

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN VS18 ĐỐI KHÁNG VỚI NẤM *Corynespora cassiicola*

Nguyễn Văn Giang¹, Nguyễn Thị Thu¹, Chu Đức Hà²

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích sàng lọc và tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Corynespora cassiicola* gây bệnh vàng lá, rụng lá trên cây trồng. Từ 86 chủng xạ khuẩn, chủng VS18 có khả năng kháng nấm *C. cassiicola* mạnh nhất đã được tuyển chọn và khảo sát một số đặc tính. Chủng xạ khuẩn VS18 không tạo sắc tố melanin, có khả năng tổng hợp enzym chitinaza và cellulaza. Khuẩn lạc có màu trắng, hình tròn, kích thước 4 - 6 mm, bề mặt xù xì, sợi khí sinh có dạng thẳng, phân nhánh, có xoắn lò xo mang bào tử ở đầu sợi. Đánh giá khả năng sinh trưởng của VS18 trên các nguồn dinh dưỡng khác nhau cho thấy, chủng VS18 có thể đồng hóa tốt các nguồn đường như I-inositol, sucrose và raffinose và nguồn nitơ khác nhau bao gồm NaNO₃, KNO₃. Mặt khác, chủng xạ khuẩn VS18 sinh trưởng tốt trong dải nhiệt độ 25 - 30°C, pH 6 - 8, chịu được nồng độ muối trong môi trường tới 4%. Dựa trên phân loại ISP, chủng VS18 có thể thuộc loài *S. noursei*.

Từ khóa: *Corynespora cassiicola*, phân lập, *Streptomyces*, xạ khuẩn

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh vàng lá, rụng lá cây trồng, do nấm *Corynespora cassiicola* có ảnh hưởng rất nghiêm trọng tới sản lượng trên đồng ruộng. Bệnh phổ biến trên đối tượng cà chua (*Solanum lycopersicum*) (Sener, 2005), dưa chuột (*Cucumis sativus*) (Muhamad *et al.*, 2010) và đậu tương (*Glycine max*) (Ferreira *et al.*, 2017). Nấm có khả năng phát triển quanh năm, ở mọi giai đoạn phát triển của cây (Sener, 2005). Hiện nay, nhiều nghiên cứu đã tập trung vào chọn giống cây trồng kháng bệnh kết hợp phòng bệnh bằng thuốc trừ sâu hóa học.

Tuy nhiên, việc sử dụng quá nhiều thuốc hóa học đã ảnh hưởng lớn đến chất lượng sản phẩm, tăng tồn dư thuốc trong nông sản. Do đó, biện pháp đấu tranh sinh học trong quản lý bệnh hại có ý nghĩa to lớn trong sản xuất nông sản bền vững. Nghiên cứu này đã được tiến hành nhằm tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng nấm *C. cassiicola* phục vụ sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh hại cây trồng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nấm *C. cassiicola* gây bệnh được thu thập từ Trung tâm Nghiên cứu bệnh cây nhiệt đới và 86 chủng xạ khuẩn từ Bộ môn Công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp đánh giá khả năng đối kháng với nấm *C. cassiicola*: Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy

trên môi trường Gause I. Nấm *C. cassiicola* gây bệnh được hoạt hóa và cấy thuần trên môi trường Potato Dextrose Agar (PDA). Khả năng đối kháng của xạ khuẩn với *C. cassiicola* được tiến hành theo phương pháp được mô tả bởi Nguyễn Lâm Dũng và Phạm Thị Trân Châu (1978); Dhanasekaran *et al.* (2012).

- Phương pháp khảo sát đặc điểm sinh học của xạ khuẩn: Hình thái của xạ khuẩn được xác định dựa trên các đặc điểm nuôi cấy, bao gồm màu sắc của khuẩn ty khí sinh (KTKS), màu sắc của khuẩn ty cơ chất (KTCC), cuống sinh bào tử, khả năng sinh sắc tố tan và sự hình thành sắc tố melanin trên hệ thống môi trường Gause I, Gause II, hệ thống môi trường ISP (Newman *et al.*, 2003).

- Phương pháp đánh giá khả năng sinh enzym cellulaza và chitinaza: Chủng xạ khuẩn được nuôi trên môi trường có bổ sung 1% carboxymethylcellulose (thử hoạt tính cellulaza) hoặc 1% chitin (thử hoạt tính chitinaza) theo phương pháp được mô tả bởi Nguyễn Lâm Dũng và Phạm Thị Trân Châu (1978).

- Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy: Khả năng đồng hóa các nguồn C, N được đánh giá theo thang điểm chuẩn (Shirling và Gottlieb, 1966), ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, nồng độ NaCl được phân tích theo phương pháp được mô tả bởi Nguyễn Xuân Cảnh và *ctv.*, 2016.

2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Bộ môn Công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam từ tháng 3/2016 - tháng 3/2017.

¹ Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Bộ môn Sinh học Phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Corynespora cassiicola*

Xạ khuẩn, đặc biệt là chi *Streptomyces* có tiềm năng để sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp như thuốc kháng sinh (Keiser *et al.*, 2000). Các chủng xạ khuẩn được hoạt hóa trên môi trường Gause I, sau đó được sử dụng để kiểm tra khả năng đối kháng với nấm *C. cassiicola* bằng phương pháp giếng thạch, thoi thạch và đồng nuôi cấy (Nguyễn Lân Dũng và Phạm Thị Trân Châu, 1978; Dhanasekaran *et al.*, 2012). Các đĩa petri thí nghiệm được đặt trong tủ lạnh 4°C trong 4 giờ, sau đó chuyển sang tủ nuôi ở 30°C, quan sát đường kính vòng đối kháng sau 7 ngày. Trong số 86 mẫu phân tích, chủng xạ khuẩn VS18 có hoạt tính đối kháng mạnh nhất (đường kính vòng đối kháng đạt $23,33 \pm 0,58$ mm).

Khi nuôi cấy chủng xạ khuẩn VS18 trên các môi trường ISP khác nhau, KTKS và KTCC biểu hiện

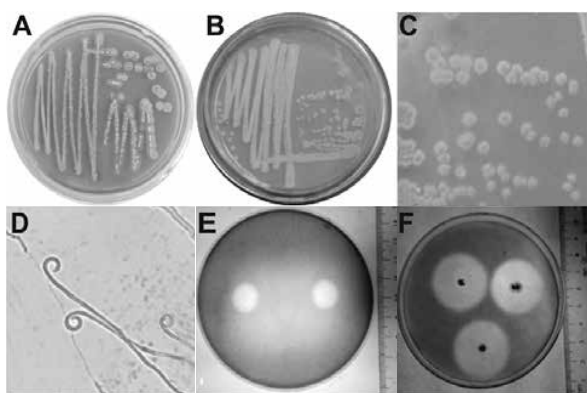
các màu sắc khác nhau (Bảng 1). Theo báo cáo của Shirling và Gottlieb (1966), rất nhiều chủng xạ khuẩn khi nuôi trên môi trường ISP6 sẽ tiết ra melanin làm thay đổi màu sắc môi trường, đây cũng là đặc điểm để phân loại xạ khuẩn.

Sau 21 ngày nuôi trên ISP6, không ghi nhận thấy sự thay đổi màu sắc của môi trường, chủng xạ khuẩn VS18 không có khả năng sinh sắc tố melanin (Hình 1A).

Đặc điểm hình thái của chủng VS18 được quan sát trên môi trường Gause I ở 30°C sau 7 ngày nuôi (Bảng 1). Màu sắc của chủng VS18 thay đổi theo thời gian nuôi cấy. Sau 4 ngày, khuẩn lạc có màu trắng, hình tròn, kích thước 4 - 6 mm, bề mặt khô, xù xì, trong khi từ ngày thứ 5 trở đi, khuẩn lạc chuyển sang màu nâu, trung tâm khuẩn lạc lõm lên, viền ngoài màu trắng. Quan sát dưới kính hiển vi, sợi khí sinh của chủng VS18 có dạng thẳng, phân nhánh, không phân đốt, có xoắn lò xo ở đầu sợi (Hình 1D).

Bảng 1. Màu sắc khuẩn lạc của chủng VS18 trên các môi trường nuôi cấy

| Môi trường | 7 ngày | | 14 ngày | | 21 ngày | |
|------------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|
| | KTKS | KTCC | KTKS | KTCC | KTKS | KTCC |
| Gause I | Nâu trắng | Nâu | Nâu trắng | Nâu | Nâu trắng | Nâu |
| Gause II | Trắng | Trắng | Trắng | Trắng | Trắng | Trắng |
| ISP-1 | Nâu trắng | Nâu | Nâu trắng | Nâu | Nâu trắng | Nâu |
| ISP-2 | Nâu trắng | Nâu | Nâu trắng | Nâu | Nâu trắng | Nâu |
| ISP-3 | Nâu trắng | Nâu | Nâu trắng | Nâu | Nâu trắng | Nâu |
| ISP-4 | Vàng | Vàng | Vàng | Vàng | Vàng | Vàng |
| ISP-5 | Trắng | Trắng | Trắng | Trắng | Trắng | Trắng |
| ISP-6 | Trắng | Vàng | Trắng | Vàng | Trắng | Vàng |
| ISP-7 | Trắng | Trắng | Trắng | Trắng | Trắng | Trắng |



Hình 1. Kết quả kiểm tra khả năng hình thành melanin (A), xác định hình thái (B), màu sắc khuẩn lạc (C), sợi khí sinh (D), khả năng sinh enzyme cellulaza (E) và enzyme chitinaza (F) của chủng xạ khuẩn VS18

Tiếp theo, trong quá trình sống, xạ khuẩn sinh tổng hợp enzym để tạo ra các thành phần cần thiết cho cơ thể mà không có sẵn trong môi trường. Vì thế, khi tuyển chọn chủng giống vi sinh vật cần tiến hành kiểm tra và lựa chọn các chủng có hoạt tính enzym mạnh, sinh nhiều enzym mong muốn theo từng mục đích. Trong nghiên cứu này, khả năng tổng hợp enzym chitinaza và cellulaza được khảo sát nhằm làm rõ cơ chế tấn công *C. cassiicola* của xạ khuẩn VS18. Kết quả sau đó được thể hiện ở Hình 1E và 1F. Khả năng sản sinh enzym mạnh, đặc biệt là chitinaza, của chủng VS18 đã đặt ra giả thuyết rằng, chủng xạ khuẩn này có khả năng phá vỡ thành tế bào nấm *C. cassiicola*, từ đó ngăn chặn sự phát triển của nấm bệnh trên cây trồng.

3.2. Kết quả đánh giá khả năng sử dụng các nguồn dinh dưỡng của chủng VS18

Để tối ưu hóa trong sản xuất, chủng VS18 được nuôi trên môi trường ISP9 có bổ sung một số nguồn C và N khác nhau. Ở đây, nguồn C được sử dụng bao gồm đường glucose, fructose, I-inositol, manitol, sucrose, xylose, rhamnose, L-arabinose, raffinose và cellulose, trong khi nguồn N được thay thế lần lượt là NaNO₃, KNO₃, Urê, NH₄NO₃ và (NH₄)₂SO₄. Khả năng đồng hóa các nguồn dinh dưỡng của VS18 đánh giá theo thang tiêu chuẩn (Shirling và Gottlieb, 1966) và được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Khả năng sử dụng các nguồn C và N khác nhau của chủng VS18

| Nguồn C | | Khả năng phát triển | Nguồn N | | Khả năng phát triển |
|---------|-------------|---------------------|---------|---|---------------------|
| Nguồn C | Glucose | ++ | Nguồn N | NaNO ₃ | +++ |
| | Fructose | + | | KNO ₃ | +++ |
| | I-Inositol | +++ | | Urê | ++ |
| | Manitol | ++ | | NH ₄ NO ₃ | + |
| | Sucrose | +++ | | (NH ₄) ₂ SO ₄ | + |
| | Xylose | + | | | |
| | Rhamnose | ++ | | | |
| | L-Arabinose | + | | | |
| | Raffinose | +++ | | | |
| | Cellulose | ++ | | | |

Ghi chú: (+++): Sử dụng rất tốt, (++): Sử dụng tốt, (+): Có khả năng sử dụng

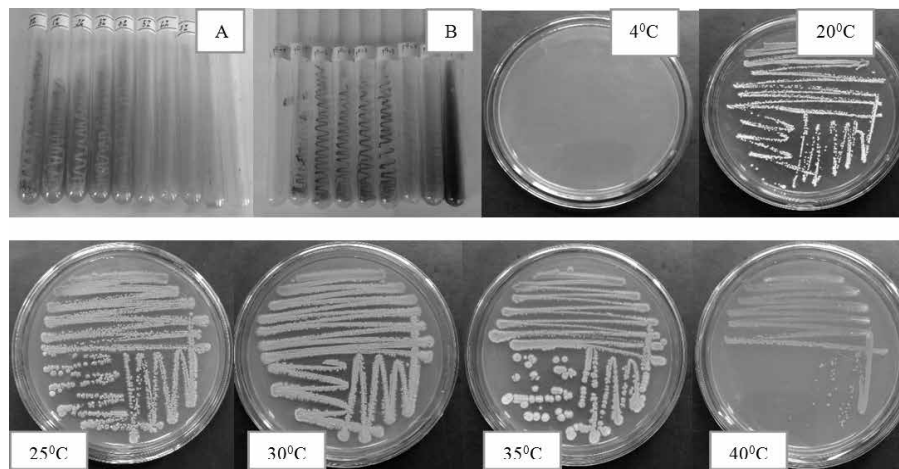
Kết quả cho thấy, chủng VS18 có khả năng sử dụng nhiều nguồn đường khác nhau, tốt nhất là inositol, sucrose và raffinose (Bảng 2). Bên cạnh đó,

VS18 cũng có khả năng sử dụng được một số nguồn N khác nhau, như NaNO₃, KNO₃, (NH₄)₂SO₄, urê và NH₄NO₃. Chủng VS18 có khả năng đồng hóa tốt NaNO₃, KNO₃, tuy nhiên, urê, (NH₄)₂SO₄ và NH₄NO₃ chỉ đạt ở mức bình thường.

3.3. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng của chủng VS18

Nhằm tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy của chủng xạ khuẩn VS18, ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đã được tiến hành khảo sát. Chủng xạ khuẩn VS18 được nuôi trên môi trường Gause 1 lần lượt ở các điều kiện nhiệt độ (0°C, 4°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C và 40°C), dải pH từ 4 - 12 và các nồng độ muối từ 0 - 9%. Sau 5 ngày nuôi cấy, sinh trưởng và phát triển của chủng đã được tiến hành kiểm tra. Kết quả cho thấy VS18 có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường có nồng độ muối từ 0 - 2%, chịu được nồng độ muối tới 4%. So sánh với kết quả nghiên cứu trước đó của Larsen (1986), chủng VS18 thuộc nhóm xạ khuẩn chịu muối thấp. Bên cạnh đó, chủng VS18 cũng có thể sinh trưởng được trong điều kiện pH môi trường từ 5 - 11, nhiệt độ từ 20 - 40 °C. Ngưỡng tối ưu đạt tại dải pH 6 - 8, nhiệt độ trong khoảng 25 - 30 °C. Kết quả này cũng được ghi nhận tương tự như trong đánh giá trước đó (Biển Văn Minh và Vũ Thị Phương Uyên, 1998; Lê Thị Hiền và *ctv.*, 2014).

Kết hợp kết quả khảo sát đặc điểm hình thái, hóa sinh của chủng xạ khuẩn VS18 và so sánh với đặc điểm mô tả trong khóa phân loại ISP cho thấy, chủng VS18 có đặc điểm tương đồng với chủng *Streptomyces noursei*, được Haxen và Brown phát hiện vào năm 1950. Nghiên cứu này sẽ tiếp tục được tiến hành nhằm phát triển chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh hại do nấm *C. cassiicola*.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ muối (A), pH (B) và nhiệt độ tới sinh trưởng của chủng xạ khuẩn VS18

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Đã sàng lọc và tuyển chọn được chủng xạ khuẩn VS18 có khả năng đối kháng mạnh nhất với nấm *Corynespora cassiicola*. Chủng xạ khuẩn VS18 không có khả năng tạo sắc tố melanin, có thể tổng hợp được enzym chitinaza và cellulaza. Khuẩn lạc có màu trắng, hình tròn, kích thước 4 - 6 mm, bề mặt khô, xù xì, sợi khí sinh có dạng thẳng, phân nhánh, không phân đốt, có xoắn lò xo ở đầu sợi.

Chủng VS18 có khả năng đồng hóa nhiều nguồn đường khác nhau, tốt nhất là inositol, sucrose và raffinose. Một số nguồn N khác cũng có thể được sử dụng tốt như NaNO_3 và KNO_3 .

Chủng VS18 sinh trưởng tốt ở nhiệt độ 25 - 30°C, pH 6 - 8, chịu được nồng độ muối trong môi trường tới 4%. Dựa trên phân loại ISP, chủng VS18 có thể thuộc loài *S. noursei*.

4.2. Đề nghị

Nghiên cứu này sẽ tiếp tục được tiến hành nhằm phát triển chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh hại do nấm *C. cassiicola*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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.

Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, 1978. *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học - Tập III*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

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.

Biển Văn Minh, Vũ Thị Phương Uyên, 1998. Một số kết quả nghiên cứu xạ khuẩn (*Streptomyces*) sinh kháng sinh được phân lập từ đất Thừa Thiên-Huế. *Thông báo khoa học - Đại học Huế*, 2: 46-51.

Dhanasekaran, D., Thajuddin, N., Panneerselvam, A., 2012. Applications of actinobacterial fungicides in agriculture and medicine, fungicides for plant and animal diseases, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Editor). *In Tech*, ISBN: 978-953-307-804-5.

Ferreira, A.F., Bentes, J.L., 2017. Pathogenicity of *Corynespora cassiicola* on different hosts in Amazonas State, Brazil. *Summa Phytopathologica*, 43(1): 63-65.

Larsen, H., 1986. Halophilic and halotolerant microorganism: an overview historical perspective. *FEMS Microbiol Biotechnol*, 24: 2235-2241.

Muhamad, Z.R., Hosneara, K., Makoto, U., Junichi, K., Yuichi, H., Sakae, A., 2010. Suppression by red light irradiation of corynespora leaf spot of cucumber caused by *Corynespora cassiicola*. *J Phytopathol*, 158:378-381.

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period. *J Nat Prod*, 66: 1022-1037.

Sener, K., 2005. Genetic variation in *Corynespora cassiicola*, the target leaf spot pathogen. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(4): 618-621.

Shirling, E.B., Gottlieb, D., 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol*, 16:313-340.

Study on biological characteristics of a newly isolated *Streptomyces* strain 'VS18' with potential anti-microbial activity against *Corynespora cassiicola*

Nguyen Van Giang, Nguyen Thi Thu, Chu Duc Ha

Abstract

This study was carried out to screen and isolate new isolated *Streptomyces* strain with potential anti-microbial activity against *Corynespora cassiicola* causing *Corynespora* leaf fall disease. Among 86 isolated samples, *Streptomyces* strain 'VS18' has showed highest anti-microbial activity against *C. cassiicola*. The 'VS18' strain could not synthesize biopigments melanin, but had the ability to produce chitinase and cellulase. Typical colonies were recorded to be circular, with white color, size 4 - 6 mm, scabrous surface, aerial hyphae consists of long, straight branching filaments with a chain of spherical spore. Evaluation of growth and development under various nutrition conditions showed that 'VS18' strain could grow on medium with I-inositol, sucrose and raffinose, and with different N resources such as NaNO_3 and KNO_3 . Additionally, the results revealed that the optimal temperature was at 25 - 30°C and and pH ranged from 6 to 8; this strain also was resistant to 4% NaCl. Finally, based on the ISP classification, 'VS18' strain was proposed to belong to *Streptomyces noursei*.

Key words: *Corynespora cassiicola*, isolation, *Streptomyces*, actinobacteria

Ngày nhận bài: 17/6/2017

Ngày phản biện: 20/6/2017

Người phản biện: TS. Trần Danh Sứ

Ngày duyệt đăng: 25/6/2017