Vietnam J. Agri. Sci. 2022, Vol. 20, No. 1: 74-81 Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam 2022, 20(1): 74-81
www.vnua.edu.vn

PHÂN LẬP, XÁC ĐỊNH VI KHUẨN GÂY BỆNH THỐI MỀM TRÊN LAN PHI ĐIỆP (*Dendrobium anosmum*) VÀ ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ ỨC CHẾ CỦA MỘT SỐ CHỦNG XẠ KHUẨN

Phạm Hồng Hiển[1], Diêm Đăng Trường[2], Dương Văn Hoàn[2], Trần Thị Đào[2], Nguyễn Thị Thu[2], Nguyễn Xuân Cảnh[2*]

[1]Ban Khoa học và Hợp tác quốc tế, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam
[2]Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

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

Ngày nhận bài: 20.07.2021 Ngày chấp nhận đăng: 09.12.2021

TÓM TẮT

Bệnh thối mềm do vi khuẩn là một trong những bệnh phổ biến và gây ảnh hưởng lớn trên nhiều loại cây trồng khác nhau bao gồm cả hoa lan, trong đó vi khuẩn gây thối mềm xâm nhập vào mô thực vật, gây thối mềm thông qua vết thương. Nghiên cứu này nhằm xác định vi khuẩn gây bệnh thối mềm trên lan Phi Điệp và tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh. Từ 05 mẫu lá lan Phi Điệp có triệu chứng bị bệnh thối mềm thu thập tại Bắc Giang, 2 chủng vi khuẩn gây bệnh được phân lập, xác định khả năng gây bệnh bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo và định danh là *Bacillus pumilus* VK3, *B. altitudinis* VK5B. Bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch, đã tuyển chọn được chủng xạ khuẩn XK7 có khả năng đối kháng với cả hai chủng vi khuẩn *B. pumilus* VK3 và *B. altitudinis* VK5B gây bệnh trên lan Phi Điệp với đường kính vòng đối kháng lần lượt là 17 ± 0,07mm và 14 ± 0,05mm.

Từ khoá: Bệnh thối mềm, lan Phi Điệp, *Bacillus pumilus*, *Bacillus altitudini,* xạ khuẩn đối kháng.

Isolation and Identification of Soft Rot Bacteria on *Dendrobium Anosmum* Orchid and Evaluation of Inhibitory Effects of Some Actinomycetes

ABSTRACT

Bacterial soft rot is one of the most common diseases and mainly affects plants including orchid *Dendrobium anosmum.* The bacteria causing soft rot penetrates plant tissue, causing soft rot through the wound. This study aimed to íolate and identify bacterial strains capable of causing soft rot disease on orchids and select actinomycetes capable of antagonizing pathogenic bacterial strains. From five samples of orchid leaves showing symptoms of soft rot disease collected in Bac Giang, two strains of bacteria capable of causing soft rot disease were-isolated and the pathogenicity determined by artificial re-infection method. Bacterial strains were identified as *Bacillus pumilus* VK3 and *B. altitudinis* VK5B. By using the disk-diffusion method, from six *Streptomyces* strains, XK7 *Streptomyces* strain was selected for its antagonistic effect against *B. pumilus* VK3 and *B. altitudinis* VK5B-with the diameters of clear zone of 17 ± 0,07mm and 14 ± 0,05mm, respectively.

Keywords: Soft rot, Dendrobium anosmum, Bacillus pumilus, Bacillus altitudini, Streptomyces.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoa lan là một trong những loài thực vật có hoa quan trọng nhất về mặt kinh tế trên thế giới (Eum & cs., 2011). Ở các nước nhiệt đới, hoa lan đã trở thành loại cây cảnh xuất khẩu chính và nhu cầu về hoa cắt cành của họ đã tăng lên nhanh chóng trong những năm qua. Là một loại cây cảnh trồng trong chậu, hoa lan đã trở thành một loại cây có giá trị quan trọng trên thị trường hoa. Trong thập kỷ qua, doanh số bán hoa lan ở Hoa Kỳ đã tăng lên khoảng 80% từ 70 triệu USD năm 1997 lên 126 triệu USD năm 2007 (Palma & cs., 2010). Theo số liệu thống kê của Vụ Kế hoạch

thuộc Bộ NN&PTNT ở Việt Nam nếu trồng lan cắt cành Dendrobium và Mokara 1ha có thể cho doanh thu trung bình từ 500 triệu - 1 tỉ đồng/ha/năm (Đào Thanh Vân & Đặng Thị Tố Nga, 2008).

Các bệnh ảnh hưởng đến cây hoa lan bao gồm thối rễ, thối thân, giả hành, đốm lá và cháy lá (Keith & cs., 2005). Các bệnh vi khuẩn phổ biến và quan trọng nhất trên cây lan bao gồm thối nhũn do *Pectobacterium carotovorum*, *Dickeya chrysanthemi* và *Pantoae cypripedii* và đốm nâu do *Acidovorax avenae* subsp. *Cattleyae* (Simone & Burnett, 2002; Cating & Palmateer, 2011; Pulawska & cs., 2013).

Thối mềm do vi khuẩn là một yếu tố hạn chế trong sản xuất lan. Sự phát triển triệu chứng nhanh chóng thường dẫn đến toàn bộ cây bị chết (Cating & cs., 2012). Bệnh thối nhũn gây ra các triệu chứng nghiêm trọng ở lan Vũ Nữ (*Oncidium* Gower Ramsey), một loài lan phổ biến ở Đài Loan (Chang & cs., 2011; Liau & cs., 2003), đặc biệt là trong những mùa ấm áp với độ ẩm cao. Tuy nhiên, điều tra quy mô lớn cho thấy tác nhân gây bệnh thối mềm do vi khuẩn trên lan Vũ Nữ là *Dickeya* sp. ở Hoa Kỳ (Cating & Palmateer, 2011). Ở nước ta hiện nay đã cũng đã có các nghiên cứu về bệnh thối mềm trên một số loài lan thông thường như lan Hồ Điệp, lan Hài do vi khuẩn *P. carotovora* gây ra, nhưng chưa có nghiên cứu nào tập chung vào loài lan Phi Điệp đang đem lại giá trị cao cho người sản xuất hiện nay.

Hiện nay, việc sử dụng các chế phẩm sinh học từ các vi sinh vật đối kháng để kiểm soát mầm bệnh hại cây trồng là phương pháp ngày càng được phổ biến nhờ có những ưu điểm không chỉ về kinh tế mà còn về khía cạnh môi trường. Việc nghiên cứu và ứng dụng các xạ khuẩn *Streptomyces* đối kháng 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 & cs., 2008). Các chủng xạ khuẩn đã được xác định có khả năng đối kháng với các chủng vi khuẩn gây bệnh thối mềm như: *Streptomyces* spp. RoN, *Streptomyces* spp. G1P và *Streptomyces* spp. N1F có khả năng ức chế *Bacillus pumilus* OD23 gây bệnh thối mềm trên khoai tây (Babana & cs., 2011). Chủng *Streptomyces halstedii* AJ-7 được đánh giá có khả năng kiểm soát nấm *P. capsici* gây bệnh trên cây ớt đỏ (Joo, 2005). Sử dụng các chủng vi sinh vật đối kháng là phương pháp thân thiện với môi trường và có tác dụng trong việc giảm số lượng vi khuẩn gây bệnh trong nhiều vườn lan (Nuryani & cs., 2018).

Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập, xác định được chủng vi khuẩn gây bệnh, tuyển chọn được các chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với các chủng vi khuẩn gây bệnh thối mềm trên lan Phi Điệp.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập vi khuẩn gây bệnh

2.1.1. Phân lập vi khuẩn

Phương pháp phân lập vi khuẩn gây bệnh được thực hiện theo phương pháp mô tả của Lin & cs. (2015). Các mẫu lan Phi Điệp có dấu hiệu bị bệnh thối mềm được thu thập từ vườn lan tại Bắc Giang. Mô lá bị nhiễm bệnh (khoảng 1 × 1cm^2) được cắt từ mép của mô thối mềm đã được khử trùng bề mặt bằng 70% etanol trong 10 giây, sau đó được đặt trong 1ml nước cất khử trùng trong 3 phút. Những mẫu lá sau khi đã cắt nhỏ được đặt lên các đĩa môi trường LB (cao nấm men 5,0g, peptone 10,0g, NaCl 10,0g), nuôi ở 30°C trong 48 giờ. Các khuẩn lạc riêng rẽ được cấy chuyển sang môi trường LB để làm thuần.

2.1.2. Lây nhiễm bệnh nhân tạo

Các chủng vi khuẩn phân lập được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng ở 30°C trong 48 giờ, sau đó được lây nhiễm nhân tạo cho lan Phi Điệp để xác định tác nhân gây bệnh theo phương pháp mô tả của Alic & cs. (2017).

Các chủng vi khuẩn được xác định có khả năng gây bệnh thối mềm, nếu xuất hiện dấu hiệu thối mềm, bọng nước xung quanh vị trí lây nhiễm.

2.2. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của vi khuẩn gây bệnh

Xác định hình thái khuẩn lạc, tế bào vi khuẩn: Các chủng vi khuẩn có khả năng gây bệnh được nuôi cấy trên môi trường LB ở 30°C trong 48 giờ để quan sát đặc điểm hình thái, màu sắc khuẩn lạc, hình thái tế bào được xác

định bằng cách nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi.

Xác định khả năng di động của vi khuẩn: Các chủng vi khuẩn được cấy trên môi trường thạch mềm chứa 0,5% agar. Dùng que cấy thẳng lấy sinh khối của vi khuẩn, cấy đâm sâu vào hầu hết chiều dài ống nghiệm. Ủ ở 30°C trong 24 giờ. Vi khuẩn có khả năng di động sẽ mọc lan khỏi đường cấy và làm đục môi trường xung quanh. Vi khuẩn không có khả năng di động sẽ chỉ mọc quanh đường cấy.

2.3. Định danh vi khuẩn gây bệnh

Chủng vi khuẩn gây bệnh phân lập được nuôi cấy trên môi trường LB lỏng, sau 48 giờ tiến hành ly tâm ở 10.000 rpm/phút, trong 10 phút ở 4°C, thu tế bào. DNA tổng số của chủng vi khuẩn được tách theo phương pháp của Masoomi & cs. (2016), gen mã hoá cho vùng 16S rRNA của các chủng vi khuẩn được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') và 1492R (5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Phản ứng được thực hiện theo chu trình nhiệt: 95°C - 5 phút, 29 chu kỳ (95°C - 30 giây, 56°C - 30 giây, 72°C - 1 phút), 72°C trong 10 phút, giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% có nhuộm bằng RedSafe ở hiệu điện thế 80V trong 50 phút. Kích thước của đoạn DNA thu được sau phản ứng PCR được so sánh với thang DNA chuẩn. Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự bằng phương pháp Sanger cải tiến tại 1st BASE (Singapore). So sánh trình tự gen tương ứng trên cơ sở dữ liệu Genbank nhờ công cụ BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). Sử dụng phần mềm MEGAX để xây dựng cây xác định mối quan hệ di truyền, với độ tin cậy được tính bằng thuật toán Bootstrap với 1.000 lần lặp lại. Dựa vào cây phân loại và giá trị Bootstrap để xác định mối quan hệ di truyền của chủng nghiên cứu.

2.4. Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh của một số chủng xạ khuẩn

Phương pháp khuếch tán đĩa thạch được sử dụng cho đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh thối mềm trên lan Phi Điệp của các chủng xạ khuẩn được thực hiện theo phương pháp mô tả của Balouiri & cs. (2015). Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh của chủng xạ khuẩn nghiên cứu được thể hiện thông qua đường kính vòng vô khuẩn (vòng tròn trong suốt bao quanh giếng thạch) được tính bằng công thức D – d (mm) trong đó D là đường kính vòng vô khuẩn (mm), d là đường kính lỗ thạch (mm).

Thí nghiệm được lặp lại ba lần với đối chứng là dịch môi trường không nuôi cấy xạ khuẩn. Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centrution 16.2. Phân tích phương sai (ANOVA) và kiểm định LSD được sử dụng để kết luận về sự sai khác giữa trung bình các nghiệm thức ở mức độ ý nghĩa P <0,05.

3. KẾT QUẢ

3.1. Phân lập vi khuẩn gây bệnh thối mềm lan Phi Điệp

Từ 5 mẫu lá lan Phi Điệp có dấu hiệu bị thối mềm trong các giò lan khác nhau được thu thập tại vườn Lan xã Minh Đức, huyện Việt Yên, tỉnh Bắc Giang, trên môi trường LB chúng tôi đã phân lập được 10 chủng vi khuẩn khác nhau về kích thước, đặc điểm khuẩn lạc và màu sắc (Bảng 1).

Kết quả lây nhiễm nhân tạo các chủng vi khuẩn phân lập sau 3 ngày cho thấy trong tổng số 10 chủng phân lập, các chủng kí hiệu VK3, VK5B có khả năng gây thối mềm cho lá lan Phi Điệp, làm lá lan bị thối nhũn, xung quanh xuất hiện quầng vàng, tại vị trí lây nhiễm xuất hiện bọng nước (Hình 1). Trong đó, chủng VK5B cho khả năng gây bệnh mạnh nhất, sau 3 ngày lây nhiễm xung quanh vị trí nhiễm xuất hiện vết thối nhũn, màu sắc lá tại vị trí lây nhiễm chuyển từ màu xanh thành đen, lá cây chuyển sang màu vàng, có biểu hiện thối nhũn, gây thối toàn bộ lá và rụng lá sau 5 ngày tái lây nhiễm. Triệu chứng bệnh trên cây lan Phi Điệp được lây nhiễm nhân tạo với chủng VK5B có khả năng gây thối mạnh, kết quả tái lây nhiễm có các biểu hiện tương tự như các triệu chứng xuất hiện trên lá lan bị bệnh thối mềm ngoài tự nhiên.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn phân lập

Kí hiệu chủng	Đặc điểm khuẩn lạc	Mẫu phân lập
VK1	Khuẩn lạc tròn màu trắng đục, bề mặt nhăn, viền liền	Lá cây
VK2	Khuẩn lạc màu nâu xám, bề mặt lồi bóng, viền liền	Lá cây
VK3	Khuẩn lạc màu trắng đục, bề mặt nhăn, viền liền	Lá cây
VK4	Khuẩn lạc trắng đục, bề mặt lồi nhẵn bóng, viền liền	Lá cây
VK5B	Khuẩn lạc màu trắng ngà, bề mặt nhăn, mép liền	Lá cây
VK6	Khuẩn lạc màu trắng đục, bề mặt lồi nhám, viền liền	Lá cây
VK7	Khuẩn lạc màu vàng nhạt đục, bề mặt nhám, viền đều	Lá cây
VK8	Khuẩn lạc màu vàng, tâm lõm, viền liền	Lá cây
VK9	Khuẩn lạc màu cam, bề mặt lồi, nhẵn bóng, mép liền	Lá cây
VK10	Khuẩn lạc đơn màu vàng đục, bề mặt lồi, viền liền	Lá cây

ĐC VK3 VK5

Hình 1. Khả năng gây bệnh thối mềm của các chủng vi khuẩn phân lập sau 3 ngày lây nhiễm nhân tạo trong phòng thí nghiệm

Kết quả trên tương đồng với nghiên cứu của Vũ Thị Hoàn & cs. (2020) về phân lập vi khuẩn thối mềm trên cây lan Hồ Điệp, trong đó tác giả cho biết các chủng vi khuẩn gây bệnh phân lập được từ lá lan Hồ Điệp sau 48 giờ lây nhiễm nhân tạo xuất hiện bọng ngậm nước và các triệu chứng bệnh tương tự như bệnh thối trên lan Hồ Điệp. Nghiên cứu của Alic & cs. (2017) về chủng vi khuẩn *Dickeya* spp. B16 và *Dickeya* spp. S1 gây bệnh thối mềm trên lan Hồ Điệp xác định, sau khi lây nhiễm nhân tạo lá cây lan thí nghiệm bị thối mềm, xuất hiện vết bọng nước xung quanh khu vực tái lây nhiễm. Các nghiên cứu của Sudarsono & cs. (2018) về vi khuẩn *D. chrysanthemi* gây thối mềm trên lan Hồ Điệp, Lin & cs. (2015) về vi khuẩn *D. chrysanthemi* PLO3 gây thối mềm trên lan Vũ Nữ (*Oncidium* Gower Ramsey) và Joko & cs. (2017) về vi khuẩn *Dickkeya* sp. và *Pseudomonas* sp. gây thối mềm trên lan Hồ Điệp cho biết sau 12-36 giờ lây nhiễm nhân tạo lây nhiễm lá lan xuất hiện các triệu chứng của bệnh thối mềm, xung quanh vị trí lây nhiễm mô lá xuất hiện các vết mọng nước.

Các nghiên cứu trước đây đều chỉ ra rằng bệnh thối mềm trên cây lan do các chủng vi khuẩn gây ra. Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn VK3, VK5B có khả năng gây bệnh cho lan Phi Điệp được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Một số đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn gây bệnh phân lập

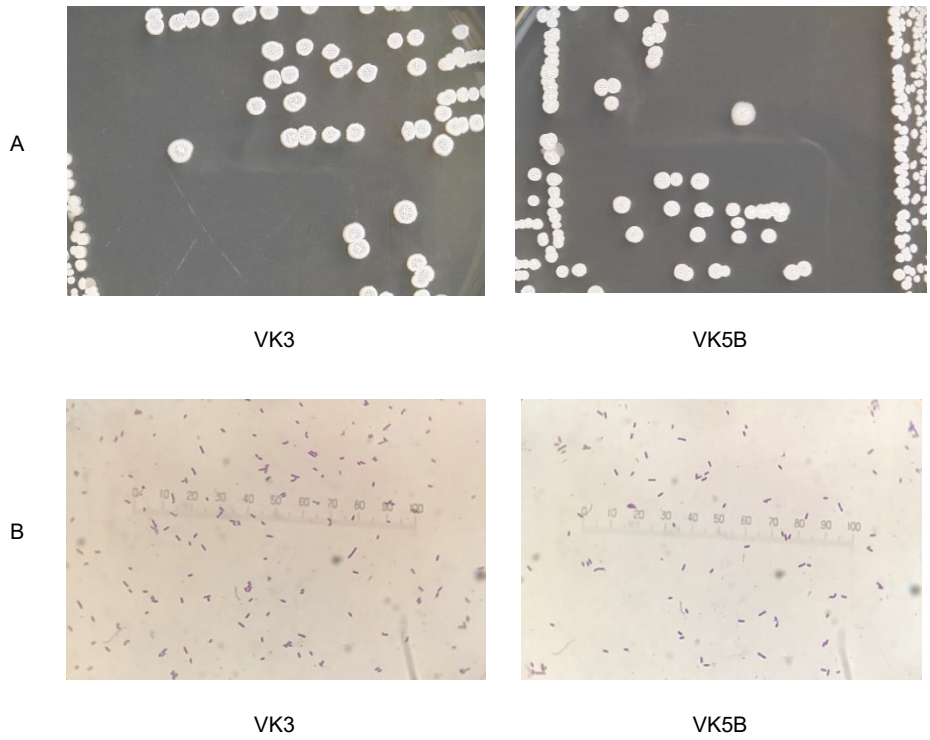
Đặc điểm hình thái tế bào, khuẩn lạc là các chỉ tiêu quan trọng cho việc phân loại vi sinh vật. Khuẩn lạc hai chủng vi khuẩn gây bệnh thối mềm trên lan Phi Điệp sau 48 giờ nuôi cấy trên môi trường LB ở 30°C có kích thước nhỏ, tròn đều, trong đó khuẩn lạc của chủng vi khuẩn VK3 có màu trắng đục, bề mặt khuẩn lạc nhăn, khuẩn

lạc của chủng vi khuẩn VK5B có màu trắng ngà, bề mặt khuẩn lạc dẹt, nhăn (Hình 2A). Kết quả quan sát hình thái tế bào bằng phương pháp nhuộm Gram cho thấy tế bào của chủng VK3 và VK5 là Gram +, dạng que ngắn (Hình 2B).

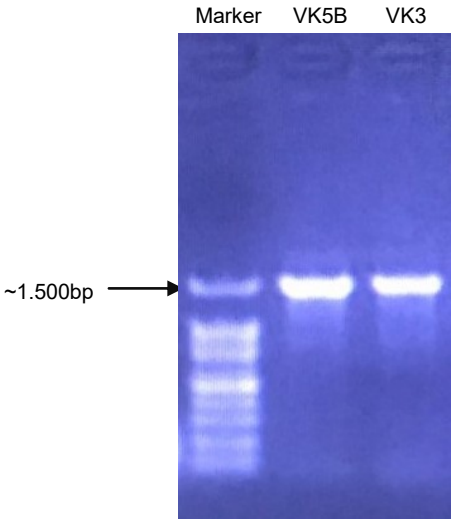
Kết quả nghiên cứu xác định cả hai chủng vi khuẩn phân lập đều có khả năng di động, trong đó chủng VK5B có khả năng di động mạnh hơn chủng VK3.

3.3. Định danh chủng vi khuẩn gây bệnh phân lập

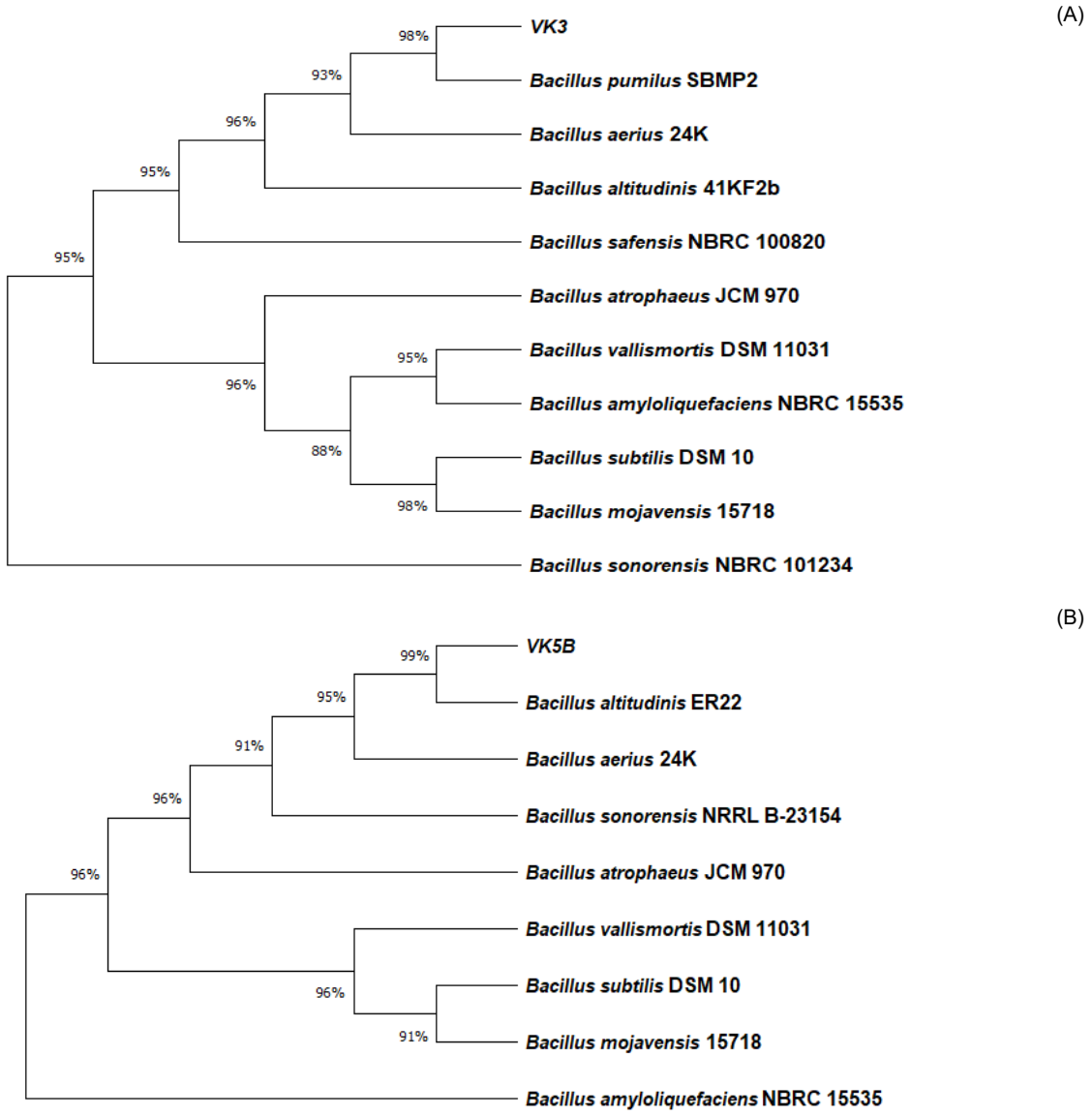
Kết quả điện di DNA thu được các băng vạch có kích thước khoảng 1500 bp (Hình 3).



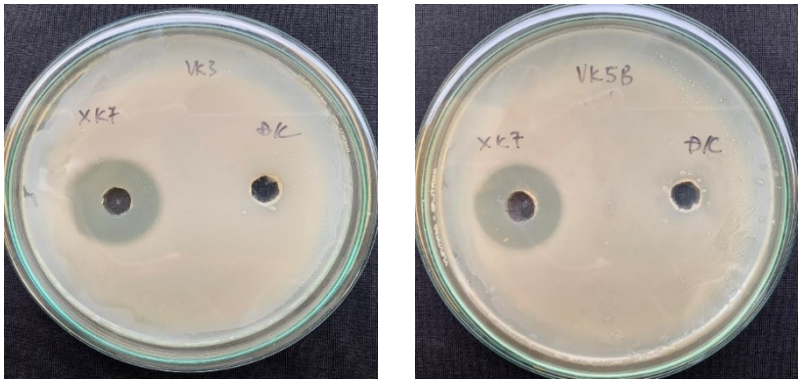
Hình 2. Hình thái khuẩn lạc (A), hình thái tế bào (B) của các chủng vi khuẩn gây bệnh thối mềm



Hình 3. Sản phẩm PCR đoạn gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn gây bệnh thối mềm



Hình 4. Cây phân loại dựa trên trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn VK3 (A), VK5B (B)



Hình 5. Khả năng đối kháng vi khuẩn gây bệnh thối mềm của chủng xạ khuẩn XK7

Kết quả thể hiện trên cây phân loại cho thấy chủng VK3 nằm cùng nhánh với chủng *B. pumilus SBMP2*, với giá trị bootstrap 98%. Kết quả căn trình tự nucleotide trên BLAST cho thấy mức độ tương đồng của 16S rRNA của chủng VK3 và *B. pumilus* SBMP2 có độ tương đồng 99,32%. Xét về mức độ tương đồng thì hai chủng này giống nhau. Chủng VK5B nằm cùng nhánh với chủng *B. altitudinis* ER22, với giá trị bootstrap 99% với mức độ tương đồng của vùng 16S rRNA của chủng VK5B và *B. altitudinis* ER22 là 99% (Hình 4).

Nhiều nghiên cứu đã công bố vi khuẩn *B. pumilus* và *B. altitudinis* có khả năng gây bệnh cho một số loài thực vật, trong đó Bathily & cs. (2010) cho biết chủng *B. pumilus* OD23 có khả năng gây bệnh thối mềm trên củ khoai tây bảo quản trong kho ở Mali, Peng & cs. (2013) xác định vi khuẩn *B. pumilus* GR8 gây bệnh thối thân rễ ở gừng, Elbanna & cs. (2014) công bố vi khuẩn *B. altitudinis* là tác nhân gây bệnh thối mềm mới và Lemjiber & cs. (2021) báo cáo vi khuẩn *B. altitudinis* B10 gây bệnh trên lá cây lê với mức độ nghiêm trọng từ 47,63 đến 57,77%, làm cho lá héo nhanh chóng, sau đó chuyển sang màu nâu nhạt và cuối cùng khô lại.

Nhiều nghiên cứu về bệnh thối mềm trên cây lan cho thấy bệnh này do nhiều chủng vi khuẩn khác nhau gây ra như: *Dickeya* sp., *Pectobacterium carotovora*, *D. chrysanthemim, Pantoae cypripedii* (Simone & Burnett, 2002; Cating & Palmateer, 2011; Cating & Palmateer 2011; Pulawska & cs., 2013; Lin & cs., 2015; Alicet & cs., 2017; Joko & cs., 2017; Sudarsono & cs., 2018; Vũ Thị Hoàn & cs., 2020). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy vi khuẩn *B. pumilus*, *B. altitudinis* ngoài khả năng gây bệnh trên một số loại cây trồng còn có khả năng gây bệnh thối mềm trên lan Phi Điệp. Đây là phát hiện mới, bổ sung thêm tác nhân gây bệnh thối mềm trên lan bên cạnh các chủng đã biết như: *Dickeya* sp., *Pectobacterium carotovora, D. chrysanthemim, Pantoae cypripedii*, tuy nhiên để khẳng định chắc chắn, cần thiết phải có thêm các nghiên cứu sâu hơn về đặc điểm sinh hóa và độc tính (đặc tính gây bệnh) của các chủng vi khuẩn phân lập.

3.4. Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh thối mềm của một số chủng xạ khuẩn

Kết quả đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh thối mềm của 6 chủng xạ khuẩn lưu trữ tại phòng thí nghiệm Bộ môn Công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam cho thấy chủng xạ khuẩn XK7 có khả năng đối kháng với cả 02 chủng vi khuẩn gây bệnh VK3, VK5B với đường kính vòng đối kháng lần lượt là: 17 ± 0,07mm và 14 ± 0,05mm, tương đương với ba chủng xạ khuẩn đối kháng với vi khuẩn *B. pumilus* gây bệnh thối mềm trên khoai tây đã được Babana công bố năm 2011 (Babana & cs., 2011) (Hình 5).

4. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn ký hiệu VK3, VK5B phân lập từ mẫu lá lan Phi Điệp có triệu chứng bị bệnh thối mềm thu thập tại Bắc Giang, gây ra các triệu chứng của bệnh thối mềm trên lan Phi Điệp khi lây nhiễm nhân tạo được định danh là *B. pumilus* VK3 và *B. altitudinis* VK5B.

Chủng xạ khuẩn ký hiệu XK7 có khả năng đối kháng đồng thời với cả hai chủng vi khuẩn gây bệnh phân lập là *B. pumilus* VK3 và *B. altitudinis* VK5B với đường kính vòng đối kháng đạt 17 ± 0,07mm và 14 ± 0,05mm, có tiềm năng sử dụng để phát triển chế phẩm vi sinh phòng trừ bệnh thối mềm trên lan Phi Điệp ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alic S., Naglic T., Znidaric M.T., Peterka M., Ravnikar M. & Dreo T. (2017). Putative new species of the genus *Dickeya* as major soft rot pathogens in *Phalaenopsis* orchid production. Plant Pathology. 66(8): 1357-1368.

Babana A.H., Bathily H., Samaké F., Maïga K., Traoré D. & Dicko A. (2011). Microbiological control of bacterial soft rot caused by *Bacillus pumilus* OD23 on potato. British Microbiology Research Journal. 1(3): 41-48.

Balouiri M., Sadiki M. & Ibnsouda S.K. (2015). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. 6(2): 71-79.

Bathily H., Babana A.H. & Samaké F. (2010). Bacillus pumilus, a new pathogen on potato tubers in storage in Mali. African Journal of Microbiology Research. 4(20): 2067-2071.

Cating R.A., Hoy M.A., & Palmateer A.J. (2012). A comparison of standard and high-fidelity PCR: evaluating quantification and detection of pathogen DNA in the presence of orchid host tissue. Plant Disease. 96(4): 480-485.

Cating R.A. & Palmateer A.J. (2011) Bacterial soft rot of *Oncidium* orchids caused by a *Dickeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*) in Florida. Plant Dis. 95(1): 74-74.

Chang Y.Y., Chu Y.W., Chen C.W., Leu W.M., Hsu H.F. & Yang C.H. (2011). Characterization of *oncidium* 'gower ramsey' transcriptomes using 454 GS-FLX pyrosequencing and their application to the identification of genes associated with flowering time. Plant and Cell Physiology. 52(9): 1532-1545.

Đào Thanh Vân & Đặng Thị Tố Nga (2008). Giáo trình Hoa lan. Truy cập từ http://tailieudientu.lrc.tnu.edu.vn/Upload/Collection/brief/brief_1308_10008_Small_09.Giaotrinhhoalan.pdf ngày 24/08/2021.

Elbanna K., Elnaggar S. & Bakeer A. (2014). Characterization of *Bacillus altitudinis* as a new causative agent of bacterial soft rot. Journal of Phytopathology. 162(11-12): 712-722.

Eum S.M., Gale S., Yukawa T. & Lee N.S. (2011). Phylogenetic and conservation status of the endangered terrestrial orchid *Nervilia nipponica* (Orchidaceae) in Korea. Biochem Syst Ecol. 39(4-6): 635-642.

Joko T., Kiswanti D., Hanudin & Subandiyah S. (2011). Occurence of bacterial soft-rot of Phalaenopsis orchids in Yogyakarta and West Java, Indonesia. In Proceeding of Internasional Seminar on Natural Resources, Climate Change dan-Food Security in Developing Countries. pp. 27-28.

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(3): 201-205.

Keith L.M., Sewake K.T. & Zee F.T. (2005). Isolation and characterization of Burkholderia gladioli from orchids in Hawaii. Plant Dis. 89: 1273-1278.

Lemjiber N., Naamani K., Merieau A., Dihazi A., Zhar N., Jediyi H. & Boukerb A.M. (2021). Identification and Genomic Characterization of Pathogenic *Bacillus altitudinis* from Common Pear Trees in Morocco. Agronomy. 11(7): 1344.

Liau C.H., Lu J.C., Prasad V., Hsiao H.H., You S.J., Lee J.T., Yang N.S., Huang H.E., Feng T.Y., Chen W.H. & Chan M.T. (2003). The sweet pepper ferredoxin-like protein (pflp) conferred resistance against soft rot disease in *Oncidium* orchid. Transgenic Research. 12(3): 329-336.

Lin Y.H., Lee P.J., Shie W.T., Chern L.L. & Chao Y.C. (2015). *Pectobacterium chrysanthemi* as the dominant causal agent of bacterial soft rot in *Oncidium* "Grower Ramsey". European Journal of Plant Pathology. 142(2); 331-343.

Masoomi A.F., Jabbari L., Khayam N.R. & Aalami A. (2016). A simple and rapid system for DNA and RNA isolation from diverse plants using handmade kit. Protocol Exchange.

Nuryani W., Hanudin H., Yusuf E.S. & Budiarto K. (2018). Physico-Chemical, Viability Evaluations and Efficacy Assessment of *Bacillus subtilis* Against Soft Rot Disease in *Phalaenopsis*. AGRIVITA, Journal of Agricultural Science. 40(3): 425-433.

Palma M.A., Chen Y.J., Hall C., Bessler D. & Leatham D. (2010). Consumer preferences for potted orchids in the Hawaiian market. Hortechnology. 20(1): 239-244.

Peng Q., Yuan Y. & Gao M. (2013). *Bacillus pumilus*, a novel ginger rhizome rot pathogen in china. Plant Disease. 97(10): 1308-1315.

Pulawska J., Mikicinski A. & Orlikowski L.B. (2013) Acidovorax cattleyae the causal agent of bacterial brown spot of *Phalaenopsis* lueddemanniana in Poland. Journal of Plant Pathology. pp. 407-410.

Shimizu M., Yazawa S. & Ushijima Y. (2008). A promising strain of endophytic *Streptomyces* sp. for biological control of cucumber anthraxcnose. Journal of General Plant Pathology. 75(1): 27-36.

Simone G.W. & Burnett H.C. (2002). Diseases caused by bacteria and fungi. Orchid pests and diseases. American Orchid Society, Delray Beach. pp. 50-73.

Sudarsono S., Elina J., Giyanto & Sukma D. (2018). Pathogen Causing *Phalaenopsis* Soft Rot Disease - 16S rDNA and Virulence Characterisation. Plant Protection Science. 54(1): 1-8.

Vũ Thị Hoàn, Phan Quốc Hưng & Vũ Thị Xuân Hương (2020). Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn đối kháng với vi khuẩn gây bệnh thối mềm trên cây lan Hồ điệp. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. 3 + 4: 5-12.