

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM *Collectotrichum* GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN QUẢ THANH LONG BỞI CÁC CHỦNG *Streptomyces* sp.

Nguyễn Thị Thủy Tiên*, Nguyễn Hiền Trang, Nguyễn Thị Đan Huyền, Lê Thanh Long

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

*Tác giả liên hệ: nguyenthithuytien84@huanf.edu.vn

Ngày nhận bài: 03.10.2022

Ngày chấp nhận đăng: 20.12.2022

TÓM TẮT

Thán thư là một trong những bệnh phổ biến gây hại trên thanh long sau thu hoạch, gây ra bởi nấm *Collectotrichum* spp. Trong nghiên cứu này, 56 chủng *Streptomyces* sp. được sử dụng để đánh giá khả năng kháng nấm *C. acutatum* C1. Kết quả sàng lọc sơ bộ bằng phương pháp cấy vệt cho thấy có 33 chủng không có khả năng kháng nấm *C. acutatum* C1, 17 chủng kháng yếu và 6 chủng thể hiện khả năng kháng nấm mạnh. Đáng chú ý, chủng NARZ có thể hiện tính kháng mạnh nhất và được định danh dựa trên gene 16S rRNA là *Streptomyces murinus*. Dịch nổi không chứa tế bào của *Strep. murinus* có thể ức chế sự phát triển của nấm *C. acutatum* C1 trên môi trường PDA. Nồng độ 28,89% có khả năng ức chế ít nhất 50% sự phát triển của đường kính tàn nấm *C. acutatum* C1. Như vậy, *Strep. murinus* NARZ có tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát bệnh thán thư trên quả thanh long sau thu hoạch.

Từ khóa: Kháng nấm, *Streptomyces*, thán thư, thanh long.

Evaluation Antifungal Ability of *Streptomyces* sp. against *Collectotrichum* Causing Anthracnose on Dragon Fruit

ABSTRACT

Anthracnose caused by *Collectotrichum* spp is one of the most common postharvest diseases of dragon fruit. In this study, 56 strains of *Streptomyces* spp. were used to evaluate the antifungal ability against *C. acutatum* C1. Preliminary screening results using streak culture method showed that 33 strains had no antifungal activity, 17 strains showed weak effect, and 6 strain had strong resistance. Notably, the strain NARZ showed the strongest inhibition and was identified based on its 16S rRNA gene as *Streptomyces murinus*. Cell-free supernatant of *Strep. murinus* prevented the growth of *C. acutatum* C1 on PDA medium. Concentration of 28.89% had the ability to inhibit at least 50% of the growth of *C. acutatum* C1. Thus, *Strep. murinus* NARZ could have potential application in anthracnose control for postharvest dragon fruit.

Keywords: Antifungal, anthracnose, dragon fruit, *Streptomyces*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, cây thanh long (*Hydrocereus undatus*) là loại cây ăn quả mà trong những năm gần đây đã được xuất khẩu và mang lại lợi ích kinh tế khá cao, góp phần to lớn trong việc chuyển đổi cơ cấu kinh tế, nâng cao thu nhập, phát triển nông nghiệp nông thôn với giá trị hàng hóa cao (Nguyễn Thế Quyết & cs., 2018). Tuy nhiên, trên thanh long, thường gặp một số bệnh ảnh hưởng tới năng suất và phẩm chất của quả

sau thu hoạch, trong đó bệnh thán thư do nấm *Collectotrichum* spp. là bệnh điển hình gây hại đáng kể nhất. Một số tác giả đã xác định *C. gloeosporioides* và *C. truncatum* gây bệnh thán thư trên cây thanh long ở Trung Quốc và Thái Lan (Guo & cs., 2014; Athipunyakom & cs., 2012). Vijaya & cs. (2015) đã tìm được chủng *C. truncatum* là tác nhân gây bệnh trên quả thanh long ở Malaysia. Gần đây, tác giả Đặng Thị Kim Uyên & cs. (2018) đã phân lập và xác định *C. truncatum* cũng là tác nhân gây bệnh thán thư

thanh long ở Việt Nam. Hiện nay, sử dụng các chất hoạt tính sinh học từ vi sinh vật đang là một biện pháp đầy tiềm năng nhằm kiểm soát nhóm tác nhân nấm gây bệnh sau thu hoạch. Một số nghiên cứu sử dụng vi sinh vật như *Streptomyces* spp., *Trichoderma* spp., *Chaetomium* spp. có hoạt tính kháng với nấm gây bệnh thán thư trên cây thanh long (Nguyễn Thế Quyết & cs., 2018; Nguyễn Như Nhút & cs., 2019).

Streptomyces sp. được biết đến như là nhóm xạ khuẩn trong tự nhiên được quan tâm đặc biệt bởi khả năng sinh tổng hợp nhiều chất có hoạt tính sinh học cao (kháng khuẩn, kháng nấm, chống ung thư, ức chế miễn dịch...). Ngày nay, 80% kháng sinh có nguồn gốc từ chi *Streptomyces* spp., là một trong số các vi sinh vật đất chiếm tỉ lệ cao và đa năng nhất, nhờ tốc độ sản xuất chất chuyển hóa lớn, khả năng phân hủy lignocellulose, chitin và vai trò cơ bản của chúng trong các chu trình sinh học của chất hữu cơ. Các nghiên cứu cũng chỉ ra sự cộng sinh giữa *Streptomyces* và thực vật, vì chất kháng sinh từ xạ khuẩn có tác dụng chống lại các mầm bệnh và dịch tiết từ thực vật cho phép sự phát triển của *Streptomyces* (De Lima & cs., 2012). Chính những đặc điểm khác biệt này nên có nhiều nghiên cứu theo hướng sử dụng xạ khuẩn như những vi khuẩn đối kháng có khả năng ứng dụng trong bảo vệ cây trồng và ức chế phát triển nấm bệnh sau thu hoạch (Martinez & cs., 2020).

Mặc dù chi *Streptomyces* spp. được xem như là tác nhân có hoạt tính sinh học mạnh, có tiềm năng kháng khuẩn, kháng nấm trong lĩnh vực nông nghiệp nhưng việc sử dụng chúng như là một tác nhân phòng trừ bệnh thán thư hại thanh long chưa được nghiên cứu một cách đầy đủ. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả phân lập và xác định chủng nấm *C. acutatum* từ thanh long, đồng thời đánh giá khả năng kháng nấm *C. acutatum* của dịch nuôi cấy từ xạ khuẩn *Streptomyces* spp. ở điều kiện *in vitro*.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các quả thanh long có vết bệnh thán thư điển hình sử dụng cho việc phân lập nấm được thu mua từ chợ Đầu Mối, phường Phú Hựu,

thành phố Huế. 56 chủng *Streptomyces* được cung cấp bởi phòng thí nghiệm vi sinh Khoa Cơ khí và Công nghệ, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phân lập dựa trên đặc điểm hình thái của nấm C. acutatum: Khuẩn lạc thuần nấm *C. acutatum* được phân lập từ những quả thanh long có vết bệnh thán thư điển hình được thực hiện theo phương pháp của Abera & cs. (2016). Dùng tăm vô trùng chấm vào mô bệnh rồi cấy lên đĩa có chứa môi trường PDA (potato dextrose agar, dịch chiết của 250g khoai tây, 20g dextrose, 20g agar, 1 lít nước). Cấy chuyển nấm đến khi thu được khuẩn lạc thuần. Dựa vào hình thái tản nấm, màu sắc tản nấm, đặc điểm hình thái khi soi dưới kính hiển vi so với mô tả trong các nghiên cứu trước (Burgess & cs., 2009) để sàng lọc, xác định sơ bộ chủng nấm gây bệnh thán thư trên quả thanh long nghi ngờ là *C. acutatum*.

Định danh nấm gây bệnh thán thư trên quả thanh long: Định danh chủng nấm gây bệnh thán thư trên quả thanh long bằng cách giải trình tự gene 28S rRNA của nấm bởi Công ty Sinh hóa Phù Sa, Cần Thơ. So sánh trình tự thu được với ngân hàng gene bằng công cụ BLASTn để định danh nấm đã phân lập.

Sàng lọc sơ bộ khả năng kháng nấm của các loài Streptomyces: Sàng lọc khả năng kháng nấm của các loài *Streptomyces* đã phân lập bằng cách sử dụng kỹ thuật cấy vệt. Các chủng *Streptomyces* được cấy vệt ở tâm đĩa Petri (rộng khoảng 1,5cm, dài bằng đường kính đĩa) có chứa môi trường ISP-4 và các đĩa được ủ ở 28-30°C trong 4-5 ngày. Sau đó, đặt hai tản nấm bệnh có kích thước 2mm² được cắt từ rìa của tản nấm sau 7 ngày nuôi cấy vào hai vị trí ở giữa thành đĩa Petri và mép của *Streptomyces*. Ủ đĩa ở 28°C, sau 7 ngày, xác định khả năng kháng nấm của *Streptomyces* dựa trên việc quan sát sự phát triển của nấm bệnh trên đĩa (Dezfully & cs., 2015).

- *Thu dịch nuôi cấy chủng Streptomyces*: *Streptomyces* đã chọn được nuôi cấy trong bình

tam giác 250ml có chứa 100ml môi trường ISP4 trên máy lắc (180 vòng/phút) ở nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 7 ngày. Ly tâm lạnh dịch nuôi cấy (10.000 vòng/phút) trong 15 phút (Tendulkar & cs., 2003). Phần dịch nổi được sử dụng để xác định khả năng kháng nấm của chủng *Streptomyces* đã chọn. Trình tự gene 16S rRNA của chủng *Streptomyces* được thực hiện bởi Công ty Sinh hóa Phù Sa, Cần Thơ. Trình tự thu được so sánh với ngân hàng gen Genbank để định danh loài bằng công cụ BLASTn trên NCBI (Altschul & cs., 1990).

- *Xác định khả năng kháng nấm của Streptomyces*: Ảnh hưởng của *Streptomyces* đến sự phát triển của nấm bệnh được xác định dựa trên đường kính tản nấm theo phương pháp của Al-Hetar & cs. (2011). Dịch nổi thu được sau khi nuôi cấy *Streptomyces* ở trên được lọc qua màng lọc có kích thước $0,2\mu\text{m}$ để loại bỏ hoàn toàn tế bào vi sinh vật (Cell Free Supernatant-CFS). Sau đó, CFS được bổ sung vào môi trường PDA để đạt các nồng độ cuối là 0% (đối chứng) 10%, 20%, 30%, 40% và 50% và đổ vào đĩa Petri $\phi 9$ với tổng thể tích 18 ml/đĩa. Khi agar đông đặc, cấy 1 tản nấm *C. actatum* kích thước 2mm^2 ở rìa tản nấm cho vào giữa đĩa Petri và nuôi ở 28°C . Theo dõi và đo đường kính tản nấm mỗi 48 giờ/lần (sau 3 ngày kể từ ngày nuôi cấy) (Al-Hetar & cs., 2011). Hiệu lực ức chế được tính theo tỉ lệ phần trăm (%) ức chế tốc độ phát triển của đường kính tản nấm PIRG % (percentage inhibition of radial growth) (Al-Hetar & cs., 2011). $\text{PIRG (\%)} = ((R_1 - R_2) \times 100) / R_1$. Trong đó:

R_1 là đường kính tản nấm ở công thức đối chứng, R_2 là đường kính tản nấm ở công thức thí nghiệm.

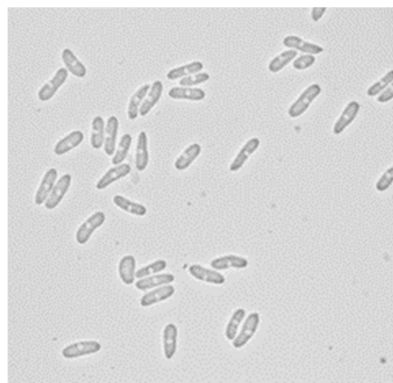
2.3. Xử lý số liệu

Kết quả thí nghiệm được phân tích phương sai ANOVA một nhân tố (one-way ANOVA) và so sánh các giá trị trung bình bằng thử nghiệm DUNCAN (Duncan's Multiple Range Test) trên phần mềm thống kê SPSS 20.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập, định danh nấm *C. acutatum* gây bệnh thán thư hại thanh long

Có 3 chủng nấm khác nhau (ký hiệu là C1, C2 và C3) được phân lập từ các quả thanh long có vết bệnh thán thư điển hình. Hình ảnh đại thể và vi thể của chúng được so sánh với đặc điểm của chủng nấm *C. acutatum* theo mô tả của tác giả Vũ Triệu Mân (2007). Trong đó, chủng C1 có mức tương đồng cao nhất về hình thái, màu sắc tản nấm cũng như về đặc điểm sinh bào tử. Tản nấm xốp, phồng lên ở giữa và mỏng dần về rìa, có màu trắng hồng trên môi trường PDA. Sợi nấm đa bào, phân nhánh mạnh, có màu trắng đến trắng hồng. Bào tử nấm là bào tử trong suốt hình trụ, thuôn nhọn về hai đầu, không có vách ngăn, có chứa thể trong suốt bên trong hoặc hiếm khi có hình trụ với đỉnh tù và thon dần về hai đầu (Hình 1).



Hình 1. Hình thái tản nấm chủng C1 phân lập trên môi trường PDA và bào tử phân sinh

Đánh giá khả năng kháng nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên quả thanh long bởi các chủng *Streptomyces* sp.

The screenshot shows the NCBI BLAST results page for a query sequence. The 'Descriptions' tab is selected. The table lists three sequences from *Colletotrichum acutatum* with 100% identity and 100% coverage. The sequences are: 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence; small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene; and internal transcribed spacer 1, partial sequence.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Colletotrichum acutatum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence...	Colletotrichum ac...	1050	1050	100%	0.0	99.83%	572	AB443950.1
Colletotrichum acutatum isolate TS 12.1.2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe...	Colletotrichum ac...	1048	1048	99%	0.0	99.82%	826	MH931266.1
Colletotrichum acutatum voucher MM13 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene...	Colletotrichum ac...	1048	1048	99%	0.0	99.82%	891	KY315935.1

Hình 2. Kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen 16S rRNA của chủng NARZ và trình tự nucleotide công bố trên ngân hàng gene theo cơ sở dữ liệu của NCBI

Bảng 1. Kết quả sàng lọc sơ bộ khả năng kháng nấm của 56 chủng *Streptomyces*

Chủng	C1	Chủng	C1	Chủng	C1	Chủng	C1
G25105	-	NBY08	-	NB201	-	N2R4	+
H12	-	ND203	+	NBA01	+	N4B5	+
H16	-	ND212	-	NBA02	+	N4R1	+
HC6	-	ND401	+	NBA03	+	NT414	+
HC111	-	NN201	-	NBA05	+	NT415	-
HDM01	+	NN203	-	NBY01	-	NARZ	+
HDM32	+	NN401	-	NBY03	-	NVA01	+
HDM122	+	NNA03	-	NBY05	-	NYD01	+
HN111	+	NNA04	-	NTA01	-	N2R3	+
HN211	-	NNA08	-	NTA03	-	NT413	-
HT123	-	NNY01	-	NTY03	+	NV406	+
HT125	-	NNY02	-	NTY04	-	N2B1	-
HTD03	-	NNY08	-	NV203	+	NT403	-
ISP5069	-	NT201	-	NV204	+	NV404	+

Ghi chú: (-): Không có hoạt tính kháng nấm; (+): Có hoạt tính kháng nấm.

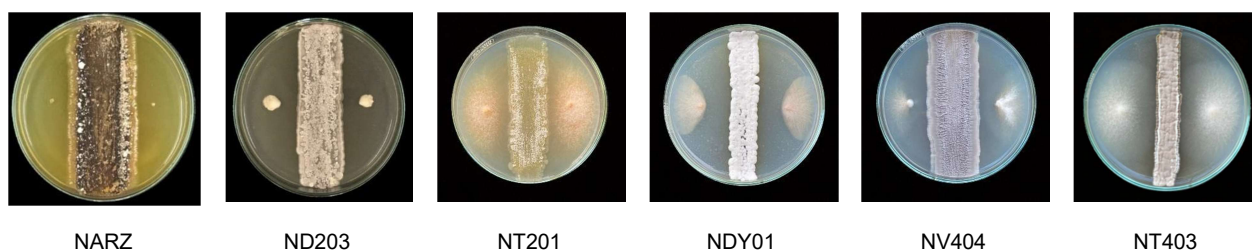
Chủng nấm C1 được định danh bằng phương pháp giải trình tự một phần gen mã hóa cho tiểu phần ribosome 28S RNA và so sánh mức độ tương đồng giữa các đoạn gene với dữ liệu đã công bố trong ngân hàng gen thông qua công cụ BLASTn. Kết quả cho thấy trình tự gene của chủng C1 tương đồng 100% với chủng *C. acutatum* AB443950 (Hình 2). Qua đó, chúng tôi xác định được chủng C1 thuộc loài *C. acutatum* và ký hiệu là *Colletotrichum acutatum* C1.

3.2. Sàng lọc sơ bộ các chủng *Streptomyces* có khả năng kháng nấm *C. acutatum* C1 cao

Trong 56 chủng *Streptomyces*, có 33 chủng

không thể hiện khả năng kháng nấm *C. acutatum* C1, 6 chủng thể hiện khả năng kháng mạnh và 17 chủng kháng yếu (Bảng 1, Hình 3).

Chủng *Streptomyces* có khả năng kháng mạnh là chủng ức chế gần như hoàn toàn sự phát triển của nấm *C. acutatum* C1, tản nấm khô và teo lại hoặc rất nhỏ; kháng yếu là chủng có khả năng ức chế một phần sự phát triển của nấm *C. acutatum* C1, tản nấm vẫn có thể phát triển về phía vách *Streptomyces* hoặc phía hướng ra ngoài đĩa. Chủng *Streptomyces* không có khả năng kháng là chủng mà nấm *C. acutatum* C1 có khả năng mọc lan ra đến rìa của chúng, thậm chí mọc xuyên qua chúng.



Hình 3. Hình ảnh sàng lọc sơ bộ khả năng kháng nấm *C. acutatum* C1 của một số loài *Streptomyces*

Không xác định khả năng kháng nấm mạnh hay yếu của *Streptomyces* dựa trên khoảng cách giữa rìa vạch xạ khuẩn và rìa tản nấm mà dựa trên quan sát sự phát triển của nấm *C. acutatum* C1 trên đĩa Petri sau 7 ngày nuôi cấy. Nguyên nhân là do có sự phát triển không đồng đều giữa các chủng *Streptomyces*. Sau 4 ngày nuôi cấy vạch *Streptomyces*, chúng tôi tiến hành cấy nấm *C. acutatum* C1 vào đĩa với khoảng cách giữa tản nấm và mép rìa của vạch *Streptomyces* bằng nhau, tiếp tục ủ ở 28°C trong 7 ngày. Tuy nhiên, mặc dù có cùng kích thước cấy vạch ban đầu (1,5cm). một số chủng *Streptomyces* vẫn tiếp tục lan rộng ra hai bên, một số chủng lại giữ nguyên kích thước trong quá trình khảo sát khả năng kháng nấm. Do đó, có trường hợp khoảng cách giữa rìa vạch *Streptomyces* và rìa tản nấm quá nhỏ do *Streptomyces* lan rộng ra hai bên nhưng lại ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm *C. acutatum* C1 trong khi một số chủng *Streptomyces* lại không lan rộng thêm mà chỉ có tác dụng ức chế một phần sự phát triển của nấm *C. acutatum* C1. Ví dụ, chủng NARZ có khoảng cách từ mép rìa xạ khuẩn và mép rìa nấm thấp hơn chủng NYD01, đạt tương ứng là 9-9,2mm và 11-11,5mm (số liệu không thể hiện). nhưng chỉ có chủng NARZ mới ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm *C. acutatum* C1.

Việc sàng lọc để lựa chọn chủng vi sinh vật có tiềm năng kháng khuẩn, kháng nấm là bước đầu quan trọng để chọn được chủng cần thiết cho các nghiên cứu sâu hơn. Piyaboon (2017) đã đánh giá khả năng kháng nấm thán thư trên ớt *C. gloeosporioides* bởi 34 chủng *Streptomyces* sp. bằng cách nuôi cấy kép. Có 19 chủng *Streptomyces* sp. ức chế sự phát triển của

C. gloeosporioides ở các mức độ khác nhau. Trong đó, chủng *Streptomyces* CH15 có khả năng kháng nấm cao nhất và được chọn để xác định khả năng kháng nấm bằng dịch chiết thô (Piyaboon, 2017). Lê Thị Hiền & cs. (2014) đã phân lập 43 chủng *Streptomyces* và sàng lọc được các chủng xạ khuẩn đối kháng nấm bệnh cây, từ 8 mẫu đất khác nhau. Trong đó, có 16 chủng đối kháng nấm *Fusarium oxysporum*, 11 chủng đối kháng nấm *Botryosphaeria dothidea*; 3 chủng đối kháng nấm *Phytophthora capsici* và 4 chủng đối kháng nấm *Sclerotium hydrophylum*. Kết quả sàng lọc thu được 2 chủng xạ khuẩn *Streptomyces roseosporus* HN6 và *Streptomyces albobaciens* NA1 có hoạt tính kháng nấm mạnh nhất (Lê Thị Hiền & cs., 2014).

Cơ chế kháng nấm của *Streptomyces* có thể liên quan đến sự cạnh tranh dinh dưỡng, khả năng sinh tổng hợp enzyme phân hủy thành tế bào nấm bệnh, phản ứng với sự phòng thủ của nấm, sản xuất oxit nitơ và làm gián đoạn hoặc phá hủy phương thức thông tin liên lạc của quần thể nấm (Zou & cs., 2021). Trong thí nghiệm này, các chủng *Streptomyces* đã được nuôi cấy trước khi đặt tản nấm *C. acutatum* C1 vào đĩa để xác định khả năng kháng nấm sau 4 ngày. Thời gian này đủ để *Streptomyces* sinh ra các chất có tính kháng nấm khuếch tán vào trong môi trường agar. Nhờ vào đó, khi tản nấm *C. acutatum* được đưa vào, sự có mặt của các chất kháng nấm này đã làm ức chế sự phát triển của chúng ở những mức độ khác nhau tùy vào khả năng tiết ra chất kháng sinh của từng chủng *Streptomyces*. Dựa trên kết quả sàng lọc sơ bộ, chủng NARZ được cho là có khả năng kháng nấm *C. acutatum* C1 mạnh nhất, do đó,

chủng này được định danh và thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Định danh chủng NARZ

Kết quả so sánh trình tự nucleotide của gen 16S rRNA của chủng NARZ với trình tự nucleotide công bố trên ngân hàng gene theo cơ sở dữ liệu của NCBI cho thấy trình tự này tương đồng tới 98,85% với trình tự gene 16S rRNA của chủng *Streptomyces costaricanus* HR391, có tên khoa học là *Streptomyces murinus*. Do đó, chúng tôi xác định chủng NARZ là *Streptomyces murinus* và đặt tên là *Streptomyces murinus* NARZ.

3.4. Khảo sát khả năng kháng nấm *C. acutatum* C1 của dịch nuôi cấy từ *S. murinus* NARZ

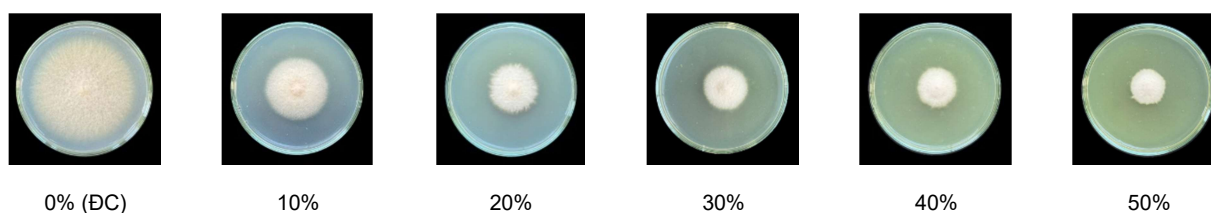
Sau 168 giờ nuôi cấy và quan sát sự phát triển của nấm *C. acutatum* C1, đường kính tản nấm và hình thái tản nấm *C. acutatum* C1 được thể hiện ở bảng 2 và hình 4.

Thời gian bắt đầu ghi nhận kích thước đường kính tản nấm ở các đĩa Petri là khi tản nấm ở đĩa có chứa 50% dịch nuôi cấy bắt đầu phát triển, tức sau 72 giờ và kết thúc quá trình theo dõi khi tản nấm ở đĩa đối chứng (không chứa dịch nuôi cấy) mọc tràn đĩa (168 giờ). Có thể thấy rằng, dịch nuôi cấy của *S. murinus* NARZ có khả năng ức chế sự phát triển của đường kính tản nấm *C. acutatum* C1. Nồng độ càng cao, khả năng ức chế càng lớn. Sau 72 giờ, đường kính của tản nấm *C. acutatum* C1 ở đĩa có chứa 50% dịch nuôi cấy chỉ đạt 6,73mm, trong khi đường kính tản nấm ở mẫu đối chứng lên đến 20,83mm. Không chỉ khác nhau về kích thước tản nấm, tốc độ phát triển của tản nấm ở từng đĩa cũng là điều đáng lưu ý. Có thể thấy rằng, nồng độ dịch nuôi cấy càng cao, tốc độ lan rộng của tản nấm càng hạn chế. Ở nồng độ dịch nuôi cấy 40%, đường kính tản nấm tăng chậm, từ 8,50mm sau 72 giờ và đạt 16,57mm và 24,10mm sau 120 giờ và 168 giờ.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ CFS của *S. murinus* NARZ đến đường kính tản nấm *C. acutatum* C1

Nồng độ CFS <i>S. murinus</i> NARZ (%)	Đường kính tản nấm (mm)			PIRG (%)
	72 giờ	120 giờ	168 giờ	
0	20,83 ^{aC} ± 0,15	43,67 ^{aB} ± 0,32	65,53 ^{aA} ± 0,70	0,00 ^f
10	13,37 ^{bC} ± 0,23	26,47 ^{bB} ± 0,25	39,60 ^{cA} ± 0,20	37,67 ^e
20	11,03 ^{cC} ± 0,15	19,17 ^{cB} ± 0,35	32,57 ^{dA} ± 0,21	48,74 ^d
30	9,73 ^{dC} ± 0,06	18,03 ^{dB} ± 0,25	28,37 ^{eA} ± 0,28	55,35 ^c
40	8,50 ^{eC} ± 0,10	16,57 ^{eB} ± 0,21	24,10 ^{fA} ± 0,43	62,06 ^b
50	6,73 ^{fC} ± 0,35	13,47 ^{fB} ± 0,25	20,27 ^{gA} ± 0,71	68,10 ^a

Ghi chú: Các giá trị trung bình đường kính tản nấm theo cột có cùng chữ cái in thường và theo hàng có cùng chữ cái in hoa là không sai khác ở mức ý nghĩa $P < 0,05$.



Hình 4. Ảnh hưởng của các nồng độ CFS của *S. murinus* NARZ đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm *C. acutaum* C1 sau 168 giờ nuôi cấy

Hiệu lực ức chế của dịch nuôi cấy *S. murinus* NARZ đối với *C. acutatum* C1 được xác định sau 168 giờ. Trong nghiên cứu này, hiệu lực ức chế đạt tối đa ở đĩa có chứa 50% dịch nuôi cấy của *S. murinus* NARZ. Phương trình hồi quy $y = 1,2008x + 15,3$ với độ tương quan: $R^2 = 0,8345$ được thiết lập dựa trên hiệu lực ức chế sự phát triển đường kính tản nấm *C. acutatum* C1 của dịch nuôi cấy của *S. murinus* NARZ. Dựa trên phương trình này, hiệu lực ức chế tối thiểu 50% sự phát triển đường kính tản nấm được xác định ở nồng độ 28,89%.

Hình 4 cho thấy, hình thái của *C. acutatum* C1 ở các công thức thí nghiệm sau 168 giờ quan sát thể hiện sự khác biệt rõ ràng. Ở công thức đối chứng, tản nấm màu trắng hồng, mọc dày, xốp, phồng lên ở giữa và mỏng dần về rìa. Ở nồng độ 40% và 50% nồng độ CFS, tản nấm có màu trắng, sợi nấm ở rìa khuẩn lạc ngắn, dày, xốp và không tạo vành phân sinh. Ở các nồng độ 10%, 20%, 30% không có sự khác biệt đáng kể. CFS của *S. murinus* NARZ làm ức chế sự phát triển của nấm *C. acutatum* C1 có thể là do chúng có chứa các chất kháng nấm được tiết ra trong quá trình nuôi cấy. Tuy nhiên, hiện nay, các nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn, kháng nấm của chủng này còn rất hạn chế. Trong nghiên cứu của Sharma & Thakur (2020), chủng *Streptomyces* sp. PB-33 được xác định tương đồng với chủng *Strep. murinus* dựa trên cây phân loại loài. Chủng này được cho là có chứa đoạn gene mã hóa cho sự sản sinh β -ketoacyl synthase là PKS-II (type II polyketide biosynthesis), có khả năng sinh tổng hợp chất kháng sinh Actinorhodin. Chủng PB-33 đã thể hiện khả năng kháng khuẩn kháng lại *S. aureus* MTCC96, MRSA ATCC 43300, *E. coli* MTCC 40 và kháng nấm *Candida albicans* MTCC 227 (Sharma & Thakur, 2020). Như vậy, có thể cho rằng sự kháng nấm *C. acutatum* C1 của *Strep. murinus* NARZ là nhờ vào khả năng sản sinh Actinorhodin của nó.

Dịch nuôi cấy của *Streptomyces* sp. có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu trên nhiều đối tượng nấm bệnh khác nhau. Tuy nhiên, các nghiên cứu chủ yếu sử dụng dịch đã chiết bởi dung môi hữu cơ từ canh trường sau nuôi cấy để

thử nghiệm. Việc sử dụng canh trường thô để đánh giá khả năng kháng nấm ít được sử dụng. Tuy nhiên, theo chúng tôi, việc sử dụng canh trường thô giúp đánh giá nhanh khả năng kháng nấm của *Streptomyces* để xác định khoảng ức chế tỉ lệ phát triển của nấm bệnh là cần thiết. Một nghiên cứu của Boukaew & cs. (2020) đã bổ sung 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 và 4,0ml dịch lọc vô trùng canh trường của *Streptomyces* RL-1-178 trong mỗi 10ml môi trường PDA để xác định khả năng kháng nấm *Penicillium digitatum* của chúng. Kết quả thu được cho thấy nồng độ 25% (tức 2,5ml dịch lọc *Streptomyces* RL-1-178 trong 10ml môi trường PDA) có khả năng ức chế 100% sự phát triển của *P. digitatum* (Boukaew & cs., 2020).

4. KẾT LUẬN

Trong số 56 chủng *Streptomyces* đã sử dụng để đánh giá hoạt tính kháng nấm *C. acutatum* C1 được phân lập từ quả thanh long, chủng NARZ được xác định là chủng có khả năng kháng cao nhất và được định danh là *S. murinus* NARZ. Nồng độ dịch nuôi cấy *S. murinus* NARZ có khả năng ức chế 50% sự phát triển của nấm *C. acutatum* C1 là 28,89%. Điều này cho thấy chủng này có tiềm năng trong việc kiểm soát bệnh thán thư trên thanh long.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế về điều kiện thực hiện và tài trợ kinh phí nghiên cứu trong khuôn khổ đề tài nghiên cứu mạnh cấp trường, mã số NCM.DHNL.2021-04 với tên đề tài: “Chế phẩm sinh học từ *Streptomyces* có tiềm năng ứng dụng trong bảo quản trái cây”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abera A., Lemessa F. & Adunga G. (2016). Morphological characteristics of Colletotrichum species associated with mango (*Mangifera indica* L.) in Southwest Ethiopia. Food Science and Quality Management. 48: 106-115.
- Al-Hetar M.Y., Abidin M.A.Z., Sariah M. & Wong M.Y. (2011). Antifungal activity of chitosan against

- Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Journal of Applied Polymer Science*. 120: 2434-2439.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Athipunyakom P., Seemadua S. & Doungsa-ard C. (2012). Anthracnose diseases of dragon fruit in Thailand: incidence and management strategies. In: *The International Conference on Tropical and Subtropical Plant Diseases*. The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand.
- Boukaew S., Petlamul W. & Prasertsan P. (2020). Comparison of the biocontrol efficacy of culture filtrate from *Streptomyces philanthi* RL-1-178 and acetic acid against *Penicillium digitatum*, *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Plant Pathol.* 158: 939-949.
- Burgess L.W., Knight T.E., Tesoriero L. & Phan H.T. (2009). Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam. Tài liệu Chuyên khảo của ACIAR. 129a.
- Đặng Thị Kim Uyên, Trần Vũ Phấn & Nguyễn Văn Hòa (2018). Xác định nấm *Colletotrichum truncatum* gây bệnh thán thư trên thanh long và hiệu quả của dịch trích thảo mộc lên sự phát triển của nấm. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*. 1(86): 83-89.
- De Lima Procópio R.E., da Silva I.R., Martins M.K., de Azevedo J.L. & de Araújo J.M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 16(5): 466-471.
- Dezfully K.N. & Ramanayaka G.J. (2015). Isolation, identification and evaluation of antimicrobial activity of *Streptomyces flavogriseus*, strain ACTK2 from soil sample of Kodagu, Karnataka State (India). *Jundishapur J Microbiol.* 8(2): e15107. doi: 10.5812/jjm.15107. PMID: 25825640; PMCID: PMC4376976.
- Guo L.W., Wu,Y.X., Ho H.H., Su Y.Y., Mao Z.C., He P.F. & He Y.Q. (2014). First report of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* in China. *Journal of Phytopathology*. 162: 272-275.
- Lê Thị Hiền, Đinh Văn Lợi, Vũ Thị Vân & Nguyễn Văn Giang (2014). Phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn (*Streptomyces* spp.) đối kháng nấm bệnh cây. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*. 12(5): 656-664.
- Martinez Z.E., Erika A.C., Luis F.C. & Elida G.M. (2020). Biocontrol potential of *Streptomyces* sp. CACIS-1.5CA against phytopathogenic fungi causing postharvest fruit. *Egyptian Journal of Biological Pest Control.* 30: 117. doi.org/10.1186/s41938-020-00319-9.
- Nguyễn Như Nhứt, Nguyễn Thị Ngọc Bích, Nguyễn Thanh Trường & Võ Thị Xuyên (2019). Phân lập nấm bệnh *Neoscytalidium dimidiatum* trên cây Thanh long và nghiên cứu kiểm soát bằng vi sinh vật. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ - Khoa học Tự nhiên*. 3(4): 286-293.
- Nguyễn Thế Quyết, Nguyễn Đức Thành, Trịnh Quốc Bình, Bùi Thị Lan Hương, Nguyễn Đức Huy & Phạm Xuân Hội (2018). Xác định khả năng đối kháng của loài *Chaetomium* spp.với nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm nâu thanh long. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*. 11(96): 111-115.
- Piyaboon O. (2017). Evaluation of crude extract substances from *Streptomyces* spp. for controlling *Colletotrichum gloeosporioides* caused anthracnose of chili. *International Journal of Agricultural Technology*. 13(4): 545-552.
- Sharma P. & Thakur D. (2020). Antimicrobial biosynthetic potential and diversity of culturable soil actinobacteria from forest ecosystems of Northeast India. *Sci Rep*. 10: 4104.
- Tendulkar S., Patkar A. & Chattoo B. (2003). A simple protocol for isolation of fungal DNA. *Biotechnology Letters*. 25: 1941-1944.
- Vijaya S.I., Anuar I.S.M. & Zakaria L. (2015). Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum truncatum* causing stem anthracnose of red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia. *Journal of Phytopathology*. 163(1): 67-71.
- Vũ Triệu Mân (2007). Giáo trình bệnh cây chuyên khoa. Đại học Nông nghiệp I, Hà Nội.
- Zou N., Zhou D., Chen Y., Lin P., Chen Y., Wang W., Xie J. & Wang M. (2021). A novel antifungal Actinomycete *Streptomyces* sp. strain H3-2 effectively controls banana Fusarium wilt. *Front. Microbiol.* 12: 706647. doi:10.3389/fmicb.2021.706647.