

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG *Ralstonia solanacearum* GÂY BỆNH HÉO XANH LẠC VÀ VÙNG

LÊ NHƯ KIỂU, TRẦN QUANG MINH, LÊ THỊ THANH THỦY, NGUYỄN VĂN HUÂN

1. MỞ ĐẦU

Hiện nay lạc và vùng được trồng rất phổ biến ở các nước trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng, đây là hai loại cây công nghiệp ngắn ngày nhưng cho hiệu quả kinh tế cao trên một đơn vị diện tích, đặc biệt cây vùng có thể trồng ở những vùng đất cằn cỗi, khô hạn. Song thực tế sản xuất 2 loại cây trồng này gặp rất nhiều khó khăn, trong đó bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây ra là một trở ngại lớn nhất. Ở nước ta bệnh héo xanh do vi khuẩn đã phát sinh ở hầu hết các địa phương có trồng vùng và lạc như: Hà Nội, Vĩnh Phúc, Bắc Ninh, Bắc Giang, Thái Nguyên, Thanh Hoá, Nghệ An... có nơi, có lúc bệnh đã gây thiệt hại nặng tới mức gây chết 100% cây trồng. Mặc dù người nông dân đã áp dụng nhiều biện pháp phòng trừ bệnh, kể cả sử dụng các loại thuốc bảo vệ thực vật hóa học nhưng hiệu quả thu được không như mong muốn, trái lại còn gây ảnh hưởng xấu đến môi trường sinh thái, sức khỏe cộng đồng [6]. Đáng ngại hơn là sự tùy tiện về liều lượng cũng như thời gian phun thuốc đã để lại một lượng thuốc khá cao trong các sản phẩm nông nghiệp và gây ra những vụ ngộ độc ảnh hưởng lớn đến sức khỏe con người.

Thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc sinh học ra đời đã khắc phục được những nhược điểm vốn có của thuốc bảo vệ thực vật hóa học và tăng cường bảo vệ môi trường. Trong đó hướng sử dụng các nhóm vi sinh vật có khả năng đối kháng với các tác nhân gây bệnh cho thực vật đã được quan tâm đặc biệt ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới và Việt Nam [2]. Trong phạm vi bài báo này, các tác giả sẽ đưa ra một số kết quả phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng cao với vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh lạc và vùng để sản xuất các chế phẩm vi sinh đối kháng ứng dụng trong sản xuất lạc và vùng ở Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Hai chủng vi khuẩn *R. solanacearum* (TS3 và SV2) nhận từ phòng thí nghiệm vi sinh và có nguồn gốc phân lập từ cây lạc, vùng bị bệnh thu thập từ hai huyện Nghi Lộc và Yên Thành tỉnh Nghệ An. Các chủng vi khuẩn đối kháng *R. solanacearum* phân lập từ đất trồng lạc, vùng. Các loại cây lạc, vùng đang trồng phổ biến ở miền Bắc. Môi trường KingB (Yeast extract 5 g; pepton 20 g; glyxerin 5 ml; K_2HPO_4 (12,5%) 12 ml; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (6,25%) 25 ml; nước cất 1000 ml), TTC (pepton 10 g; casein hydrolyzat 1 g; glucoza 5 g; thạch 20 g; nước cất 1 lần 1000 ml. Khử trùng ở 0,5 ở 121°C, 20 phút, làm lạnh đến 60°C và thêm 5 ml 2-3-5 Triphenyl Tetrazolium Chloride 1%).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân lập vi khuẩn đối kháng tiến hành theo Geels và Schippers -1983. 10 g đất được khuấy đều trong 90 ml nước cất khử trùng, lắc 30 phút, để lắng tự nhiên, lấy phần dịch trong để phân lập vi khuẩn đối kháng. Mẫu thu từ các cây được nghiền trong cối sứ có chứa 1 ml nước cất khử trùng, bỏ cặn, sử dụng phần dịch để phân lập vi khuẩn đối kháng. *Bước 1:* Mỗi mẫu dịch trên được pha loãng đến nồng độ nhất định, sao cho khi dùng 0,1 ml trải đều trên bề mặt môi trường KB hoặc PDA, ủ ở nhiệt độ 28°C ÷ 30°C trong 24 ÷ 48 giờ có thể nhìn rõ các khuẩn lạc riêng biệt. *Bước 2:* Những khuẩn lạc có sắc tố vàng, nâu hoặc xanh nhạt được hoà loãng trong các ống eppendorf riêng biệt, dùng 100µl dung dịch trải đều trên bề mặt đĩa môi trường KB hoặc PDA (mật độ tế bào trong dung dịch sao cho sau khi ủ ở 28°C ÷ 30°C trong 24 ÷ 48 giờ có thể nhìn rõ các khuẩn lạc riêng biệt). *Bước 3:* Phun dịch vi khuẩn gây bệnh héo xanh phủ lên bề mặt môi trường, ủ ở nhiệt độ 28°C ÷ 30°C trong 24 ÷ 48 giờ. *Bước 4:* Quan sát các đĩa môi trường, nếu xuất hiện những vùng ức chế (vòng vô khuẩn), nghĩa là có vi khuẩn đối kháng tại điểm đó. *Bước 5:* Những tế bào vi khuẩn đối kháng được làm sạch và giữ trong nước cất khử trùng hoặc glyxerol 30% ở - 80°C để sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

Phương pháp xác định hoạt tính đối kháng vi khuẩn gây bệnh: bằng cách đo đường kính vòng ức chế; đó là vòng tròn trong suốt bao quanh khuẩn lạc (đối với trường hợp cấy điểm) hoặc lỗ thạc (đối với trường hợp khoan lỗ thạc), nơi mà vi sinh vật gây bệnh không sinh trưởng được [5].

Phương pháp đánh giá độc tính của vi khuẩn đối kháng đối với chuột bạch: theo phương pháp LD₅₀ oral (liều gây chết trung bình 50% cá thể chuột khi thuốc xâm nhập qua đường miệng) của NIAST, 2003. Chuột bạch có trọng lượng 18 g/con được nuôi ổn định trong 3 ngày, sau đó phân thành các công thức tương ứng với số lượng chủng vi khuẩn đối kháng thí nghiệm và chủng *B.subtilis* trong men tiêu hóa làm đối chứng dương, mỗi chủng vi khuẩn kiểm định được tiến hành trên 15 con và chia thành 3 lô, mỗi lô được bố trí ăn thức ăn đã được trộn với dịch vi khuẩn đối kháng tương ứng với các nồng độ 2.10⁷; 2.10⁸ và 2.10⁹ tb/g thức ăn. Theo dõi các triệu chứng bất thường của chuột trong vòng 24 giờ để đánh giá mức độ gây độc cấp tính và theo dõi khả năng gây độc bán trường diễn trong 30 ngày của các chủng vi khuẩn đối kháng.

Phương pháp đánh giá tính độc của các chủng vi khuẩn trên cây trồng, theo 10TCN: 216-1995 (216-2003). Dịch nuôi cấy của từng chủng được bổ sung trực tiếp vào đất trước khi trồng cây với mật độ khoảng 10⁵ - 10⁹ tb/gram, theo dõi tỉ lệ cây nhiễm bệnh sau 2 tháng (thí nghiệm tại Viện Thổ nhưỡng Nông hóa) [3, 4].

Phân loại vi sinh vật bằng xác định trình tự gen 16S rRNA: i) Sử dụng chương trình BLAST để phát hiện những trình tự tương đồng với các trình tự nucleotit nghiên cứu đã được công bố trong ngân hàng gen, nhằm xác nhận trình tự đích và chọn một số trình tự có độ tương đồng cao để so sánh và phân tích. ii) Sử dụng chương trình phần mềm máy tính MEGA2 để đối chiếu. Phân tích và xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phương pháp tối thiểu (Maximum Parsimony- MP method) và phương pháp tiến hoá tối thiểu (Minimum Evolution - ME method) trên cơ sở khoảng cách di truyền theo mô hình Kimura, dựa vào cây phả hệ người ta xác định được mối quan hệ của các chủng vi sinh vật cần kiểm tra [1].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập các chủng vi khuẩn đối kháng

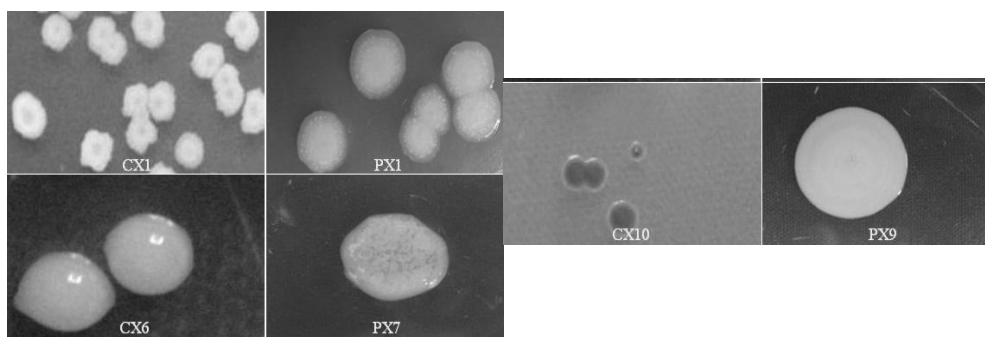
Từ các mẫu đất, cây lạc và vùng khỏe thu thập ở các xã thuộc huyện Nghi Lộc và Yên Thành, tỉnh Nghệ An, đã phân lập và tuyển chọn được 7 chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng

với vi khuẩn *R. solanacearum*, kích thước vòng ức chế đạt từ 10 mm – 18 mm, như vậy có thể xếp các chủng vi khuẩn này thuộc loại có hoạt lực đối kháng tương đối cao. Đây là các chủng vi khuẩn đối kháng có tiềm năng cao trong sản xuất chế phẩm vi sinh phòng trừ bệnh héo xanh lác và vùng. Kết quả thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Hoạt lực đối kháng của các chủng vi khuẩn phân lập

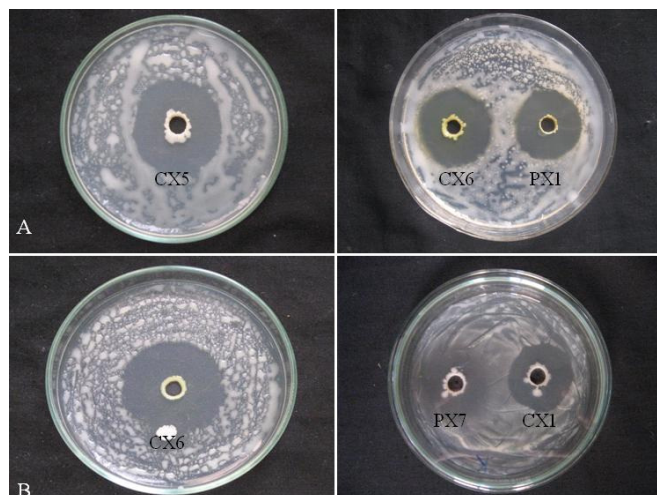
TT	Kí hiệu chủng	Nguồn gốc	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc	Đường kính vòng ức chế (mm)	
				Rs vùng	Rs lạc
1	CX ₁	Đất và cây lạc, vùng khôe tại huyện Nghi Lộc, Nghệ An	Khuẩn lạc tròn to, bẹt, mép có răng cưa, màu trắng, dạng bột	12	12
2	CX ₅		Khuẩn lạc tròn kích thước trung bình, tâm hơi nhẵn, mép trơn, màu xám nhạt, dạng bột	18	18
3	CX ₆		Khuẩn lạc tròn nhỏ bóng, màu vàng, hơi nhày	16	16
4	CX ₈		Khuẩn lạc dạng hình ovan, trắng, chảy nhót	-	-
5	CX ₁₀		Khuẩn lạc tròn nhỏ, hơi lồi màu đỏ, nhày	14	14
6	CX ₁₃		Khuẩn lạc tròn to, bẹt, mép có răng cưa, vàng cam, dạng bột	-	-
7	PX ₁	Đất và cây lạc, vùng khôe tại huyện Yên	Khuẩn lạc tròn to, lồi bóng, màu xám, sắc tố màu nâu nhày	12	12
8	PX ₇	Thành, Nghệ An	Khuẩn lạc tròn to, bề mặt khuẩn lạc tròn lồi, màu trắng sữa, hơi nhày	10	10
9	PX ₉		Dạng không chuẩn mực, vòm lồi, mép khuẩn lạc không màu, bẹt, trắng, nhày	10	10
10	PX ₁₂		Khuẩn lạc kích thước trung bình, dẹt trong, bề mặt phẳng nhẵn, màu xanh đen, nhày	-	-

Chú thích: Rs: *Ralstonia solanacearum*



Hình 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của một số chủng vi khuẩn đối kháng

Hình 1 cho thấy, hầu hết khuẩn lạc các chủng tuyển chọn đều có hình tròn, kích thước từ 2 - 10 mm, màu sắc đa dạng từ màu trắng đến màu đỏ, bề mặt nhẵn, trơn, hoặc xù xì, mép nhẵn hoặc có hình răng cưa. Hình 2 minh họa tính đối kháng của các chủng vi khuẩn tuyển chọn thể hiện qua đường kính vòng ức chế của chúng với 2 loại vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh lác và vàng, các vòng ức chế thể hiện rất rõ và điển hình.



Hình 2. Hoạt lực đối kháng của một số chủng vi khuẩn đối kháng trong điều kiện in vitro
A: *R. solanacearum* TS3 gây bệnh héo xanh lác
B: *R. solanacearum* SV2 gây bệnh héo xanh vàng

Bảng 2. Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn đối kháng

STT	Kí hiệu chủng	Gram	Sinh trưởng hiếu khí	Sinh trưởng kỵ khí	Hình thái khuẩn lạc trên YDC	Phát quang trên KB	Sinh trưởng trên DIM	Oxydase	Sinh bào tử
1	CX ₁	+	+	+	Khô	-	-	±	+
2	CX ₅	+	+	+	Nhăn, xám	-	-	±	+
3	CX ₆	-	+	+	Nhày, vàng	-	-	-	-
4	CX ₈	-	+	-	Nhày	-	-	-	-
5	CX ₁₀	-	+	-	Đỏ, nhày	+	±	+	-
6	CX ₁₃	+	+	+	Khô	-	±	-	+
7	PX ₁	-	+	-	Nhày, xám	+	-	-	-
8	PX ₇	-	+	-	Trắng	+	-	-	-
9	PX ₉	-	+	-	Trắng nhày	-	-	+	-
10	PX ₁₂	-	+	-	Xanh, nhày	-	-	-	-

Chú thích: +: dương tính, -: âm tính, ±: yếu.

Kết quả bảng 2 cho thấy, tất cả các chủng đều là loại hiếu khí, 4 chủng CX1, CX5, CX6 và CX13 có thể vừa sinh trưởng ở điều kiện kỵ khí vừa sinh trưởng hiếu khí, 3 chủng CX1, CX5 và CX13 Gram dương, các chủng còn lại là Gram âm, có 2 chủng sinh bào tử (CX1 và CX5). Dựa vào các đặc điểm sinh học cơ bản của các chi (genus) phổ biến theo N.W. Schaad (2001), 03 chủng CX10, PX1, PX7 có thể thuộc chi *Pseudomonas* và các chủng CX1, CX5 và CX13 thuộc chi *Bacillus*, chủng CX6, CX8 và CX12 thuộc chi *Erwinia* và chủng PX9 thuộc chi *Burkholderia*. Các chủng vi khuẩn thuộc các chi này đã được thông báo là có khả năng tổng hợp các chất trao đổi kháng khuẩn và được sử dụng rộng rãi trong phòng trừ bệnh cây trồng.

3.2. Đánh giá độc tính của các chủng vi khuẩn đối kháng đối với cây lạc và vừng

Các chủng vi sinh vật đối kháng khi đưa ra ngoài môi trường tự nhiên phải đảm bảo không gây bệnh cho thực vật và động vật. Bởi vậy đánh giá độc tính của các chủng vi sinh vật đối kháng là yêu cầu bắt buộc để có thể tiếp tục tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Tiến hành đánh giá độc tính của các chủng vi khuẩn đối kháng đối với cây trồng. Các thí nghiệm được tiến hành trong nhà lưới quy mô nhỏ trên cả hai loại cây trồng lạc và vừng, mỗi loại 10 cây. Theo dõi tỉ lệ cây chết, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Đánh giá độc tính của các chủng vi khuẩn đối kháng với cây lạc và vừng quy mô nhà lưới

TT	Kí hiệu chủng	Tỉ lệ cây chết (%) lần 1		Tỉ lệ cây chết (%) lần 2		Tỉ lệ cây chết (%) lần 3	
		Cây lạc	Cây vừng	Cây lạc	Cây vừng	Cây lạc	Cây vừng
1	CX ₁	0	0	0	0	0	0
2	CX ₅	0	0	0	0	0	0
3	CX ₆	60	46	0	0	0	0
4	CX ₈	25	28	0	0	0	0
5	CX ₁₀	0	0	0	0	0	0
6	CX ₁₃	0	0	0	0	0	0
7	PX ₁	0	0	0	0	0	0
8	PX ₇	0	0	0	0	0	0
9	PX ₉	0	0	0	0	0	0
10	PX ₁₂	0	0	0	0	0	0
11	<i>B.subtilis</i>	0	0	0	0	0	0
12	TS3	100	100	100	100	100	100
13	SV2	100	100	100	100	100	100

Chú thích: chủng *B. subtilis* trong men tiêu hóa dùng cho người (hãng Pastyl Bio).

TS3: chủng *R. solanacearum* gây bệnh lạc; SV2: chủng *R. solanacearum* gây bệnh vừng.

Kết quả bảng 3 cho thấy, ở các công thức trồng lạc và vùng có bổ sung chủng CX₆ và CX₈ thì xuất hiện cây chết nhũn, lá thâm nhợt và đen ở lần 1; các thí nghiệm lần 2 và 3 không thấy xuất hiện bệnh này, có thể trong quá trình thí nghiệm lần 2 và 3 đất không bị nhiễm loại vi khuẩn gây bệnh thối nhũn. Tại những công thức bổ sung các chủng vi khuẩn đối kháng còn lại đều không gây chết cây, riêng công thức bổ sung chủng TS3 và SV2 (các chủng vi khuẩn gây bệnh héo xanh) thể hiện độc tính mạnh đối với lạc và vùng, gây chết 100% cây. 02 chủng CX₅ và PX₁ ngoài khả năng đối kháng chúng còn có khả năng kích thích sinh trưởng cho cả lạc và vùng (kết quả không thể hiện ở đây) được chọn để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Như vậy, hầu hết các chủng vi khuẩn đối kháng đều không gây độc với cây trồng và có thể sử dụng để sản xuất chế phẩm vi sinh đối kháng phòng chống bệnh héo xanh lạc và vùng.

3.3. Đánh giá tính độc của vi khuẩn đối kháng đối với chuột bạch

Tuy nhiên để đánh giá tính an toàn sinh học của các chủng vi sinh vật nghiên cứu đối với môi trường, cũng như sức khỏe cộng đồng, đã tiến hành cho chuột ăn và uống trực tiếp dịch của 10 chủng vi khuẩn trên với các liều lượng cao nhất (2.10^9 tb/ml dịch uống và 2.10^9 tb/g thức ăn), trong 30 ngày liên tiếp và theo dõi sự thay đổi các hiện tượng sinh lý (trọng lượng, các triệu chứng phát sinh không bình thường) và giải phẫu các cơ quan nội tạng của chuột, chủ yếu là gan.

Kết quả cho thấy, tất cả 150 con chuột thí nghiệm đều phát triển bình thường sau 30 ngày, không thể hiện bất kỳ một biểu hiện khác thường nào, các mẫu gan của chuột ở các lô thí nghiệm và lô đối chứng có trọng lượng và kích thước tương đương nhau và không có hiện tượng xuất huyết hay hoại tử. Như vậy các chủng vi khuẩn đối kháng này là an toàn, không gây độc cho động vật máu nóng tức là cũng không có khả năng gây độc cho người và có thể sử dụng để sản xuất chế phẩm vi sinh đối kháng.



Hình 3. Thí nghiệm đánh giá tính độc trên chuột bạch

3.4. Đánh giá tác dụng hạn chế bệnh héo xanh lạc và vùng của các chủng vi khuẩn đối kháng

Chủng PX₁ thuộc chi *Pseudomonas* và CX₅ thuộc chi *Bacillus* được chọn để thí nghiệm. Trong điều kiện nhà lưới, hạt được ủ nảy mầm rồi được tẩm dung dịch vi khuẩn đối kháng ở mật độ 10^6 - 10^7 tb/ml dịch, sau đó hạt được trồng trên đất đã bổ sung vi khuẩn gây bệnh ở mật độ 10^6 - 10^7 tb/g đất, thí nghiệm được theo dõi trong 40 ngày, kết quả minh họa ở bảng 4 và 5.

Kết quả bảng 4 cho thấy, sau lây bệnh nhân tạo trên giống vùng trắng V6 triệu chứng bệnh héo xanh vi khuẩn bắt đầu xuất hiện ngay từ lần theo dõi đầu tiên (sau 10 ngày), tăng dần theo thời gian và đạt tỉ lệ cao nhất sau 40 ngày. Ở công thức bổ sung chủng CX5 tỉ lệ cây chết 27,1%

và công thức bổ sung chủng PX1 là 23,33%. Như vậy, các chủng vi khuẩn đối kháng CX5, PX1 đã làm giảm tỉ lệ bệnh héo xanh vùng so với ĐC (+) lần lượt là 66,64% và 71,31%.

Bảng 4. Tác dụng hạn chế bệnh héo xanh giống vùng trắng V6 của một số chủng vi khuẩn đối kháng

Công thức	Tỉ lệ bệnh (%) sau lây bệnh nhân tạo			
	10 ngày	15 ngày	20 ngày	40 ngày
CT1: <i>R. solanacearum</i> SV2 (ĐC+)	18	45,67	72	81,23
CT2: bổ sung chủng CX5	0	6,3	23,67	27,1
CT3: bổ sung chủng PX1	0	3,3	21	23,3
LSD 5%	2,0	11,78	5,93	8,94

Kết quả bảng 5 cho thấy, triệu chứng bệnh héo xanh xuất hiện muộn sau 15 ngày lây bệnh nhân tạo, bệnh chỉ xuất hiện ở công thức CT1 (ĐC+) -14%. Ở các lần theo dõi sau bệnh mới xuất hiện ở các công thức có bổ sung chủng CX5, PX1 với tỉ lệ $\leq 12\%$, tuy nhiên bệnh có tăng dần theo thời gian và đạt tỉ lệ cao nhất sau 40 ngày, ở công thức CT2 tỉ lệ này là 14,33% và công thức CT3 là 21,67%. Như vậy, các chủng vi khuẩn đối kháng CX5, PX1 đã làm giảm tỉ lệ bệnh héo xanh lạc so với ĐC (+) lần lượt là 74,41% và 61,3%.

Bảng 5. Tác dụng hạn chế bệnh héo xanh giống lạc MD7 của một số chủng vi khuẩn đối kháng

Công thức	Tỉ lệ bệnh (%) sau lây bệnh nhân tạo			
	10 ngày	15 ngày	20 ngày	40 ngày
CT1: <i>R. solanacearum</i> TS3 (ĐC+)	0,00	14	28	56
CT2: bổ sung chủng CX5	0,00	0	6,67	14,33
CT3: bổ sung chủng PX1	0,00	4	12	21,67
LSD 5%	-	3,65	4,72	7,83



Hình 4. Thí nghiệm đánh giá khả năng hạn chế bệnh héo xanh lạc



Hình 5. Thí nghiệm đánh giá khả năng hạn chế bệnh héo xanh vùng

3.5. Kết quả phân loại các chủng vi khuẩn đối kháng

Theo kết quả đọc trình tự nucleotit gen 16S rARN của 2 chủng vi khuẩn và phân loại theo chương trình BLAST cho thấy: chủng PX1 tương đồng 99,9% với loài *Pseudomonas aeruginosa*; CX5 tương đồng 99,9% với loài *Bacillus megaterium*. Đây là các chủng đã được xem là không độc hại với môi trường và con người.

Trình tự nucleotit minh họa của chủng PX1:

```
GCGAGCGGCGGACGGGTGAGtAATGCCTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAA  
CGGGCGcTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATTAGATGA  
GCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACGTGGTCTGAGA  
GGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATT  
GGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCcGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACT  
TTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTGATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGG  
CTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG  
CGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTG
```

Trình tự nucleotit minh họa của chủng CX5:

```
TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAaC  
CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTtGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCCTTA  
CAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGA  
CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG  
GAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTA  
AAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAA  
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG  
CGGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC
```

4. KẾT LUẬN

10 chủng vi khuẩn phân lập và tuyển chọn được có hoạt tính đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum*, an toàn đối với cây trồng và động vật máu nóng. Trong đó, chủng CX5 thuộc chi *Bacillus* và PX1 thuộc chi *Pseudomonas* vừa có khả năng kiểm soát bệnh héo xanh vi khuẩn do *R. solanacearum* trên cả lạc và vùng. Chủng CX5 làm giảm tỉ lệ vùng chết héo là 66.64% và lạc là 74.41% so đối chứng; với chủng vi khuẩn PX1 tỉ lệ này là 71.31% và 61.3%, vừa có khả năng kích thích sinh trưởng cây trồng, do đó chúng có tiềm năng cao trong sản xuất chế phẩm vi sinh đối kháng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Như Kiều, Nguyễn Ngọc Cường, Shin san Ichi Ito - Phân tích ADN của một số chủng vi khuẩn đối kháng với vi khuẩn gây bệnh héo xanh cà chua, Tạp chí Công nghệ sinh học **1** (1) (2003) 79-84.
2. Lê Như Kiều - Triển vọng ứng dụng vi sinh vật hữu ích trong nông nghiệp và bảo vệ môi trường, Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam **2** (7) (2008) 68-74.
3. Phạm Chí Thành - Giáo trình Phương pháp thí nghiệm đồng ruộng, 1988, tr. 31-134.
4. 10TCN: 216-1995 (216-2003) - Khảo nghiệm hiệu lực phân bón trên đồng ruộng đối với cây trồng.

5. 10TCN 714-2006 - Phương pháp đánh giá hoạt tính đối kháng của vi sinh vật có khả năng đối kháng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh cây trồng cạn.
6. Black L. L., Green S. K., Hartman G. L., Poulos J. M. - Pepper Diseases: A Field Guide. Asian Vegetable Research & Development Center, AVRDC Publication **31-347** (1991) 98.
7. Geels and Schippers - Selection of Antagonistic Fluorescent *Pseudomonas* sp. and their Root Colonization and Persistence following Treatment of Seed Potato, *Phytopath. Z.* **108** (1983) 193-206.
8. N. W. Schaad, J. B. Jones, W. Chun - Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic bacteria, Third Edition, APS Press, 2001.

SUMMARY

ISOLATION AND SELECTION OF ANTAGONISTIC BACTERIA TO *RALSTONIA SOLANACEARUM* CAUSED BACTERIAL WILT DISEASE ON GROUNDNUT AND SESAME

Chemical pesticides are widely used to control diseases. However, the use of these pesticides can be expensive. They may also play a dominant role in environmental pollution, such as groundwater contamination. Thus, using biological control agents, especially biopesticides, to fight such disease is gaining increasing momentum in the agricultural biotechnology research. This paper bring out the results of isolation and selection the antagonistic bacteria to make micro-product (biopesticides) for controlling bacterial wilt disease on groundnut and sesame. 10 isolates of antagonistic bacteria to *Ralstonia solanacearum* have selected, which are not harmful to plant and mice. Among them CX₅ belonging to *Bacillus* and PX₁ is *Pseudomonas*. The both CX₅ and PX₁ can control bacterial wilt disease on groundnut, sesame and Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). So these isolates are selected to control bacterial wilt disease on groundnut and sesame. When using CX₅ strain reduced 66.64% of died sesame, 74.41% groundnut; PX₁ reduced 71.31% of died sesame plant and 61.3% on groundnut, respectively.

Địa chỉ:

Viện Thổ nhưỡng Nông hóa.

Nhận bài ngày 10 tháng 3 năm 2009

