TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH CHỦNG XẠ KHUẨN CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM GÂY BỆNH THỰC VẬT

Nguyễn Viết Hưng, Đỗ Thị Hiền, Nguyễn Mạnh Tuấn*
Trường Đại học Nông Lâm - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Với mục tiêu sàng lọc được chủng *Streptomyces* sinh hoạt chất kháng nấm tiềm năng trong kiểm soát các bệnh do nấm gây ra ở thực vật. Chủng P5-1 có khả năng ức chế mạnh nhất cả hai chủng nấm gây bệnh thực vật (*Fusarium oxysporum* và *Phytophthora capsici*) từ 379 chủng giống xạ khuẩn phân lập. Hoạt chất kháng nấm tổng số của chủng P5-1 có màu vàng, tan tốt ở trong nước và ức chế sinh trưởng nấm *Fusarium oxysporum* và *Phytophthora capsici* lần lượt là 8 và 16 µg/ml. Bào tử của chủng P5-1 dạng thẳng, hình elip, bề mặt nhẵn, kích thước 0,8 × 1,0 µm. Phân tích trình tự gen 16S rRNA của chủng P5-1 xác nhận chủng P5-1 là một thành viên thuộc chi *Streptomyces*, có mức độ tương đồng cao nhất (99,64%) với chủng *Streptomyces pratensis* ch24^T (JQ806215), chủng P5-1 được đặt tên là *Streptomyces pratensis* P5-1 (MK652886). Chủng xạ khuẩn P5-1 được coi là ứng cử viên tiềm năng để phát triển chế phẩm sinh học sử dụng trong kiểm soát bệnh ở cây trồng.

Từ khóa: *Streptomyces*; *hoạt chất kháng nấm; kiểm soát bệnh sinh học; bệnh nấm; hoạt chất sinh học tự nhiên*.

Ngày nhận bài: 23/6/2020; Ngày hoàn thiện: 31/7/2020; Ngày đăng: 31/7/2020

SCREENING AND IDENTIFICATION OF ACTINOMYCETE SHOWING ANTIFUNGAL DISEASES ACTYVITY IN PLANT

Nguyen Viet Hung, Do Thi Hien, Nguyen Manh Tuan*
TNU - University of Agriculture and Forestry

ABSTRACT

Our aim to find potential Streptomyces species producing antifungal compound for biocontrolling fungal diseases of plants. Strain P5-1 have the strongest ability to inhibit both *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capsici* among the 379 actinomycetes isolated previously. Total antifungal compound is yellow color, well soluble in water and inhibits growth of *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capsici* ranging from 8 and 16 µg/ml, respectively. Spores of strain P5-1 are straight, ellip-shape, smooth surface, spore size of 0.8 × 1.0 µm. Analysis of 16S rRNA gene sequence of strain P5-1 confirmed that strain P5-1 is a member of the genus *Streptomyces*, has the highest similarity (99.64%) to *Streptomyces pratensis* ch24^T (JQ806215), was named as *Streptomyces pratensis* P5-1 (MK652886). Strain P5-1 could considered a potential candidate for development of probiotics application for treating fungal pathogens in plants.

Keywords: *Streptomyces*; *antifungal activity; biocontrol of fungal diseases; fungal diseases; natural bioactive compounds*

Received: 23/6/2020; Revised: 31/7/2020; Published: 31/7/2020

* Corresponding author. *Email: nguyenmanhtuan@tuaf.edu.vn*

1. Đặt vấn đề

Kiểm soát dịch bệnh ở cây trồng là một trong những vấn đề quan trọng nhất đối với sản xuất nông nghiệp. Có hai giải pháp chính để kiểm soát dịch bệnh ở cây trồng, sử dụng hóa chất bảo vệ thực vật hoặc sử dụng vi sinh vật đối kháng. Vấn đề tồn dư của hóa chất bảo vệ thực vật không những trực tiếp làm giảm giá trị của sản phẩm nông nghiệp, mà còn để tiềm ẩn rất nhiều rủi ro cho sức khỏe con người và môi trường sinh thái. Hạn chế tối đa việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật là xu thế, áp dụng ở hầu hết các nước có nền sản xuất nông nghiệp trên thế giới. Hoạt chất sinh học kháng nấm hoặc kháng khuẩn là chất "chống lại sự sống", được sinh ra từ sinh vật nhân sơ hoặc nhân chuẩn, có khả năng tiêu diệt hoặc ức chế sinh trưởng vi sinh vật đích. Penicillin là kháng sinh tự nhiên đầu tiên được phát hiện và mở ra "kỷ nguyên vàng" về nghiên cứu khám phá hoạt chất sinh học tự nhiên vào những năm 1940~1950 [1]. Hoạt chất sinh học được ứng dụng rộng rãi ở tất cả các lĩnh vực của cuộc sống. Trong sản xuất nông nghiệp, sử dụng các chủng vi khuẩn sinh kháng nấm/kháng khuẩn tiềm năng được coi là "chìa khóa" quan trọng trong quản lý dịch hại tổng hợp ở cây trồng thay vì lạm dụng hóa chất bảo vệ thực vật [2], [3]. Nấm *Fusarium* spp. và *Phytophthora* spp. là tác nhân chính, thường gặp gây bệnh thối rễ ở cây trồng, với tỷ lệ gây bệnh từ 50 đến 100%, làm giảm năng suất ít nhất trên 54% [4].

Streptomyces là vi khuẩn Gram dương, có mặt đa dạng ở trong đất. Các kháng sinh tự nhiên tách chiết từ chi *Streptomyces* đóng góp hơn 70% các kháng sinh quan trọng sử dụng trong cuộc sống [5]. Các hoạt chất kháng nấm quan trọng sinh ra bởi các chủng *Streptomyces* được biết như nystatin (từ chủng *Streptomyces noursei*), amphotericin B (*Streptomyces nodosus*) và natamycin (*Streptomyces natalensis*) [6]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sàng lọc được chủng xạ khuẩn P5-1, có thể được xem xét là ứng viên tiềm năng trong kiểm soát bệnh do nấm gây ra ở cây trồng.

2. Vật liệu, môi trường và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và môi trường nghiên cứu

Chủng nấm kiểm định và các chủng Streptomyces:

Các chủng nấm kiểm định bao gồm *Fusarium oxysporum* KACC 41083 và *Phytophthora capsici* KACC 40483 được cung cấp bởi ngân hàng chủng giống Hàn Quốc (KACC: Korean Agricultural Culture Collection).

Các chủng *Streptomyces* (379 chủng) được phân lập từ nghiên cứu của Đỗ Thị Hiền [7], được lưu giữ trong glycerol ở -80ºC. Các chủng *Streptomyces* được hoạt hóa trên môi trường R2A (17209, Sigma Aldrich) ở 28ºC.

Môi trường sử dụng:

Môi trường PDA (g/l: Dịch chiết khoai tây, 200; Dextrose, 20; Thạch, 20, pH = 5,6~6), môi trường R2A (g/l: Proteose peptone, 0,5; Yeast extract, 0,5; Casein, 0,5; Glucose, 0,5; Soluble starch, 0,5; Dipotassium phosphate, 0.3; Magnesium sulphate, 0,024; Sodium pyruvate, 0,3; Nước cất 1 lít; pH 7,2). Môi trường Gause I (g/l: tinh bột, 20; KNO_3, 1; NaCl, 0,5; K_2HPO_4, 0,5; $MgSO_4.7H_2O$, 0,5; $FeSO_4.7H_2O$, 0,01; nước cất 1 lít; pH=7,4). Môi trường ISP (Inorganic Salt Starch Agar) - 4 (g/l: Tinh bột, 10; K_2HPO_4, 1; $MgSO_4.7H_2O$, 1; NaCl, 1; $(NH_4)_2SO_4$, 2; $CaCO_3$, 2g; nước cất 1 lít; pH = 7). Môi trường Tryptic Soy Broth (TSB) (Becton Dickinson France).

Các thiết bị chính cho nghiên cứu:

Tủ an toàn sinh học cấp hai (NU-425-400E, Nuaire, Mỹ), tủ lạnh -20ºC (Freezer Eco 130, Fiocchetti, Ý), tủ lạnh sâu -80ºC (ILS-DF8517E, Nuaire, Mỹ), máy ly tâm lạnh (Mikro 220R, Anh), máy quang phổ định lượng DNA (Biomate 3, Thermo, Mỹ), máy nhân gen/PCR (Veriti, Thermo, Mỹ), máy điện di ngang (Cleaver Scientific, Anh).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp sàng lọc khả năng kháng nấm từ bộ chủng Streptomyces:

Các chủng *Streptomyces* bảo quản ở -80ºC trong glycerol, được hoạt hóa trên môi trường thạch đĩa R2A ở 30ºC trong 5 ngày. Bào tử của hai chủng nấm *Fusarium oxysporum* KACC 41083 và *Phytophthora capsici* KACC 40483 được chuẩn bị ở mật độ khoảng

10^5 bào tử/ml, 100 µl dịch bào tử của mỗi chủng nấm được cấy trải lên bề mặt đĩa thạch môi trường PDA (sử dụng đĩa petri đường kính 90 mm). Các chủng *Streptomyces* sau khi hoạt hóa được chấm điểm trên bề mặt môi trường PDA có chứa chủng nấm kiểm định. Kiểm tra khả năng đối kháng (hình thành vòng ức chế nấm sinh trưởng) ở 25°C trong 7 ngày.

Phương pháp tách chiết hoạt chất kháng nấm tổng số của chủng P5-1:

Chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong 1 lít môi trường Gause I ở 30°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 7 ngày. Sau 7 ngày lên men, ly tâm loại bỏ sinh khối tế bào. Bổ sung ethyl acetate vào dịch ly tâm (tỷ lệ 1:1, v/v). Thu nhận pha ethyl acetate, quá trình tách chiết được lặp lại thêm 2 lần. Loại bỏ ethyl acetate bằng máy cô quay chân không ở 40°C, hòa cặn vào trong nước cất vô trùng, lọc qua màng lọc 0,2 µm và đông khô. Bảo quản bột hoạt chất kháng nấm tổng số ở -20°C cho các nghiên cứu tiếp theo.

Đánh giá hoạt tính kháng nấm (MIC_{90}) của dịch chiết kháng nấm từ chủng P5-1:

Bột hoạt chất kháng nấm được hòa vào dung môi dimethyl sulfoxide ở dải nồng độ khác nhau. Các bước tiến hành theo mô tả của Alastruey-Izquierdo [8], sử dụng amphotericin B (A4888, Sigma Aldrich) là đối chứng dương. Kết quả thí nghiệm được ghi nhận ở 25°C, 48 giờ.

Đặc điểm bào tử của chủng P5-1:

Chủng P5-1 được nuôi cấy trên môi trường ISP-4 ở 30°C trong 21 ngày. Hình thái bào tử được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét SEM (Scanning Electron Microscope).

Định danh, phân loại chủng P5-1:

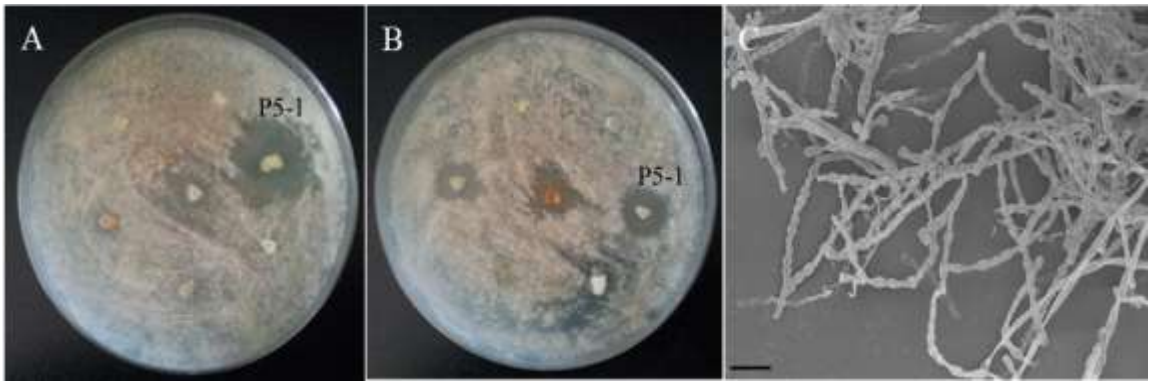
Nuôi cấy chủng P5-1 trong môi trường TSA ở 30°C, 24 giờ, 150 vòng/phút. Ly tâm loại bỏ dịch thể, thu nhận sinh khối tế bào để tách chiết DNA tổng số theo phương pháp của Sambrook [9]. Trình tự gen 16S rRNA được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') và 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') [10]. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1% và gửi đọc trình tự tại công ty Macrogen (Hàn Quốc). Trình tự gen 16S rRNA của chủng P5-1 được so sánh với các chủng vi khuẩn đã công bố sử dụng phần mềm EzTaxon server (https://www.ezbiocloud.net/), được đăng ký trên ngân hàng GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/). Sơ đồ phân loại của chủng P5-1 được xây dựng dựa trên phần mềm MEGA X 10.1 (https://www.megasoftware.net/).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Sàng lọc các chủng xạ khuẩn kháng nấm Fusarium oxysporum và Phytophthora capsici

Từ 379 chủng xạ khuẩn được phân lập từ trước, chúng tôi đã sàng lọc được chủng P5-1 thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh nhất cả hai chủng nấm gây bệnh thực vật *Fusarium oxysporum* và *Phytophthora capsici*, đường kính vòng kháng nấm lần lượt là 13,5 và 10 mm (Hình 1A, B). Bên cạnh đó, chủng P5-1 ức chế sinh trưởng cả bốn loại vi khuẩn kiểm định bao *gồm Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6051A và *Bacillus anthracis* KEMB 211-146 [7]. Kết quả nghiên cứu của Lê Thị Hiền [3] đã tuyển chọn được hai chủng xạ khuẩn *Streptomyces albofaciens* NA1 và *Streptomyces roseosporus* HN6 từ đất, đây là hai chủng tiềm năng trong kiểm soát các bệnh gây hại ở cây trồng do *Fusarium oxysporum*, *Botryosphaeria dothidea*, *Phytophthora capsic* gây ra. Gần đây, nhóm nghiên cứu của Lưu Trần Đông và cộng sự [11] đã sàng lọc được chủng *Streptomyces hydrogenans* VTCC 41117 thể hiện hoạt tính đối kháng cả 05 loại nấm gây bệnh ở thực vật, bao gồm (*Phytophthora capsici* VTCC 31701, *Alternaria* sp. VTCC 31702, *Botrytis cinerea* VTCC 31703, *Collectotrichum gloeosporioides* VTCC 31705, *Fusarium* sp. VTCC 31704).

Bào tử của chủng P5-1 dạng thẳng, bào tử có hình elip, bề mặt bào tử nhẵn, kích thước 0,8 × 1,0 µm (Hình 1C). Đây là đặc điểm hình thái điển hình của các thành viên thuộc chi *Streptomyces* đã được mô tả [12].



Hình 1. *Hoạt tính kháng nấm của chủng P5-1 bằng phương pháp cấy chấm điểm trên môi trường PDA sau 5 ngày nuôi cấy ở 25°C. Fusarium oxysporum KACC 41083 (A); Phytophthora capsici KACC 40483 (B); Hình thái bào tử, thanh bar, 5 µm (C)*

3.2. Tách chiết và đánh giá hoạt chất kháng nấm tổng số (MIC$_{90}$)

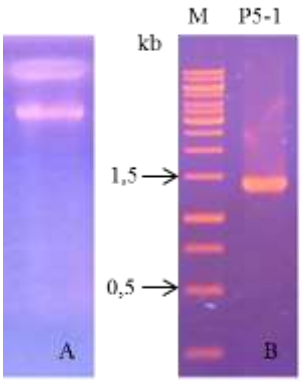
Hoạt chất kháng nấm tổng số (KSTS) của chủng P5-1 có màu vàng tranh, thu được 2,15g hoạt chất sinh học từ 1 lít môi trường Gause I. Khả năng đối kháng hai loại nấm gây bệnh ở cây trồng của KSTS từ chủng P5-1 dao động từ 8 đến 16 µg/ml (Bảng 1). Nghiên cứu của Đỗ Thị Tuyến [13] đã tuyển chọn được chủng *Streptomyces* sp. HT17.8, dịch chiết hoạt chất của chủng HT17.8 thể hiện hoạt tính mạnh đối với hai chủng nấm *Fusarium oxysporum* và *Fusarium solani* lần lượt là 19 và 20 mm. Tương tự, Dịch chiết hoạt chất kháng nấm từ hai chủng *Streptomyces* sp. XK3 và *Streptomyces* sp. XK28 có khả năng ức chế cả ba loại nấm bệnh ở thực vật (*Fusarium solani*, *Phytophthora* sp. và *Fusarium oxysporum*) với đường kính vòng kháng nấm dao động từ 10 đến 20 mm [14].

Bảng 1. *Kết quả đánh giá nồng độ hoạt chất kháng nấm của chủng P5-1 ức chế sinh trưởng hai chủng nấm gây bệnh ở thực vật*

Chủng nấm	Giá trị MIC$_{90}$ (µg/ml)	
	KSTS	Amphotericin B
Fusarium oxysporum KACC 41083	8	2
Phytophthora capsici KACC 40483	16	4

3.3. Định danh, phân loại chủng P5-1

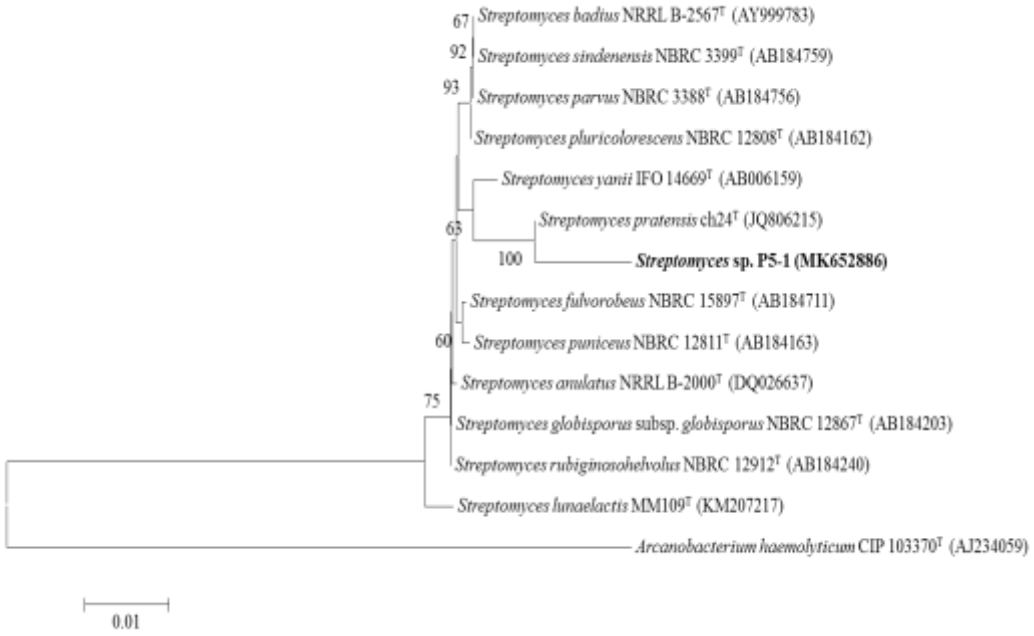
Chúng tôi đã thu nhận được DNA tổng số của chủng P5-1 có nồng độ 785 µg/ml với chỉ số A_{260}/A_{280} là 1,82 và A_{260}/A_{230} là 1,84. Kết quả kiểm tra trên gel agarose 1% cho thấy có 1 băng và không bị đứt gãy (Hình 2A)



Hình 2. *Hình ảnh điện di DNA tổng số (A), sản phẩm PCR khuếch đại gen mã hóa 16S rRNA B) của chủng P5-1 trên gel agarose 1%. M: marker, 10kb*

Sản phẩm PCR khuếch đại gen mã hóa 16S rRNA cũng xuất hiện 1 băng, có kích thước khoảng 1,5 kb (Hình 2B). Trình tự gen 16S rRNA của chủng P5-1 sau khi đọc trình tự có chiều dài là 1483 bp và được đăng ký trên ngân hàng GenBank với mã số truy nhập là MK652886. Kết quả so sánh sự tương đồng giữa trình tự gen 16S rRNA của chủng P5-1 với các chủng vi sinh vật đã công bố thông qua phần mềm Eztaxon server cho thấy chủng P5-1 có mức độ tương đồng cao nhất (99,64%) với chủng *Streptomyces pratensis* ch24^T (Mã số gen 16S rRNA: JQ806215). Vị trí phân loại của chủng P5-1 được xác nhận thuộc chi *Streptomyces* (Hình 3). Dựa vào

ngưỡng chặn (≥98,7%) về sự tương đồng của trình tự gen 16S rRNA với các loài *Streptomyces* đã công bố [15] và vị trí trong sơ đồ tiến hóa, chủng P5-1 được nhận diện là một thành viên thuộc chi *Streptomyces*, được gọi tên là *Streptomyces pratensis* P5-1.



Hình 3. *Sơ đồ phả hệ của chủng P5-1 với các loài Streptomyces gần nhất dựa vào trình tự gen 16S rRNA. Chủng Arcanobacterium haemolyticum CIP 103370^T (AJ234059) là ngoài chi Streptomyces. Thanh bar: 0.01*

4. Kết luận

Tuyển chọn được chủng P5-1 từ 379 chủng xạ khuẩn có hoạt tính mạnh nhất ức chế sinh trưởng cả hai chủng nấm gây bệnh thực vật (*Fusarium oxysporum* và *Phytophthora capsici*), với giá trị MIC dao động từ 8 đến 16 µg/ml.

Chủng P5-1 có chuỗi bào tử dạng thẳng, bào tử có hình elip, bề mặt bào tử nhẵn, kích thước 0,8 × 1,0 µm. Phân tích trình tự gen 16S rRNA xác nhận chủng P5-1 là thành viên của chi *Streptomyces*, được đặt tên là *Streptomyces pratensis* P5-1. Mã số truy nhập gen 16S rRNA của chủng P5-1 trên ngân hàng thế giới là MK652886.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

[1]. N. Khardori, "Antibiotics—Past, Present and Future," *Med Clin North Am*, vol. 90, no. 6, pp. 1049-1076, 2006.

[2]. N. Someya, "Biological control of fungal plant diseases using antagonistic bacteria," *J. Gen Plant Pathol*, vol. 74, pp. 459-460, 2008.

[3]. T. H. Le, V. L. Dinh, T. V. Vu, and V. G. Nguyen, "Isolation and screening *Streptomyces* spp. against plant pathogenic fungi," (In Vietnamese), *J. Sci & Devel*, vol. 12, no. 5, pp. 656-664, 2014.

[4]. J. Vallance, F. Deniel, G. L. Floch, L. Guerin-Dubrana, D. Blancard, and P. Rey, "Pathogenic and beneficial microoganisms in soilless culture," *Agron Sustain Dev*, vol. 31, pp. 191-203, 2011.

[5]. J. Berdy, "Bioactive microbial metabolites," *J Antibiot (Tokyo)*, vol. 58, no. 1, pp. 1-26, 2005.

[6]. E. B. V. Arnam, A. C. Ruzzini, C. S. Sit, H. Horn, A. A. Pinto-Tomás, C. R. Currie, and J. Clardy, "Selvamicin, an atypical antifungal polyene from two alternative genomic contexts," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 113, no. 46, pp. 12940-12945, 2016.

[7]. T. H. Do, B. D. Do, M. T. Nguyen, and X. V. Nguyen, "Isolation and screening of actinomyces species inhibits Gram positive bacteria," (In Vietnamese), *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 197, no. 4, pp. 127-133, 2019.

[8]. A. Alastruey-Izquierdo, M. Cuenca-Estrella, A. Monzon, E. Mellado, and J. L. Rodriguez-Tudela, "Antifungal susceptibility profile of clinical Fusarium spp. isolates identified by molecular methods," *J. Antimicrob Chemother*, vol. 61, no. 4, pp. 805-809, 2008.

[9]. J. Sambrook, and D. Russell, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

[10]. J. A. Frank, C. I. Reich, S. Sharma, J. S. Weisbaum, B. A. Wilson, and G. J. Olsen, "Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes," *Appl Environ Microbiol*, vol. 74, no. 8, pp. 2461-2470, 2008.

[11]. T. D. Luu, S. T. Vu, T. V. Nguyen, T. N. M. Dinh, H. M. Nguyen, and K. N. T. Nguyen, "Screeing for antagonistic actinomycetes against five plant pathogenic fungi and description of the strong activity strain *Streptomyces hydrogenans* VTCC 41117," (In Vietnamese), *Journal of tropical science and technology*, no. 18, pp. 70-81, 07/2019.

[12]. S. T. Williams, M. Goodfellow, and G. Alderson, *Genus Streptomyces Waksman and Henrici 1943*, 339AL, *in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4, pp. 2452–2492, 1989. Edited by S. T. Williams, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

[13]. T. T. Do, and T. D. C. Vi, "Taxonomic characteristics of actinomycetes strains having the antibiotic ability against pathogenic fungi attaching tea in Thai Nguyen," (In Vietnamese), *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 107, no. 7, pp. 97-102, 2013.

[14]. T. K. C. Nguyen, T. H. Tran, T. T. H. Pham, and V. C. Pham, "Isolation of antagonistic microoganisms against some plant fungal pathogens ans evaluation of their activity in vitro and in vivo," (In Vietnamese), *Journal of Science and Technology*, vol. 52, no. 4, pp. 419-430, 2014.

[15]. H. P. Browne, S. C. Forster, B. O. Anonye, N. Kumar, B. A. Neville, M. D. Stares MD, D. Goulding, and T. D. Lawley, "Culturing of "unculturable" human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation," *Nature*, vol. 533, pp. 543-546, 2016.