



## KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG CỦA XẠ KHUẨN ĐỐI VỚI NẤM *Phytophthora* SP. GÂY BỆNH CHÁY LÁ, THỐI THÂN TRÊN CÂY SEN

Đinh Hồng Thái<sup>1</sup> và Lê Minh Tường<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Văn phòng Hội đồng Nhân dân và Ủy ban Nhân dân huyện Tháp Mười, tỉnh Đồng Tháp

<sup>2</sup>Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 05/08/2016

Ngày chấp nhận: 26/10/2016

### Title:

Examining the antagonistic ability of Actinomycetes against *Phytophthora* sp. causing leaf blight and stem rot disease on lotus

### Từ khóa:

Enzyme  $\beta$ -glucanase, *Phytophthora* sp., siderophore, xạ khuẩn

### Keywords:

Actinomycetes,  $\beta$ -glucanase, *Phytophthora* sp., siderophore

### ABSTRACT

The research was aimed to screen Actinomycete isolates which are able to control leaf blight and stem rot disease on lotus caused by *Phytophthora* sp.. Ninety-three actinomycete isolates were collected from lotus field in some provinces of the Mekong Delta. The preliminary testing determined 30 isolates capable inhibiting *Phytophthora* sp. growth in laboratory conditions. Testing the antagonistic ability against *Phytophthora* sp. of 30 actinomycete isolates done with 5 replications showed that 5 isolates CM18, HG3, HG4, TG1 and BL6 indicated higher stabler antagonistic ability than others tested and the best - CM18 isolate - could reduce mycelial growth of *Phytophthora* sp. within the radius of 16.75mm and antagonistic efficacy of 89.89% at 60 hours after inoculation. Besides, the testing  $\beta$ -glucanase productivity of these Actinomycetes on  $\beta$ -glucan medium conducted with 5 replications showed that CM18 isolate was the best with the  $\beta$ -glucan lyses halo radius of 10,81mm at 14 days after testing. Moreover, all tested actinomycete isolates were able to produce siderophore under hydroxamates form.

### TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm tìm ra chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Phytophthora* sp. gây bệnh cháy lá – thối thân trên cây sen. Kết quả phân lập được 93 chủng xạ khuẩn từ đất trồng sen ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Qua đánh giá sơ khởi đã chọn được 30 chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng cao với nấm gây bệnh cháy lá – thối thân trên cây sen. Khả năng đối kháng của 30 chủng xạ khuẩn đối với nấm *Phytophthora* sp. được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm với 5 lần lặp lại. Kết quả cho thấy, 5 chủng xạ khuẩn CM18, HG3, HG4, TG1 và BL6 luôn thể hiện khả năng đối kháng cao và bền với nấm *Phytophthora* sp.. Trong đó, chủng CM18 thể hiện khả năng đối kháng cao nhất với bán kính vòng vô khuẩn là 16,75 mm và hiệu suất đối kháng là 89,89% ở thời điểm 60 giờ sau khi cấy. Khả năng tiết enzyme  $\beta$ -glucanase của các chủng xạ khuẩn có triển vọng được thực hiện trên môi trường  $\beta$ -glucan với 5 lần lặp lại. Kết quả cho thấy, chủng xạ khuẩn CM18 có khả năng tiết enzyme  $\beta$ -glucanase cao nhất với bán kính vòng phân giải là 10,81 mm ở thời điểm 14 ngày sau khi cấy. Bên cạnh đó, các chủng xạ khuẩn thí nghiệm đều có khả năng tiết siderophore dạng hydroxamates.

Trích dẫn: Đinh Hồng Thái và Lê Minh Tường, 2016. Khảo sát khả năng đối kháng của xạ khuẩn đối với nấm *Phytophthora* sp. gây bệnh cháy lá, thối thân trên cây sen. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 3): 20-27.

## 1 MỞ ĐẦU

Tại Đồng bằng sông Cửu Long, các mô hình trồng sen trên đất vùng trũng và ruộng lúa cho năng suất và lợi nhuận ngày càng cao. Tuy nhiên, việc thâm canh kéo dài nhưng kỹ thuật canh tác cũng như quản lý dịch hại chưa được quan tâm đúng mức nên đã dẫn đến tình trạng dịch hại ngày càng diễn biến phức tạp, trong đó bệnh cháy lá, thối thân do nấm *Phytophthora* sp. gây ra là bệnh rất phổ biến trên cây sen (Nguyễn Phước Tuyên, 2008). Bệnh có khả năng xâm nhiễm và lây lan nhanh chóng nếu gặp điều kiện ẩm ướt do nấm gây bệnh có thể sản sinh ra bào tử động. Vì vậy, biện pháp ngăn chặn và phòng trị bệnh cần phải được thực hiện một cách có hiệu quả để nâng cao năng suất và chất lượng cây sen. Đối với bệnh do tác nhân *Phytophthora* gây ra thì việc phòng trị bệnh là rất khó khăn do nấm có phạm vi ký chủ rộng và có khả năng lưu tồn rất lâu trong đất (Babadoost, 2001). Việc sử dụng thuốc hóa học để quản lý bệnh tuy cho hiệu quả nhanh chóng nhưng không bền vững vì có một số nhược điểm như: gây ô nhiễm môi trường, không an toàn cho người sản xuất và tiêu dùng, tăng chi phí sản xuất và tạo điều kiện cho nấm bệnh hình thành nội kháng thuốc (Gusmini *et al.*, 2005). Hơn nữa, hậu quả của việc lạm dụng nông dược còn giết chết vi sinh vật đối kháng với dịch bệnh, từ đó làm mất cân bằng sinh thái và dịch bệnh dễ bộc phát nhanh (Phạm Văn Kim, 2000). Để khắc phục những hạn chế đó và hướng đến nền nông nghiệp sản xuất theo hướng an toàn, bền vững và thân thiện với môi trường thì biện pháp sinh học dần được sử dụng thay thế cho biện pháp hóa học. Trong đó, việc nghiên cứu và ứng dụng các xạ khuẩn *Streptomyces* để đối kháng với nấm bệnh đang rất có triển vọng do xạ khuẩn có khả năng đối kháng mạnh thông qua việc tiết ra các sản phẩm hữu cơ đa dạng (Shimizu *et al.*, 2008). Kết quả nghiên cứu của Joo (2005) cho rằng, chủng *Streptomyces halstedii* AJ-7 được đánh giá có khả năng kiểm soát nấm *P. capsici* gây bệnh trên cây ớt đỏ. Theo Valois *et al.* (1996), *Streptomyces* sp. chủng 5406 làm giảm đáng kể thiệt hại do nấm *Phytophthora* và *Pythium* gây ra trên cây họ đậu. Xạ khuẩn *S. rochi* có khả năng đối kháng với nấm *P. capsici* gây bệnh thối rễ trên ớt với hiệu quả giảm bệnh lên đến 78,9% và ức chế sự phát triển của sợi nấm *P. capsici* trong điều kiện *in vitro* bằng cách tiết kháng sinh (Ezziyyani *et al.*, 2007). Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm ra chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với nấm gây bệnh cháy lá, thối thân trên cây sen làm tiền đề cho những nghiên cứu sau nhằm tìm ra sản phẩm sinh học vừa có khả năng quản lý bệnh vừa thân thiện với môi trường.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

### 2.1 Thu thập và phân lập xạ khuẩn

Thu từng mẫu đất ở vườn trồng sen của nông dân cho vào túi nilon riêng và đem về phòng thí nghiệm bệnh cây thuộc Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Trường Đại học Cần Thơ để phân lập. Mẫu đất được thu xung quanh vùng rễ sen. Xạ khuẩn được phân lập theo phương pháp của Hsu và Lockwood (1975): cân 4 gam đất + 40 ml nước cất thanh trùng cho vào ống Fancol 50 ml đem lắc đều trong 30 phút. Sau đó pha loãng ở 4 nồng độ: 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, rút 50 µl huyền phù ở nồng độ 10<sup>-3</sup> và 10<sup>-4</sup> cho vào đĩa petri chứa môi trường ISP4. Đĩa được ủ từ 2 - 3 ngày, sau đó nhận dạng khuẩn lạc xạ khuẩn và tách rông bằng cách dùng đũa vi khuẩn đã khử trùng vớt khuẩn lạc đơn xạ khuẩn vạch lên đĩa chứa môi trường MS. Thực hiện cách cấy truyền đơn khuẩn lạc này cho đến khi nguồn được thuần thì đem đi trữ bằng cách dùng đũa cấy vi khuẩn đã khử trùng vớt một khuẩn lạc đơn và cấy vào ống nghiệm chứa môi trường MS đổ mặt nghiêng, khi khuẩn lạc được hình thành thì đem ống trữ ở 4 - 8°C.

### 2.2 Thu thập và phân lập nấm

#### *Phytophthora* sp. gây bệnh cháy lá, thối thân trên cây sen

Thu những cây sen có triệu chứng bệnh cháy lá thối thân ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Mẫu cây bệnh sau khi thu ở các ruộng được đặt trong các túi nilon riêng biệt ứng với mỗi ruộng, mẫu thu về phải phân lập ngay trong ngày hoặc 1 ngày sau đó.

#### 2.2.1 Thí nghiệm 1: Khảo sát khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Phytophthora* sp. gây bệnh cháy lá thối thân trên cây sen trong điều kiện phòng thí nghiệm

##### Bố trí thí nghiệm: gồm 2 thí nghiệm

– Thí nghiệm 1a: Thực hiện đánh giá nhanh khả năng đối kháng của 93 chủng xạ khuẩn đối với nấm *Phytophthora* sp. gây bệnh cháy lá – thối thân trên cây sen với 2 lần lặp lại. Sau đó, chọn ra những chủng xạ khuẩn thực sự có khả năng đối kháng với nấm gây bệnh cháy lá – thối thân trên cây sen bằng cách đo bán kính vòng vô khuẩn và tính hiệu suất đối kháng.

– Thí nghiệm 1b: Đánh giá khả năng đối kháng của chủng xạ khuẩn chọn lọc được từ thí nghiệm 1a với nấm *Phytophthora* sp. gây bệnh cháy lá – thối thân trên cây sen với 5 lần lặp lại, số nghiệm thức là số chủng xạ khuẩn thí nghiệm.

*Chuẩn bị nguồn xạ khuẩn:* nuôi xạ khuẩn trong ống nghiệm chứa môi trường MS khoảng 3 - 5

ngày. Sau đó, đổ 1 ml nước cất thanh trùng vào ống nghiệm tạo huyền phù xạ khuẩn, cho khoan giấy thấm ( $\phi = 5$  mm) vào ống nghiệm chứa huyền phù xạ khuẩn trong 1 phút, kẹp khoan giấy thấm đưa lên thành ống nghiệm và để khô nước khoảng 1 phút.

**Cách thực hiện:** Nấm *Phytophthora* sp. được nuôi trên đĩa petri chứa 10 ml môi trường PDA trong khoảng 7 ngày. Khi nấm phát triển được khoảng 7 - 10 ngày thì dùng dụng cụ đục lỗ đường kính 5 mm lấy khoan chuyên vào giữa đĩa petri chứa 10 ml môi trường PDA. Sau đó, khoan giấy thấm ( $\phi = 5$  mm) có xạ khuẩn được đặt đối diện với khoan nấm *Phytophthora* sp. và cách thành đĩa 1 cm. Đĩa Petri được đặt trong điều kiện nhiệt độ phòng và đánh giá khả năng đối kháng của xạ khuẩn với nấm bằng cách đo bán kính vòng vô khuẩn và tính hiệu suất đối kháng ở thời điểm 24, 36, 48 và 60 giờ sau khi cấy. Hiệu suất đối kháng được tính theo công thức (Moayedí và Mostowfizadeh-ghalamfasa, 2009):

$$\text{Hiệu suất đối kháng} = [(G1-G2)/G1] \times 100$$

Trong đó: (G1). Bán kính vùng sợi nấm ở nghiệm thức đối chứng

(G2). Bán kính vùng sợi nấm ở nghiệm thức có xạ khuẩn

#### 2.2.2 Thí nghiệm 2 Khảo sát khả năng phân giải $\beta$ -glucan của các chủng xạ khuẩn có triển vọng

**Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức là một chủng xạ khuẩn có triển vọng.

**Cách thực hiện:** Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Renwich *et al.*, 1991. Các chủng xạ khuẩn được cấy thành 3 điểm cách đều nhau trên đĩa petri chứa môi trường chứa cơ chế  $\beta$ -glucan. Các đĩa thí nghiệm được đặt ở điều kiện nhiệt độ phòng. Xác định hoạt tính enzyme  $\beta$ -glucanase ở từng thời điểm bằng cách tráng dịch Congo – red 0,6% trên đĩa thạch, đổ bỏ phần dung dịch Congo – red 0,6% thừa và tráng bề mặt agar với nước.

**Chỉ tiêu theo dõi:** Đo bán kính phân giải  $\beta$ -glucan (mm) là vùng không bắt màu thuốc nhuộm ở các thời điểm 10, 12 và 14 ngày sau khi cấy.

#### 2.2.3 Thí nghiệm 3 Khảo sát khả năng tiết siderophore của các chủng xạ khuẩn có triển vọng

**Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức là một chủng xạ khuẩn có triển vọng.

**Thực hiện thí nghiệm:** Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Pérez-Miranda *et al.*

(2007). Mỗi chủng xạ khuẩn được cấy thành 5 điểm/đĩa cách đều nhau trong đĩa petri chứa môi trường MS, giữ ở nhiệt độ 30°C trong 10 ngày. Sau đó đổ 10 ml môi trường O-CAS lên bề mặt môi trường đang nuôi xạ khuẩn sao cho ngập hết các khuẩn lạc xạ khuẩn.

#### 2.2.4 Chỉ tiêu theo dõi

Quan sát và ghi nhận sự thay đổi màu sắc của môi trường tại thời điểm đo chồng và sau 1 giờ.

**Xử lý số liệu:** các số liệu ghi nhận được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel và phân tích bằng phần mềm thống kê MSTATC qua phép thử DUNCAN.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Phytophthora* sp. gây bệnh cháy lá thối thân trên cây sen trong điều kiện phòng thí nghiệm

Qua thí nghiệm đánh giá nhanh khả năng đối kháng của 93 chủng xạ khuẩn đã chọn được 30 chủng xạ khuẩn biểu hiện khả năng đối kháng cao với nấm *Phytophthora* sp. Kết quả đánh giá khả năng đối kháng của 30 chủng xạ khuẩn đối với nấm *Phytophthora* sp. thông qua chỉ tiêu bán kính vòng vô khuẩn (Bảng 1) và hiệu suất đối kháng (Bảng 2).

#### 3.2 Bán kính vòng vô khuẩn (BKVVK)

Khả năng đối kháng của 30 chủng xạ khuẩn đối với nấm *Phytophthora* sp. thông qua bán kính vòng vô khuẩn được trình bày ở Bảng 1. Ở thời điểm 24 giờ sau khi cấy (GSKC), hầu hết các chủng xạ khuẩn thí nghiệm đều thể hiện khả năng đối kháng với nấm *Phytophthora* sp. ở nhiều mức độ khác nhau, trong đó chủng xạ khuẩn CM18 có BKVVK cao nhất là 18,25 mm và khác biệt có ý nghĩa so với các chủng xạ khuẩn còn lại, kể đến là 6 chủng xạ khuẩn HG3, BL4, HG4, BL6, TG1 và BL7 thể hiện khả năng đối kháng với BKVVK lần lượt là 16,5 mm; 16 mm; 15,5 mm; 14 mm; 14 mm; 12,75 mm. Ở 36 GSKC, BKVVK của các chủng xạ khuẩn thí nghiệm giảm dần. Tuy nhiên, các chủng xạ khuẩn CM18, HG3, HG4, TG1 và BL6 vẫn cho hiệu quả đối kháng cao thể hiện qua BKVVK từ 12,75 – 17,5 mm, trong đó chủng xạ khuẩn CM18 vẫn cho BKVVK cao nhất là 17,5 mm, cao hơn và khác có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn còn lại. Ở 48 GSKC, các chủng xạ khuẩn CM18, HG3, HG4, TG1 và BL6 vẫn cho hiệu quả đối kháng cao với BKVVK từ 11,5 – 17 mm. Trong đó, chủng xạ khuẩn CM18 vẫn cho BKVVK cao nhất là 17 mm, cao hơn và khác có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn còn lại. Đến thời điểm 60 GSKC, 5 chủng xạ khuẩn CM18,

HG3, HG4, TG1 và BL6 vẫn cho hiệu quả đối kháng với nấm *Phytophthora* sp.. Cao nhất là CM18 với BKVVK là 16,75 mm, tiếp theo là 4

chủng xạ khuẩn HG4, HG3, TG1 và BL6 với BKVVK lần lượt là 13 mm, 12,25 mm, 11,75 mm và 11,5 mm (Hình 1)

**Bảng 1: Bán kính vòng vô khuẩn (mm) của 30 chủng xạ khuẩn đối với nấm *Phytophthora* sp. gây hại trên cây sen qua các thời điểm**

STT	Xạ khuẩn	Bán kính (mm) vòng vô khuẩn ở các thời điểm khảo sát			
		24 GSKC	36 GSKC	48 GSKC	60 GSKC
1	CM18	18,25 a	17,50 a	17,00 a	16,75 a
2	HG3	16,50 b	15,00 b	12,75 bc	12,25 bc
3	BL6	14,00 c	12,75 cd	11,50 c	11,50 c
4	TG1	14,00 c	13,00 c	12,00 c	11,75 bc
5	VL6	10,25 fg	7,25 il	5,50 hm	5,00 gj
6	HG4	15,50 b	14,50 b	13,50 b	13,00 b
7	GH1	11,75 de	8,00 hj	6,25 gj	6,25 fg
8	DT4	10,75 ef	7,75 hk	6,75 fh	6,00 fh
9	BL2	12,50 d	7,00 im	4,50 lo	3,50 jl
10	DT9	8,00 hk	7,00 im	3,25 oq	2,25 ln
11	DT23	9,75 fh	8,25 hi	5,75 gl	5,50 fi
12	BL3	9,00 gj	7,00 im	4,25 mo	1,75 mn
13	DT14	8,00 ik	6,00 lm	1,50 r	0,75 n
14	DT22	12,00 de	10,00 fg	7,00 fg	5,75 fi
15	DT18	9,50 f-i	8,00 hj	6,50 gi	5,75 fi
16	HG1	9,25 gj	6,50 jm	4,75 kn	4,50 hk
17	BL1	4,00 l	3,00 n	1,75 r	1,50 mn
18	BL4	16,00 b	11,50 de	9,50 d	9,00 d
19	DT3	8,50 hk	7,25 il	5,00 jn	4,50 hk
20	DT2	7,75 jk	5,75 lm	4,25 mo	4,25 ik
21	DT13	12,50 d	9,25 gh	8,00 ef	7,00 ef
22	BL7	12,75 cd	11,00 ef	9,00 de	7,75 de
23	DT20	9,00 gj	6,25 km	2,25 qr	1,50 mn
24	VL5	9,00 gj	5,50 m	2,50 pr	1,00 mn
25	DT17	10,75 ef	8,00 hj	4,75 kn	3,25 kl
26	CM10	9,25 fj	5,50 m	2,50 pr	1,25 mn
27	DT6	7,50 k	5,75 lm	2,75 pr	1,50 mn
28	HG14	12,50 d	9,25 gh	6,00 gk	4,25 ik
29	DT5	10,00 fh	8,00 hj	5,25 im	3,75 jl
30	CM11	10,00 fh	6,25 km	3,75 np	2,50 lm
Mức ý nghĩa		*	*	*	*
CV (%)		8,3	10,71	14,07	17,77

Ghi chú: Các số trong cùng một cột được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% qua phép kiểm định Duncan. \*: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%

**3.3 Hiệu suất đối kháng (HSDK)**

Hiệu suất đối kháng (HSDK) của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Phytophthora* sp. được trình bày ở Bảng 2. Ở thời điểm 24 GSKC, các chủng xạ khuẩn có HSDK với nấm thể hiện ở nhiều mức độ khác nhau từ 7,69 – 80,77%, trong đó chủng xạ khuẩn CM18 có HSDK cao nhất là 80,77%, kế đến các chủng xạ khuẩn HG3, BL4, HG4, BL6, TG1 và BL7 có HSDK cao lần lượt là 71,79%; 69,23%; 66,67%; 58,97%; 58,97% và 52,56% và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn còn lại. Vào thời điểm 36 GSKC, HSDK của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Phytophthora* sp. trong

khoảng từ 43,7 – 86,67%. Trong đó, chủng xạ khuẩn CM18 có HSDK cao nhất (86,67%), kế đến 4 chủng xạ khuẩn HG3, HG4, TG1 và BL6 với HSDK lần lượt là 79,26 %, 77,78%, 73,33% và 72,59%, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại. Ở thời điểm 48 GSKC, tất cả các chủng xạ khuẩn thí nghiệm thể hiện HSDK cao hơn 50%, trong đó chủng xạ khuẩn CM18 vẫn duy trì khả năng đối kháng cao nhất với HSDK là 86,67%, kế đến 4 chủng xạ khuẩn HG3, HG4, TG1 và BL6 có HSDK lần lượt là 79,51%, 79,51%, 77,11% và 75,90%, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê

so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại. Đến thời điểm 60 GSKC, tất cả các chủng xạ khuẩn thể hiện HSĐK với nấm *Phytophthora* sp. trong khoảng từ 51,19 – 89,89%. Năm chủng xạ khuẩn CM18, HG3, HG4, TG1 và BL6 vẫn giữ được HSĐK ở mức cao hơn 70%. Trong đó, chủng xạ

khuẩn CM18 vẫn duy trì khả năng đối kháng cao nhất với HSDK là 89,89%. Kế đến, 4 chủng xạ khuẩn HG3, HG4, TG1 và BL6 có HSĐK lần lượt là 79,76%, 78,57%, 76,79% và 76,19%, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại.

**Bảng 2: Hiệu suất đối kháng (%) của 30 chủng xạ khuẩn với nấm *Phytophthora* sp. gây hại trên cây sen qua các thời điểm**

STT	Xạ khuẩn	Hiệu suất đối kháng (%) qua các thời điểm khảo sát			
		24 GSKC	36 GSKC	48 GSKC	60 GSKC
1	CM18	80,77 a	86,67 a	89,76a	89,89a
2	HG3	71,79 b	79,26 b	79,51 b	79,76 b
3	BL6	58,97 c	72,59 cd	75,90 c	76,19 b
4	TG1	58,97 c	73,33 c	77,11 bc	76,79 b
5	VL6	39,74 fg	56,30 il	61,45 fh	60,71 fh
6	HG4	66,67 b	77,78 b	79,51 b	78,57 b
7	GH1	47,44 de	58,52 hj	63,86 ef	64,29 ef
8	DT4	42,31 ef	57,78 hk	63,26 eg	63,10 ef
9	BL2	51,28 d	55,56 il	59,64 gj	58,33 gh
10	DT9	30,77 hk	55,56 il	54,82 km	52,97 jk
11	DT23	37,18 fh	59,26 hi	60,85 fi	60,71 fh
12	BL3	33,33 gj	55,56 il	57,23 ik	54,17 ij
13	DT14	28,21 ik	52,59 l	52,41 lm	51,78 jk
14	DT22	48,72 de	64,44 fg	64,46 ef	63,69 ef
15	DT18	35,90 fi	58,52 hj	63,26 eg	61,90 fg
16	HG1	34,61 fi	54,08 jl	58,44 hij	58,33 gh
17	BL1	7,69 l	43,70 m	51,81 m	52,38 jk
18	BL4	69,23 b	68,89 de	72,28 d	71,43 c
19	DT3	30,77 hk	56,30 il	59,04 hj	58,33 gh
20	DT2	24,36 k	51,85 l	57,23 ik	57,74 hi
21	DT13	51,28 d	62,22 gh	66,27 e	66,67 de
22	BL7	52,56 cd	67,41 ef	71,08 d	68,46 cd
23	DT20	33,33 gj	53,33 kl	52,41 lm	51,19 jk
24	VL5	32,05 gj	52,59 l	53,01 lm	50,00 k
25	DT17	42,31 ef	58,52 hij	60,85 fi	57,74 hi
26	CM10	34,61 fi	51,85 l	54,22 km	50,60 jk
27	DT6	25,64 jk	51,85 l	53,62 km	51,19 jk
28	HG14	51,28 d	62,22 gh	61,45 fh	57,74 hi
29	DT5	38,46 fh	58,52 hj	61,45 fh	58,93 gh
30	CM11	38,46 fh	53,33 kl	56,03 jkl	53,57 jk
Mức ý nghĩa		*	*	*	*
CV (%)		11,11	4,54	3,65	3,91

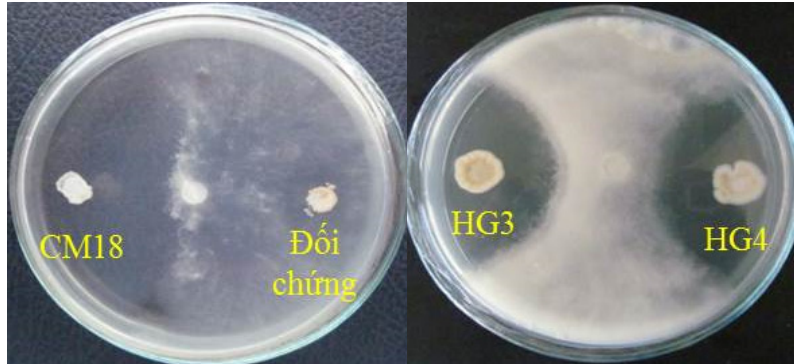
Ghi chú: Các số trong cùng một cột được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% qua phép kiểm định Duncan. \*: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%

Kết quả Bảng 1 và Bảng 2 cho thấy, 5 chủng xạ khuẩn CM18, HG3, HG4, TG1 và BL6 luôn thể hiện khả năng đối kháng cao với nấm *Phytophthora* sp. qua các thời khảo sát và duy trì đến thời điểm 60 giờ sau khi cấy. Kết quả này cho thấy, có thể 5 chủng xạ khuẩn này thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Phytophthora* sp. bằng nhiều cơ chế khác nhau. Theo ghi nhận của Phạm Văn Kim (2006), xạ khuẩn có khả năng tiết kháng sinh để tiêu diệt mầm bệnh hoặc hạn chế

sự phát triển của mầm bệnh bằng cơ chế cạnh tranh dinh dưỡng. Sự cạnh tranh này có thể diễn ra theo nhiều cách như gây ra những biến đổi bất thường trong sự hình thành bào tử, làm trương phồng sợi nấm, phá hủy hoặc làm hư hại các cấu trúc của sợi nấm hay tiết ra các enzyme phân hủy sợi nấm (Upadhyay và Jayaswa, 1992). Bên cạnh đó, các chủng *Streptomyces* spp. còn cho thấy khả năng của chúng trong việc tiết ra enzyme phân hủy vách tế bào nấm gây bệnh như protease, chitinase, cellulase (Jadarat *et al.*, 2008; Vasconcellos và

Cardoso, 2009) hoặc tiết kháng sinh (Shimizu *et al.*, 2009). Theo một số nghiên cứu, chẳng hạn như Huỳnh Văn An (2011) cho rằng, xạ khuẩn có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Phytophthora capsici* gây bệnh thối trái dưa hấu trong điều kiện *in vitro*. Bên cạnh đó, chủng *Streptomyces halstedii* AJ-7 còn được đánh giá có khả năng kiểm soát nấm

*Phytophthora capsici*, gây bệnh trên cây ớt đỏ (Joo, 2005). Theo Valois *et al.* (1996), *Streptomyces* sp. chủng 5406 có khả năng làm giảm thiệt hại của nấm *Phytophthora* và *Pythium* trên cây họ đậu. Xạ khuẩn *Streptomyces rochi* có khả năng đối kháng với nấm *P. capsici* gây bệnh thối rễ trên ớt với hiệu quả giảm bệnh đến 78,9% (Ezziymani *et al.*, 2007).



**Hình 1:** Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn CM18, HG4, HG3, đối với sự phát triển của khuẩn ty nấm *Phytophthora* sp. trong điều kiện phòng thí nghiệm ở thời điểm 60 GSKC

**3.4 Khả năng tiết enzyme  $\beta$ -glucanase phân giải  $\beta$ -glucan của các chủng xạ khuẩn có triển vọng**

Khả năng phân giải  $\beta$ -glucan của các chủng xạ khuẩn được trình bày ở Bảng 3. Kết quả ghi nhận được cả 5 chủng xạ khuẩn đều có khả năng tiết enzyme  $\beta$ -glucanase phân giải  $\beta$ -glucan. Vào thời điểm 10 ngày sau khi cấy (NSKC) chủng xạ khuẩn CM18 có bán kính vòng phân giải lớn nhất là 7,56 mm, kế đến chủng xạ khuẩn HG3 với bán kính vòng phân giải là 6,50 mm, cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại. Đến thời điểm 12 NSKC, bán kính vòng phân giải của 5 chủng xạ khuẩn đều tăng, trong đó 2 chủng CM18 và HG3 có bán kính vòng phân giải lớn nhất lần lượt là 9,37 mm và 8,81 mm, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại. Ở thời điểm 14 NSKC, chủng CM18 có bán kính vòng phân giải cao nhất là 10,81 mm, kế đến chủng xạ khuẩn HG3 với bán kính vòng phân giải là 9,31 mm, cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại (Hình 2).

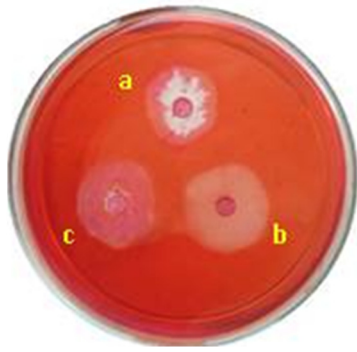
Như vậy, cả 5 chủng xạ khuẩn thí nghiệm đều có khả năng tiết enzyme  $\beta$ -glucanase phân giải  $\beta$ -glucan với nhiều mức độ khác nhau, trong đó chủng CM18 thể hiện khả năng phân giải cao và bền đến thời điểm 14 ngày sau khi cấy. Kết quả thí nghiệm trên cho thấy các chủng xạ khuẩn này thể hiện khả năng đối kháng với nấm *Phytophthora* sp. có thể liên quan đến cơ chế phân giải  $\beta$ -glucan làm phá vỡ vách tế bào của nấm gây bệnh, từ đó ức chế sự sinh trưởng và phát triển của nấm gây bệnh cháy lá, thối thân trên cây sen. Kết quả này cũng được

ghi nhận tương tự bởi Võ Kim Phương (2014), cho rằng 5 chủng xạ khuẩn GCT.TG9, NCT.TG3, NCT.TG4, NCT.TG10 và NCT.TG18 đều có khả năng phân giải  $\beta$ -glucan, trong đó chủng GCT.TG9 có khả năng phân giải  $\beta$ -glucan tốt nhất. Theo Gopalakrishnan *et al.* (2013) 5 chủng xạ khuẩn *Streptomyces* (CAI-24, CAI-121, CAI-127, KAI-32 và KAI-90) có khả năng đối kháng cao với nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* và đều có khả năng sản xuất  $\beta$ -1,3-glucanase. 4/6 chủng *Streptomyces* (CAI-13, CAI-85, CAI-140 và CAI-155) có khả năng thúc đẩy tăng trưởng thực vật gián tiếp bằng cách đối kháng với tác nhân gây bệnh thông qua sản xuất  $\beta$ -1,3-glucanase (Gopalakrishnan *et al.*, 2014).

**Bảng 3:** Bán kính phân giải  $\beta$ -glucan ở các thời điểm 10, 12 và 14 ngày sau thí nghiệm của các chủng xạ khuẩn có triển vọng

Chủng xạ khuẩn	Bán kính (mm) vòng phân giải $\beta$ -glucan		
	10 ngày	12 ngày	14 ngày
BL6	4,93 c	5,37 cd	6,43 cd
CM18	7,56 a	9,37 a	10,81 a
TG1	3,93 d	5,93 bc	6,62 cd
HG3	6,50 b	8,81 a	9,31 b
HG4	4,37 cd	6,37 b	7,12 c
Mức ý nghĩa	*	*	*
CV (%)	11,02	7,14	5,94

Ghi chú: Các số trong cùng một cột được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% qua phép kiểm định Duncan. \*: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%



**Hình 2: Khả năng phân giải  $\beta$ -glucan ở thời điểm 14 ngày sau khi cấy của các chủng xạ khuẩn có triển vọng (a: chủng HG3, b: chủng CM18, c: chủng HG4)**

**3.5 Khả năng tiết siderophore của các chủng xạ khuẩn có triển vọng**

Khả năng tiết siderophore của các chủng xạ khuẩn được biểu hiện qua sự thay đổi màu sắc trên môi trường đồ chông O-CAS được trình bày ở Bảng 4. Kết quả cho thấy, 5 chủng xạ khuẩn thí nghiệm đều có khả năng chuyển môi trường từ màu xanh sang màu cam là siderophore dạng hydroxamates (Hình 3).

**Bảng 4: Khả năng tiết siderophore của các chủng xạ khuẩn có triển vọng**

Các chủng xạ khuẩn	Màu sắc thay đổi	Dạng siderophore
BL6	Cam	Hydroxamates
CM18	Cam	Hydroxamates
TG1	Cam	Hydroxamates
HG3	Cam	Hydroxamates
HG4	Cam	Hydroxamates



**Hình 3: Dạng siderophore của 5 chủng xạ khuẩn có triển vọng trên môi trường đồ chông O-CAS**

Siderophore là hợp chất sản xuất bởi nấm và vi khuẩn, liên kết với các ion  $Fe^{3+}$  được vận chuyển vào trong tế bào (Macagnan *et al.*, 2008). Việc sản

xuất siderophores được thực hiện bởi các tác nhân kiểm soát sinh học với số lượng đủ để có thể hạn chế  $Fe^{3+}$  sẵn có đối với các tác nhân gây bệnh (Glick và Bashan, 1997). Gopalakrishnan *et al.* (2011) đã ghi nhận 5 chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng cao với *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* và đều có khả năng sản xuất siderophore dạng hydroxamates. Bên cạnh đó, Nguyễn Thị Vàng (2013) cho biết 5 chủng *Bacillus* phân lập trên lúa tại huyện Châu Thành và Phụng Hiệp, tỉnh Hậu Giang có khả năng đối kháng mạnh với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* và đều có khả năng tiết siderophore dạng hydroxamates. Như vậy, cả 5 chủng xạ khuẩn triển vọng đều có khả năng tiết siderophore dạng hydroxamates, do đó đây có thể là yếu tố giúp các chủng xạ khuẩn kiểm soát bệnh.

**4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT**

- 5 chủng xạ khuẩn CM18, HG3, HG4, TG1 và BL6 luôn thể hiện khả năng đối kháng cao với nấm *Phytophthora* sp., trong đó chủng CM18 thể hiện khả năng đối kháng cao nhất đến thời điểm 60 giờ sau khi cấy.
- Cả 5 chủng xạ khuẩn có triển vọng đều có khả năng tiết enzyme phân giải  $\beta$ -glucan, trong đó chủng CM18 có khả năng phân giải cao nhất.
- Cả 5 chủng xạ khuẩn có triển vọng đều có khả năng tiết siderophore dạng Hydroxamates.
- Đề nghị khảo sát khả năng quản lý bệnh cháy lá – thối thân trên cây sen của chủng xạ khuẩn CM18 trong điều kiện nhà lưới

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Babadoost, M. (2001). Phytophthora blight of cucurbits. University of Illinois Extension.

Bogumił, A., L. Sas Paszt, A. Lisek, P. Trzciński and H. Harbuzov (2013). Identification of new Trichoderma strains with antagonistic activity against Botrytis cinerea. Folia Horticulturae, Volume 25, Issue 2, 123–132.

Ezziyyani M., Requena M. E., Egea-Gilbert C. and Candela M. E. (2007). Biological Control of Phytophthora Root Rot of Pepper Using Trichoderma harzianum and Streptomyces rochei in Combination. Journal Phytophthora 155: 342-349.

Glick, B.R. and Y. Bashan (1997). Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. Biotechnology Advances, Vol. 15, No. 2, 353-378.

Gopalakrishnan, S., S. Pande, M. Sharma, P. Humayun, B.K. Kiran, D. Sandeep, M.S. Vidya, K. Deepthi and O. Rupela (2011). Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of Fusarium wilt of chickpea. Crop Protection 30: 1070- 1078.

- Gopalakrishnan, S., S. Vadlamudi, M.S. Vidya and A. Rathore (2013). Plant growth-promoting activities of *Streptomyces* spp. in sorghum and rice. *Gopalakrishnan et al. SpringerPlus*, 2:574.
- Gopalakrishnan, S., S. Vadlamudi, P. Bandikinda, A. Sathya, R. Vijayab-harathi, O. Rupela, B. Kudapa, K. Katta, R.K. Varshney (2014). Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Micro-biol Res* 169:40-48.
- Gusmini G., R. Song and Wehner T.C.(2005). New sources of resistance to gummy stem blight in watermelon. *Crop Science* 45: 582 – 588.
- Huỳnh Văn An (2011). Phòng trừ sinh học bệnh thối trái dưa hấu (*Phytophthora capsici*) bằng xạ khuẩn trong điều kiện phòng thí nghiệm. Luận văn tốt nghiệp kỹ sư Bảo vệ thực vật. Bộ môn Bảo vệ Thực vật. Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng. Trường Đại học Cần Thơ.
- Jaradat Z., A. Dawagreh, Q. Ababneh and I. Saadoun (2008). Influence of Culture Conditions on Cellulase Production by *Streptomyces* sp. (strain J2). *Jordan Journal of Biological Sciences* 1(4), pp 141-146.
- Joo, G. J. (2005). Production of an anti-fungal substance for biological control of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight in red-peppers *Streptomyces halstedii*. *Biotechnology Letter* 27, 201-205.
- Macagnan, S., R. S. Romeiro, A. W. V. Pomella and J. T. Souza (2008). Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora* (ex *Crinipellis*) *perniciosa* by phylloplane actinomycetes. *Biological Control* 47, 309-314.
- Moayedi G. and Mostowfizadeh-ghalamfarsa R (2009). Antagonistic Activities of *Trichoderma* spp. on *Phytophthora* Root Rot of Sugar Beet, *Iran Agricultural Research* 28(2) 21-38.
- Nguyễn Phước Tuyên (2008). Kỹ thuật trồng sen. NXB Nông nghiệp thành phố Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Thị Vàng (2013). Đánh giá khả năng đối kháng của các chủng *Bacillus* phân lập trên lúa tại huyện Châu Thành và Phụng Hiệp (Hậu Giang) với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* và khảo sát một số cơ chế có liên quan. Luận văn thạc sĩ ngành Bảo vệ thực vật. Đại học Cần Thơ.
- Phạm Văn Kim (2000). Các nguyên lý về bệnh hại cây trồng. Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.
- Phạm Văn Kim (2006). Giáo trình vi sinh vật và sự chuyên hóa vật chất trong đất. Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.
- Pérez-Miranda, S., N. Cabiros, R. George-Téllez, L.S. Zamudio-Rivera and F.J. Fernández (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods* 70: 127-131.
- Renwick A., R. Campbel and S. Coe. (1991). Assessment of invitro screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology*, 40: 524-532.
- Shimizu, M., Yazawa, S., Ushijima, Y. (2008). A promising strain of endophytic *Streptomyces* sp. for biological control of cucumber anthracnose. *J Gen Plant Pathol* 75:27 – 36.
- Upadhyay R. S., and R. K. Jayaswal (1992). *Pseudomonas cepacia* causes mycelial deformities and inhibition of conidiation in phytopathogenic fungi. *Current Microbiology* 24(4), 181 – 187.
- Võ Kim Phương (2014). Định danh và khảo sát một số cơ chế đối kháng của nấm chủng xạ khuẩn có khả năng quản lý bệnh thán thư hại gấc (*Momordica cochinchinensis*). Luận văn tốt nghiệp cao học, ngành Bảo vệ Thực vật, Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, trường Đại học Cần Thơ.
- Vasconcellos R. L. F. and E. J. B. N Cardoso (2009). Rhizospheric *Streptomyces* as potential biocontrol agents of *Fusarium* and *Armillaria* pine rot and as PGPR for *Pinus taeda*. *Biocontrol* 54(6), 807-816.
- Valois D., Fayad K., Barasubiye T., Garon M., Delry C., Brzezinski R. and Beaulieu C. (1996). Glucanolytic *Actinomycetes* Antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the Causal Agent of Raspberry Root Rot. *Applied and Environment Microbiology* 62(5): 1630-1635.