

ĐỊNH DANH VÀ KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA XẠ KHUẨN CÓ TRIỂN VỌNG TRONG PHÒNG TRỊ BỆNH THÁN THƯ HẠI GẮC

Lê Minh Tường^{1*}, Phạm Tuấn Vũ², Võ Kim Phương²

¹Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường đại học Cần Thơ

²Học viên cao học ngành Bảo vệ Thực vật, Trường đại học Cần Thơ

Email*: lmtuong@ctu.edu.vn

Ngày gửi bài: 13.05.2015

Ngày chấp nhận: 10.10.2016

TÓM TẮT

Đề tài được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm tại Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Trường đại học Cần Thơ nhằm định danh đến loài xạ khuẩn có khả năng quản lý bệnh thán thư hại gốc và khảo sát một số đặc tính của chúng. Qua kết quả định danh xạ khuẩn dựa vào đặc điểm nuôi cấy, đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh lý - sinh hóa và khuếch đại gen vùng 16S - rRNA đã xác định được 5 chủng xạ khuẩn nghiên cứu thuộc 5 loài xạ khuẩn sau: *Streptomyces avellaneus*, *Streptomyces pallidus*, *Streptomyces vinaceus*, *Streptomyces showdoensis* và *Streptomyces exfoliatus*. Bên cạnh đó, khả năng phân giải chitin của 5 chủng xạ khuẩn được thực hiện trên môi trường chứa chitin. Kết quả 2 chủng *S. pallidus* và *S. vinaceus* có khả năng phân giải chitin cao với bán kính vòng phân giải chitin lần lượt là 13,6mm và 12,9mm ở thời điểm 7 ngày sau thí nghiệm. Khả năng phân giải β -glucan của 5 chủng xạ khuẩn được thực hiện trên môi trường chứa β -glucan. Kết quả chủng *S. avellaneus* có khả năng phân giải β -glucan tốt nhất với bán kính vòng phân giải 6 mm ở thời điểm 13 ngày sau thí nghiệm.

Từ khóa: Chitin, *Streptomyces*, thán thư hại gốc, xạ khuẩn, β -glucan.

Identification and Evaluation of Some Characteristics of Actinomycetes Isolates as Potential Agents for Controlling Anthracnose Disease on *Momordica cochinchinensis*

ABSTRACT

The research was carried out in the laboratory of Plant Protection department, Can Tho University. The aims of this research were to (i) identify the *actinomycetes* isolates that were able to control anthracnose disease on *Momordica cochinchinensis* and (ii) examine their characteristics. Based on the culture, morphological, physiological and biochemical characteristics and sequencing of the 16S-rRNA gene, five actinomycetes isolates were identified as five species: *Streptomyces avellaneus*, *Streptomyces pallidus*, *Streptomyces vinaceus*, *Streptomyces showdoensis* and *Streptomyces exfoliatus*. Chitinase activity assay tested on chitin medium showed that *S. pallidus* and *S. vinaceus* isolates had chitinolytic activity, with the chitin lyses halo radius of 13.6 mm and 12.9 mm, respectively, at 7 days after testing. β -glucanase activity assay tested on β -glucan medium indicated that *S. avellaneus* had the β -glucanolytic activity, with the β -glucan lyses halo radius of 6.0 mm at 13 days after testing.

Keywords: Chitin, *Streptomyces*, anthracnose disease, *actinomycetes*, β -glucan.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh thán thư trên gốc do nấm *Colletotrichum* spp. thường gây hại nặng vào mùa mưa khi nhiệt độ và độ ẩm trong không khí cao làm cho bệnh phát triển nhanh chóng. Hiện nay, biện pháp hóa học chủ yếu được nông dân

sử dụng trong quản lý bệnh. Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc hóa học liên tục sẽ hình thành tính kháng và phát sinh loài mới (Backman *et al.*, 1997), đồng thời gây ô nhiễm môi trường do dư lượng thuốc hóa học để lại trong quá trình sử dụng. Ngày nay, biện pháp phòng trị sinh học đã được chú trọng do có nhiều ưu điểm là không

ô nhiễm môi trường và quan trọng là tạo ra nguồn lương thực an toàn cho con người. Vi sinh vật đối kháng đã được ứng dụng để phòng trừ nấm gây bệnh cây trồng bởi nhiều cơ chế khác nhau. Có nhiều nhóm vi sinh vật đối kháng với nấm bệnh như nấm, vi khuẩn và xạ khuẩn. Trong đó, xạ khuẩn (Actinomycetes) là nhóm vi sinh vật đang được quan tâm nghiên cứu. Theo các nghiên cứu, xạ khuẩn có khả năng đối kháng với các nấm bệnh là *Fusarium oxysporium*, *Colletotrichum* spp., *Phytophthora capsici*,... (Joo *et al.*, 2005; Kamel *et al.*, 2007; Shimizu *et al.*, 2009). Bên cạnh đó, xạ khuẩn được xem là có triển vọng trong quản lý một số bệnh hại cây trồng ở ĐBSCL, chẳng hạn như sử dụng xạ khuẩn trong quản lý bệnh héo rũ trên cây mè do nấm *Fusarium oxysporium* (Đoàn Thị Kiều Tiên, 2012), bệnh thán thư hại ớt do nấm *Colletotrichum* spp. (Tô Huỳnh Như, 2012). Kết quả nghiên cứu của Lê Minh Tường (2014) cho thấy 5 chủng xạ khuẩn GCT.TG9; NCT.TG3; NCT.TG4; NCT.TG10; NCT.TG18 thể hiện khả năng phòng trị bệnh thán thư hại gấc do nấm *Colletotrichum* spp. gây ra trong điều kiện phòng thí nghiệm thể hiện hiệu quả ức chế sự phát triển của sợi nấm cao và trong điều kiện nhà lưới thể hiện qua phần trăm diện tích lá nhiễm bệnh thấp và hiệu quả giảm bệnh cao tương đương nghiệm thức thuốc hóa học (Lê Minh Tường, 2014). Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm định danh loài xạ khuẩn có triển vọng và khảo sát một số đặc tính của chúng, làm tiền đề cho những nghiên cứu sau nhằm tìm ra sản phẩm sinh học góp phần trong việc quản lý bệnh thán thư hại gấc nói riêng và thán thư hại cây trồng nói chung.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Năm chủng xạ khuẩn GCT.TG9; NCT.TG3; NCT.TG4; NCT.TG10; NCT.TG18 được thu từ đất trồng gấc ở một số tỉnh ĐBSCL và thể hiện khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư hại gấc trong điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới (Lê Minh Tường, 2014).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát đặc điểm hình thái

a. Màu sắc của hệ sợi khí sinh, hệ sợi cơ chất và sắc tố tan

Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp của Shirling và Gottlieb (1966). Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trên các môi trường: ISP2, ISP3, ISP4 và ISP5 ở điều kiện nhiệt độ phòng. Chỉ tiêu ghi nhận là quan sát màu sắc hệ sợi cơ chất, hệ sợi khí sinh và sắc tố tan tiết ra ngoài môi trường nuôi cấy ở thời điểm 7, 14 và 21 ngày sau thí nghiệm. Ghi nhận các màu: vàng nâu, vàng nâu ánh đỏ hoặc da cam, vàng nâu ánh xanh da trời hoặc tím, vàng nâu lẫn xanh lá cây (Shirling và Gottlieb, 1966).

b. Cuống sinh bào tử và hình dạng bề mặt bào tử

Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp của Tresner *et al.* (1961). Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trên môi trường MS trong 5 ngày. Chuỗi bào tử được quan sát dưới kính hiển vi quang học để xác định dạng chuỗi bào tử của xạ khuẩn như sau: dạng thẳng hay hơi lượn sóng ký hiệu là RF (Rectif lexibiles), dạng hình móc câu hay hình xoắn không hoàn toàn ký hiệu là RA (Retinaculiaperti) và dạng xoắn ốc ký hiệu là S (Spirales). Hình dạng bào tử được quan sát dưới kính hiển vi điện tử để xác định các dạng bào tử như sau: bào tử dạng tròn (nhẵn), bào tử dạng gai, bào tử dạng khối u, bào tử dạng có lông.

2.2.2. Khảo sát đặc tính sinh hóa

a. Khả năng tiết enzym protease của các chủng xạ khuẩn

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Mitra and Chakrabartty (2005). Các chủng xạ khuẩn được nhân nuôi trên môi trường MS trong 5 ngày. Xạ khuẩn được cấy thành 3 điểm, mỗi điểm là một khoanh giấy thấm (có đường kính 5 mm) có tẩm huyền phù xạ khuẩn trên đĩa petri có chứa môi trường Skim milk agar. Sau đó, tiến hành đo bán kính vòng phân giải protein ở thời điểm 2, 4, 6 và 8 ngày sau thí nghiệm.

b. Khả năng tiết enzym lipase của các chủng xạ khuẩn

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Ertuđrul *et al.* (2007). Các chủng xạ khuẩn được nhân nuôi trên môi trường MS trong 5 ngày. Xạ khuẩn được cấy thành 3 điểm, mỗi điểm là một khoanh giấy thấm (có đường kính 5 mm) có tẩm huyền phù xạ khuẩn trên đĩa petri có chứa môi trường Tween 80 agar. Sau đó, tiến hành đo bán kính vòng phân giải lipid ở thời điểm 3, 5 và 7 ngày sau thí nghiệm.

c. Khả năng tiết enzym amylase của các chủng xạ khuẩn

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Santos (2012). Xạ khuẩn được nhân nuôi trên môi trường MS trong 5 ngày. Xạ khuẩn được cấy thành 3 điểm, mỗi điểm là một khoanh giấy thấm (có đường kính 5 mm) có tẩm huyền phù xạ khuẩn trên đĩa petri có chứa môi trường tinh bột. Sau đó, tiến hành đo bán kính vòng phân giải tinh bột ở thời điểm 2, 4, 6, 8 ngày sau thí nghiệm.

d. Sự hình thành sắc tố melanin của các chủng xạ khuẩn có triển vọng

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Shirling và Gottlieb (1966). Xạ khuẩn được nuôi cấy trên môi trường ISP6 ở nhiệt độ phòng. Sau đó, quan sát màu của môi trường ở thời điểm 2, 4 ngày sau thí nghiệm. Nếu sinh sắc tố melanin, thì màu của môi trường nuôi cấy sẽ chuyển từ màu vàng sang màu nâu cho đến màu đen.

2.2.3. Định đến loài của các chủng xạ khuẩn có triển vọng trong kiểm soát bệnh thán thư hại gạo bằng phương pháp sinh học phân tử

Tách chiết DNA của các chủng xạ khuẩn thực hiện theo phương pháp của Weisburg *et al.* (1991). Cặp môi được sử dụng để khuếch đại đoạn gen 16S - rRNA của các chủng xạ khuẩn trong nghiên cứu là: 1492R: 5' - TACGGTTACCTTGTTACGACT - 3' và 27: 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTC - 3' (Weisburg *et*

al., 1991). Sau đó, tiến hành giải trình tự trên hệ thống máy ABI 3130XL. Phân tích kết quả bằng phần mềm sequencing analysis 5.3 và so sánh với kết quả trên ngân hàng gen để xác định tên của xạ khuẩn.

2.2.4. Khảo sát các cơ chế liên quan đến khả năng kiểm soát bệnh của các chủng xạ khuẩn có triển vọng trong kiểm soát bệnh thán thư hại gạo

a. Khảo sát khả năng phân giải chitin của các chủng xạ khuẩn có triển vọng

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 lần lặp lại và theo phương pháp Nguyễn Thị Hà (2012). Các chủng xạ khuẩn được cấy trên môi trường MS trong 5 ngày. Xạ khuẩn được cấy thành 3 điểm, mỗi điểm là khoanh giấy thấm vô trùng có bán kính (có đường kính 5 mm) được tẩm huyền phù xạ khuẩn trên đĩa petri chứa môi trường chitin agar (4% colloidal chitin). Các đĩa petri được đặt trong tủ định ôn để xạ khuẩn phát triển. Sau đó, tiến hành đo bán kính phân giải chitin ở thời điểm 3, 5 và 7 ngày sau thí nghiệm.

b. Khảo sát khả năng phân giải β -glucan của các chủng xạ khuẩn có triển vọng

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, với 5 lần lặp lại. Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp của Henric *et al.* (1995). Các chủng xạ khuẩn được cấy trên môi trường MS trong 5 ngày. Xạ khuẩn được cấy thành 5 điểm, mỗi điểm là khoanh giấy thấm có bán kính là 5 mm được tẩm huyền phù xạ khuẩn trên đĩa petri chứa môi trường β -glucan. Các đĩa petri được đặt trong tủ định ôn để xạ khuẩn phát triển, sau đó nhuộm với dung dịch congo red 0,6 g/l. Sau đó, tiến hành đo bán kính phân giải β -glucan ở thời điểm 9, 11 và 13 ngày sau thí nghiệm.

2.3 Xử lý số liệu

Số liệu sau khi ghi nhận được xử lý bằng phần mềm Excel, phân tích ANOVA và kiểm định khác biệt bằng kiểm định DUNCAN với phần mềm SPSS.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm hình thái, đặc điểm nuôi cấy và đặc điểm sinh lý - sinh hóa

3.1.1. Đặc điểm của chủng xạ khuẩn GCT.TG9

Kết quả được trình bày ở bảng 1 cho thấy chủng GCT.TG9 có chuỗi bào tử dạng thẳng và hơi gợn sóng (RF), bề mặt bào tử dạng nhẵn (smooth). Khi nuôi cấy trên môi trường ISP2 chủng này có hệ sợi khí sinh màu xám, hệ sợi cơ chất màu vàng. Trên môi trường ISP3, chủng này có hệ sợi ký sinh màu đỏ, hệ sợi cơ chất màu vàng. Trên môi trường ISP4 và ISP5 chủng này

có hệ sợi khí sinh màu trắng và hệ sợi cơ chất màu vàng. Chủng này không tạo sinh sắc tố tan trên các môi trường nuôi cấy và không tiết melanin trên môi trường ISP7. Chủng xạ khuẩn trên có khả năng đồng hóa các nguồn carbon như glucose, manitol, saccharose và cellulose... Bên cạnh đó dựa vào các đặc điểm chung của xạ khuẩn đã được nghiên cứu trước đây xác định các đặc điểm nhận dạng xạ khuẩn và xác định được chủng xạ khuẩn GCT.TG9 thuộc Gram dương và có khả năng tiết các enzyme ngoại bào như protease và lipase.

Khi so sánh đặc điểm phân loại của chủng GCT.TG9 với loài chuẩn *Streptomyces avellaneus*

Bảng 1. Đặc điểm hình thái, đặc điểm nuôi cấy và đặc điểm sinh lý - sinh hóa của chủng GCT.TG9, chủng NCT.TG3 và chủng NCT.TG4 và so sánh với loài chuẩn dựa theo khóa phân loại của Shirling và Gottlieb (1972)

Đặc điểm phân loại		Chủng GCT. TG9	Loài chuẩn <i>S. vellaneus</i>	Chủng NCT. TG3	Loài chuẩn <i>S. pallidus</i>	Chủng NCT. TG4	Loài chuẩn <i>S. vinaceus</i>
Hình thái	Hình dạng chuỗi bào tử	RF	RF	S	S	RA	RA
	Bề mặt bào tử	Nhẵn	Nhẵn	Nhẵn	Nhẵn	Nhẵn	Nhẵn
Môi trường ISP2	Màu HSKS	Xám	Xám	Trắng	Trắng	Trắng	Trắng
	Màu HSCC	Vàng	Vàng	Vàng nâu	Vàng nâu	Vàng nâu	Vàng nâu
	Sắc tố tan	Không	Không	Không	Không	Không	Không
Môi trường ISP3	Màu HSKS	Đỏ	Đỏ	Đỏ	Đỏ	Đỏ	Đỏ
	Màu HSCC	Vàng	Vàng	Vàng	Vàng	Vàng nâu	Vàng nâu
	Sắc tố tan	Không	Không	Không	Không	Không	Không
Môi trường ISP4	Màu HSKS	Trắng	Trắng	Trắng	Trắng	Trắng	Trắng
	Màu HSCC	Vàng	Vàng	Vàng nâu	Vàng nâu	Vàng nâu	Vàng nâu
	Sắc tố tan	Không	Không	Không	Không	Không	Không
Môi trường ISP5	Màu HSKS	Trắng	Trắng	Trắng	Trắng	Trắng	Trắng
	Màu HSCC	Vàng	Vàng	Vàng	Vàng	Vàng nâu	Vàng nâu
	Sắc tố tan	Không	Không	Không	Không	Không	Không
Môi trường ISP7	Khả năng tiết melanin	Không	Không	Có	Có	Có	Có
Gram		Dương	Dương	Dương	Dương	Dương	Dương
Đồng hóa carbon		Glucose, saccharose, manitol và cellulase	Glucose, manitol, saccharose và cellulose	Glucose, manitol, saccharose và cellulose	Glucose, manitol, saccharose và cellulose	Glucose, manitol, saccharose và cellulose	Glucose, manitol, saccharose và cellulose
Tiết enzyme ngoại bào		Protease và lipase	Protease và lipase	Protease và lipase	Protease và lipase	Protease và lipase	Protease và lipase

Ghi chú: HSKC: Hệ sợi khí sinh; HSCC: hệ sợi cơ chất

trong khóa phân loại của Shirling và Gottlieb (1972), chủng GCT.TG9 có nhiều đặc điểm giống với loài chuẩn về đặc điểm hình thái, đặc điểm nuôi cấy và đặc điểm sinh lý - sinh hóa. Vậy, chủng GCT.TG9 có thể thuộc loài *S. avellaneus*.

3.1.2. Đặc điểm của chủng xạ khuẩn NCT.TG3

Chủng NCT.TG3 có chuỗi bào tử dạng xoắn ốc (S), bề mặt bào tử dạng nhẵn, khi nuôi cấy trên môi trường ISP2 và ISP4 chủng này có màu sắc hệ sợi khí sinh màu trắng, màu hệ sợi cơ chất là màu vàng nâu. Trên môi trường ISP3 chủng này có màu hệ sợi khí sinh màu đỏ, hệ sợi cơ chất màu vàng. Trên môi trường ISP5 chủng này có hệ sợi khí sinh màu trắng, hệ sợi cơ chất màu vàng, không hình thành sắc tố tan trên các môi trường nuôi cấy và có khả năng sinh melanin trên môi trường ISP7. Chủng xạ khuẩn trên có khả năng đồng hóa các nguồn carbon như glucose, manitol, saccharose và cellulose... Bên cạnh đó, dựa vào các đặc điểm chung của xạ khuẩn đã được nghiên cứu trước đây xác định các đặc điểm nhận dạng xạ khuẩn và xác định được chủng xạ khuẩn NCT.TG3 thuộc Gram dương và có khả năng tiết các enzyme ngoại bào như protease và lipase (Bảng 1).

Khi so sánh các đặc điểm phân loại của chủng NCT.TG3 với loài chuẩn *Streptomyces pallidus* dựa vào khóa phân loại xạ khuẩn của Shirling và Gottlieb (1972), chủng NCT.TG3 có các đặc điểm về hình thái, nuôi cấy và đặc điểm sinh lý - sinh hóa giống với các đặc điểm của loài chuẩn. Vậy, chủng NCT.TG3 có thể thuộc loài *S. pallidus*.

3.1.3. Đặc điểm của chủng xạ khuẩn NCT.TG4

Chủng NCT.TG4 có chuỗi bào tử dạng xoắn không hoàn toàn (RA), bề mặt bào tử dạng nhẵn, khi nuôi cấy trên môi trường ISP2 và ISP5 chủng này có hệ sợi khí sinh màu trắng, hệ sợi cơ chất màu vàng nâu. Trên môi trường ISP3 chủng này có hệ sợi khí sinh màu đỏ, hệ sợi cơ chất màu vàng nâu. Trên môi trường ISP4 chủng này có hệ sợi khí sinh màu trắng, hệ sợi cơ chất màu vàng nâu, không hình thành sắc tố tan trên các môi

trường nuôi cấy và có khả năng sinh melanin trên môi trường ISP7. Chủng xạ khuẩn trên có khả năng đồng hóa các nguồn carbon như glucose, manitol, saccharose và cellulose... Bên cạnh đó, dựa vào các đặc điểm chung của xạ khuẩn đã được nghiên cứu trước đây xác định các đặc điểm nhận dạng xạ khuẩn và xác định được chủng xạ khuẩn NCT.TG4 thuộc Gram dương và có khả năng tiết các enzyme ngoại bào như protease và lipase (Bảng 1).

Khi so sánh các đặc điểm phân loại của chủng NCT.TG4 với loài chuẩn *Streptomyces vinaceus* dựa vào khóa phân loại xạ khuẩn của Shirling và Gottlieb (1972) thì chủng NCT.TG4 có các đặc điểm về hình thái, nuôi cấy và đặc điểm sinh lý - sinh hóa giống với các đặc điểm của loài chuẩn. Vậy, chủng NCT.TG4 có thể thuộc loài *S. vinaceus*.

3.1.4. Đặc điểm của chủng xạ khuẩn NCT.TG10

Kết quả được trình bày ở bảng 2 cho thấy chủng NCT.TG10 có chuỗi bào tử dạng thẳng và hơi gợn sóng (RF), bề mặt bào tử dạng nhẵn (smooth). Khi nuôi cấy trên môi trường ISP2 và ISP4 chủng này có hệ sợi khí sinh màu trắng, hệ sợi cơ chất màu vàng nâu. Khi nuôi cấy trên môi trường ISP3 và ISP5 chủng này có hệ sợi khí sinh và hệ sợi cơ chất màu vàng. Không sinh sắc tố tan trên các môi trường nuôi cấy. Chủng này có khả năng tiết melanin trên môi trường ISP7. Chủng xạ khuẩn trên có khả năng đồng hóa các nguồn carbon như: glucose, manitol, saccharose và cellulose... Bên cạnh đó dựa vào các đặc điểm chung của xạ khuẩn đã được nghiên cứu trước đây xác định các đặc điểm nhận dạng xạ khuẩn và xác định được chủng xạ khuẩn NCT.TG10 thuộc Gram dương và có khả năng tiết các enzyme ngoại bào như protease và lipase.

Khi so sánh đặc điểm phân loại của chủng NCT.TG10 với loài chuẩn *Streptomyces showdoensis* trong khóa phân loại của Shirling và Gottlieb (1972), chủng NCT.TG10 có nhiều đặc điểm giống với loài chuẩn về đặc điểm hình thái, đặc điểm nuôi cấy và đặc điểm sinh lý - sinh hóa. Vậy, chủng NCT.TG10 thuộc loài *S. showdoensis*.

Bảng 2. Đặc điểm hình thái, đặc điểm nuôi cấy và đặc điểm sinh lý - sinh hóa của chủng NCT.TG10 và chủng NCT.TG18 và so sánh với loài chuẩn dựa theo khóa phân loại của Shirling và Gottlieb (1972)

Đặc điểm phân loại		Chủng NCT. TG10	Loài chuẩn <i>Streptomyces showdoensis</i>	Chủng NCT. TG18	Loài chuẩn <i>Streptomyces exfoliatus</i>
Hình thái	Hình dạng chuỗi bào tử	RF	RF	RF	RF
	Bề mặt bào tử	Nhẵn	Nhẵn	Nhẵn	Nhẵn
Môi trường ISP2	Màu HSKS	Trắng	Trắng	Xám	Xám
	Màu HSCC	Vàng nâu	Vàng nâu	Vàng nâu	Vàng nâu
	Sắc tố tan	Không	Không	Không	Không
Môi trường ISP3	Màu HSKS	Vàng	Vàng	Xám	Xám
	Màu HSCC	Vàng	Vàng	Vàng nâu	Vàng nâu
	Sắc tố tan	Không	Không	Không	Không
Môi trường ISP4	Màu HSKS	Trắng	Trắng	Trắng	Trắng
	Màu HSCC	Vàng nâu	Vàng nâu	Vàng	Vàng
	Sắc tố tan	Không	Không	Không	Không
Môi trường ISP5	Màu HSKS	Vàng	Vàng	Xám	Xám
	Màu HSCC	Vàng	Vàng	Xám	Xám
	Sắc tố tan	Không	Không	Không	Không
Môi trường ISP7	Khả năng tiết melanin	Có	Có	Không	Không
Gram		Dương	Dương	Dương	Dương
Đồng hóa carbon		Glucose, manitol, saccharose và cellulose	Glucose, manitol, saccharose và cellulose	Glucose, saccharose, manitol và cellulose	Glucose, saccharose, manitol và cellulose
Tiết enzyme ngoại bào		Protease và lipase	Protease và lipase	Protein và lipase	Protein và lipase

Ghi chú: HSKC: Hệ sợi khí sinh; HSCC: hệ sợi cơ chất

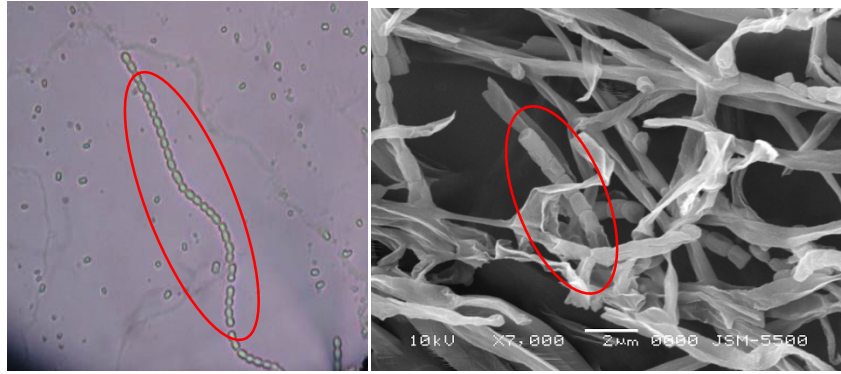
3.1.5. Đặc điểm của chủng xạ khuẩn NCT.TG18

Kết quả được trình bày ở bảng 2 cho thấy chủng NCT.TG18 có chuỗi bào tử dạng thẳng và xoắn không hoàn toàn (RF), bề mặt bào tử dạng nhẵn (smooth). Khi nuôi cấy trên môi trường ISP2 và ISP3 chủng này có hệ sợi khí sinh màu xám, hệ sợi cơ chất màu vàng nâu. Trên môi trường ISP4 chủng này có hệ sợi khí sinh màu trắng và hệ sợi cơ chất màu vàng. Trên môi trường ISP5 chủng này có hệ sợi khí sinh trắng và hệ sợi cơ chất màu xám. Không sinh sắc tố tan trên các môi trường nuôi cấy. Chủng này không tiết melanin trên môi trường ISP7. Chủng xạ khuẩn trên có khả năng đồng hóa các

nguồn carbon như: glucose, manitol, saccharose và cellulose... Bên cạnh đó dựa vào các đặc điểm chung của xạ khuẩn đã được nghiên cứu trước đây xác định các đặc điểm nhận dạng xạ khuẩn và xác định được chủng xạ khuẩn NCT.TG18 thuộc Gram dương và có khả năng tiết các enzyme ngoại bào như protease và lipase.

Khi so sánh đặc điểm phân loại của chủng NCT.TG18 với loài chuẩn *Streptomyces exfoliatus* trong khóa phân loại của Shirling và Gottlieb (1972), chủng NCT.TG18 có nhiều đặc điểm giống với loài chuẩn về đặc điểm hình thái, đặc điểm nuôi cấy và đặc điểm sinh lý - sinh hóa

Vậy, chủng NCT.TG18 có thể thuộc loài *S. exfoliatus*.



Hình 1. Hình dạng cuống sinh bào tử dạng gợn sóng (A) và bề mặt bào tử trơn (B) được quan sát dưới kính hiển vi quang học (A) và kính hiển điện tử (B)

3.2. Định danh đến loài các chủng xạ khuẩn có triển vọng trong kiểm soát bệnh thán thư hại gấc bằng phương pháp sinh học phân tử

Để đạt được kết quả định danh đến loài của năm chủng xạ khuẩn, trong nghiên cứu này đã sử dụng phản ứng PCR để khuếch đại đặc hiệu trên vùng gen 16S - rRNA. Đây là vùng gen chỉ thị được dùng phổ biến trong định loại vi sinh vật. Cặp mồi được thiết kế cho phản ứng PCR cho phép khuếch đại trọn vẹn trình tự của gen 16S - rRNA, đảm bảo tốt cho các nghiên cứu về xác định đầy đủ trình tự của gen.

Kết quả bảng 3 cho thấy các chủng xạ khuẩn thí nghiệm có mức độ tương đồng với loài chuẩn dựa vào trình tự gen vùng 16S - rRNA với mức độ tương đồng là 99%.

3.3. Khả năng phân giải chitin của các chủng xạ khuẩn có triển vọng trong kiểm soát bệnh thán thư hại gấc

Qua kết quả trình bày trên bảng 4 cho thấy tất cả các chủng xạ khuẩn nghiên cứu đều có khả năng tiết enzyme phân giải chitin trên môi trường chitin agar. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Sowmya *et al.* (2012) cho rằng chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. cũng có khả năng tiết enzyme chitinase trên môi trường chitin agar. Ở thời điểm 3 NSTN, chủng xạ khuẩn *S. pallidus* có bán kính vòng phân giải chitin lớn nhất 9,30 mm và khác biệt ý nghĩa thống kê mức 1% so với các chủng xạ khuẩn còn lại. Ở thời điểm 5 NSTN, các chủng xạ khuẩn có bán kính vòng phân giải tăng, trong đó chủng *S. pallidus* có bán kính vòng phân giải lớn nhất 12 mm, khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn còn lại. Ở thời điểm 7 NSTN, chủng xạ khuẩn *S. pallidus* và *S. vinaceus* có bán kính vòng phân giải lớn nhất 13,60 mm và 12,90 mm khác biệt có ý nghĩa thống kê với các chủng xạ khuẩn còn lại.

Qua kết quả thí nghiệm cho thấy các chủng xạ khuẩn nghiên cứu đều có khả năng tiết

Bảng 3. Mức độ tương đồng (%) trình tự gene của 5 chủng xạ khuẩn thí nghiệm với trình tự gene của các chủng xạ khuẩn có sẵn trên ngân hàng gene dựa vào trình tự gen vùng 16S - rRNA

Chủng xạ khuẩn	Xác định loài trên ngân hàng gen	Mức độ tương đồng (%)
GCT.TG9	<i>Streptomyces avellaneus</i>	99
NCT.TG3	<i>Streptomyces pallidus</i>	99
NCT.TG4	<i>Streptomyces vinaceus</i>	99
NCT.TG10	<i>Streptomyces showdoensis</i>	99
NCT.TG18	<i>Streptomyces exfoliates</i>	99

Bảng 4. Diễn biến bán kính (mm) vòng phân giải chitin của các chủng xạ khuẩn

Các chủng xạ khuẩn	Bán kính (mm) vòng phân giải chitin		
	3 ngày	5 ngày	7 ngày
<i>Streptomyces avellaneus</i>	6,10 ^c	9,20 ^b	8,20 ^c
<i>Streptomyces pallidus</i>	9,30 ^a	12,00 ^a	13,60 ^a
<i>Streptomyces vinaceus</i>	7,80 ^b	10,00 ^b	12,90 ^a
<i>Streptomyces showdoensis</i>	4,80 ^d	5,80 ^c	5,20 ^d
<i>Streptomyces exfoliates</i>	6,90 ^c	9,00 ^b	9,80 ^b
CV (%)	9,78%	12,41%	5,42%
Ý nghĩa của F tính	**	**	**

Ghi chú: Các trung bình trong cùng một cột được theo sau bởi một hay những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê trong phép thử Duncan với mức ý nghĩa 5%; **: khác biệt ý nghĩa 1%.

enzyme chitinase với nhiều mức độ khác nhau. Điều này có thể liên quan đến cơ chế đối kháng của các chủng xạ khuẩn thí nghiệm đối với nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư hại gạo. Kết quả này phù hợp với công bố của Yuan và Crawford (1995), chủng xạ khuẩn *Streptomyces lydicus* WYEC108 phân lập ở vùng rễ có hiệu quả trong phòng trị bệnh thối rễ do *Pythium ultimum* vì chủng xạ khuẩn trên có khả năng tiết được chitinase phá hủy vách tế bào nấm. Bên cạnh đó, Shimizu *et al.* (2009) khi nghiên cứu hiệu quả đối kháng của xạ khuẩn *Streptomyces* sp. với nấm *Colletotrichum orbiculare* gây bệnh thán thư hại dưa leo cho thấy chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. có khả năng tiết ra enzyme chitinase.

3.4. Khả năng phân giải β -glucan của các chủng xạ khuẩn có triển vọng trong kiểm soát bệnh thán thư hại gạo

Bảng 5 cho thấy hầu hết các chủng xạ khuẩn nghiên cứu đều tiết enzyme β -glucanase trên môi trường β -glucan agar. Kết quả phân giải β -glucan của các chủng xạ khuẩn được trình bày như sau.

Vào thời điểm 9 NSTN chủng xạ khuẩn *S. avellaneus* có bán kính vòng phân giải β -glucan lớn nhất 3,4 mm và có khác biệt ý nghĩa thống kê với các chủng còn lại. Thời điểm 11 NSTN khả năng phân giải β -glucan của các chủng xạ khuẩn có tăng và có sự khác biệt ý nghĩa giữa chủng xạ khuẩn *S. avellaneus* với

Bảng 5. Diễn biến bán kính (mm) vòng phân giải β -glucan của các chủng xạ khuẩn

Các chủng xạ khuẩn	Bán kính (mm) vòng phân giải β -glucan		
	9 ngày	11 ngày	13 ngày
<i>Streptomyces avellaneus</i>	3,4 ^a	5,4 ^a	6,0 ^a
<i>Streptomyces pallidus</i>	1,8 ^b	2,6 ^c	3,0 ^{cd}
<i>Streptomyces vinaceus</i>	2,2 ^b	3,0 ^{bc}	3,8 ^{bc}
<i>Streptomyces showdoensis</i>	2,4 ^b	3,6 ^b	4,0 ^b
<i>Streptomyces exfoliates</i>	1,0 ^c	1,4 ^d	2,6 ^d
CV (%)	20,70%	18,22%	18,22%
Ý nghĩa của F tính	**	**	**

Ghi chú: Các trung bình trong cùng một cột được theo sau bởi một hay những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê trong phép thử Duncan với mức ý nghĩa 5%; **: khác biệt ý nghĩa 1%.

các chủng xạ khuẩn còn lại, trong đó chủng xạ khuẩn *S. avellaneus* có bán kính vòng phân giải lớn nhất 5,4 mm. Vào thời điểm 13 NSTN bán kính vòng phân giải β -glucan vẫn tiếp tục tăng và chủng *S. avellaneus* có bán kính vòng phân giải β -glucan lớn nhất là 6 mm.

Vi sinh vật đối kháng với nấm gây bệnh cây trồng thông qua cơ chế tiết enzyme β -glucanase phân giải thành phần β -glucan có trên vách tế bào mầm bệnh, đây có thể xem như là biện pháp sinh học quản lý mầm bệnh một cách có hiệu quả (Backman *et al.*, 1997). Qua kết quả khảo sát khả năng phân giải β -glucan cho thấy, tất cả 5 chủng xạ khuẩn nghiên cứu đều có khả năng phân giải β -glucan trong đó chủng *S. avellaneus* có khả năng phân giải β -glucan tốt nhất. Kết quả khảo sát trên phù hợp với kết quả nghiên cứu của Gobalakrishnan *et al.* (2013) cho rằng 5 chủng xạ khuẩn *Streptomyces* CAI - 24, *Streptomyces* CAI - 121, *Streptomyces* CAI - 127, *Streptomyces* KAI - 32 và *Streptomyces* KAI - 90 đều có khả năng tiết β -glucanase và kết quả nghiên cứu của Nagpure *et al.* (2013) chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. MT7 có khả năng tiết enzyme β -glucanase.

4. KẾT LUẬN

Năm chủng xạ khuẩn nghiên cứu thuộc loài *Streptomyces avellaneus*, *Streptomyces pallidus*, *Streptomyces vinaceus*, *Streptomyces showdoensis*, *Streptomyces exfoliatus*.

Tất cả 5 chủng xạ khuẩn thí nghiệm đều có khả năng phân giải chitin trong đó 2 chủng *S. pallidus* và *S. vinaceus* có khả năng phân giải chitin tốt hơn 3 chủng còn lại ở thời điểm 7 ngày sau thí nghiệm.

Tất cả 5 chủng xạ khuẩn thí nghiệm đều có khả năng phân giải β -glucan trong đó chủng *S. avellaneus* có khả năng phân giải β -glucan tốt nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Backman, P.A., M. Wilon and J.F. Murphy (1997). Bacterial for biological control of plant disease. In: Rechecigl, N.A. and J.E. Rechecigl, Environmentally Safe Approaches to Crop Diseases Control. Lewis Publishers, Baco Raton, Florida, 95 - 109.
- Đoàn Thị Kiều Tiên. (2012). Đánh giá khả năng gây hại của các dòng nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo rũ trên cây mè (*Sesamum indicum* L.) và bước đầu nghiên cứu hiệu quả phòng trừ bằng biện pháp hóa học và sinh học. Luận văn Thạc sĩ Bảo vệ Thực vật, Khoa Nông nghiệp và SHUD, Trường đại học Cần Thơ.
- Ertuđrul, S., G. Dönmez and S. Takaç (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*, 149(3): 720 - 724.
- Gobalakrishnan, S., V. Srinivas, S.M. Meesala Sree Vidya and A. Rathore (2013). Plant growth - promoting activities of *Streptomyces* spp. in sorghum and rice. *Springerplus*, 2: 574.
- Henric, C.W., J.D. Doyle and B. Hugley (1995). A new solid medium for enumerating cellulose - utilizing bacteria in soil. *Applied and environmental microbiology*, 61(5): 2016 - 2019.
- Joo, G. J. (2005). Production of an antifungal substance for biological control of *Phytophthora capsici* causing Phytophthora blight in red peppers by *Streptomyces halstedii*. *Biotechnology Letters*, 27: 201 - 205.
- Kamel, Z., M.A. Rizk and A.A. Gawad. (2007). Biocontrol of tomato pathogens *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and *Alternaria solani* and tomato rowth promotion using microbial antagonists, *Journal Res. Microbiology*.
- Lê Minh Tường (2014). Hiệu quả của xạ khuẩn trong phòng trị bệnh thán thư hại Gấc do nấm *Colletotrichum* spp. gây ra. Hội thảo Quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội. Trang 238 - 248.
- Mitra, P., and P. Chakrabartty (2005). An extracellular protease with depilation activity from *Streptomyces nogalator*. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64(12): 978.
- Nagpure, A., B. Choudhary, S. Kumar and R.K. Gupta (2013). Isolation and characterization of chitinolytic *Streptomyces* sp. MT17 and its antagonism towards word - rotting fungi. *Ann Microbiol.*, 11p.
- Nguyễn Thị Hà (2012). Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy *Aspergillus protuberus* sinh tổng hợp enzyme chitinase được phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ. *Tạp chí khoa học đại học Cần Thơ*, 22b: 26 - 35.
- Santos, É.R.D., Z.N.S. Teles, N.M. Campos, D.A.J.D. Souza, A.S.D.R. Bispo and R.P.D. Nascimento (2012). Production of α -amylase from *Streptomyces* sp. SLBA - 08 strain using agro -

- industrial by - products. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(5): 793 - 800.
- Shimizu, M., S. Yazawa and U. Yusuke (2009). A strain of endophytic *Streptomyces* sp. for biological control of cucumber anthracnose. *J Gen Plant Pathol.*, 75: 27 - 36.
- Shirling, E. B., and D. Gottlieb (1972). Cooperative Description of type strain of *Streptomyces*. *International Association of Microbiological Societies*, pp. 265 - 349.
- Shirling, E.B., and D. Gottlieb (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International journal of systematic bacteriology*, 16(3): 313 - 340.
- Sowmya, B., D. Gomathi, M. Kalaiselvi, G. Ravikumar, C. Arulraj and C. Uma (2012). Production and Purification of Chitinase by *Streptomyces* sp. from Soil. *Journal of Advanced Scientific Research*, 3(3): 25 - 29.
- Tô Huỳnh Như (2012). Đánh giá khả năng đối kháng và hiệu quả phòng trị của xạ khuẩn đối với chủng nấm *Colletotrichum* ST2 gây bệnh thán thư trên giống ớt sừng. Luận văn Thạc sĩ Bảo vệ Thực vật, Khoa Nông nghiệp & SHUD, Trường đại học Cần Thơ.
- Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier, and D.J. Lane (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2): 697 - 703.
- Yuan, W. M. and D.L. Crawford (1995). Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Microbiology*, 612: 3119 - 3128.