

TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG KIỂM SOÁT BỆNH CHẢY GÔM TRÊN CÂY CAM (*Citrus sinensis*)

Phạm Hồng Hiền¹, Bạch Thị Điệp², Nguyễn Thị Chúc Quỳnh²,
Phùng Quang Tùng², Đặng Thị Thanh Tâm^{3*}

¹*Ban Khoa học và Hợp tác quốc tế, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*

²*Viện Bảo vệ thực vật*

³*Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

*Tác giả liên hệ: thanhtram@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 02.04.2022

Ngày chấp nhận đăng: 05.07.2022

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành với mục đích tìm kiếm các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Phytophthora* spp., tác nhân chính gây bệnh chảy gôm trên cây cam. Từ 38 chủng vi khuẩn phân lập từ đất trồng cam tại Hòa Bình và Tiền Giang, đã tuyển chọn được 01 chủng vi khuẩn ký hiệu LHB15 có khả năng đối kháng mạnh với nấm *Phytophthora citrophthora* 18PMS và *P. palmivora* 17PMS. Dựa trên đặc điểm hình thái và phân tích trình tự đoạn 16S rRNA, chủng vi khuẩn LHB15 được xác định thuộc loài *Bacillus siamensis*. Chủng *B. siamensis* LHB15 sinh trưởng tốt nhất ở điều kiện nhiệt độ 37°C và pH7. Chủng *B. siamensis* LHB15 có khả năng ức chế cao đối với nấm *P. citrophthora* 18PMS trong đất và trong rễ cây cam sau 45 ngày xử lý. Kết quả cho thấy đây là chủng vi khuẩn đối kháng có tiềm năng ứng dụng trong phát triển chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh chảy gôm trên cây cam.

Từ khóa: Đối kháng, bệnh chảy gôm, *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora palmivora*, *Bacillus siamensis*.

Selection of Potential Bacterial Strain for Controlling Gummosis Disease in Citrus (*Citrus sinensis*)

ABSTRACT

The research aimed to identify potential biocontrol agents in controlling *Phytophthora* spp. that causes gummosis disease of citrus (*C. sinensis*). Out of 38 strains isolated from the soil samples collected from Hoa Binh and Tien Giang provinces, the strain LHB15 showed strong antagonistic activity against *P. citrophthora* 18PMS and *P. palmivora* 17PMS. Analysis of morphological characteristics and 16S rRNA sequence, the strain LHB15 was identified as *B. siamensis*. The optimal condition for the growth of *B. siamensis* LHB15 was determined in LB at 37°C and pH 7. Testing the antagonistic activity against *P. citrophthora* 18PMS in greenhouse conditions showed a strong reduction in the presence of fungi on soil and citrus roots after 45 days of treatment. The study indicated that the *B. siamensis* LHB15 is a potential strain for controlling gummosis in citrus.

Keywords: Antagonistic activity, gummosis, *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora palmivora*, *Bacillus siamensis*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cam là cây ăn quả quan trọng nhất trên thế giới với sản lượng ước tính 124.246 nghìn tấn năm 2016 (Rajput & cs., 2020). Ở Việt Nam, cam là cây trồng quan trọng với diện tích khoảng 100 nghìn hecta, sản lượng đạt 1.545,9 nghìn tấn, tăng 33,2% so với năm trước tính đến

năm 2021, với các vùng trồng cam trọng điểm như Hòa Bình, Tiền Giang, Nghệ An (Tổng cục Thống kê, 2021). Tuy nhiên, ngành công nghiệp cam luôn phải đối mặt với rất nhiều tác động bất lợi của các nhân tố vô sinh và bệnh hại. Trong các bệnh hại trên cây cam thì bệnh chảy gôm mặc dù là bệnh mới nổi nhưng có khả năng gây thiệt hại lớn cho năng suất và chất lượng

cam ước tính giảm khoảng 10-30% năng suất mỗi năm (Mounde & cs., 2009). Nguyên nhân gây bệnh là các chủng nấm thuộc chi *Phytophthora* sống trong đất. Bệnh lây lan và gây hại tất cả bộ phận của cây, gây chảy mủ, đặc biệt ở các vườn trồng với mật độ dày và khó thoát nước. Cây bị bệnh biểu hiện triệu chứng héo rũ vàng úa, sinh trưởng kém và cây sẽ chết khi bị nhiễm bệnh nặng. Bệnh chảy gom là bệnh có sức tàn phá cực lớn và có thể làm cho vườn cây ăn trái bị suy kiệt hoàn toàn. Bệnh được ghi nhận thấy ở 90% vườn trồng với tỉ lệ bệnh trung bình là 45% (Mekonen & cs., 2015). Để kiểm soát bệnh thì các loại thuốc trừ nấm nội hấp như metalaxyl và fosetyl-Al thường được sử dụng và đạt hiệu quả cao. Tuy nhiên, nếu sử dụng cùng loại thuốc trong thời gian dài sẽ xuất hiện các chủng nấm kháng thuốc (Graham & Feichtenberger, 2015). Hiện nay, bên cạnh chiến lược nghiên cứu phát triển các giống kháng bệnh thì các biện pháp sinh học như sử dụng dịch chiết thực vật để kích thích hệ thống kháng của cây trồng, vi sinh vật đối kháng (nấm, khuẩn) là các giải pháp thân thiện với môi trường, có hiệu quả kinh tế và hiệu quả cao trong quản lý bệnh chảy gom. Một số vi sinh vật đối kháng hiệu quả đã được nghiên cứu và ứng dụng như *Bacillus* spp., *Trichoderma viride*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. lignorum*, *Gliocladium virens* và *Pseudomonas fluorescens* (Jagtap & cs., 2012). Đặc biệt, các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* là đối tượng được quan tâm vì khả năng bảo vệ cây trồng kháng lại các bệnh do nấm có nguồn gốc trong đất gây ra (Jamali & cs., 2004). Chính vì vậy, hướng tiếp cận của nghiên cứu hiện nay là phân lập được các chủng *Bacillus* có khả năng đối kháng với nấm *Phytophthora* spp. gây bệnh chảy gom trên cây cam. Đây là hướng nghiên cứu triển vọng và có khả năng ứng dụng cao trong thực tiễn sản xuất. Tuy nhiên, các nghiên cứu, ứng dụng theo hướng này trong quản lý bệnh chảy gom trên cam vẫn chưa phát triển ở Việt Nam. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu, phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* đối kháng với nấm gây bệnh chảy gom trên cây cam tại Việt Nam. Kết quả nghiên cứu sẽ phục vụ phát triển chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh chảy gom trên cây cam tại Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Hai chủng nấm *P. citrophthora* 18PMS và *P. palmivora* 17PMS gây bệnh chảy gom trên cây cam phân lập tại Việt Nam, đang được lưu giữ tại Viện Bảo vệ thực vật, được sử dụng trong nghiên cứu để đánh giá khả năng đối kháng của các chủng vi khuẩn phân lập.

2.2. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng với nấm *Phytophthora* spp.

Mẫu đất từ các vùng trồng cam của tỉnh Hòa Bình và Tiền Giang được thu thập theo phương pháp của Drenth & Guest (2004). Cụ thể, mẫu đất được lấy ở 3 điểm của từng cây theo hình tam giác đều trong đó lấy gốc cây làm trung tâm, sau đó trộn đều thành 1 mẫu (01 mẫu/cây). Mẫu đất lấy tại nơi có rễ tơ phát triển và theo chiều sâu của rễ cách mặt đất từ 0-20cm. Mỗi vườn lấy 5 mẫu theo đường chéo góc. Mẫu thu thập ghi rõ thông tin: ngày, địa điểm, tên chủ vườn.

Các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* spp. được phân lập theo phương pháp của Saidi & cs. (2009). Cân 5g đất thu thập và hòa trong 45ml nước vô trùng trong bình tam giác. Bình mẫu được đun nóng ở điều kiện 80°C trong 10 phút. Dịch huyền phù được pha loãng nhiều lần và cấy trải trên môi trường LB đặc và được ủ ở điều kiện 28°C trong khoảng thời gian 3-5 ngày (Saidi & cs., 2009). Các chủng vi khuẩn được lựa chọn là các chủng có đặc điểm hình thái đặc trưng của chi *Bacillus*. Các chủng lựa chọn được làm thuần bằng cấy ria lập đi lập lại khuẩn lạc trên môi trường LB đặc. Khuẩn lạc sau làm thuần được lưu giữ trong ống thạch nghiêng và trong glycerol.

Để đánh giá sơ bộ khả năng đối kháng của các chủng vi khuẩn, khối thạch chứa nấm gây bệnh *P. citrophthora* 18PMS và *P. palmivora* 17PMS được cấy vào giữa đĩa petri chứa môi trường PDA. Vi khuẩn đối kháng được cấy 4 góc xung quanh khối thạch chứa nấm gây bệnh và cách vành đĩa petri 1cm và được giữ ở điều kiện 30°C trong 7 ngày và tiến hành đánh giá khả

năng ức chế của vi khuẩn đối với nấm bệnh. Chủng vi khuẩn có tính đối kháng (chủng tiềm năng) được lưu giữ và sử dụng cho nghiên cứu tiếp theo.

2.3. Đánh giá hoạt tính đối kháng của vi khuẩn đã tuyển chọn

Các chủng vi khuẩn tiềm năng đã phân lập được đánh giá hoạt tính đối kháng theo phương pháp của Živković & cs. (2010) dựa trên kích thước vùng ức chế nấm bệnh (Živković & cs., 2010). Chủng vi khuẩn tiềm năng được đồng nuôi cấy với nấm gây bệnh theo kiểu đối xứng hai bên trên đĩa petri chứa môi trường PDA. Vi khuẩn được cấy cách vành đĩa 1,5cm. Đĩa đối chứng chỉ cấy nấm bệnh *P. citrophthora* 18PMS và *P. palmivora* 17PMS. Đĩa thí nghiệm được ủ ở điều kiện 30°C trong 12 ngày và tiến hành thu số liệu kích thước vùng ức chế với nấm bệnh (vùng nấm bệnh không phát triển). Dựa vào kích thước này phân loại hoạt tính đối kháng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu. Hoạt tính đối kháng được phân loại theo mức: đối kháng yếu (> 0-5mm), đối kháng trung bình (> 5-10mm), đối kháng mạnh (> 10-15mm), đối kháng rất mạnh (> 15-20mm). Thí nghiệm được lặp lại 5 lần đối với mỗi chủng vi khuẩn.

2.4. Định danh chủng vi khuẩn đối kháng đã tuyển chọn

Để tiến hành định danh chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng, tiến hành phân tích trình tự 16S rRNA. DNA tổng số của các chủng vi khuẩn tuyển chọn được tách chiết bằng GeneJET Genomic DNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trình tự 16S rRNA được nhân lên bằng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3') và 1492R (5'-GGTACCTTGTTAC GACTT-3'). Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0,8%, tinh sạch và giải trình tự. Kết quả giải trình tự 16S rRNA của chủng tuyển chọn được căn trình tự trên Ngân hàng Gen nhờ công cụ Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Cây phân loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA6.

2.5. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh trưởng của chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15

Tiến hành đánh giá khả năng đồng hóa nguồn cacbon, khả năng yếm khí, khử nitrate, phân giải cellulose, ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến khả năng sinh trưởng của chủng *B. siamensis* LHB15.

- Khả năng đồng hóa nguồn cacbon của *B. siamensis* LHB15

Chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 được nuôi cấy trên môi trường LB. Sau đó chuyển từng khuẩn lạc đơn vào ống nghiệm chứa 5ml môi trường khoáng cơ bản ((NH₄)₂SO₄ (2,0 g/l); MgSO₄.7H₂O (0,2 g/l); NaH₂PO₄.H₂O (0,5 g/l); CaCl₂.2H₂O (0,1 g/l); K₂HPO₄ (0,5 g/l)) có bổ sung các nguồn cacbon khác nhau như: D-glucose, Saccarose, tinh bột, Glycerol và Maltose với nồng độ 1%. Ống đối chứng là ống không bổ sung vi khuẩn. Sau 3 ngày, tiến hành nhỏ dung dịch Bromothymol blue vào trong môi trường, nếu môi trường chuyển từ màu xanh sang màu da cam hoặc màu vàng nhạt là vi khuẩn có khả năng đồng hóa nguồn cacbon.

- Khả năng sử dụng nitrate

Chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 được nuôi trên môi trường LB. Sau đó chuyển khuẩn lạc đơn vào ống nghiệm chứa 5ml môi trường chọn lọc (meat extract 5 g/l; peptone 10 g/l, KNO₃ 1 g/l, pH = 7,0). Ống vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường chọn lọc được ủ ở điều kiện 28°C trong 3 ngày. Ống đối chứng là ống không bổ sung vi khuẩn. Sau thời gian nuôi cấy, thử hoạt tính lần lượt với 1 giọt dung dịch thuốc thử Griess và 1 giọt dung dịch thuốc thử Diphenylamine. Sau khi bổ sung thuốc thử Griess, nếu dung dịch nuôi cấy chuyển màu (đỏ, hồng, da cam hay nâu) là biểu thị có nitorite, tức là vi khuẩn có khả năng khử nitrate. Nếu dịch nuôi cấy không chuyển màu, thêm 1-2 giọt thuốc thử Diphenylamin để kiểm tra sự có mặt của nitrat. Dung dịch chuyển màu xanh lam được hiểu vi khuẩn không khử nitrate.

- Khả năng sinh trưởng trong điều kiện yếm khí

Chuẩn bị các ống nghiệm chứa 5ml môi trường chọn lọc (Peptone (2 g/l), NaCl (5 g/l), KH₂PO₄ (0,3 g/l), Bromothymol blue (1%),

pH = 7,0) và 0,5ml dung dịch glucose 1%. Sau đó tiến hành cấy chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 vào ống môi trường. Tiếp đến, bổ sung 1 lớp paraffin đã hấp khử trùng dày 5 mm để tạo điều kiện kỵ khí và được ủ ở điều kiện 28°C trong 3 ngày. Nếu ống môi trường chuyển từ màu từ xanh lá sang màu da cam, màu vàng nhạt hay màu xanh nước biển thì đó là vi khuẩn yếm khí.

- Xác định khả năng phân giải cellulose

Chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 được nuôi cấy trên môi trường khoáng (1 g/l NH_4NO_3 , 0,5 g/l K_2HPO_4 , 0,5 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/l NaCl, 0,1 g/l CaCl_2 , 0,02 g/l FeCl_3 , 0,05 g/l yeast extract, 15 g/l agar, pH = 7,0) có bổ sung 1% Carboxymethyl cellulose (CMC). Cấy chấm điểm vi khuẩn mới hoạt hóa trên đĩa petri chứa môi trường đã được chuẩn bị và ủ trong điều kiện 30°C. Sau 5 ngày, sử dụng thuốc thử Lugol để xác định khả năng phân giải CMC của vi khuẩn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

- Ảnh hưởng của yếu tố nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của vi khuẩn

Chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 được cấy trên môi trường LB đặc và nuôi cấy các mức nhiệt độ 22, 25, 30, 37 và 55°C. Khả năng sinh trưởng của vi khuẩn được đánh giá sau hai ngày nuôi cấy.

- Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng của vi khuẩn

Chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 được cấy trên môi trường thạch đĩa LB với các mức pH 5, 7, 9 và 11. Đánh giá khả năng sinh trưởng của vi khuẩn dựa trên sinh khối của vi khuẩn sau hai ngày nuôi cấy (Nguyễn Lâm Dũng, 2014).

2.6. Đánh giá khả năng kiểm soát nấm *P. citrophthora* 18 PMS của chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 trong điều kiện nhà lưới

Để đánh giá khả năng kiểm soát nấm *P. citrophthora* 18PMS của chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15, tiến hành so sánh hiệu lực kiểm soát nấm của chủng này với các công thức xử lý khác nhau trên cây cam lòng vàng sạch bệnh 1 năm tuổi. Cây cam được trồng trong bầu

cùng đất và giá thể (2kg giá thể/bầu) và đất được lây nhiễm chủng nấm *P. citrophthora* 18PMS (7ml dung dịch bào tử nấm/bầu với nồng độ 10^4 du động bào tử/ml) 50 ngày trước khi xử lý. Các công thức xử lý được bố trí như sau: Công thức 1: Chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 được nuôi cấy trong 3 ngày trên giá thể gạo đã được hấp khử trùng để đạt đến mật độ 10^8 cfu/g. Hòa 1,1g giá thể gạo có chứa chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 vào nước và tưới dịch vào trong bầu đất đã được lây nhiễm bằng nấm *P. citrophthora* 18PMS. Công thức 2 và công thức 3 được tiến hành tương tự nhưng thay chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 bằng chế phẩm chứa nấm *Trichoderma* (TRICÔ-ĐHCT) (với lượng sử dụng 0,42 g/bầu) hoặc hoạt chất Metalaxyl (Acody 35WP) (với liều lượng sử dụng 0,022 ml/bầu), tương ứng. Công thức 4 (đối chứng) không bổ sung vi khuẩn hay tác nhân ức chế khác. Tiến hành đánh giá tỉ lệ cánh hoa hồng mất màu có nấm *Phytophthora* trong đất và rễ cây cam được đánh giá trước và sau xử lý 30 và 45 ngày (Erwin & Ribeiro, 1996). Hiệu lực phòng chống nấm bệnh được tính tại thời điểm 30 và 45 ngày sau xử lý theo công thức Henderson-Tilton:

$$HQ(\%) = \left(1 - \frac{Ta \times Cb}{Ca \times Tb} \right) \times 100$$

Trong đó: Ta: Tỉ lệ % cánh hoa mất màu có *Phytophthora* sau xử lý (SXL); Tb: Tỉ lệ % cánh hoa mất màu có *Phytophthora* trước xử lý (TXL); Ca: Tỉ lệ % cánh hoa mất màu có *Phytophthora* đối chứng SXL; Cb: Tỉ lệ % cánh hoa mất màu có *Phytophthora* đối chứng TXL. Số liệu được tính toán bằng Excel và xử lý thống kê bằng phần mềm Statistics 9.1.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và tuyển chọn sơ bộ vi khuẩn đối kháng nấm bệnh *Phytophthora* spp.

Từ 221 mẫu đất trồng cam thu thập ở Hòa Bình và Tiền Giang, chúng tôi tiến hành phân lập được 38 chủng vi khuẩn và đánh giá sơ bộ khả năng đối kháng với nấm *P. citrophthora* 18PMS và *P. palmivora* 17PMS (Bảng 1).

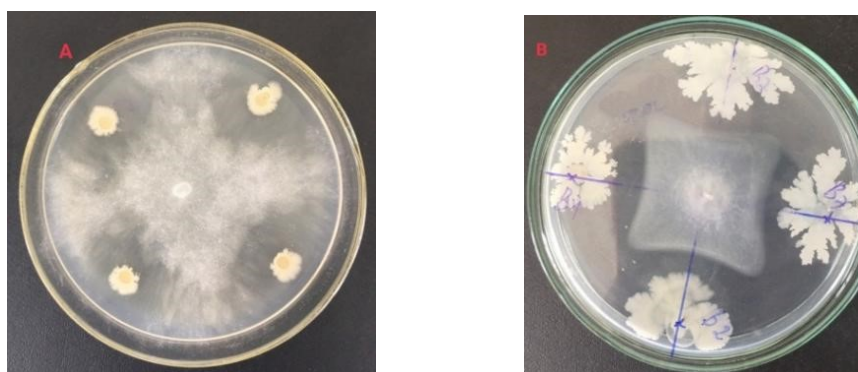
Đối với chủng nấm bệnh *P. citrophthora* 18PMS có 3/22 chủng vi khuẩn phân lập trên đất Hòa Bình và 1/16 chủng vi khuẩn phân lập trên đất Tiền Giang có tiềm năng đối kháng. Đối với chủng nấm bệnh *P. palmivora* 17PMS, có 5/22 chủng vi khuẩn phân lập trên đất Hòa Bình và 1/16 chủng phân lập trên đất tiền

Giang có tiềm năng đối kháng. Như vậy, qua khảo sát sơ bộ có 06 chủng tiềm năng có khả năng đối kháng với cả hai chủng nấm gây bệnh là B1, B2, B7, LHB15, LHB31 và LHB41. Các chủng vi khuẩn tiềm năng này là nguồn vật liệu để đánh giá khả năng đối kháng với nấm bệnh.

Bảng 1. Tuyển chọn sơ bộ vi khuẩn đối kháng với nấm bệnh *Phytophthora* spp.

Nguồn đánh giá	Tổng số chủng vi khuẩn	Khả năng đối kháng	Số lượng chủng vi khuẩn đối kháng với		Ký hiệu các chủng có tiềm năng đối kháng
			<i>P. citrophthora</i> 18PMS	<i>P. palmivora</i> 17PMS	
Mẫu đất Hòa Bình	22	+	3	5	LHB31, LHB41, B1, B2, B7
		-	19	17	
Mẫu đất Tiền Giang	16	+	1	1	LHB15
		-	15	15	

Ghi chú: (+): Có tiềm năng đối kháng; (-): Không có tiềm năng đối kháng.



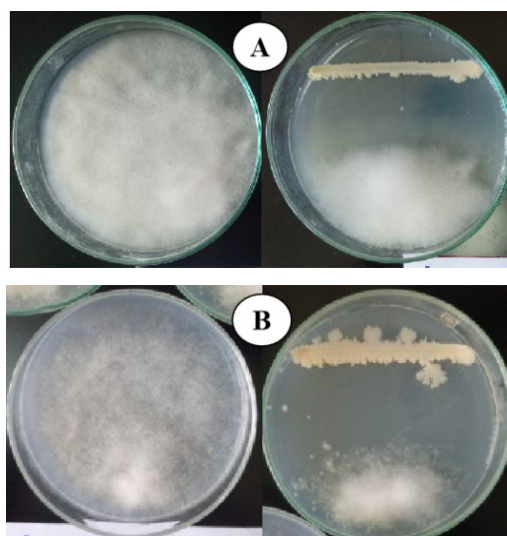
Ghi chú: A: Chủng vi khuẩn không có tiềm năng đối kháng, B: Chủng vi khuẩn có tiềm năng đối kháng với nấm bệnh.

Hình 1. Tuyển chọn sơ bộ chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *P. citrophthora* 18PMS

Bảng 2. Hoạt tính đối kháng với nấm bệnh *Phytophthora* spp. của các chủng vi khuẩn tiềm năng sau 12 ngày đồng nuôi cấy

Chủng	Kích thước vùng ức chế nấm bệnh (mm)		Đánh giá hoạt tính đối kháng	
	<i>P. citrophthora</i> 18PMS	<i>P. palmivora</i> 17PMS	<i>P. citrophthora</i> 18PMS	<i>P. palmivora</i> 17PMS
LHB 15	15,0	20,0	Mạnh	Rất mạnh
LHB 31	-	9,0	-	Trung bình
LHB 41	12,5	9,5	Mạnh	Trung bình
B1	17,0	10,0	Rất mạnh	Trung bình
B2	-	8,0	-	Trung bình
B7	13,0	10,0	Mạnh	Trung bình

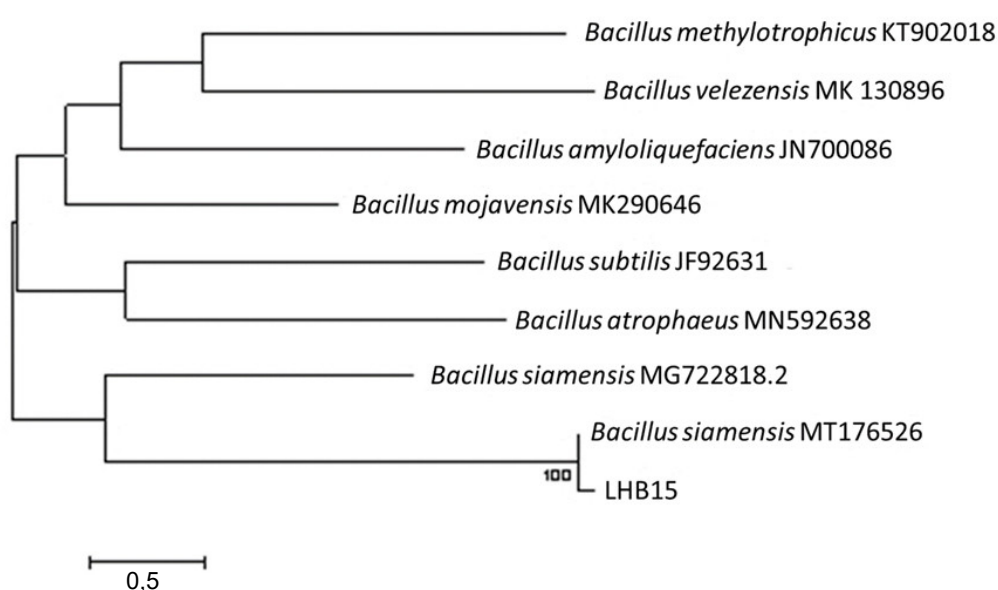
Ghi chú: (-): Không đối kháng, (> 0-5mm): Đối kháng yếu, (> 5-10mm): Đối kháng trung bình, (> 10-15mm): Đối kháng mạnh, (> 15-20mm): Đối kháng rất mạnh.



Hình 2. Biểu hiện tính đối kháng với nấm bệnh *P. citrophthora* 18PMS (A) và *P. palmivora* 17PMS (B) của chủng LHB15 sau 12 ngày đồng nuôi cấy

Bảng 3. Kết quả định danh các chủng vi khuẩn đối kháng bằng phân tích trình tự gen 16S rRNA

Chủng	Tỉ lệ trình tự so sánh (%)	Tỉ lệ tương đồng (%)	Trình tự tương đồng trên NCBI
B1	100	97,92	JN700086.1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. plantarum strain R08
B7	100	99,98	CP029069.1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ALB65
LHB41	99	97,78	KM853034.1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain WP104
LHB15	99	98,93	MG722818.2 <i>Bacillus siamensis</i> SB1001



Hình 3. Cây phân loại chủng LHB15 dựa trên trình tự 16S rRNA

3.2. Đánh giá hoạt tính đối kháng của chủng vi khuẩn đã tuyển chọn

Từ 06 chủng vi khuẩn có tiềm năng, chúng tôi tiếp tục tiến hành đánh giá hoạt tính đối kháng theo phương pháp đồng nuôi cấy trên đĩa petri (Bảng 2). Trong 06 chủng chọn lọc có 4 chủng vi khuẩn (LHB15, LHB41, B1, B7) thể hiện tính đối kháng trung bình đến rất mạnh với cả hai chủng nấm *P. citrophthora* 18PMS và *P. palmivora* 17PMS sau 12 ngày đồng nuôi cấy trên môi trường PDA. Trong đó chủng LHB15 (Hình 2) biểu hiện đối kháng mạnh và rất mạnh, vùng ức chế nấm bệnh đạt 15mm đối với *P. citrophthora* 18PMS và 20mm đối với *P. palmivora* 17PMS. Chủng LHB31 và B2 không đối kháng với nấm *P. citrophthora* 18PMS, đối kháng trung bình với *P. palmivora* 17PMS với vùng ức chế nấm bệnh tương ứng là 9mm và 8mm (Bảng 2).

3.3. Định danh chủng vi khuẩn đối kháng đã tuyển chọn

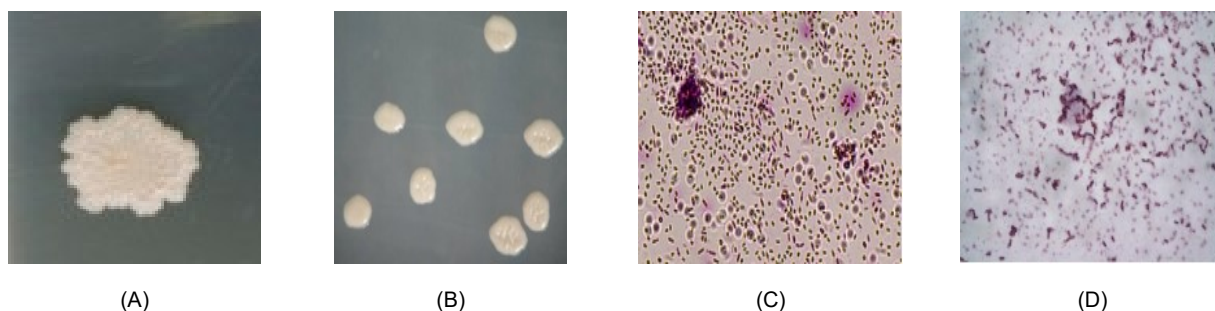
Dựa trên phân tích trình tự 16S rRNA, chúng tôi xác định các chủng vi khuẩn tiềm năng (B1, B7, LHB15, LHB41) là các chủng thuộc chi *Bacillus* (Bảng 3, Hình 3). Trong đó, chủng vi khuẩn B1, B7, LHB41 tương đồng cao với loài

Bacillus amyloliquefaciens, chủng vi khuẩn LHB15 tương đồng với loài *Bacillus siamensis*. Như vậy, các chủng thu thập được đều thuộc chi *Bacillus*. Dựa vào cây phân loại, chủng LHB15 cho hoạt tính đối kháng mạnh với nấm gây bệnh được xác định và đặt tên là loài *Bacillus siamensis* LHB15 (*B. siamensis* LHB15).

Các nghiên cứu về vi khuẩn *B. siamensis* cho thấy loài vi khuẩn này thường có đặc tính kháng nhiều loại nấm bệnh trên cây trồng (Gorai & cs., 2021; Park & cs., 2021). Chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 được đánh giá là chủng tiềm năng để tiến hành nghiên cứu sâu hơn.

3.4. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15

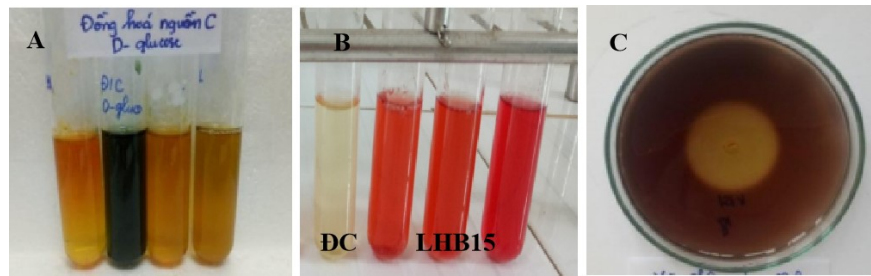
Tiến hành nuôi cấy, nhuộm gram tế bào, chúng tôi xác định được hình thái khuẩn lạc chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 là vi khuẩn gram dương (Hình 4D). Khuẩn lạc có màu trắng, lồi, không tròn, bề mặt bóng, không nhăn, không tiết sắc tố ra môi trường, kích thước 2-5mm (sau 72h, trên môi trường NA, ở $t = 30^{\circ}\text{C}$) (Hình 4B). Tế bào hình que ngắn, kích thước $(1,85-1,92) \times (0,64-0,71)\mu\text{m}$. Khuẩn lạc rìa răng cưa vàng nhạt, bề mặt nhẵn khi nuôi trên môi trường LB đặc (Hình 4A).



Hình 4. Hình thái khuẩn lạc trên môi trường LB (A), môi trường NA (B), tế bào (C) và nhuộm gram (D) của chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15

Bảng 4. Đặc điểm sinh học của chủng *B. siamensis* LHB15

Chỉ tiêu theo dõi	Đặc điểm
Khả năng đồng hóa cacbon	Có khả năng đồng hóa nhiều nguồn cacbon khác nhau như D-glucose, Saccarose, tinh bột, Glycerol và Maltose.
Khả năng phát triển trong điều kiện yếm khí	Không có khả năng sinh trưởng trong điều kiện yếm khí
Khả năng khử nitrate	Có khả năng khử nitrate
Khả năng phân giải cellulose	Có khả năng sinh enzyme phân giải cellulose



Hình 5. Khả năng đồng hóa D-glucose (A), khử nitrate (B), phân giải cellulose (C) của chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15

Bảng 5. Ảnh hưởng nhiệt độ nuôi cấy và độ pH đến sự sinh trưởng của vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 (sau 2 ngày nuôi cấy)

Nhiệt độ (°C)	Khả năng sinh trưởng
22	-
25	+
30	++
37	+++
57	-
Giá trị pH của môi trường	Kích thước khuẩn lạc (mm)
5	4,00
7	5,00
9	2,17
11	0

Ghi chú: (-): Sinh trưởng yếu; (+): Sinh trưởng trung bình; (++) : Sinh trưởng mạnh; (+++): Sinh trưởng rất mạnh.

Bảng 6. Hiệu lực phòng chống nấm *P. citrophthora* 18PMS trong đất của chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15

Công thức	Lượng bổ sung/bầu	Tỉ lệ cánh hoa mất màu trong đất trồng cam (%)			Hiệu lực (%)	
		TXL	30 ngày SXL	45 ngày SXL	30 ngày SXL	45 ngày SXL
<i>B. siamensis</i> LHB15	1,1g	54,33 ^a	49,20 ^b	37,20 ^c	36,52	63,08
<i>Trichoderma</i>	0,42g	48,67 ^a	49,60 ^b	46,80 ^b	28,56	48,15
Metalaxyl	0,022ml	52,67 ^a	18,80 ^c	17,20 ^d	74,98	82,39
Đối chứng	-	47,67 ^a	68,00 ^a	88,40 ^a	-	-
CV%		18,01	18,25	14,85		
LSD _{0,05}		8,40	7,77	6,46		

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột là sai khác nhau có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$; TXL: Trước xử lý, SXL: Sau xử lý.

Một số đặc điểm sinh học của chủng *B. siamensis* LHB15 đã được khảo sát và kết quả được trình bày trong bảng 4 và hình 5.

Chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 sinh trưởng thích hợp trong ngưỡng nhiệt độ 30-37°C

và nhiệt độ tối ưu là 37°C, ở giá trị pH 5-9 và giá trị pH tối ưu của môi trường nuôi cấy là 7 (Bảng 5). Kết quả này là những thông số quan trọng phục vụ mục tiêu nhân nuôi thu sinh khối chủng vi khuẩn.

Bảng 7. Hiệu lực phòng chống nấm *P. citrophthora* 18PMS trong rễ cây của chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15

Công thức	Lượng bổ sung/bầu	Tỉ lệ cánh hoa mất màu trong rễ trồng cam (%)			Hiệu lực (%)	
		TXL	30 ngày SXL	45 ngày SXL	30 ngày SXL	45 ngày SXL
<i>B. siamensis</i> LHB15	1,1g	38,80 ^b	28,00 ^c	10,40 ^c	46,71	84,59
<i>Trichoderma</i>	0,42g	52,40 ^a	40,00 ^b	38,40 ^b	43,63	57,87
Metalaxyl	0,022ml	40,00 ^b	6,80 ^d	4,80 ^d	87,45	93,10
Đối chứng	-	38,40 ^b	52,00 ^a	66,80 ^a	-	-
CV%		21,81	17,52	19,10		
LSD _{0,05}		8,49	5,10	5,28		

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột là sai khác có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$. TXL: Trước xử lý, SXL: sau xử lý.

3.5. Đánh giá khả năng kiểm soát nấm *P. citrophthora* 18PMS của vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 trong điều kiện nhà lưới

Để đánh giá hiệu quả của chủng *B. siamensis* LHB15 trong điều kiện nhà lưới, chúng tôi chỉ tiến hành đánh giá hiệu lực kiểm soát nấm *P. citrophthora* 18PMS. Đây là chủng nấm chính phân lập từ mẫu bệnh chảy gôm trên cây Cam ở Việt Nam. Hiệu lực kiểm soát nấm của chủng *B. siamensis* LHB15 được thể hiện qua khả năng kiểm soát nấm gây bệnh trong đất và trong rễ của cây cam thí nghiệm. Đối với khả năng kiểm soát nấm bệnh trong đất, mẫu đất được thu vào 2 thời điểm là 30 và 45 ngày sau xử lý (Bảng 6). Ngoài ra khả năng kiểm soát nấm trong rễ cây cũng được đánh giá và trình bày trong bảng 7.

Kết quả trong bảng 6 cho thấy, xử lý vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 cho hiệu lực phòng chống nấm *P. citrophthora* 18PMS đạt 36,52% sau 30 ngày xử lý và tăng lên 63,08% sau 45 ngày xử lý. So sánh hiệu lực của việc xử lý đất bằng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 với các phương thức khác cho thấy, hiệu lực của chủng vi khuẩn này cao hơn chế phẩm nấm *Trichoderma* và thấp hơn hoạt chất kháng nấm Metalaxyl. Tương tự, hiệu lực phòng chống nấm trong rễ cây của chủng *B. siamensis* LHB15 đạt 46,71% sau 30 ngày xử lý và tăng lên 84,59% sau 45 ngày xử lý. Hiệu lực của chủng vi khuẩn này cao hơn hiệu quả của việc xử lý với chế phẩm nấm *Tricoderma*.

Tuy nhiên, việc xử lý vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 trong đất nhiễm nấm *P. citrophthora* 18PMS vẫn đạt hiệu quả thấp hơn chất diệt nấm Metalaxyl sau 30 ngày và 45 ngày xử lý (Bảng 7). Như vậy, có thể thấy rằng việc xử lý đất trồng với chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 có tác dụng phòng và chống lại nấm *P. citrophthora* 18PMS trong cả đất trồng và trong rễ cây cam. Các nghiên cứu khác trên loài vi khuẩn *B. siamensis* cũng cho thấy rằng loài vi khuẩn này có khả năng kiểm soát nấm *Phytophthora* spp. trong đất (Barquero & cs., 2016; Mi & cs., 2021). Như vậy, chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 có tiềm năng trong việc sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ nấm *Phytophthora* spp. gây bệnh chảy gôm trên cây cam

4. KẾT LUẬN

Từ 38 chủng vi khuẩn phân lập từ đất trồng cam Hòa Bình và Tiền Giang, chúng tôi đã đánh giá và tuyển chọn được chủng vi khuẩn LHB15 có hoạt tính đối kháng mạnh với hai chủng nấm gây bệnh chảy gôm *P. citrophthora* 18PMS và *P. palmivora* 17PMS. Kết quả định danh bằng phân tích trình tự và kết hợp hình thái, chủng vi khuẩn LHB15 được xác định là *B. siamensis*. Khảo sát các đặc điểm sinh học cho thấy, chủng vi khuẩn *B. siamensis* LHB15 sinh trưởng tối ưu ở nhiệt độ 37°C và pH = 7, có khả năng đồng hóa nguồn cacbon đa dạng, có khả năng khử nitrat, không có khả năng sống yếm khí và có khả năng sinh enzyme phân giải cellulose.

Chủng vi khuẩn này có hiệu lực phòng chống nấm bệnh *P. citrophthora* 18PMS trong đất và trên cây cam trong điều kiện nhà lưới. Hiệu lực phòng chống đạt 63,08% trong đất và 84,59% trong rễ cây sau 45 ngày xử lý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Barquero M., Terrón A., Velázquez E. & González-Andrés F. (2016). Biocontrol of *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* and *Phytophthora capsici* with autochthonous endophytes in common bean and pepper in Castilla y León (Spain). Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction. Springer International Publishing. pp. 221-235.
- Drenth A. & Guest D. (2004). Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia. ACIAR monograph. 114.
- Erwin D.C. & Ribeiro O.K. (1996). Phytophthora diseases worldwide. APS Press, American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 562p.
- Gorai P.S., Ghosh R., Mandal S., Ghosh S., Chatterjee S., Gond S.K. & Mandal N.C. (2021). *Bacillus siamensis* CNE6- a multifaceted plant growth promoting endophyte of *Cicer arietinum* L. having broad spectrum antifungal activities and host colonizing potential. Microbiological Research. 252: 126859.
- Graham J. & Feichtenberger E. (2015). Citrus phytophthora diseases: Management challenges and successes. Journal of Citrus Pathology. 2.
- Jagtap G.P., Dhavale M. & Dey U. (2012). Evaluation of natural plant extracts, antagonists and fungicides in controlling root rot, collar rot, fruit (brown) rot and gummosis of citrus caused by *Phytophthora* spp. *in vitro*. pp. 27-47.
- Jamali F., Sharifi-Tehrani A., Okhovvat M., Zakeri Z. & Saberi-Riseh R. (2004). Biological control of chickpea Fusarium wilt by antagonistic bacteria under greenhouse condition. Commun Agric Appl Biol Sci. 69(4): 649-51.
- Mekonen M., Ayalew A., Weldetsadik K. & Awol S. (2015). Assessing and Measuring of Citrus gummosis (*Phytophthora* spp.) in Major Citrus Growing Areas of Ethiopia. Journal of Horticulture. 2: 154.
- Mi Y., Zhao X., Liu F., Sun C., Sun Z. & Liu L. (2021). Changes in soil quality, bacterial community and anti-pepper Phytophthora disease ability after combined application of straw and multifunctional composite bacterial strains. European Journal of Soil Biology. 105: 103329.
- Mounde L.G., Ateka E.M., Kihurani A.W., Wasilwa L. & Thurair E.G. (2009). Occurrence and distribution of citrus gummosis (*Phytophthora* spp.) in Kenya. Journal of Horticultural Science. 2.
- Nguyễn Lân Dũng (2014). Giáo trình vi sinh vật học, Nhà xuất bản Hà Nội. tr. 198-212.
- Park B.R., Son H.J., Park J.H., Kim E.S., Heo S.J., Youn H.R., Koo Y.M., Heo A.Y., Choi H.W., Sang M.K., Lee S.W., Choi S.H. & Hong J.K. (2021). Chemical Fungicides and *Bacillus siamensis* H30-3 against Fungal and Oomycete Pathogens Causing Soil-Borne Strawberry Diseases. The plant pathology journal. 37(1): 79-85.
- Rajput N., Atiq M., Tariq H., Modassar W. & Hameed A. (2020). Citrus Gummosis: A Formidable Challenge to Citrus Industry: A Review. 16: 131-144.
- Saidi N., Kouki S., M'hiri F., Hajlaoui M.R., Mahrouk M., Ouzari H., Jedidi N. & Hassen A. (2009). Characterization and selection of *Bacillus* sp. strains, effective biocontrol agents against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, the causal agent of Fusarium crown and root rot in tomato. Annals of Microbiology. 59(2): 191.
- Tổng cục Thống kê (2021). Thông cáo báo chí về tình hình kinh tế - xã hội quý IV và năm 2021. Truy cập từ <https://www.gso.gov.vn/du-lieu-va-so-lieu-thong-ke/2021/12/thong-cao-bao-chi-ve-tinh-hinh-kinh-te-xa-hoi-quy-iv-va-nam-2021/> ngày 01/03/2022.
- Živković S., Stojanović S., Ivanović Ž., Veljko G., Popović T. & Balaž J. (2010). Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Archives of Biological Sciences. 62.