xạ khuẩn được coi là tác nhân kiểm soát sinh học trong nông nghiệp với khả năng sinh nhiều hoạt chất được sử dụng để kiểm soát vi khuẩn và vi nấm gây bệnh thực vật [5]. Chúng có khả năng tiết các chất chuyển hóa thứ cấp ức chế sinh trưởng (như kháng sinh, độc tố, chất hoạt động bề mặt, chất dễ bay hơi) có thể ngăn chặn hoặc tiêu diệt vi sinh vật khác [6]. Các loài xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* được xem là nguồn sản xuất chất kháng sinh nhiều nhất [7]. Việc tìm kiếm các chủng xạ khuẩn có khả năng kháng *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* phục vụ nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh thối rụng quả trên cây cam sẽ góp phần xây dựng và phát triển ngành nông nghiệp an toàn và bền vững.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Chủng nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* gây bệnh thối rụng quả trên cây cam được cung cấp và lưu giữ tại

*Tác giả liên hệ: Email: taovx.tsa@gmail.com

Studying on the antifungal activity of the actinomycete XK1 isolated from growing orange's soil against pathogenic fungi causing disease in citrus

Bao Tram Tran¹, Thi Hien Nguyen¹, Binh Minh Tran¹,
Thi Thuy Linh Nguyen², Thi Van Anh Hoang²,
Hanh Dung Thai², Van Tuan Tran², Xuan Tao Vu^{1*}

¹Center of Experimental Biology, National Center for Technological Progress, Ministry of Science and Technology

²Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi

Received 22 February 2021; accepted 6 April 2021

Abstract:

Streptomyces are considered to be one of the actinomycetes genera having potential in the production of agricultural probiotics because they are safe and have strong antagonism to many bacterial and fungal species that cause plant diseases. In this study, 18 strains of actinomycetes were isolated from growing oranges' soil in Ha Giang province, of which the actinomycete strain XK1 was considered to be strongly resistant to the fungi *Penicillium digitatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing fruit rot and shedding in citrus. Based on morphological characteristics and 16S rRNA sequence, the strain XK1 was determined to belong to the *Streptomyces albulus*. On MT2 medium with pH=6, after five days of shaking cultivation at 30°C, the liquid cultures of *S. albulus* XK1 showed the strongest resisting activity to *P. digitatum* and *C. gloeosporioides*. At the same time, the broth cultures of *S. albulus* XK1 showed inhibitory activity against *P. digitatum* in oranges. The actinomycete strain *S. albulus* XK1 was selected base on strong antifungal ability against *P. digitatum* and *C. gloeosporioides* and had a potential for application in the production of probiotics used to control fruit rot and shedding in citrus.

Keywords: actinomycete, antifungal activity, *Colletotrichum gloeosporioides*, orange crops, *Penicillium digitatum*.

Classification number: 4.1

Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ.

Các mẫu đất vùng rễ cây cam khỏe mạnh được thu thập tại Hà Giang để phân lập các chủng xạ khuẩn.

Cam dùng cho nghiên cứu khả năng kháng nấm *P. digitatum* của dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1 là cam giống V2 trồng tại Hà Giang ở giai đoạn thu hoạch.

Thu mẫu đất

Thu mẫu đất vùng rễ của các cây cam khỏe mạnh, phát triển tốt. Mỗi điểm thu đào xuống từ mặt đất 10-15 cm và lấy khoảng 100 g đất xung quanh vùng rễ của cây. Mẫu được đựng trong túi polyetylen riêng biệt, ghi thời gian và địa điểm thu mẫu. Mẫu được bảo quản mát và được sử dụng để phân lập các chủng xạ khuẩn.

Phân lập xạ khuẩn

Các chủng xạ khuẩn được phân lập trên môi trường ISP4. Các mẫu đất được pha loãng bằng nước cất khử trùng đến các nồng độ khác nhau từ 10^{-1} đến 10^{-5} . Cây trái mẫu ở các nồng độ pha loãng trên môi trường ISP4. Các đĩa được ủ ở 28-30°C cho đến khi thu nhận các khuẩn lạc xạ khuẩn riêng rẽ [8].

Thu bào tử nấm

Các chủng nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* được nuôi cấy trên môi trường PDA 3-5 ngày ở 25-28°C để tiến hành thu bào tử. Quy trình thu bào tử được thực hiện theo Vu và cộng sự (2018) [9]. Dịch bào tử được xác định nồng độ bằng buồng đếm Thoma và pha loãng đến nồng độ thích hợp để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Dịch bào tử có thể được bảo quản ở 4°C để sử dụng trong 3-4 tuần hoặc giữ lâu dài trong glycerol 20% ở -30°C sau khi đã được làm đông trong nitơ lỏng.

Xác định hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp đặt thỏi thạch và khuếch tán trên đĩa thạch

Với phương pháp đặt thỏi thạch dùng cho sàng lọc ban đầu, các chủng xạ khuẩn được nuôi trên môi trường ISP4 ở 30°C, sau 72 giờ đục những thỏi thạch có đường kính 9 mm đặt lên trên các đĩa đã được cấy trái 50 µl dịch bào tử các chủng nấm gây bệnh (10^6 bào tử/ml). Hoạt tính kháng nấm được tính bằng hiệu số đường kính vòng kháng nấm và đường kính thỏi thạch.

Với phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, chủng xạ khuẩn được nuôi lắc trong môi trường dịch thể (lắc 200 vòng/phút) ở các điều kiện khác nhau (môi trường, thời gian, nhiệt độ, pH). Dịch nuôi xạ khuẩn được ly tâm 12000 vòng/phút trong 10 phút để thu phần dịch. Bổ sung 50 µl dịch thu được vào mỗi lỗ trên đĩa thạch PDA đã được cấy trái 50 µl dịch bào tử các chủng nấm gây bệnh (10^6 bào tử/ml). Các đĩa petri sau khi đặt thỏi thạch hoặc bổ sung dịch xạ khuẩn được nuôi ở 25°C trong thời gian 5-7 ngày và đo

đường kính vòng kháng nấm hình thành [10]. Hoạt tính kháng nấm được tính bằng hiệu số đường kính vòng kháng nấm và đường kính giếng thạch.

Định danh chủng xạ khuẩn XK1 thông qua đặc điểm hình thái và giải trình tự 16S rRNA

Hình thái và màu sắc khuẩn lạc của chủng xạ khuẩn XK1 được quan sát sau 5-6 ngày nuôi cấy trên môi trường ISP4 ở 30°C. Chủng xạ khuẩn XK1 được nuôi cấy trực tiếp trên tiêu bản kính hiển vi vô trùng có chứa môi trường ISP4. Tiêu bản được giữ trong hộp nhựa vô trùng có bổ sung giấy thấm và nước vô trùng để duy trì độ ẩm. Mẫu được ủ ở 30°C trong 4-5 ngày. Hình thái của hệ sợi và cuống sinh bào tử được quan sát dưới kính hiển vi [9]. Đồng thời, DNA tổng số của chủng XK1 được tách chiết theo quy trình nhóm nghiên cứu đã công bố [11]. Trình tự 16S rRNA được khuếch đại từ DNA tổng số bằng PCR sử dụng cặp mồi đa năng đặc hiệu cho phổ rộng các loài vi khuẩn gồm: mồi xuôi 63F: 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' và mồi ngược 1378R: 5'-GGGCGGWTGTACAAGGC-3' [12]. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0,7% và tinh sạch bằng kit tinh sạch của hãng Promega (Mỹ). Mẫu DNA tinh sạch được giải trình tự bởi Công ty 1st BASE (Singapore) và trình tự 16S rRNA được phân tích so sánh với cơ sở dữ liệu của GenBank. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA6 [13].

Tối ưu điều kiện nuôi cấy chủng xạ khuẩn XK1 để đạt được hoạt tính kháng *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* cao

Điều kiện nuôi cấy được tối ưu đối với chủng xạ khuẩn XK1 bằng cách so sánh hoạt tính kháng nấm của dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn XK1 ở các điều kiện khác nhau. Hoạt tính kháng nấm được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch [10]. Các điều kiện tối ưu bao gồm: môi trường dinh dưỡng (ISP4, SKS, MT301, 2M và MT2); thời gian nuôi cấy (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ngày); nhiệt độ nuôi cấy (25, 30 và 37°C); pH môi trường (5, 6, 7, 8). Thành phần các môi trường sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: ISP4 (g/l: tinh bột-10; K₂HPO₄-1; MgSO₄-3; NaCl-5; (NH₄)₂SO₄-2; pepton-5; CaCO₃-2; FeSO₄-0,001475; MnCl₂-0,001; ZnSO₄-0,001835); SKS (g/l: tinh bột-10; glucose-10; bột đậu tương-10; peptone-5; CaCO₃-3); MT301 (g/l: tinh bột-24; glucose-1; peptone-3; cao thịt-3; cao nấm men-5; CaCO₃-4); 2M (g/l: tinh bột-20; bột đậu tương-15; cao nấm men-2; CaCO₃-4); MT2 (g/l: tinh bột-25; glucose-20; bột đậu tương-10; cao nấm men-10; NaCl-2; CaCO₃-5; MgSO₄-1).

Đánh giá khả năng kháng nấm *P. digitatum* trên cam của dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn XK1

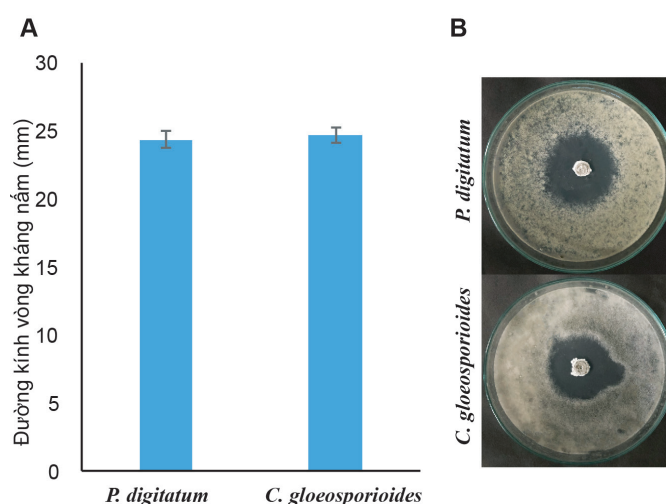
Quả cam được làm sạch bằng nước cất vô trùng và ethanol 70%, sau đó tạo vết thương xâm nhiễm bằng tăm vô trùng. Ở công thức thí nghiệm lây nhiễm nấm *P. digitatum*, cam được chia làm hai nhóm, một nhóm cam được ngâm

trong dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn XK1 (điều kiện nuôi theo kết quả nghiên cứu tối ưu) và một nhóm cam được ngâm trong nước cất vô trùng trong 30 phút và để khô tự nhiên, sau đó được lây nhiễm 10 µl dịch bào tử nấm *P. digitatum* (nồng độ 10⁶ bào tử/ml) [9]. Ở công thức đối chứng, hai nhóm cam được xử lý tương tự nhưng không tiến hành lây nhiễm nấm *P. digitatum*. Thí nghiệm được bố trí trong hộp kín vô trùng ở 25°C và quan sát sau 3, 5 và 7 ngày. Mỗi nhóm cam gồm 10 quả và mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Kết quả và thảo luận

Phân lập và tuyển chọn chủng xạ khuẩn kháng nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides*

Từ các mẫu đất thu tại vùng rễ các cây cam phát triển khỏe mạnh, chúng tôi đã phân lập được 18 chủng xạ khuẩn khác nhau. Đánh giá sơ bộ khả năng kháng nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* bằng phương pháp đặt thời thạch cho thấy, chủng xạ khuẩn XK1 thể hiện hoạt tính kháng mạnh đồng thời cả 2 loài nấm gây bệnh thối và rụng quả trên cây cam là *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* (hình 1).



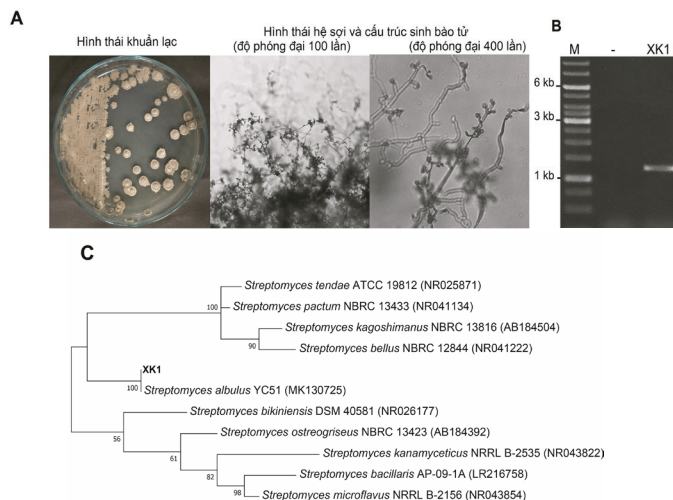
Hình 1. Khả năng kháng nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* của chủng xạ khuẩn XK1. (A) Đường kính vòng kháng nấm; (B) Vòng kháng nấm trên đĩa môi trường.

Trên thế giới, rất nhiều công trình khoa học đã đề cập tới khả năng kháng nấm bệnh thực vật của các chủng xạ khuẩn. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces halstedii* AJ-7 được đánh giá có khả năng kiểm soát nấm *Phytophthora capsici* gây bệnh trên cây ớt đỏ [14] hay chủng xạ khuẩn *S. rhizosphaericus* 0250 có khả năng kháng mạnh nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo rũ ở cây mướp [15]. Xạ khuẩn *S. rochi* có khả năng đối kháng với nấm *P. capsici* gây bệnh thối rễ trên ớt với hiệu quả giảm bệnh lên đến 78,9% và ức chế sự phát triển của sợi nấm *P. capsici* trong điều kiện *in vitro* bằng cách tiết kháng sinh [16]. Chủng xạ khuẩn XK1 phân lập được trong nghiên cứu này có khả năng kháng mạnh với nấm gây bệnh trên cây

cam là *P. digitatum* và *C. gloeosporioides*. Do đó, chủng xạ khuẩn XK1 có tiềm năng phục vụ nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh thối rụng quả trên cây cam.

Định danh chủng xạ khuẩn XK1

Để xác định an toàn sinh học và nhận biết chủng xạ khuẩn XK1 dùng cho nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh kiểm soát nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* gây bệnh trên cam, chúng tôi tiến hành định danh chủng XK1 nêu trên dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự 16S rRNA. Đánh giá về đặc điểm khuẩn lạc cho thấy, chủng xạ khuẩn XK1 có khuẩn lạc lồi, bề mặt nhẵn, có các nếp, ban đầu có màu trắng sau chuyển sang màu xám, đường kính khuẩn lạc từ 3-5 mm sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường ISP4 ở 28-30°C. Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy, khuẩn ty cơ chất đều phân nhánh mạnh và không bị đứt. Từ cuống sinh bào tử hình thành chuỗi bào tử dài có dạng xoắn móc câu, cong nhẹ ở đầu (hình 2A). Các đặc điểm này là những đặc điểm điển hình của chi xạ khuẩn *Streptomyces* [17].

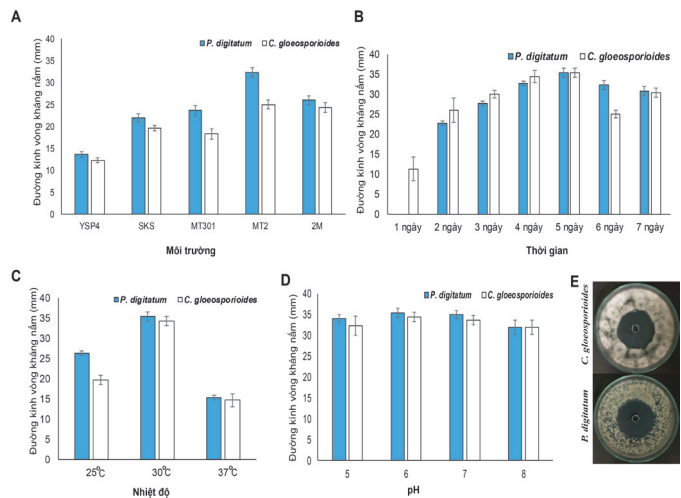


Hình 2. Định danh chủng xạ khuẩn XK1 dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự 16S rRNA. (A) Hình thái chủng xạ khuẩn trên đĩa thạch YSP4 và dưới kính hiển vi; (B) Kết quả khuếch đại trình tự 16S rRNA; (C) Cây phát sinh loài dựa trên trình tự 16S rRNA; M: 1 kb DNA marker.

Để định danh chủng xạ khuẩn XK1, DNA tổng số của chủng xạ khuẩn XK1 được tách chiết để sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại 16S rRNA với cặp mồi 63F/1378R. Kết quả PCR cho thấy có một băng duy nhất kích thước khoảng 1300 bp (hình 2B). Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,7%, sau đó được tinh sạch bằng kit tinh sạch DNA của hãng Promega theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu DNA tinh sạch được giải trình tự bởi Công ty 1st BASE (Singapore). Kết quả so sánh trình tự 16S rRNA với dữ liệu trong GenBank và xây dựng cây phát sinh chủng loại sử dụng phần mềm MEGA6 [13] cho thấy, chủng xạ khuẩn XK1 thuộc loài *Streptomyces albulus* với độ tương đồng về trình tự 16S rRNA là 99% (hình 2C). Do vậy, chủng XK1 được xác định là *Streptomyces albulus* XK1.

Nghiên cứu điều kiện nuôi cấy tối ưu cho chủng xạ khuẩn *S. albulus* XK1

Môi trường dinh dưỡng, thời gian nuôi cấy, nhiệt độ và pH môi trường là các yếu tố quan trọng, ảnh hưởng tới hoạt tính kháng vi sinh vật của xạ khuẩn [18, 19]. Trong nghiên cứu này, các điều kiện nuôi cấy chủng xạ khuẩn XK1 được tối ưu nhằm thu được hoạt tính kháng nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* cao nhất. Kết quả tối ưu cho thấy, chủng xạ khuẩn XK1 được nuôi cấy trên môi trường MT2 với pH=6, sau 5 ngày nuôi ở nhiệt độ 30°C cho hoạt tính kháng đồng thời cả 2 loài nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* cao nhất (hình 3).

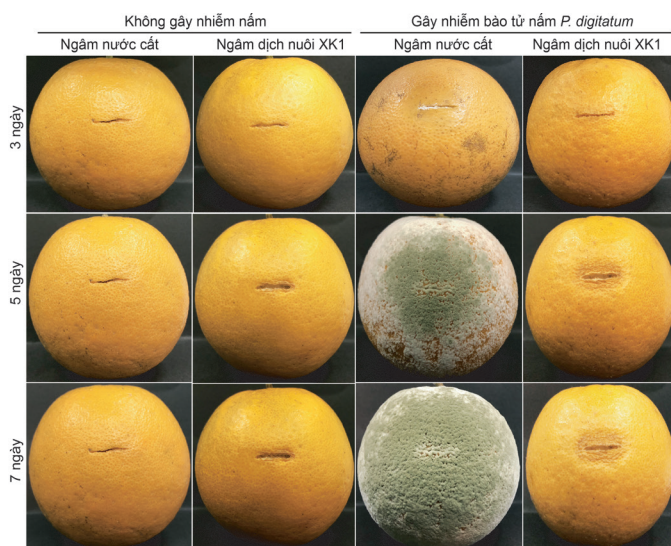


Hình 3. Kết quả nghiên cứu điều kiện nuôi cấy tối ưu cho chủng xạ khuẩn XK1. (A) Các loại môi trường dinh dưỡng; (B) Thời gian nuôi cấy; (C) Nhiệt độ nuôi cấy; (D) pH môi trường nuôi cấy; (E) Khả năng kháng nấm của dịch nuôi chủng xạ khuẩn ở điều kiện tối ưu.

Khả năng kháng nấm *P. digitatum* trên cam của dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1

Dịch nuôi chủng xạ khuẩn *S. albulus* XK1 được xác định có khả năng kháng mạnh nấm *P. digitatum*, tuy nhiên khả năng kháng nấm trên cam là kết quả quan trọng nhằm định hướng ứng dụng dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1 vào thực tế sản xuất chế phẩm sinh học. Kết quả nghiên cứu sau 3-7 ngày cho thấy, trên các mẫu cam được xử lý với nước cất và dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1 không lây nhiễm bào tử nấm *P. digitatum* không có hiện tượng bất thường, chứng tỏ nước cất và dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1 không làm ảnh hưởng tới cam. Trên mẫu cam được xử lý với nước cất và lây nhiễm bào tử nấm *P. digitatum*, cam bắt đầu xuất hiện hiện tượng thối hỏng sau 3 ngày, sau 5 ngày cam bị thối 50% bề mặt quả và sau 7 ngày cam đã bị thối toàn bộ bề mặt quả. Tuy nhiên, trên mẫu cam xử lý với dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1 không thấy xuất hiện hiện tượng thối hỏng (hình 4). Như vậy, có thể thấy, dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1 không chỉ kháng nấm *P. digitatum* trên đĩa thạch mà còn kháng mạnh khi thử nghiệm trên cam. Khả năng kháng nấm *P. digitatum* của dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1 có thể là do chủng xạ khuẩn này có khả năng sinh tổng

hợp các chất có hoạt tính sinh học như kháng sinh, độc tố, chất hoạt động bề mặt, chất dễ bay hơi, từ đó có thể ngăn chặn sự sinh trưởng hoặc tiêu diệt nấm bệnh [6, 7]. Hiện nay ở Việt Nam, các nghiên cứu sử dụng vi sinh vật để kiểm soát nấm *P. digitatum* gây bệnh trên cam chưa có nhiều. Trong khi đó, cam là một trong những cây trồng phổ biến và diện tích trồng ngày càng mở rộng. Dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1 có thể sử dụng cho sản xuất chế phẩm vi sinh kháng nấm *P. digitatum* gây bệnh trên cam.



Hình 4. Khả năng kháng nấm *P. digitatum* gây bệnh trên cam của dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1.

Kết luận

Nghiên cứu này đã tuyển chọn được chủng xạ khuẩn XK1 phân lập từ đất trồng cam tại tỉnh Hà Giang có hoạt tính kháng mạnh đồng thời cả 2 loài nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* gây thối và rụng quả cam. Dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự 16S rRNA, chủng xạ khuẩn XK1 được xác định thuộc loài *Streptomyces albulus*. Điều kiện nuôi cấy tối ưu cho chủng *S. albulus* XK1 đạt hoạt tính kháng *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* mạnh nhất gồm: môi trường MT2 với pH=6, thời gian nuôi 5 ngày ở 30°C. Dịch nuôi cấy chủng *S. albulus* XK1 thể hiện hoạt tính ức chế khả năng gây bệnh của nấm *P. digitatum* trên cam. Chủng xạ khuẩn *S. albulus* XK1 có tiềm năng ứng dụng trong việc sản xuất chế phẩm sinh học dùng cho kiểm soát vi nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* gây bệnh thối và rụng quả trên cây cam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Bautista-Baños (2014), *Postharvest Decay, Control Strategies*, Elsevier, pp.53-61.
- [2] D. Aiello, R. Carrieri, V. Guarnaccia, A. Vitale, E. Lahoz, G. Polizzi (2015), "Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. karstii* causing preharvest disease on *Citrus sinensis* in Italy", *Journal of Phytopathology*, **163**(3), pp.168-177.
- [3] H. Benyahia, A. Ifi-Jr, C. Smaili, M. Afellah, Y. Lamsetef, L. Timmer

(2003), "First report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing withertip on twigs and tear stain on fruit of citrus in Morocco", *Plant Pathology*, **52**(6), pp.798-798.

[4] 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.

[5] S.D. Schrey, M.T. Tarkka (2008), "Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis", *Antonie Van Leeuwenhoek*, **94**(1), pp.11-19.

[6] M.E. Hibbing, C. Fuqua, M.R. Parsek, S.B. Peterson (2010), "Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle", *Nature Reviews Microbiology*, **8**(1), pp.15-25.

[7] Z. Qin, K. Peng, X. Zhou, R. Liang, Q. Zhou, H. Chen, D.A. Hopwood, T. Kieser, Z. Deng (1994), "Development of a gene cloning system for *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *yingchengensis*, a producer of three useful antifungal compounds, by elimination of three barriers to DNA transfer", *Journal of Bacteriology*, **176**(7), pp.2090-2095.

[8] S.C. Hsu, J.L. Lockwood (1975), "Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil", *Applied Microbiology*, **29**(3), pp.422-426.

[9] T.X. Vu, T.T. Ngo, L.T.D. Mai, T.T. Bui, D.H. Le, H.T.V. Bui, H.Q. Nguyen, B.X. Ngo, V.T. Tran (2018), "A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using *DsRed* and *GFP* to visualize citrus host colonization", *Journal of Microbiological Methods*, **144**, pp.134-144.

[10] B. Intra, I. Mungsuntisuk, T. Nihira, Y. Igarashi, W. Panbangred (2011), "Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease", *BMC Research Notes*, **4**(1), pp.1-9.

[11] V.T. Tran, T.B.X.L. Do, T.K. Nguyen, X.T. Vu, B.N. Dao, H.H. Nguyen (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.

[12] J.R. Marchesi, T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin, J.C. Fry, S.J. Hiom, W.G. Wade (1998), "Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA", *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(2), pp.795-799.

[13] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar (2013), "MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, **30**(12), pp.2725-2729.

[14] G.J. Joo (2005), "Production of an anti-fungal substance for biological control of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight in red-peppers by *Streptomyces halstedii*", *Biotechnology Letters*, **27**(3), pp.201-205.

[15] X.F. Li, Y.H. Tian, H.Y. Peng, B.L. He, K.X. Gao (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.

[16] M. Ezziyiani, M. Requena, C. Egea-Gilabert, M. Candela (2007), "Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination", *Journal of Phytopathology*, **155**(6), pp.342-349.

[17] Q. Li, X. Chen, Y. Jiang, C. Jiang (2016), *Morphological Identification of Actinobacteria, Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*, Rijeka, Croatia: InTech, pp.59-86.

[18] H. Gao, M. Liu, J. Liu, H. Dai, X. Zhou, X. Liu, Y. Zhuo, W. Zhang, L. Zhang (2009), "Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology", *Bioresource Technology*, **100**(17), pp.4012-4016.

[19] M. Oskay (2011), "Effects of some environmental conditions on biomass and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp., KGG32", *International Journal of Agriculture & Biology*, **13**(3), pp.317-324.