

## **TUYỂN CHỌN VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ĐỐI KHÁNG CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN *Streptomyces* sp. VNUA24 VỚI NẤM *Alternaria alternata* HẠI THỰC VẬT**

**Đặng Thị Thanh Tâm, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Vũ Phương Thảo, Nguyễn Văn Giang\***

*Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

\*Tác giả liên hệ: [nvgiang@vnua.edu.vn](mailto:nvgiang@vnua.edu.vn)

Ngày nhận bài: 05.12.2025

Ngày chấp nhận đăng: 04.01.2026

### **TÓM TẮT**

Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích sàng lọc và đánh giá khả năng kháng nấm *A. alternata* của chủng xạ khuẩn. Khả năng đối kháng nấm *A. alternata* của chủng xạ khuẩn được tuyển chọn và đánh giá thông qua các phương pháp như đồng nuôi cấy, khảo sát khả năng đối kháng bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch và sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử để xác định, nhận diện các gen liên quan tới tổng hợp các hoạt chất có hoạt tính sinh học của chủng xạ khuẩn được tuyển chọn. Kết quả thí nghiệm cho thấy, khi đồng nuôi cấy trên môi trường PDA, từ 56 chủng xạ khuẩn nghiên cứu đã sàng lọc được 09 chủng có hoạt tính đối kháng với nấm *A. alternata*. Đặc biệt, trong đó chủng *Streptomyces* sp. VNUA24 biểu hiện hoạt tính kháng nấm *A. alternata* mạnh nhất với tỷ lệ phần trăm đối kháng là  $77,62 \pm 2,63\%$  sau 12 ngày đồng nuôi cấy. Dịch nuôi 7 ngày của chủng xạ khuẩn VNUA24 trên môi trường Gause I không thể hiện được hoạt tính đối kháng với nấm *A. alternata*, tuy nhiên, các hợp chất hữu cơ bay hơi từ chủng *Streptomyces* sp. VNUA24 đã tác động đến *A. alternata*, biểu hiện sự ức chế với hoạt tính đối kháng đạt 23,13% sau 7 ngày nuôi cấy. Bên cạnh đó, bằng phương pháp PCR, nghiên cứu đã phát hiện được sự có mặt của 5 trên 8 gen liên quan đến quá trình tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học thuộc các nhóm gene PKS-I, PKS-II và NRPS. Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng *Streptomyces* sp. VNUA24 là chủng tiềm năng cho định hướng phát triển chế phẩm phòng trừ bệnh do nấm *A. alternata* gây ra ở cây trồng.

Từ khoá: Chủng xạ khuẩn, nấm gây bệnh hại thực vật, các hoạt chất sinh học.

### **Screening *Streptomyces* sp. Strains for Antagonistic Activity against Phytopathogenic *Alternaria alternata***

### **ABSTRACT**

This study was conducted with the aim of screening and evaluating the antifungal activity against *Alternaria alternata* of potential native actinomycete genetic resources. The antagonistic activity of actinomycetes strains against *A. alternata* was evaluated through methods such as co-cultivation, agar diffusion analysis, and molecular techniques to identify genes involved in the synthesis of bioactive compounds in the selected actinomycete strains. Experimental results showed that, using co-cultivation on PDA medium, nine strains with antagonistic activity against *A. alternata* were screened from 56 actinomycete strains. Notably, *Streptomyces* sp. VNUA24 showed the strongest antifungal effect, with an inhibition percentage of  $77.62 \pm 2.63\%$  after 12 days of co-cultivation. The 7-day culture filtrate of the strain VNUA24 grown in Gause I medium did not display any antagonistic activity against *A. alternata*. Interestingly, evaluation of the volatile organic compounds produced by *Streptomyces* sp. VNUA24 revealed inhibitory effects, resulting in an antagonistic activity of 23.13% after 7 days of incubation. The PCR analysis detected the presence of 5 out of 8 biosynthetic genes associated with the production of bioactive metabolites belonging to the PKS-I, PKS-II, and NRPS gene clusters. Overall, the findings indicate that *Streptomyces* sp. VNUA24 is a promising candidate for the development of biocontrol products in managing crop diseases caused by *A. alternata*.

Keywords: *Streptomyces* spp., pathogenic fungi, biological active compounds.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong chi nấm *Alternaria*, *A. alternata* được coi là loài sản sinh độc tố nấm phổ biến nhất trong các sản phẩm nông sản (Paster & Barkai-Golan, 2008). Hơn thế nữa, khoảng 400 loài thực vật phân bố trên toàn thế giới đã được báo cáo là dễ bị lây nhiễm với *Alternaria* spp., trong đó *A. alternata* có khả năng lây nhiễm gây hại cho một phần tư các loài thực vật (hơn 100 loài) bao gồm cây ngũ cốc, rau, cây ăn quả, cây cảnh và các loại cây công nghiệp (Zhang & cs., 2023; Miranda-Apodaca & cs., 2023). Triệu chứng bệnh thường gặp do loại nấm này gây lên là đốm dạng vòng trên lá hoặc bất định màu nâu đen, thối thân, thối hoặc mốc lõi quả, tổn thương sau thu hoạch. Thiệt hại kinh tế do *A. alternata* gây ra không chỉ đến từ việc giảm năng suất mà còn giảm giá trị thương phẩm. Tại Việt Nam, *A. alternata* đã được công bố gây bệnh đốm lá trên bắp cải, dưa leo, nha đam, và thối thân trên cây thanh long (Nguyễn Xuân Trường & cs., 2024; Nguyễn Thị Liên & cs., 2024; Hồ Thị Cẩm Nguyên & cs., 2024; Đỗ Quang Trung & cs., 2021). Trong những năm gần đây, *A. alternata* được xem là một trong những tác nhân gây bệnh nghiêm trọng đối với nhiều loại cây trồng làm vườn trên thế giới.

Để kiểm soát *A. alternata*, nhiều biện pháp đã được áp dụng theo hướng quản lý tổng hợp. Trong đó, biện pháp hóa học vẫn được áp dụng phổ biến, đặc biệt khi bệnh xuất hiện ở mức độ nặng. Các nhóm hoạt chất như dithiocarbamate (mancozeb), triazole (difenoconazole), strobilurin (azoxystrobin, pyraclostrobin) được ghi nhận có hiệu lực trong nhiều nghiên cứu gần đây. Tuy nhiên, do hiện tượng kháng thuốc đã xuất hiện tại nhiều quốc gia và các vấn đề về môi trường, sức khỏe luôn là hạn chế lớn nhất trong việc sử dụng thuốc hóa học trong phòng trừ bệnh (Bai & cs., 2025; Liu & cs., 2025). Do đó, kiểm soát sinh học đã thu hút sự quan tâm nghiên cứu sâu rộng trong việc quản lý bền vững các bệnh nấm thực vật. Nền tảng cho kiểm soát sinh học để ngăn chặn bệnh thực vật là sử dụng các sinh vật sống đối kháng để tiêu diệt mầm bệnh thực vật (Coakley & cs., 1999). Xạ

khuẩn đặc biệt là các loài trong chi *Streptomyces* phát triển mạnh trong đất được xem là tác nhân kiểm soát sinh học với nhiều cơ chế. Nghiên cứu gần đây đã cho thấy các loài trong chi *Streptomyces* kiểm soát sinh học nấm *A. alternata* bằng cách ức chế mạnh sự phát triển hệ sợi của nấm thông qua cơ chế tiết enzyme phân giải thành tế bào và cạnh tranh dinh dưỡng (Cai & cs., 2023). Bên cạnh đó, hợp chất hữu cơ bay hơi (volatile organic compounds - VOCs) do xạ khuẩn sinh ra, như geosmin và ahermin được chứng minh có khả năng kìm hãm sự nảy mầm của bào tử và làm biến dạng hệ sợi của *A. alternata* (Ghanem & cs., 2022; Pipponzi & cs., 2025). Đặc biệt, các cụm gen sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp thuộc nhóm polyketide synthase (PKS) và nonribosomal peptide synthetase (NRPS) của *Streptomyces* mã hóa nhiều hợp chất có hoạt tính kháng nấm mạnh, trong đó có hoạt chất ức chế, tiêu diệt nấm *A. alternata* (Evangelista-Martínez & cs., 2020; Komaki & Tamura, 2023). Tại Việt Nam hiện chưa có nhiều công bố về việc sàng lọc và khai thác nguồn xạ khuẩn bản địa có khả năng đối kháng *A. alternata*, nên đây là hướng nghiên cứu mới, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn đáp ứng nhu cầu phát triển chế phẩm sinh học trong phòng trừ bệnh hại do loại nấm này gây lên ngày càng tăng.

Nghiên cứu này tập trung khai thác nguồn gen xạ khuẩn bản địa trong bộ sưu tập chủng giống xạ khuẩn tiềm năng, tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng mạnh với nấm *A. alternata*. Từ đó, nghiên cứu một số đặc tính đối kháng và nhận biết một số gen sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp thuộc nhóm PKS và NRPS của chủng xạ khuẩn tuyển chọn. Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học quan trọng cho nghiên cứu phát triển các chế phẩm sinh học hiệu quả trong phòng trừ bệnh do nấm *A. alternata* ở cây trồng.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Tổng số 56 chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. đã được định danh thuộc bộ sưu tập chủng giống xạ khuẩn và chủng nấm bệnh *A. alternata*

gây bệnh đốm lá trên cây trồng được bảo quản lưu giữ tại Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Sàng lọc các chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng nấm *Alternaria alternata*

Các chủng xạ khuẩn được đánh giá hoạt tính đối kháng nấm *A. alternata* bằng phương pháp đồng nuôi cấy (Dhanasekaran & cs., 2012) trên môi trường PDA. Đối với chủng nấm kiểm định, thực hiện đặt khối thạch chứa nấm (đường kính 5mm) vào giữa trung tâm đĩa thạch. Mỗi chủng xạ khuẩn sau khi hoạt hoá, được cấy chuyển nuôi trên môi trường Gause I sau 5 đến 7 ngày. Lấy dụng cụ chuyên dụng đục 4 khối thạch chứa xạ khuẩn (đường kính 5mm) và đặt vào 4 giếng thạch đã chuẩn bị trên đĩa đã cấy chủng nấm kiểm định. Khoảng cách giữa chủng nấm kiểm định và chủng xạ khuẩn là 20mm. Công thức đối chứng không chứa chủng xạ khuẩn. Các đĩa thí nghiệm được nuôi ở điều kiện 30°C trong tủ nuôi. Khả năng đối kháng nấm *A. alternata* của các chủng xạ khuẩn được đánh giá sau 12 ngày nuôi ủ.

Hoạt tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn được đánh giá bằng cách đo đường kính phát triển của tản nấm trên đĩa đối chứng và đĩa thí nghiệm bằng phần mềm ImageJ và tính tỷ lệ phần trăm ức chế theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ phần trăm ức chế} = (D_0 - D_{TN})/D_0 \times 100$$

Trong đó:  $D_0$ : đường kính tản nấm trong đĩa đối chứng;  $D_{TN}$ : đường kính tản nấm trong đĩa thí nghiệm

### 2.2.2. Đánh giá ảnh hưởng của dịch nuôi chủng xạ khuẩn tuyển chọn đến sự phát triển của nấm

Hoạt tính đối kháng nấm của dịch nuôi các chủng xạ khuẩn tuyển chọn được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch (Dhanasekaran & cs., 2012). Xạ khuẩn được nuôi trong môi trường Gause I lỏng, lắc 180 vòng/phút trong 7 ngày ở 30°C. Dịch nuôi được thu bằng cách ly tâm 10.000 vòng/phút

trong 20 phút và lọc dịch nổi qua màng lọc 0,22 $\mu$ m. Chuẩn bị bốn giếng thạch ở bốn góc của đĩa thạch PDA, cách trung tâm đĩa 20mm, bằng cách sử dụng dụng cụ chuyên dụng và nhỏ 100 $\mu$ l dịch nuôi xạ khuẩn vào mỗi giếng thạch ở đĩa thí nghiệm. Dịch nuôi được thay thế bằng nước vô trùng ở mẫu đối chứng. Các đĩa được đặt trong tủ lạnh ở 4°C trong 6 giờ để các chất có hoạt tính sinh học khuếch tán hết vào môi trường. Sau đó đặt khối thạch chứa chủng nấm (kích thước 5mm) cần được kiểm định vào trung tâm của các đĩa thạch này. Các đĩa sau khi cấy nấm được đặt trong tủ nuôi ở nhiệt độ 30°C và nuôi trong 5 ngày.

Hoạt tính kháng nấm của dịch nuôi chủng xạ khuẩn được đánh giá như mô tả tại mục 2.2.1

### 2.2.3. Đánh giá ảnh hưởng các hợp chất hữu cơ bay hơi từ chủng xạ khuẩn tuyển chọn đến sự phát triển của nấm *Alternaria alternata*

Ảnh hưởng của hợp chất hữu cơ bay hơi (VOC) của chủng xạ khuẩn tuyển chọn đến sự phát triển của nấm *Alternaria alternata* được thực hiện theo phương pháp đĩa đôi (double-disk chamber) theo Arrebola & cs. (2010) và Ayed & cs. (2021) có sửa đổi: Chủng xạ khuẩn tuyển chọn được nuôi trên môi trường Gause I bằng cách đặt khối thạch (kích thước 5mm) chứa khuẩn lạc vào 5 vị trí trên đĩa môi trường, nuôi ở 30°C trong 2 ngày. Nấm *Alternaria alternata* được cấy bằng cách đặt khối thạch chứa nấm (kích thước 5mm) vào trung tâm đĩa môi trường PDA. Lượng môi trường là giống nhau giữa các đĩa. Cấu trúc của buồng nuôi đôi: Các chủng xạ khuẩn và chủng nấm được nuôi trên hai đĩa petri khác nhau. Sau hai ngày nuôi, đĩa petri nuôi chủng xạ khuẩn được úp chồng lên trên đĩa petri nuôi chủng nấm để tạo thành buồng đĩa đôi, và gắn kín bằng parafilm. Ở đối chứng, đĩa phía trên không chứa xạ khuẩn. Hoạt tính kháng nấm được đánh giá sau 7 và 12 ngày.

Hoạt tính kháng nấm của hợp chất VOC từ chủng xạ khuẩn được đánh giá như mô tả tại mục 2.2.1

#### **2.2.4. Nhận dạng sự có mặt của của các gen liên quan đến quá trình tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học**

##### **a. Tách chiết DNA tổng số**

Sinh khối xạ khuẩn được chuẩn bị cách: Tiến hành lấy 50mg đến 100mg sinh khối xạ khuẩn trên đĩa pettri sau 3 đến 5 ngày nuôi ủ vào vào ống ly tâm 2ml bằng cách dùng que cấy đã khử trùng gạt lấy sinh khối trên bề mặt khuẩn lạc xạ khuẩn. DNA tổng số của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA24 được tách theo phương pháp của Masoomi-Aladizgeh & cs. (2016) có thay đổi: bổ sung (Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol) (25:24:1) vào trước khi sử dụng (Chloroform : Isoamyl alcohol) (24:1). Nồng độ, tính nguyên vẹn và độ tinh sạch của DNA tổng số được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% và máy đo quang phổ trước khi tiến hành phản ứng PCR (Masoomi-Aladizgeh & cs., 2016).

##### **b. Khuếch đại các gen liên quan đến quá trình tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học bằng phản ứng PCR**

Các vùng được bảo tồn trong PKS-I ketosynthase (KS), PKS-II ketosynthase alpha (KS $\alpha$ ) và ketosynthase beta (KS $\beta$ ), NRPS adenylation (AD) đã được chọn để nhận dạng sự có mặt của các gen liên quan đến quá trình tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học từ chủng xạ khuẩn (Qi & cs., 2019, Tenebro & cs., 2021; Bundale & cs., 2014).

Khuếch đại các gen sinh tổng hợp PKS loại 1 (PKSI) sử dụng 3 cặp mồi KS-F/ KS-R (KS-F: 5' CCSCAGSAGCGCSTSYTSCTSGA 3'; KS-R: 5' GTSCCSGTSCCGTGSYSTCSA 3'); KSMA-F/ KSMA-R (KSMA-F: 5' TSGCSATGGACCCS CAGCAG 3'; KSMA-R: 5' CCSGTSCCGTGSGC CTCSAC 3') ; K1-F/ M6-R (K1-F: 5' TSAAGTC SAACATCGGBCA 3'; M6-R: 5' CGCAGGTT SCSGTACCAGTA 3'). Chu trình nhiệt cho các phản ứng PCR với 3 cặp mồi: biến tính chu kỳ ban đầu 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 34 chu kỳ ở 95°C trong 1 phút, 45 giây ở 58°C đối với cặp mồi KS-F/KS-R; KSMA-F/ KSMA-R và ở 53°C đối với cặp mồi K1-F/ M6-R, sau đó là giai

đoạn kéo dài mạch ở 72°C trong 1 phút 30 giây và ổn định mạch ở 72°C trong 10 phút. Kích thước vùng gen PKS I được khuếch đại bởi các cặp mồi này lần lượt khoảng 670bp; 700bp và 1.200-1.400bp.

Khuếch đại các gen sinh tổng hợp PKS loại 2 (PKSII) sử dụng 4 cặp mồi KS $\alpha$ / KS $\beta$  (KS $\alpha$ : TSGRCTACRTCAACGSCACGG 3'; KS $\beta$ : 5' TACSAGTCSWTCGCCTGGTTC 3'), KS1-F/ KS1-R (KS1-F: 5' TSGCSTGCTTGAYG CSATC 3'; KS1-R: 5' TGGAAN CCGCCGAABCCTCT 3'), 540-F/ 1100-R (540-F: 5' GGITGCACSTCIGGIMTSGAC 3'; 1100-R: 5' CCGATSGCICCSAGIGAGTG 3'), KS $\alpha$  (KS $\alpha$ F: 5' GATGGTCTCCACCGGCTGC 3'; KS $\alpha$ R: 5' GTCTCGTGGCGGTCGTTCTGC 3'). Chu trình nhiệt cho các phản ứng PCR với 4 cặp mồi: biến tính chu kỳ ban đầu 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 34 chu kỳ ở 95°C trong 1 phút, 45 giây ở 58°C đối với cặp mồi KS $\alpha$ / KS $\beta$ , KS1-F/ KS1-R, 540-F/1100-R, KS $\alpha$  sau đó là giai đoạn kéo dài mạch ở 72°C trong 1 phút 30 giây và ổn định mạch ở 72°C trong 10 phút. Kích thước vùng gen PKSII được khuếch đại bởi các cặp mồi này lần lượt khoảng 800-900bp; 613bp; 554bp và 470bp.

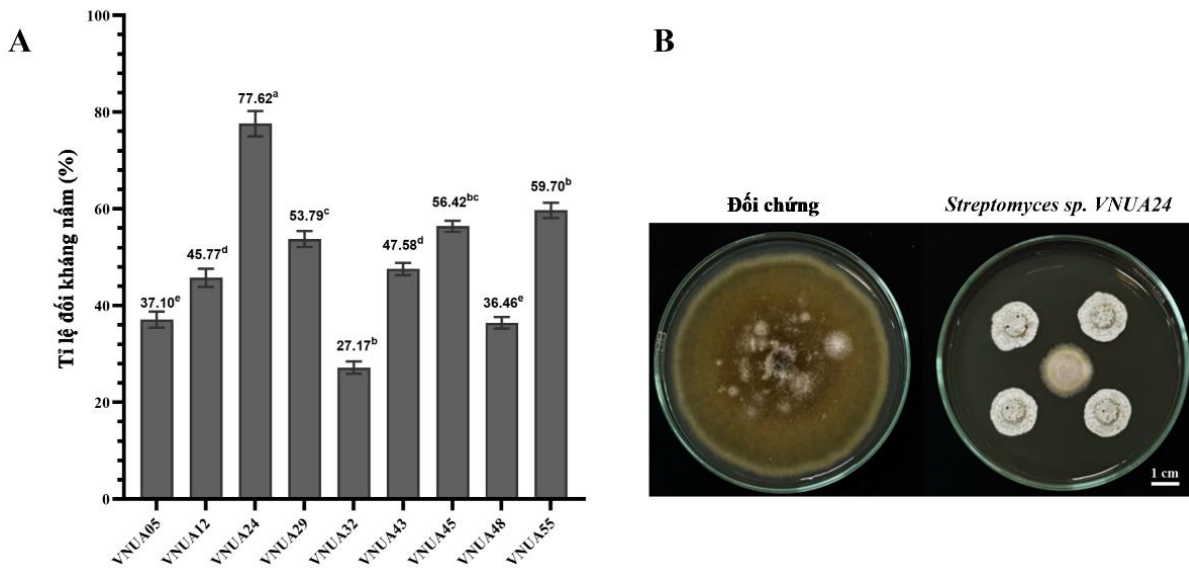
Khuếch đại gen sinh tổng hợp NRPS sử dụng cặp mồi A3-F/ A7-R (A3-F: 5' GCSTACSYSATSTACACSTCSGG 3'; A7-R: 5' SASGTCVCCSGTSCGGTAS 3') cho kích thước đoạn gen khuếch đại khoảng 700bp. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR là biến tính chu kỳ ban đầu 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 34 chu kỳ ở 95°C trong 1 phút, 45 giây ở 59°C sau đó là giai đoạn kéo dài mạch ở 72°C trong 1 phút 30 giây và ổn định mạch ở 72°C trong 10 phút.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5% với hiệu điện thế 80V trong 45 phút trong dịch TAE (1X). Kiểm tra kết quả điện di bằng máy soi gel.

#### **2.2.5. Xử lý số liệu**

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2019. Các giá trị được biểu diễn dưới dạng trung bình của ba lần lặp lại  $\pm$  độ lệch chuẩn (Mean  $\pm$  SD). Đồ thị được xây dựng bằng phần mềm GraphPad Prism 10.

Tuyển chọn và đánh giá hoạt tính đối kháng của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA24 với nấm *Alternaria alternata* hại thực vật



Ghi chú: A: Tỷ lệ ức chế nấm *Alternaria alternata* của 09 chủng xạ khuẩn có hoạt tính sau 12 ngày nuôi cấy ở 30°C; B: Hình ảnh chủng *Streptomyces* sp. VNUA24 ức chế sinh trưởng của nấm *Alternaria alternata*; Các ký tự chữ cái khác nhau trên các cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $P \leq 0,01$ .

**Hình 1. Sàng lọc chủng xạ khuẩn có hoạt tính đối kháng với nấm *Alternaria alternata***

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Sàng lọc và tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng nấm *Alternaria alternata*

Sau 12 ngày đồng nuôi cấy của các chủng xạ khuẩn *Streptomyces* spp. với chủng nấm *A. alternata* và quan sát khả năng hình thành vòng đối kháng. Kết quả sàng lọc khả năng đối kháng với nấm *A. alternata* cho thấy, chỉ 9/56 chủng xạ khuẩn có hoạt tính đối kháng. Hoạt tính kháng nấm của 9 chủng xạ khuẩn này (Hình 1) trong khoảng từ 27,17% đến 77,62%. Trong đó, chủng *Streptomyces* sp. VNUA24 biểu hiện hoạt tính kháng nấm mạnh nhất với tỷ lệ phần trăm kháng nấm là  $77,62 \pm 2,63\%$  sau 12 ngày nuôi cấy (Hình 1A). Kết quả đồng nuôi cấy của chủng này với nấm *A. alternata* (Hình 1B) cho thấy *Streptomyces* sp. VNUA24 có thể đã tiết vào môi trường thạch các hoạt chất sinh học ức chế sinh trưởng hệ sợi của nấm *A. alternata*. Bên cạnh đó, không quan sát thấy sự hình thành bào tử trên bề mặt của tản nấm.

Chủng *Streptomyces* sp. VNUA24 được

phân lập từ đất ở Hà Tĩnh với các đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên môi trường Gause 1: kích thước khuẩn lạc khoảng 3,5-5mm, bề mặt dạng tổ ong, viền tia xạ, khuẩn khí sinh màu xám trắng, khuẩn ty cơ chất màu trắng. Hình thái chuỗi sinh bào tử dạng xoắn lò xo, bào tử đốt đặc trưng của chi *Streptomyces*. Đáng chú ý, *Streptomyces* sp. VNUA24 đã được công bố có khả năng đối kháng một số nấm bệnh trên cây chuối (Đặng Thị Thanh Tâm & cs., 2023). Sự biểu hiện hoạt tính kháng nấm với nấm *A. alternata* gây bệnh phổ rộng cho thấy hoạt tính kháng đa nấm của chủng xạ khuẩn nghiên cứu. So sánh với các công bố gần đây nhất cho thấy, khả năng kháng nấm *A. alternata* của chủng *Streptomyces* sp. VNUA24 cao hơn so với chủng *Streptomyces odonnellii* SZF-179 kháng nấm *A. alternata* gây bệnh trên lê, với tỷ lệ ức chế là 55,04% (Zhang & cs., 2023). Tương tự, chủng xạ khuẩn *Streptomyces diastatochromogenes* VNUA27 có khả năng kháng nấm *A. alternata* gây bệnh trên cây chuối với tỷ lệ ức chế là  $55,38 \pm 3,39\%$  (Nguyễn Thị Thanh Mai & cs., 2023). Do vậy, chủng *Streptomyces* sp. VNUA24 được lựa chọn là chủng tiềm năng nhất đối kháng nấm *A. alternata*.

### 3.2. Ảnh hưởng của dịch nuôi chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA24 đến sự phát triển của nấm *Alternaria alternata*

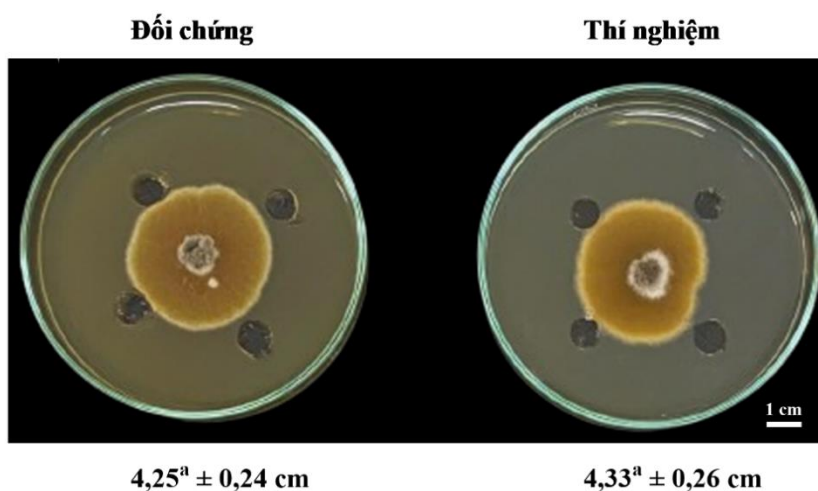
Dịch nuôi chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA 24 được thu sau 7 ngày nuôi và bổ sung vào đĩa thạch đã được nuôi cấy nấm *A.alternata* và quan sát khả năng sinh trưởng hệ sợi của nấm. Kết quả đánh giá cho thấy, dưới tác động của dịch nuôi chủng *Streptomyces* sp. VNUA24 đường kính của tản nấm *A. alternata* đạt  $4,33 \pm 0,26$  (đơn vị cm) sau 5 ngày. Tuy nhiên, kết quả đường kính tản nấm ở công thức thí nghiệm với công thức đối chứng ( $4,25 \pm 0,24\text{cm}$ ) không có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P \leq 0,01$ ) (Hình 2). Như vậy, có thể thấy dịch nuôi loại bỏ tế bào của chủng *Streptomyces* sp. VNUA24 không thể hiện hoạt tính kháng nấm.

Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng, các loài trong chi *Streptomyces* có khả năng ức chế nấm bệnh thông qua việc tổng hợp các hợp chất chuyển hóa thứ cấp, trong đó có các chất kháng nấm dạng khuếch tán trong môi trường. Dịch lọc nuôi cấy của chủng xạ khuẩn *Streptomyces odonellii* SZF-179, *Streptomyces hygrosopicus* JY-22 có hoạt tính kháng nấm *A. alternata* gây bệnh đốm đen (Cai & cs., 2023; Zhang & cs., 2023). Nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Mai & cs. (2023) cũng đã chỉ ra rằng dịch nuôi cấy chủng *Streptomyces diastatochromogenes*

VNUA27 có khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi nấm *A. alternata* với tỷ lệ phần trăm đối kháng là  $38,34\% \pm 1,05$  (đơn vị %). Kết quả thí nghiệm đồng nuôi cấy giữa chủng *Streptomyces* sp. VNUA24 và nấm *A. alternata* cho thấy khả năng kháng nấm mạnh, gợi ý rằng chủng *Streptomyces* này có thể tiết ra các hợp chất kháng nấm trong môi trường nuôi. Kết quả nghiên cứu thu được từ chủng *Streptomyces* sp. VNUA24 khác với các chủng xạ khuẩn khác có thể do các hoạt chất kháng nấm không được tổng hợp mạnh trong điều kiện nuôi cấy trên môi trường Gause I, lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ  $30^{\circ}\text{C}$ .

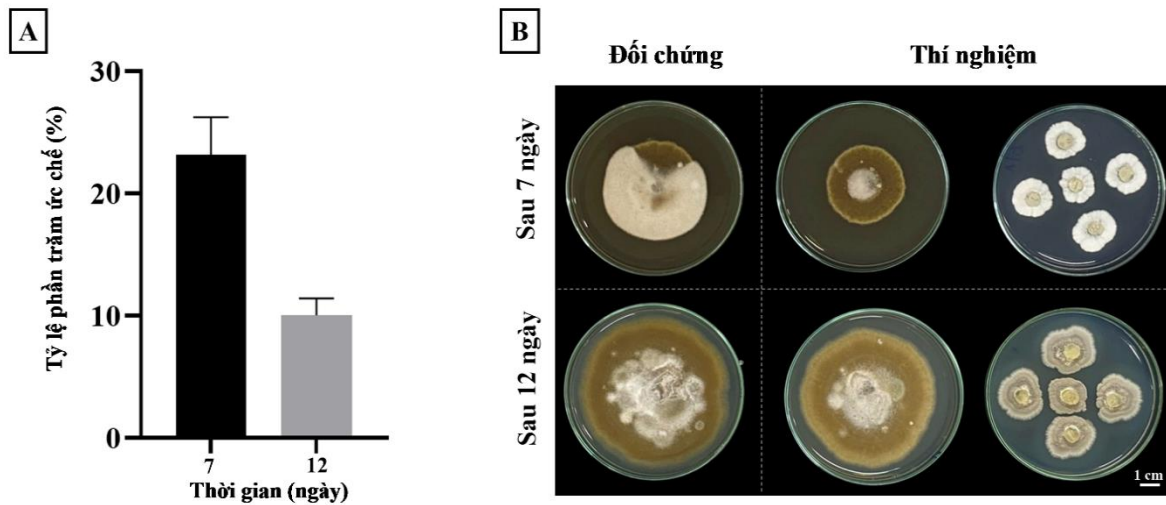
### 3.3. Ảnh hưởng của các hợp chất hữu cơ bay hơi từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA24 đến sự phát triển của nấm *Alternaria alternata*

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của các hợp chất hữu cơ bay hơi được tổng hợp bởi chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA 24 đến sinh trưởng hệ sợi của nấm *A.alternata* được khảo sát. Kết quả đánh giá (Hình 3) cho thấy, hiệu quả kháng nấm của các hợp chất VOC từ xạ khuẩn sau 7 ngày là  $23,13 \pm 3,11\%$  và giảm dần sau 12 ngày xuống  $10,03 \pm 1,38\%$ . Điều này cho thấy chủng *Streptomyces* sp. VNUA24 có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *A. alternata* thông qua việc tiết ra các hợp chất VOC.



Hình 2. Ảnh hưởng của dịch nuôi chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA24 đến sự phát triển của nấm *Alternaria alternata* sau 5 ngày nuôi cấy ở  $30^{\circ}\text{C}$

Tuyển chọn và đánh giá hoạt tính đối kháng của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA24 với nấm *Alternaria alternata* hại thực vật



Ghi chú: A: Tỷ lệ ức chế của hợp chất hữu cơ bay hơi từ chủng *Streptomyces* sp. VNUA24 đến sự phát triển của nấm *Alternaria alternata* sau 7 ngày và 12 ngày nuôi cấy ở 30°C; B: Hình thái tản nấm và màu sắc khuẩn ty khí sinh của xạ khuẩn sau 7 ngày và 12 ngày nuôi cấy ở 30°C.

### Hình 3. Ảnh hưởng của hợp chất hữu cơ bay hơi từ xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA24 đến sự phát triển của nấm *Alternaria alternata*

Theo nghiên cứu của Wang & cs. (2013), các hợp chất VOC từ chủng *Streptomyces alboflavus* TD-1 ức chế nấm *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* và *Penicillium citrinum*, với tỷ lệ ức chế đều vượt 24,8% sau 5 ngày. Tương tự, Ayed & cs. (2021) đã công bố hợp chất VOC từ chủng *Streptomyces* sp. S97 ức chế mạnh sự phát triển của *Rhizoctonia solani* và *Phoma medicaginis* (95%), *Fusarium solani* (69%), *Fusarium oxysporum* và *Sclerotium rolfsii* (20%). So sánh với các nghiên cứu này, cho thấy tác dụng kháng nấm *A. alternata* của các hợp chất VOC từ chủng *Streptomyces* sp. VNUA24 ở mức trung bình

Ở chi *Streptomyces*, quá trình sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp có mối liên hệ chặt chẽ với sự phát triển hình thái (Khushboo & cs., 2022). Trên môi trường rắn, các hợp chất thứ cấp bắt đầu được tổng hợp sau giai đoạn tế bào bước vào chu trình tự chết, tiếp theo, sẽ hình thành khuẩn ty khí sinh và phát triển thành chuỗi bào tử (Beroigui & Errachidi, 2023). Đối với chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA24, khuẩn ty khí sinh có màu trắng sau 7 ngày nuôi cấy, sau đó dần chuyển sang màu xám khi khối

bào tử hình thành (sau 12 ngày) (Hình 3). Do đó, có thể giải thích rằng hoạt tính đối kháng nấm *A. alternata* của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA24 giảm dần sau 12 ngày là do sự suy giảm sinh tổng hợp các hợp chất VOC có hoạt tính kháng nấm *A. alternata* khi có sự thay đổi trong quá trình phát sinh hình thái. Như vậy, có thể khẳng định, chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA24 có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng nấm *Alternaria alternata* mạnh, trong đó có vai trò của các hợp chất hữu cơ bay hơi.

### 3.4. Phát hiện gen liên quan đến quá trình tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA24

Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện các gen liên quan đến quá trình tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học cho thấy, 5 trên 8 cặp mồi sử dụng khuếch đại các gen mã hoá PKS loại 1 (KSMA-F/KSMB-R), PKS loại 2 (KS1-F/KS1-R; 540-F/1100-R; KS $\alpha$  và NRPS (A3-F/A7-R) ở chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA24 cho xuất hiện băng DNA với kích thước tương ứng khoảng 700bp; 613bp; 554bp; 470 và khoảng 700bp với cặp mồi A3-F/ A7-R.

Kích thước này tương ứng với kích thước của vùng gen khi thiết kế mỗi khuếch đại (Hình 4). Điều này cho thấy các cụm gen liên quan đến tổng hợp polyketide và peptide không ribosome được bảo tồn và có khả năng hoạt động ở chủng này. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA24 cho kết quả khuếch đại trên cả ba gen mã hoá PKS I, PKS II và NRPS - đây là đặc điểm quan trọng phản ánh tiềm năng sinh tổng hợp đa dạng các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học (Gallo & cs., 2013).

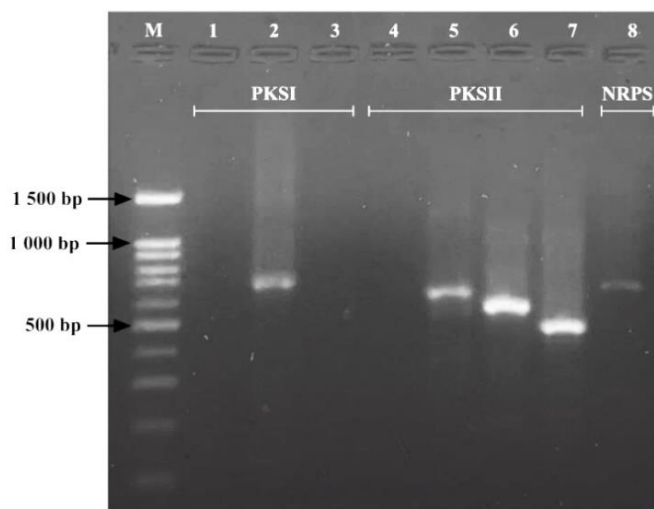
Nghiên cứu của Qi & cs. (2019) đã công bố chủng *Streptomyces* sp. SC3-4 có khả năng đối kháng với 13 loại nấm gây bệnh thực vật. Đánh giá tiềm năng sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học của chủng SC3-4 cho thấy gen PKS I và PKS II được khuếch đại thành công bằng các cặp mồi K1-F/M6-R, KS1-F/KS1-R tương ứng. Mặt khác, gen NRPS của chủng SC3-4 không được khuếch đại thành công bằng cặp mồi A3-F/A7-R. Có thể cho rằng, chủng *Streptomyces* sp. VNUA24 mang đủ cả ba nhóm gen PKS-I, PKS-II và NRPS cho thấy chủng có thể tạo ra phổ hợp chất kháng nấm rộng hơn so với các chủng chỉ mang một hoặc hai nhóm gen.

Kết quả khuếch đại thành công 5 gen trong

đó có đủ cả ba nhóm gen liên quan đến quá trình tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học đã cung cấp bằng chứng di truyền cho hoạt tính kháng nấm *A. alternata* đã được nghiên cứu.

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tuyển chọn được chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA24 có hoạt tính đối kháng mạnh với nấm *A. alternata* với tỷ lệ phần trăm đối kháng  $77,62 \pm 2,63\%$  sau 12 ngày đồng nuôi cấy trên môi trường PDA. Hợp chất hữu cơ bay hơi từ chủng xạ khuẩn cho tỷ lệ đối kháng đạt 23,13% sau 7 ngày. Mặt khác, dịch nuôi 7 ngày của chủng xạ khuẩn trên môi trường Gause I không thể hiện được hoạt tính đối kháng với nấm *A. alternata*. Đồng thời, bằng phản ứng PCR nghiên cứu đã phát hiện được 5 gen trong đó có đủ cả ba nhóm gen liên quan đến quá trình tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học PKS-I, PKS-II và NRPS. Kết quả của nghiên cứu mở ra tiềm năng khai thác chủng *Streptomyces* sp. VNUA24 như nguồn tác nhân sinh học và là nguồn gene cho nghiên cứu phát triển hợp chất kháng nấm *A. alternata* - “alternaricidal” mới.



Ghi chú: M: Thang chuẩn ADN kích thước 1.500bp; (1): Cặp mồi KS-F/KS-R; (2): Cặp mồi KSMA-F/KSMB-R; (3): Cặp mồi K1-F/M6-R; (4): Cặp mồi KSa/KSβ; (5): Cặp mồi KS1-F/KS1-R; (6): Cặp mồi 540-F/1100-R; (7): Cặp mồi KSa; (8): Cặp mồi A3-F/A7-R.

**Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại các vùng gen mã hoá PKS và NRPS của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA24**

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự tài trợ kinh phí từ nhiệm vụ quỹ gen cấp quốc gia mã số NVQG-2021/ĐT01: “Khai thác nguồn gen xạ khuẩn (*Streptomyces* sp. VNUA24, VNUA74 và VNUA116) để sản xuất chế phẩm sinh học kiểm soát bệnh Panama hại chuối”.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad T., Xing F., Cao C. & Liu Y. (2024). Characterization and toxicological potential of *Alternaria alternata* associated with post-harvest fruit rot of *Prunus avium* in China. *Frontiers in Microbiology*. 15: 1273076.
- Arrebola E., Sivakumar D. & Korsten L. (2010). Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. 53(1): 122-128.
- Ayed A., Kalai-Grami L., Ben Slimene I., Chaouachi M., Mankai H., Karkouch I., Djebali N., Elkahoui S., Tabbene O., Limam F. (2021). Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces* sp. strain S97 against *Botrytis cinerea*. 31(12): 1330-1348.
- Bai Q., Ma X., Hayat M., Tang Y. & Wang Z. (2025). Comparison and Analysis of Resistance Differences in *Alternaria alternata* from Fungicides with Three Different Mechanisms. *Journal of Fungi*. 11(4): 305.
- Beroigui O. & Errachidi F. (2023). *Streptomyces* at the heart of several sectors to support practical and sustainable applications: A review. 6(1).
- Bundale S., Begde D., Nashikkar N., Kadam T. & Upadhyay A. (2014). Isolation of aromatic polyketide producing soil *Streptomyces* using combinatorial screening strategies. *OALib J*. 1: 1-16.
- Cai L., Zhang H., Deng Y., Tian W., Fan G. & Sun X. (2023). Antifungal Activity of *Streptomyces hygroscopicus* JY-22 against *Alternaria alternata* and Its Potential Application as a Biopesticide to Control Tobacco Brown Spot. *Agronomy*. 13(7): 1944.
- Coakley S.M., Scherm H. & Chakraborty S. (1999). Climate change and plant disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 399-426.
- Dhanasekaran D., Thajuddin N. & Panneerselvam A. (2012). Applications of actinobacterial fungicides in agriculture and medicine. *Fungic Plant Anim.* 2: 29-54.
- Đỗ Quang Trung, Nguyễn Thị Thu Hằng, Phạm Bích Ngọc, Đinh Mai Vân, Trần Thị Hằng & Lưu Thế Anh (2021). Nghiên cứu *in vitro* các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của nấm *Alternaria alternata* gây bệnh thối ngọn cà trên cây thanh long (*Hylocereus* spp.). *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*. 57(2): 115-120.
- Evangelista-Martínez Z., Contreras-Leal E.A., Corona-Pedraza L.F. & Gastélum-Martínez É. (2020). Biocontrol potential of *Streptomyces* sp. CACIS-1.5CA against phytopathogenic fungi causing postharvest fruit diseases. *Egypt J. Biol. Pest Control*. 30: 117.
- Gallo A., Ferrara M. & Perrone G. (2013). Phylogenetic Study of Polyketide Synthases and Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Biosynthesis of Mycotoxins. *Toxins*. 5(4): 717-742.
- Ghanem G.A.M., Gebily D.A.S., Ragab M.M. Ayat M., Ali. A., Soliman K.N. & Abd El-Moity H. (2022). Efficacy of antifungal substances of three *Streptomyces* spp. against different plant pathogenic fungi. *Egypt J. Biol. Pest Control*. 32: 112
- Hồ Thị Cẩm Nguyên, Đoàn Cẩm Tiên, Lê Minh Trường, Trịnh Minh Hợp & Nguyễn Thị Nhã (2024). Nghiên cứu tác nhân gây bệnh đốm lá và bệnh teo đầu lá nha đam (*Aloe vera*) trồng tại tỉnh Ninh Thuận. *Tạp chí Nông nghiệp và Môi trường*. 3+4: 86-92
- Khushboo Kumar P., Dubey K.K., Usmani Z., Sharma M. & Gupta V.K. (2022). Biotechnological and industrial applications of *Streptomyces* metabolites. 16(1): 244-264
- Komaki H. & Tamura T. (2023). Profile of PKS and NRPS Gene Clusters in the Genome of *Streptomyces cellostaticus* NBRC 12849<sup>†</sup>. *Fermentation*. 9(11): 924.
- Liu Y., Bao M., Wang Y. & Zhang C. (2025). Development of Procymidone and Difenconazole Resistance in *Alternaria alternata*, the Causal Agent of Kiwifruit Brown Spot Disease. *Plants*. 14(14): 2245.
- Masoomi-Aladizgeh F., Jabbari L., Khayam Nekouei R. & Aalami A. (2016). A simple and rapid system for DNA and RNA isolation from diverse plants using handmade kit. *Protoc Exch*.
- Miranda-Apodaca J., Artetxe U., Aguado I., Martin-Souto L., Ramirez-Garcia A., Lacuesta, M., Becerril J.M., Estonba A., Ortiz-Barredo A., Hernández A., Zorraonaindia I. & Pérez-López, U. (2023). Stress Response to Climate Change and Postharvest Handling in Two Differently Pigmented Lettuce Genotypes: Impact on *Alternaria alternata* Invasion and Mycotoxin Production. *Plants* (Basel, Switzerland): 12(6): 1304.
- Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Nhật Hào, Nguyễn Lam Minh & Nguyễn Tăng Phú (2024). Phân lập và

- tuyển chọn vi khuẩn đối kháng nấm *Alternaria alternata* gây bệnh đốm lá trên dưa leo. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 22(2): 244-251.
- Nguyễn Thị Thanh Mai, Nguyễn Thị Thu, Trần Văn Tuấn, Phạm Hồng Hiền & Nguyễn Xuân Cảnh (2023). Khảo sát một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn *Streptomyces diastatochromogenes* VNUA27 sử dụng trong kiểm soát nấm bệnh hại cây chuối. Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam (Bản B): 65(5): 59-63
- Nguyễn Xuân Trường, Nguyễn Thị Thu, Võ Thị Bích Thủy, Đặng Thị Thanh Tâm, Nông Thị Huệ, Phạm Hồng Hiền & Nguyễn Xuân Cảnh (2024). Nấm *Alternaria alternata* gây bệnh đốm lá trên bắp cải (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) tại tỉnh Nghệ An. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 22(1): 107-114.
- Paster N. & Barkai-Golan R. (2008). Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: Part 2. World Mycotoxin J. 1(4): 385-396.
- Pipponzi S., Licciardello F., Caradonia F. & Stefani E. (2025). Volatile organic compounds produced by *Streptomyces* sp. SA51 mitigate *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* infection and stimulate lettuce seedling growth. Eur J. Plant Pathol. 173: 125-142
- Qi D., Zou L., Zhou D., Chen Y., Gao Z., Feng R., Zhang M., Li K., Jianghui X. & 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.
- Raynaldo F.A., Xu Y., Wang Q., Wu B. & Li D. (2024). Biological control and other alternatives to chemical fungicides in controlling postharvest disease of fruits caused by *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. Food Innovation and Advances. 3(2): 135-143.
- Tam T.T.D., Son T.D., Thu T.N., Hai T.N. & Canh X.N. (2023). Complete genome sequence of *Streptomyces* sp. strain VNUA24, a potential antifungal bacterium isolated from soil. National Library of Medicine. 12(9): e00372-23.
- Tenebro C.P., Trono D.J.V.L., Vicera C.V.B., Sabido E.M., Ysulat Jr J.A., Macaspac A.J.M., Tampus K.A., Fabrigar T.A.P., Saludes J.P & Dalisay D.S. (2021). Multiple strain analysis of *Streptomyces* species from Philippine marine sediments reveals intraspecies heterogeneity in antibiotic activities. Scientific reports. 11(1): 17544.
- Zhang F., Wen S., Wang B., Zhang Z., Liu F., Ye T., Wang K., Hu H., Yang X. & Fang W. (2023). Biocontrol Potential of *Streptomyces odonnellii* SZF-179 toward *Alternaria alternata* to Control Pear Black Spot Disease. 24(24): 17515.
- Zhang M.-J., Zheng X.-R., Li H. & Chen F.-M. (2023). *Alternaria alternata*, the Causal Agent of a New Needle Blight Disease on *Pinus bungeana*. Journal of Fungi. 9(1): 71.
- Zhang Y., Liu C. & van der Fels - Klerx H.J. (2025). Occurrence, toxicity, dietary exposure, and management of *Alternaria* mycotoxins in food and feed: A systematic literature review. Compr Rev Food Sci Food Saf. 24(1): e70085.