NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH ĐỐI KHÁNG VỚI NẤM *Fusarium oxysporum* GÂY BỆNH TRÊN CHUỐI CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN *Streptomyces* sp. VNUA27

Đinh Trường Sơn[1], Nguyễn Thị Thanh Mai[2], Nguyễn Thị Thu[1], Nguyễn Thanh Hải[1], Trần Thị Đào[1], Ngô Thị Vân Anh[1], Nguyễn Xuân Cảnh[1*]

[1]Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
[2]Trung tâm Sinh học thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ

[*]Tác giả liên hệ: nxcanh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 04.05.2022 Ngày chấp nhận đăng: 19.08.2022

TÓM TẮT

Bệnh héo vàng chuối do nấm *Fusarium oxyspoum* f. sp. *cubense* (*Foc*) gây thiệt hại nặng nề nhất đối với chuối. Đặc biệt, chủng *Foc* TR4 có thể lây nhiễm hầu hết các giống chuối. So với các biện pháp truyền thống, biện pháp sinh học sử dụng vi sinh vật trong phòng trừ bệnh được coi là biện pháp chiến lược. Trong nghiên cứu này, chủng xạ khuẩn VNUA27 được phân lập, đánh giá khả năng đối kháng với nấm *Foc* TR4. Đánh giá ảnh hưởng của dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn VNUA27 đến sự phát triển của hệ sợi và nảy mầm của bào tử nấm *Foc* TR4. Trên cơ sở nghiên cứu các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và phân tích vùng trình tự 16S rARN chủng xạ khuẩn VNUA27 đã được xác định là *Streptomyces diastatochromogenes* VNUA27. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng xạ khuẩn VNUA27 đối kháng mạnh với nấm *Foc* TR4 (54,78%). Sợi nấm *Foc* TR4 sau khi được xử lý bằng dịch nuôi của chủng VNUA27 bị co lại và biến dạng. Các mẫu bào tử của nấm *Foc* TR4 được xử lý bằng dịch nuôi của chủng xạ khuẩn VNUA27 cho thấy một tỉ lệ lớn bào tử không nảy mầm (ức chế 82,42%). Đặc biệt, nghiên cứu này đã phát hiện ra gen chức năng KSα tham gia vào quá trình sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp của chủng VNUA27. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng xạ khuẩn VNUA27 là chủng tiềm năng giúp phòng trừ nấm *Foc* TR4 đạt hiệu quả cao bằng biện pháp sinh học.

Từ khóa: Xạ khuẩn, *Streptomyces*, *Fusarium oxyspoum* f. sp. *cubense.*

Antagonistic Properties of *Streptomyces* sp. VNUA27 Strain Against *Fusarium oxysporum* Causing Panama Disease on Banana

ABSTRACT

Panama disease or banana Fusarium wilt caused by *Fusarium oxyspoum* f. sp. *cubense (Foc)* is one of the most destructive plant diseases. In particular, the strain *Foc TR4* can infect most banana varieties. Compared with traditional methods, biological measures using microorganisms in disease control are considered strategic measures. In this study, actinomycete strain VNUA27 was isolated and evaluated for its ability to antagonize *Foc* TR4. The effect of culture filtrates of the VNUA27 strain on the growth of hyphae and germination of *Foc* TR4 fungal spores was evaluated. Based on the morphological, physiological, and biochemical characteristics and sequence analysis of 16S rRNA region, actinomycete strain VNUA27 was assigned as *Streptomyces diastatochromogenes* VNUA27. The actinomycete strain VNUA27 exhibited high antifungal activity against *Foc* TR4 (54.78%). After treatment with the strain VNUA27 culture filtrates, the *Foc* TR4 hyphae became shrunk and deformed. Spore samples of *Foc* TR4 treated with culture filtrates of the strain VNUA27 showed a high percentage of non-germinated spores (82.42% inhibition). In particular, the results revealed the function of KSα gene clusters that contributed to the biosynthesis of active secondary metabolites of the strain VNUA27. This study showed that the actinomycete strain VNUA27 is a potential agent for biological control of *Foc* TR4 of Fusarium wilt with high efficiency.

Keywords: Actinomycetes, *Streptomyces*, *Fusarium oxyspoum* f. sp. *cubense.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chuối (*Musa* ssp.), có nguồn gốc từ Đông Nam Á, được trồng rộng rãi ở khắp các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Bởi vì chuối giàu dinh dưỡng và tinh bột nên được coi là cây lương thực quan trọng thứ tư sau gạo, lúa mì và ngô để giảm nạn đói của con người ở châu Phi bởi Tổ chức Nông lương Liên hợp quốc (Song & cs., 2018). Năm 2019, sản lượng chuối trên toàn thế giới là hơn 113 triệu tấn; hai nước trồng chuối lớn nhất là Ấn Độ (36,7%) và Trung Quốc (13,8%) (Tzean & cs., 2019). Tuy nhiên, bệnh héo vàng do nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense (Foc)* là một trong những loại bệnh gây hại nặng nề nhất đối với chuối, gây thiệt hại lớn về kinh tế trong thời gian dài. Đặc biệt, chủng *Foc* 4 nhiệt đới (*Foc* TR4) có thể lây nhiễm vào hơn 80% các giống chuối (Ghag & cs., 2015; Zhang & cs., 2019). Bệnh hại này đã được tìm thấy ở các vùng sản xuất chuối lớn của các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới (Ghag & cs., 2015). Ở Việt Nam, chủng *Foc* TR4 gây hại trên chuối tiêu, chuối tây xuất hiện nhiều vùng trồng chuối ở các tỉnh Vĩnh Phúc, Phú Thọ, Hưng Yên, Lào Cai, Hà Nội (Trần Ngọc Hùng & cs., 2020). Việc quản lý hiệu quả và lâu dài đối với bệnh héo vàng trên chuối vẫn còn là thách thức, phần lớn do cây ký chủ lâu năm và nấm bệnh tồn tại lâu trong đất (Ploetz & Evans, 2015). Hiện nay, phương pháp được sử dụng phổ biến nhất để kiểm soát bệnh héo vàng trên chuối là sử dụng thuốc hóa học để tiêu diệt trực tiếp mầm bệnh trong đất. Ưu điểm của việc kiểm soát hóa học là nhanh chóng, tiết kiệm, đơn giản và hiệu quả trong thời gian ngắn. Tuy nhiên các đặc tính của đất và sự đa dạng của vi sinh vật sẽ bị phá hủy do sử dụng hóa chất trong thời gian dài. Ngoài ra còn tiềm ẩn nguy cơ về môi trường và an toàn thực phẩm. Các biện pháp nông nghiệp để kiểm soát bệnh như luân canh, cải tạo đất tiêu tốn rất nhiều thời gian, công sức và không phù hợp với các vườn chuối thâm canh hiện đại quy mô lớn. So với các cách phòng ngừa khác nhau, biện pháp sinh học sử dụng vi sinh vật đối kháng nấm *Foc* được coi là giải pháp chiến lược phòng trừ bệnh héo vàng chuối hiệu quả để giảm việc sử dụng thuốc diệt nấm (Bubici & cs., 2019).

Xạ khuẩn có khả năng tạo ra các chất chuyển hoá thứ cấp quan trọng, sản xuất ra 70% các chất kháng khuẩn. *Streptomysec* là chi quan trọng nhất và là nguồn cũng cấp 2/3 tất cả các kháng sinh tự nhiên (Lucas & cs., 2012). Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng các hợp chất có hoạt tính sinh học liên quan chặt chẽ tới gen mã hóa polyketide synthase (PKS) và nonribosomal peptide synthetase (NRPS). NRPS sinh tổng hợp chất thứ cấp không thông qua ribosome tạo dạng peptide nhờ quá trình tổng hợp các protein và axit amin. PKS là các enzyme chính cần thiết để tổng hợp polyketide - hợp chất chuyển hóa thứ cấp (Albright & cs., 2014; Ginolhac & cs., 2004). Trong chi *Streptomyces*, có ba loại PKS (loại I, loại II và loại III) (Lal & cs., 2000; Funabashi & cs., 2008; Okamoto & cs., 2009). Vì vậy, việc sàng lọc nghiên cứu các cụm gen này là nguồn dữ liệu quan trọng tìm ra các hợp chất sinh học. Các hợp chất kháng khuẩn đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ thực vật khỏi sự tấn công của các tác nhân gây bệnh (Qi & cs., 2019; Wei & cs., 2020). Trên thế giới, có nhiều nghiên cứu khám phá ra các chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomysec* có khả năng sinh ra các hợp chất thứ cấp từ các loại PKS và NRPS có khả năng kháng mạnh với *Foc* TR4. Chẳng hạn như *Streptomyces* sp. strain g10, *S. noursei* Da07210, *Streptomyces* sp. SCA3-4 có khả năng đối kháng mạnh với *Foc* TR4 (Getha & cs., 2005; Wu & cs., 2009; Qi & cs., 2019). Hợp chất thứ cấp chiết từ *Streptomyces* sp. YYS-7, *Streptomyces* sp. 5-10, *Streptomyces* sp. H4 cho đối kháng mạnh, gây biến dạng hệ sợi và ức chế sự nảy mầm của *Foc* TR4, cải thiện sự phát triển của cây chuối sau khi tái lây nhiễm trên chậu (Wei & cs., 2020; Li & cs., 2021; Yun & cs., 2021). Ở Việt Nam, số lượng nghiên cứu khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense (Foc)*, đặc biệt là nghiên cứu xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất sinh học nhóm polyketide còn rất hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu sàng lọc các hợp chất sinh học nhóm polyketide và NRPS từ xạ khuẩn là hướng nghiên cứu triển vọng về an toàn sinh học ở Việt Nam. Bài báo này tập trung nghiên cứu rõ các đặc tính đối kháng với nấm *Fusarium* *oxysporum* f. sp. *cubense* TR4 *(Foc* TR4*)* gây bệnh trên chuối của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA27 (viết tắt là VNUA27) phân lập từ đất trồng chuối tại Hà Tĩnh. Cụ thể, nghiên cứu chỉ rõ ảnh hưởng của dịch nuôi chủng xạ khuẩn VNUA27 tới bào tử và hệ sợi của nấm, định danh và sàng lọc phát hiện gen KSα mã hoá PKSII có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA27 được phân lập từ đất trồng chuối ở xã Xuân Liên, huyện Nghi Xuân, tỉnh Hà Tĩnh. Chủng VNUA27 đã được phân lập theo phương pháp của Rahman & cs. (2011), làm thuần và lưu giữ giống trên môi trường Gause 1. Chủng nấm *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, TR4 đã được nghiên cứu chi tiết về đặc điểm sinh học, định danh và lưu giữa tại phòng thí nghiệm Bộ môn Công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Chủng giống này có thể coi là chủng tham chiếu chuẩn để các nghiên cứu khác sử dụng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát khả năng đối kháng nấm Foc TR4 của chủng VNUA27

Khảo sát khả năng đối kháng nấm *Foc* TR4 của chủng VNUA27 bằng phương pháp đồng nuôi cấy trên môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) (Sadeghian & cs., 2016; Wei & cs., 2020; Qi & cs., 2021; Zou & cs., 2021) và phương pháp khuếch tán đĩa thạch (Mohseni & cs., 2013; Wei & cs., 2020; Qi & cs., 2021; Zou & cs., 2021).

Sau khi nuôi cấy ở 28°C trong 5-7 ngày, hoạt tính đối kháng nấm của chủng xạ khuẩn được xác định bằng cách đo đường kính vùng ức chế (khoảng cách của sợi nấm tới xạ khuẩn) và tính tỉ lệ phần trăm ức chế sự phát triển của sợi nấm (GI) theo công thức sau:

$$GI = \frac{D - D1}{D} \times 100\%$$

Trong đó: D và D1 lần lượt là đường kính của sợi nấm trong đĩa đối chứng và đĩa thí nghiệm.

2.2.2. Ảnh hưởng của dịch nuôi từ chủng VNUA27 đối với sự phát triển của sợi nấm Foc TR4

Khả năng ức chế của dịch nuôi đối với sự phát triển của hệ sợi nấm *Foc* TR4 được phát hiện bằng phương pháp của Yun & cs. (2021). Nhỏ dịch nuôi xạ khuẩn sau 7 ngày lên trên tấm lam kính chứa sợi nấm *Foc* TR4 đang phát triển. Sau khi nuôi ở 28°C trong 2-3 ngày, các mẫu sợi nấm được quan sát dưới kính hiển vi quang học (Axio Scope A1, Carl ZEISS, Đức)

2.2.3. Ảnh hưởng của dịch nuôi từ chủng VNUA27 đến sự nảy mầm của bào tử nấm Foc TR4

Thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng sự nảy mầm của bào tử được thực hiện theo phương pháp của Phuakjaiphaeo & cs. (2016). Sự nảy mầm của bào tử được quan sát và đếm trên kính hiển vi quang học (Axio Scope A1, Carl ZEISS, Đức), chỉ những ống mầm có kích thước dài hơn kích thước bào tử của chúng mới được tính là đã nảy mầm. Tỉ lệ phần trăm ức chế sự nảy mầm của bào tử (PSGI) được tính theo công thức của Gemeda & cs. (2014):

$$PSGI = \frac{S_c - S_t}{S_c} \times 100\%$$

Trong đó: S_c và S_t lần lượt là số lượng trung bình bào tử nảy mầm trong mẫu đối chứng và mẫu thí nghiệm.

2.2.4. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học và định danh chủng xạ khuẩn VNUA27

Đặc điểm hình thái và nuôi cấy chủng xạ khuẩn VNUA27 được xác định trên hệ thống môi trường ISP và môi trường Gause-1 (Shirling & Gottlieb, 1966) sau 5-7 ngày nuôi cấy ở 30°C. Khả năng sinh sắc tố melanin được quan sát trên môi trường ISP6 sau 7 ngày, nếu môi trường chuyển từ màu vàng nhạt sang màu nâu hoặc đen thì chủng xạ khuẩn có khả năng sinh ra melanin. Các đặc điểm khuẩn lạc gồm màu sắc khuẩn ty cơ chất (KTCC), khuẩn ty khí sinh

(KTKS) và khả năng sinh sắc tố tan được đánh giá bằng cách so sánh với bảng màu ISCC-NBS (Kelly, 1958).

Phương pháp xác định hình thái chuỗi sinh bào tử, khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, nồng độ NaCl tới sinh trưởng và phát triển của chủng VNUA27, định danh chủng VNUA27 được thực hiện theo phương pháp của Nguyễn Xuân Cảnh & cs. (2016). Cụ thể, xác định hình thái chuỗi sinh bào tử thực hiện như sau: Cấy chủng xạ khuẩn trên môi trường Gause 1 đã găm lamen vào thạch với góc nghiêng 45° so với bề mặt thạch. Sau 3 ngày nuôi cấy ở 30°C, tiến hành rút lamen có khuẩn ty khí sinh của xạ khuẩn bám lên và quan sát kết quả trên kính hiển vi điện tử quét (SEM). Khảo sát ảnh hưởng nhiệt độ, pH, nồng độ muối NaCl đến sinh trưởng và phát triển của chủng xạ khuẩn VNUA27 bằng cách nuôi cấy chủng VNUA27 trên môi trường Gause 1 với các điều kiện nuôi cấy khác nhau bao gồm: nhiệt độ (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50°C); pH (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12); nồng độ muối NaCl (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9%). Chủng VNUA27 được định danh căn cứ vào đặc điểm hình thái, nuôi cấy và phân tích trình vùng 16S rRNA được khuếch đại bằng cặp mồi 27F và 1492R (Weisburg & cs., 1991).

2.2.5. Phát hiện gen KSα sinh tổng hợp PKS II

Khuếch đại gen KSα sinh tổng hợp PKS II theo phương pháp của Metsa-Ketela & cs. (1999), bằng trình tự mồi: KSα-F: 5'-GATGGT CTCCACCGGCTGC-3' và KSα-R: 5'-GTCTCG TGGCGGTCGTTCTGC-3'. Cặp mồi đặt tại công ty Macrogen (Seoul, Hàn Quốc). Tổng hỗn hợp phản ứng PCR là 20µl bao gồm 10µl mastermix 2X, 1µl KSα-F (10µM), 1µl KSα-R (10µM), 1µl DNA (140 ng/µl), 7µl H_2O. Chu trình nhiệt cho các phản ứng PCR bắt đầu là 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ ở 95°C trong 1 phút, 58°C trong 30 giây, 72°C trong 2 phút và thời gian kéo dài mạch cuối cùng 10 phút tại 72°C. Cặp mồi khuyếch đại sản phẩm có kích thước 470bp (Bundale & cs., 2014).

2.2.6. Phân tích số liệu

Số liệu được xử lý sơ bộ trên phần mềm Excel. Vẽ biểu đồ, thống kê bằng phần mềm GraphPad Prism 9 với độ tin cậy P <0,05. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức được xác định bằng cách sử dụng phân tích phương sai một chiều (ANOVA). Kiểm định Ducan để so sánh sự khác biệt giữa các trung bình nghiệm thức.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và phân loại chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA27

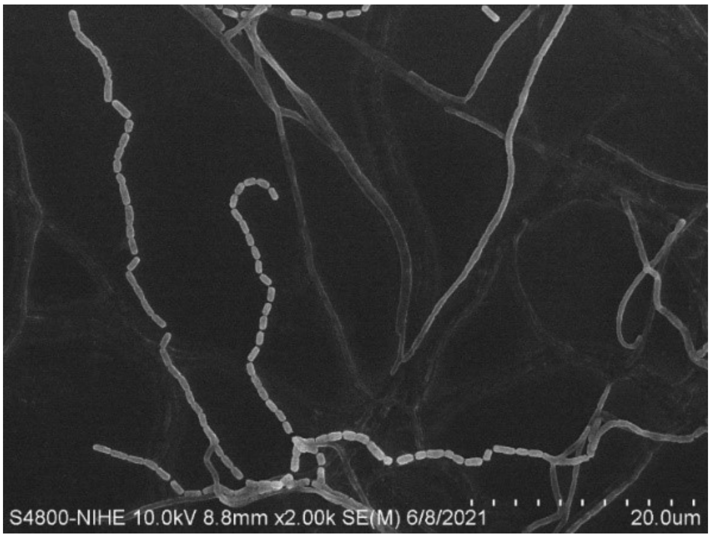
3.1.1. Đặc điểm phân lập và hình thái

Nghiên cứu của Zhou & cs. (2019) đã phát hiện ra rằng đất quanh vùng thân rễ tại vườn trồng chuối không có triệu chứng bệnh héo vàng trong 10 năm có nhiều vi sinh vật có đặc tính sinh học kháng nấm *Foc.* Trên cơ sở đó, chủng xạ khuẩn VNUA27 được phân lập từ đất trồng chuối tại huyện Nghi Xuân, tỉnh Hà Tĩnh. Sau đó, chủng xạ khuẩn VNUA27 được tiến hành các bước nghiên cứu để phân loại.

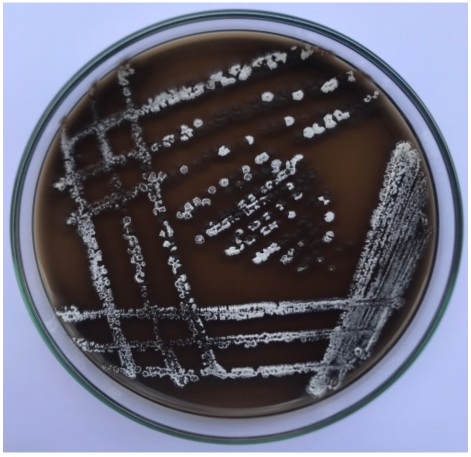
Nghiên cứu đặc điểm hình thái là một trong những tiêu chí đầu tiên để phân loại xạ khuẩn (Miyadoh, 1997). Kết quả nuôi cấy chủng xạ khuẩn VNUA27 trên môi trường Gause I, ISP1-ISP5 để quan sát các đặc điểm màu sắc KTCC và KTKS, sắc tố tan được mô tả ở bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm nuôi cấy của chủng xạ khuẩn VNUA27 trên các môi trường Gause I và ISP

Đặc điểm	Gause I	ISP1	ISP2	ISP3	ISP4	ISP5
Màu KTCC	Trắng	Vàng nâu	Vàng nâu	Trắng xám	Trắng	Trắng
Màu KTKS	Trắng	Trắng	Trắng xám	Xám	Trắng	Trắng
Tiết sắc tố tan	Nâu nhạt	Nâu	Nâu	Nâu nhạt	Nâu nhạt	Không



Hình 1. Hình thái chuỗi sinh bào tử của chủng xạ khuẩn VNUA27 dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) ở độ phóng đại 2.000 lần



Hình 2. Kết quả kiểm tra khả năng hình thành melanin của chủng VNUA27 khi nuôi cấy trên môi trường ISP-6 sau 7 ngày

Sau khi nghiên cứu các đặc điểm khuẩn lạc, chủng xạ khuẩn VNUA27 được nghiên cứu xác định thời gian hình thành, hình dạng chuỗi sinh bào tử và bào tử. Kết quả quan sát dưới kính hiển vi quang học cho thấy, chủng xạ khuẩn VNUA27 bắt đầu hình thành cuống sinh bào tử sau 36 giờ nuôi cấy. Các bào tử được sắp xếp thành chuỗi dài, dạng xoắn và sau 48 giờ bắt đầu đứt rời khỏi chuỗi, phát tán. Quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) ở độ phóng đại 2.000 lần cho thấy rõ, hình thái chuỗi sinh bào tử của chủng VNUA27 rất đặc trưng với dạng xoắn màu trắng, mỗi chuỗi hình thành 20-35 bào tử (Hình 1).

3.1.2. Khả năng hình thành sắc tố melanin

Xạ khuẩn tổng hợp và hình thành sắc tố melanin được coi là một tiêu chí chuẩn để phân loại (Zenova, 1965; Arai & Mikami, 1972). Kết quả sau 7 ngày nuôi cấy chủng xạ khuẩn VNUA27 trên môi trường ISP6 cho thấy màu của môi trường chuyển trừ màu vàng nhạt sang màu nâu đen, chứng tỏ chủng VNUA27 có khả năng sinh sắc tố melanin (Hình 2). Các hợp chất melanin được xạ khuẩn sinh ra có tác dụng bảo vệ chúng khỏi bức xạ tia cực tím (Dastager & cs., 2006). Đặc biệt, melanin từ xạ khuẩn đã được nghiên cứu cho thấy có nhiều hoạt tính sinh học bao gồm hoạt động chống oxy hoá, đặc tính kháng khuẩn (Sivaperumal & cs., 2015).

3.1.3. Khả năng thích nghi với một số điều kiện môi trường của chủng VNUA27

Nghiên cứu, khảo sát khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng xạ khuẩn VNUA27 trên một số điều kiện môi trường khác nhau nhằm mục đính cung cấp thông tin về điều kiện nuôi cấy, phục vụ cho các nghiên cứu lên men sau này. Kết quả cho thấy, chủng xạ khuẩn VNUA27 sinh trưởng và phát triển tốt trong điều kiện nhiệt độ từ 25-35°C, với khoảng pH từ 6-9 (Bảng 2).

Nghiên cứu này còn cho thấy chủng xạ khuẩn VNUA27 sinh trưởng và phát triển mạnh ở nồng độ muối (NaCl) 1-2% và có thể sinh trưởng được ở nồng độ muối là 4% nên chủng này được xếp vào nhóm chịu muối trung bình (Larsen, 1986). Các kết quả về điều kiện môi trường nuôi cấy tương đối giống với các kết quả nghiên cứu đã được công bố của Qi & cs. (2021).

3.1.4. Định danh chủng VNUA27

Chủng xạ khuẩn VNUA27 được phân tích, so sánh vùng trình tự của đoạn gen 16S rRNA trên ngân hàng gen và tiến hành xây dựng cây phân loại (Hình 3).

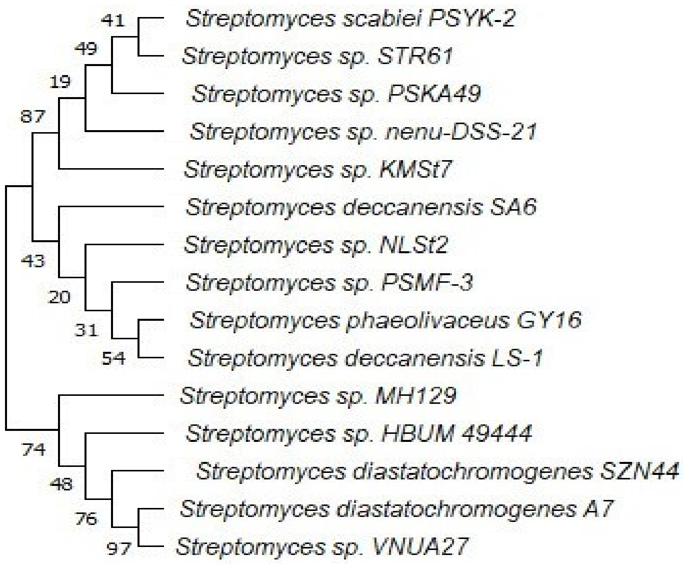
Dựa vào cây phân loại cho thấy chủng xạ khuẩn VNUA27 nằm cùng nhánh với chủng *Streptomyces diastatochromogenes* A7 với giá trị bootstrap là 97. Kết quả giải trình tự nucleotide cho thấy mức độ tương đồng của hai trình tự 16S rRNA của VNUA27 và *Streptomyces diastatochromogenes* A7 là 99,44%. Xét trên cơ sở phân tử về giá trị tin cậy và mức độ tương đồng thì hai chủng này cùng một loài. Ngoài ra các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa đã nghiên cứu cho thấy chủng xạ khuẩn VNUA27 có nhiều đặc điểm giống với chủng *Streptomyces diastatochromogenes* A7 trên ngân hàng gen (Shirling & Gottlieb, 1966). Vì vậy, có thể kết luận rằng chủng xạ khuẩn VNUA27 có quan hệ gần gũi với loài *Streptomyces diastatochromogenes* và đặt tên chủng xạ khuẩn VNUA27 là *Streptomyces diastatochromogenes* VNUA27.

3.2. Khả năng đối kháng của chủng xạ khuẩn VNUA27 với nấm *Foc* TR4

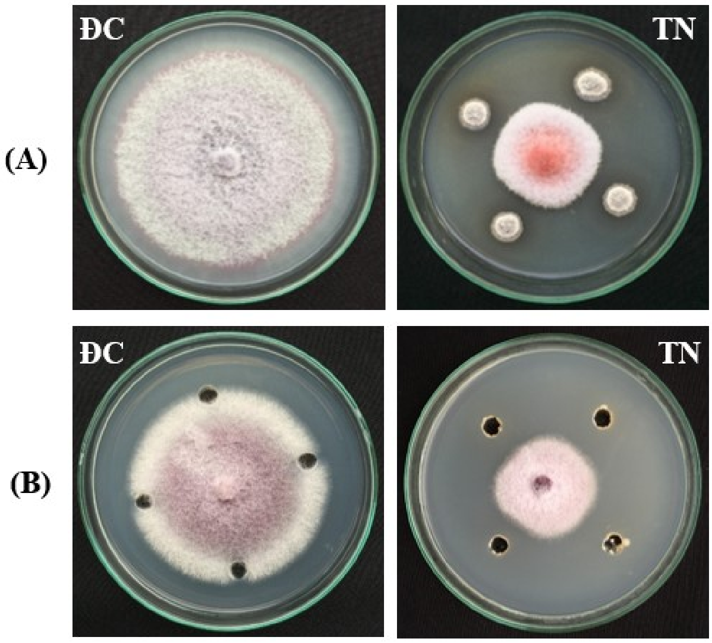
Xạ khuẩn được sử dụng như tác nhân kiểm soát sinh học chống các bệnh truyền nhiễm qua đất. Khả năng đối kháng với các vi sinh vật gây bệnh của xạ khuẩn được cho là nhờ các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học. Các chất này được xạ khuẩn tiết ra môi trường trong quá trình nuôi cấy. Do đó, hoạt tính kháng nấm của chủng VNUA27 được đánh giá bằng phương pháp đồng nuôi cấy và khuếch tán trên đĩa thạch. Kết quả quá trình nuôi cấy đã xác định được chủng VNUA27 có khả năng đối kháng mạnh với nấm *Foc* TR4, cho tỉ lệ phần trăm đối kháng là 54,78% ± 1,35 khi đồng nuôi cấy (Hình 4A) và 46,01% ± 1,06 khi tiến hành thử nghiệm khuếch tán đĩa thạch (Hình 4B). Kết quả này cho thấy chủng VNUA27 có tỉ lệ kháng nấm *Foc* TR4 tốt, cao hơn rất nhiều so với chủng *S. griseorubiginosus* có tỉ lệ kháng nấm *Foc* là 37,05% đã được công bố bởi Cao & cs. (2005). So sánh với nghiên cứu gần đây nhất, chủng VNUA27 cho kết quả kháng nấm tương đương với chủng SCA 2-4 có tỉ lệ kháng nấm *Foc* TR4 là 53,17% khi đồng nuôi cấy và 42,47% khi khuếch tán đĩa thạch bằng sử dụng dịch chiết xuất (6,25 µg/ml) tách từ chủng SCA 2-4 (Qi & cs., 2021).

Bảng 2. Ảnh hưởng của một số điều kiện môi trường đến sự phát triển của chủng xạ khuẩn VNUA27

Yếu tố	Khoảng tối ưu	Khoảng chịu đựng
Nhiệt độ (°C)	25-30	20-40
NaCl (%)	1-2	1-4
pH	6-10	4-12



Hình 3. Cây phân loại dựa trên trình tự 16S rRNA của chủng xạ khuẩn VNUA27



Hình 4. Hoạt tính kháng nấm *Foc* TR4 của chủng VNUA27 bằng phương pháp đồng nuôi cấy (A) và phương pháp khuếch tán đĩa thạch (B)

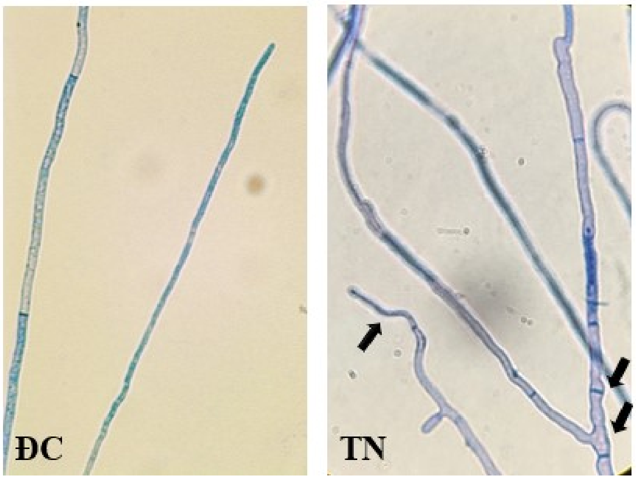
3.3. Tác động của dịch nuôi của chủng VNUA27 tới sinh trưởng và phát triển của nấm *Foc* TR4

3.3.1. Tác động của dịch nuôi của chủng VNUA27 đến sự phát triển của hệ sợi nấm Foc TR4

Từ kết quả nghiên cứu khả năng kháng nấm *Foc* TR4 của chủng VNUA27 cho thấy rằng không có sự tiếp xúc trực tiếp giữa khuẩn lạc và dịch nuôi cấy chủng VNUA27 với sợi nấm trong các mẫu thí nghiệm. Điều đó chứng minh rằng, sự ức chế nấm *Foc* TR4 của chủng VNUA27 rất có thể do các chất chuyển hoá kháng nấm được sinh ra và khuếch tán trong môi trường thạch. Chính vì vậy, sau khi xác định khả năng đối kháng, chủng xạ khuẩn VNUA27 được tiến hành nghiên cứu sâu hơn tìm hiểu ảnh hưởng của dịch nuôi đến sự phát triển của hệ sợi và sự nảy mầm của bào tử nấm *Foc* TR4. Kết quả quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 lần cho thấy hình thái sợi nấm ở mẫu thí nghiệm có sự bất thường. Cụ thể, sợi nấm bị biến dạng, tại các đỉnh phần ngọn nấm teo và quăn rụt lại, phần thân hình thành các mấu lồi và sợi nấm xuất hiện nhiều vách ngăn hơn so với mẫu đối chứng (Hình 5).

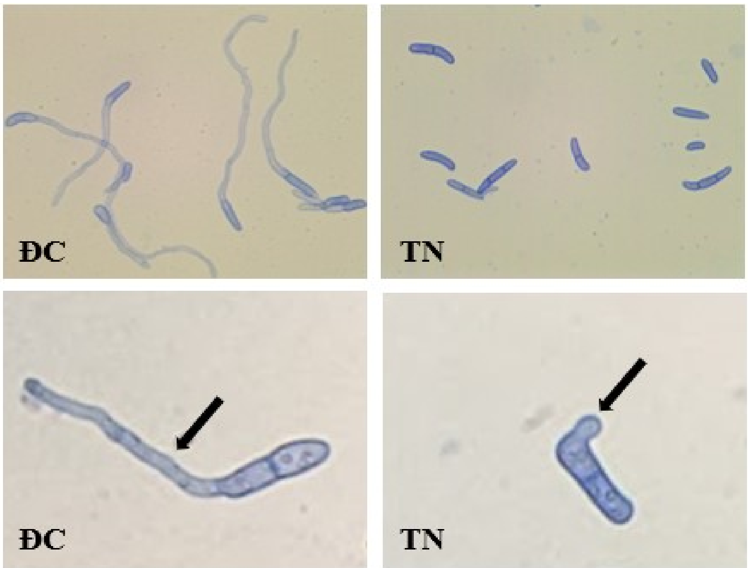
3.3.2. Tác động của dịch nuôi cấy của chủng xạ khuẩn VNUA27 đến sự nảy mầm của bào tử nấm Foc TR4

Nấm *Foc* tồn tại dưới dạng bào tử hậu (chlamydospores) rât lâu trong đất (hơn 20 năm), ngay cả khi không có thực vật kí chủ (Buddenhagen, 2007). Bào tử này có thành dày, có thể chịu được các môi trường khắc nghiệt và dễ dàng nảy mầm khi gặp điều kiện thuận lợi. Đây là một trong những nguyên nhân chính gây khó khăn trong việc kiểm soát nấm bệnh này. Nghiên cứu tác động của dịch nuôi chủng xạ khuẩn VNUA27 đến sự nảy mầm của bào tử nấm *Foc* có ý nghĩa quan trọng trong việc phòng trừ bệnh hiệu quả lâu dài. Vì sự nảy mầm của bào tử rất cần thiết đối sự phát triển của bệnh nấm trong giai đoạn đầu. Thí nghiệm được tiến hành theo dõi tỉ lệ nảy mầm sau 3 giờ, 6 giờ, 9 giờ, 12 giờ ở mẫu thí nghiệm và đối chứng. Kết quả các mẫu dịch bào tử được xử lý bằng dịch nuôi cấy xạ khuẩn VNUA27 cho thấy tỉ lệ nảy mầm lần lượt là 1,72%; 11,07%; 17,58%; 17,82% và mẫu đối chứng lần lượt là 66,58%; 87,05%; 94,21%; 94,14% (Hình 6).

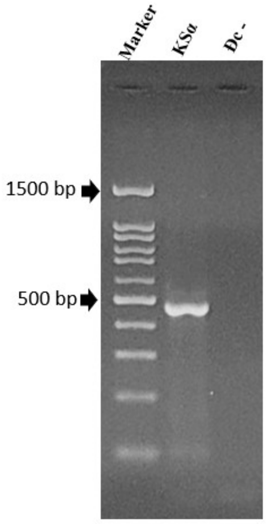


Hình 5. Tác động của dịch nuôi cấy của chủng xạ khuẩn VNUA27 đến sự phát triển của hệ sợi nấm *Foc* TR4

Hình 6. Tỉ lệ bào tử nảy mầm của bào tử nấm *Foc* TR4 theo các mốc thời gian



Hình 7. Tác động của dịch nuôi cấy đến sự nảy mầm của bào tử sau 9 giờ



Hình 8. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuyếch đại gen KSα

Đáng chú ý, tỉ lệ nảy mầm tại thời điểm 9 giờ và 12 giờ của mẫu thí nghiệm và đối chứng không có sự sai khác về thống kê với độ tin cậy P <0,05. Điều này chứng minh rằng, dịch nuôi xạ khuẩn VNUA27 đã ức chế sự nảy mầm của bào tử nấm *Foc* TR4 với tỉ lệ ức chế nảy mầm là 82,42% sau 9 giờ (chỉ có 17,58% nảy mầm). Quan sát hình thái bào tử dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 lần cho thấy, trong mẫu thí nhiệm, bào tử không nảy mầm hoặc phát triển chậm với ống mầm sưng phình (Hình 7). Ngược lại, 94,21% bào tử nảy mầm với hình thái bình thường ở mẫu đối chứng và chỉ có 5,86% bào tử không nảy mầm ở điều kiện bình thường.

Những phát hiện này cho thấy rằng dịch nuôi chủng xạ khuẩn VNUA27 có chứa hợp chất kháng nấm, tác động tích cực đến việc làm giảm khả năng lây nhiễm của nấm *Foc* TR4 lên chuối bằng cách ức chế sự phát triển hệ sợi và nảy mầm của bào tử, do đó làm giảm mức độ gây hại của bệnh. Kết quả này tương tự với các nghiên cứu gần đây nhất khi nghiên cứu ảnh hưởng của dịch nuôi và dịch chiết từ các chủng xạ khuẩn có khả năng kháng nấm *Foc* TR4 mạnh (Jing & cs., 2020; Wei & cs., 2020; Qi & cs., 2021; Zou & cs., 2021).

3.4. Phát hiện gen liên quan đến sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp từ chủng xạ khuẩn VNUA27

Nghiên cứu trước đó của Shentu & cs. (2016) đã chỉ ra rằng chủng *Streptomyces diastatochromogenes* 1268 có thể tổng hợp ít nhất 4 loại kháng sinh khác nhau là toyocamycin và ba loại thuốc kháng sinh tetraene macrolide. Tất cả các hợp chất này đều có khả năng chống lại các nấm gây bệnh trên thực vật rất cao chẳng hạn như *Fusarium oxysporum* và *Rhizoctonia solani*. Hơn nữa, việc nghiên cứu phát hiện gen mã hóa PKSII không những dự đoán được khả năng sinh tổng hợp kháng sinh của chủng xạ khuẩn mà còn là tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn nhằm xác định quá trình hình thành gen mã hóa sinh kháng sinh và xác định hợp chất kháng sinh đó. KSα (α-ketoacyl synthase) là một trong ba tiểu phần cốt lõi trong tất cả các cụm gen mã hóa PKSII. Do đó, KSα có thể được sử dụng để nhận biết sàng lọc các hợp chất PKSII (Sun & cs., 2012). Trên cơ sở khoa học đó, chủng xạ khuẩn VNUA27 đã được tiến hành sàng lọc và đánh giá gen KSα liên quan đến quá trình trao đổi chất thứ cấp. Kết quả hình 8 cho thấy, sản phẩm khuyếch đại gen KSα của chủng VNUA27 bằng phản ứng PCR cho một băng DNA duy nhất có kích thước 470bp tương ứng với kích thước đã được cống bố khi thiết kế mồi. Kết quả nghiên cứu chứng tỏ chủng xạ khuẩn VNUA27 có tiềm năng sinh tổng hợp kháng sinh. Đây là một trong những dữ liệu quan trọng phục vụ cho nghiên cứu sau này để tìm ra các hợp chất sinh học kháng nấm *Foc* TR4 từ chủng xạ khuẩn tiềm năng này.

4. KẾT LUẬN

Chủng VNUA27 có khả năng đối kháng mạnh với nấm *Foc* TR4 với tỉ lệ đối kháng là 54,78%. Đặc biệt, nghiên cứu đã chỉ rõ ảnh hưởng của dịch nuôi VNUA27 tác động làm biến dạng hình thái sợi nấm và ức chế sự nảy mầm của bào tử (ức chế 82,42%), kết quả này đã chỉ rõ đồng thời hai con đường làm hạn chế sự phát triển của nấm bệnh *Foc* TR4 bằng dịch nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*. Ngoài ra, nghiên cứu đã phát hiện ra gen KSα tham gia vào quá trình sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp từ chủng xạ khuẩn VNUA27. Đây là một trong những bước đầu tiên giúp sàng lọc, phát hiện được hợp chất có hoạt tính sinh học kháng nấm từ chủng VNUA27. Kết quả nghiên cứu là tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về cấp độ phân tử và quy trình lên men của chủng VNUA27 tạo ra chế phẩm sinh học nhằm kiểm soát bệnh héo vàng do nấm *Foc* TR4 gây nên bằng biện pháp sinh học.

LỜI CÁM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự tài trợ kinh phí từ đề tài khoa học công nghệ tiềm năng cấp Bộ của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn mã số ĐTTN.13/21.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Albright J.C., Goering A.W., Doroghazi J.R., Metcalf W.W. & Kelleher N.L. (2014). Strain-specific proteogenomics accelerates the discovery of natural products via their biosynthetic pathways. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 41(2): 451-459.

Arai T. & Mikami Y. (1972). Chromogenicity of *streptomyces*. Applied Microbiology. 23(2): 402-406.

Bubici G., Kaushal M., Prigigallo M. I., Gómez-Lama Cabanás C. & Mercado-Blanco J. (2019). Biological control agents against Fusarium wilt of banana. Frontiers in Microbiology. 10: 616.

Buddenhagen I. (2007). Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and history of introduction of tropical Race 4' to better manage banana production. In III International Symposium on Banana: ISHS-ProMusa Symposium on Recent Advances in Banana Crop Protection for Sustainable. 828: 193-204.

Bundale S., Begde D., Nashikkar N., Kadam T. & Upadhyay A. (2014). Isolation of aromatic polyketide producing soil *Streptomyces* using combinatorial screening strategies. OALib Journal. 1: 1-16.

Dastager S., Li W.-J., Dayanand A., Tang S.-K., Tian X.-P., Zhi X.-y., Xu L.-H. & Jiang C.-L. (2006).

Seperation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. African Journal of Biotechnology. 5(11).

Funabashi M., Funa N. & Horinouchi S. (2008). Phenolic lipids synthesized by type III polyketide synthase confer penicillin resistance on *Streptomyces griseus*. Journal of Biological Chemistry. 283(20): 13983-13991.

Gemeda N., Woldeamanuel Y., Asrat D. & Debella A. (2014). Effect of essential oils on *Aspergillus s*pore germination, growth and mycotoxin production: a potential source of botanical food preservative. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 4: S373-S381.

Getha K., Vikineswary S., Wong W., Seki T., Ward A. & Goodfellow M. (2005). Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of Fusarium wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 32(1): 24-32.

Ghag S.B., Shekhawat U.K. & Ganapathi T.R. (2015). Fusarium wilt of banana: biology, epidemiology and management. International Journal of Pest Management. 61(3): 250-263.

Ginolhac A., Jarrin C., Gillet B., Robe P., Pujic P., Tuphile K., Bertrand H., Vogel T.M., Perriere G. & Simonet P. (2004). Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. Applied and Environmental Microbiology. 70(9): 5522-5527.

Jing T., Zhou D., Zhang M., Yun T., Qi D., Wei Y., Chen Y., Zang X., Wang W. & Xie J. (2020). Newly isolated *Streptomyces* sp. JBS5-6 as a potential biocontrol agent to control banana fusarium wilt: genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. Frontiers in microbiology. 11: 602591.

Kelly K.L. (1958). Centroid notations for the revised ISCC-NBC color name blocks. Journal of Research of the National Bureau of Standards. 61(5): 2911.

Lal R., Kumari R., Kaur H., Khanna R., Dhingra N. & Tuteja D. (2000). Regulation and manipulation of the gene clusters encoding type-I PKSs. Trends in biotechnology. 18(6): 264-274.

Larsen H. (1986). Halophilic and halotolerant microorganisms - an overview and historical perspective. FEMS Microbiology Reviews. 2(1-2): 3-7.

Li X., Li K., Zhou D., Zhang M., Qi D., Jing T., Zang X., Qi C., Wang W. & Xie J. (2021). Biological control of banana wilt disease caused by *Fusarium oxyspoum* f. sp. *Cubense* using *Streptomyces* sp. H4. Biological Control. 155: 104524.

Lucas X., Senger C., Erxleben A., Grüning B.A., Döring K., Mosch J., Flemming S. & Günther S. (2012). StreptomeDB: a resource for natural compounds isolated from *Streptomyces* species. Nucleic Acids Research. 41(D1): D1130-D1136.

Metsä-Ketelä M., Salo V., Halo L., Hautala A., Hakala J., Mäntsälä P. & Ylihonko K. (1999). An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. FEMS Microbiology Letters. 180(1): 1-6.

Miyadoh S. (1997). Atlas of actinomycetes. Society for Actinomycetes Japan.

Mohseni M., Norouzi H., Hamedi J. & Roohi A. (2013). Screening of antibacterial producing actinomycetes from sediments of the Caspian Sea. International Journal of Molecular and Cellular Medicine. 2(2): 64.

Nguyễn Xuân Cảnh, Hồ Tú Cường, Nguyễn Thị Định & Phạm Thị Hiếu (2016). Nghiên cứu chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 14(11): 1809-1816

Okamoto S., Taguchi T., Ochi K. & Ichinose K. (2009). Biosynthesis of actinorhodin and related antibiotics: discovery of alternative routes for quinone formation encoded in the act gene cluster. Chemistry & Biology. 16(2): 226-236.

Phuakjaiphaeo C., Chang C., Ruangwong O. & Kunasakdakul K. (2016). Isolation and identification of an antifungal compound from endophytic *Streptomyces* sp. CEN 26 active against *Alternaria brassicicola*. Letters in Applied Microbiology. 63(1): 38-44.

Ploetz R.C. & Evans E.A. (2015). The future of global banana production. Horticultural Reviews. 43: 311-3

Qi D.F., Zou L., Zhou D., Zhang M., Wei Y., Zhang L., Xie J. & Wang W. (2021). Identification and Antifungal Mechanism of a Novel Actinobacterium *Streptomyces huiliensis sp. nov*. against *Fusarium oxysporum.* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 of Banana. Frontiers in Microbiology. 3399.

Qi D., Zou L., Zhou D., Chen Y., Gao Z., Feng R., Zhang M., Li K., Xie J. & Wang W. (2019). Taxonomy and broad-spectrum antifungal activity of *Streptomyces* sp. SCA3-4 isolated from rhizosphere soil of *Opuntia stricta*. Frontiers in Microbiology. 10: 1390.

Rahman M., Islam M. Z., Islam M. & Ul A. (2011). Antibacterial activities of actinomycete isolates collected from soils of Rajshahi, Bangladesh. Biotechnology Research International.

Sadeghian M., Bonjar G.H.S. & Sirchi G.R.S. (2016). Post harvest biological control of apple bitter rot by soil-borne actinomycetes and molecular identification of the active antagonist. Postharvest Biology and Technology. 112: 46-54.

Shirling E.T. & Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology. 16(3): 313-340.

Sivaperumal P., Kamala K. & Rajaram R. (2015). Bioactive DOPA melanin isolated and characterised from a marine actinobacterium *Streptomyces sp*. MVCS6 from Versova coast. Natural Product Research. 29(22): 2117-2121.

Song S., Xu Y., Huang D., Miao H., Liu J., Jia C., Hu W., Valarezo A.V., Xu B. & Jin Z. (2018). Identification of a novel promoter from banana aquaporin family gene (MaTIP1; 2) which responses to drought and salt-stress in transgenic *Arabidopsis thaliana.* Plant Physiology and Biochemistry. 128: 163-169.

Sun W., Peng C., Zhao Y. & Li Z. (2012). Functional gene-guided discovery of type II polyketides from culturable actinomycetes associated with soft coral *Scleronephthya sp.* PloS One. 7(8): e42847

Trần Ngọc Hùng, Đỗ Thị Vĩnh Hằng & Nguyễn Đức Huy (2020). Bệnh héo vàng (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) hại chuối tiêu tại Việt Nam. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 18(5): 315-322.

Tzean Y., Lee M.-C., Jan H.-H., Chiu Y.-S., Tu T.-C., Hou B.-H., Chen H.-M., Chou C.-N. & Yeh H.-H. (2019). Cucumber mosaic virus-induced gene silencing in banana. Scientific Reports. 9(1): 1-9.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. & Lane D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology. 173(2): 697-703.

Wei Y., Zhao Y., Zhou D., Qi D., Li K., Tang W., Chen Y., Jing T., Zang X. & Xie J. (2020). A newly isolated *Streptomyces* sp. YYS-7 with a broad-spectrum antifungal activity improves the banana plant resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. Frontiers in Microbiology. 11: 1712.

Wu X., Huang H., Chen G., Sun Q., Peng J., Zhu J. & Bao S. (2009). A novel antibiotic produced by *Streptomyces noursei* Da07210. Antonie van Leeuwenhoek. 96(1): 109-112.

Yun T., Zhang M., Zhou D., Jing T., Zang X., Qi D., Chen Y., Li K., Zhao Y. & Tang W. (2021). Anti-*Foc* RT4 activity of a newly isolated *Streptomyces* sp. 5-10 from a medicinal plant (*Curculigo capitulata*). Frontiers in Microbiology. 11: 610698.

Zenova G. (1965). Melanoid pigments of Actinomycetes. Mikrobiologiia. 34(2): 278-283.

Zhang L., Cenci A., Rouard M., Zhang D., Wang Y., Tang W. & Zheng S.-J. (2019). Transcriptomic analysis of resistant and susceptible banana corms in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. Scientific Reports. 9(1): 1-14.

Zhou D., Jing T., Chen Y., Wang F., Qi D., Feng R., Xie J. & Li H. (2019). Deciphering microbial diversity associated with Fusarium wilt-diseased and disease-free banana rhizosphere soil. BMC Microbiology. 19(1): 1-13.