

PHÂN LẬP VI SINH VẬT ĐỐI KHÁNG MỘT SỐ NGUỒN BỆNH NẤM THỰC VẬT VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CỦA CHúng *IN VITRO* VÀ *IN VIVO*

Nguyễn Thị Kim Cúc^{1,*}, Trần Thị Hồng², Phạm Thị Thúy Hoài²,
Phạm Việt Cường²

¹Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm KHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

²Viện Nghiên cứu Khoa học miền Trung, Viện Hàn lâm KHCNVN, TP Huế

*Email: kcnguyenthi@gmail.com

Đến Tòa soạn: 25/08/2013; Chấp nhận đăng: 23/4/2014

TÓM TẮT

Hiện nay, có khoảng hơn 80.000 loài nấm được biết có khả năng gây bệnh cho cây trồng, trong đó *F.oxysporum*, *F.solani*, *Phytophthora* sp là những loài gây thiệt hại lớn nhất, chúng có thể phá hủy toàn bộ vụ thu hoạch của các cây trồng quan trọng như: tiêu, cà phê, cà chua... Cùng với sự phát triển nhanh chóng của khoa học và công nghệ, nhiều nhà khoa học trên thế giới đã nghiên cứu ứng dụng biện pháp sinh học để phòng chống dịch hại, sử dụng khả năng đối kháng của một số loại nấm, vi khuẩn, xạ khuẩn để trừ bệnh hại cây trồng. Trong nghiên cứu này, 37 chủng vi khuẩn và 10 chủng xạ khuẩn được phân lập từ đất và rễ tiêu bị bệnh ở Quảng Trị và được đánh giá hoạt tính ức chế sinh trưởng một số nguồn bệnh nấm thực vật bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Kết quả nhận được cho thấy 31 chủng vi khuẩn và 5 chủng xạ khuẩn phân lập đối kháng nấm *F.oxysporum*, tất cả 37 chủng vi khuẩn và 2 chủng xạ khuẩn ức chế sinh trưởng của *F.solani*, 10 chủng vi khuẩn và 6 chủng xạ khuẩn đối kháng với *Phytophthora* sp. Đã định danh 5 chủng vi khuẩn và 2 chủng xạ khuẩn phân lập có hoạt tính đối kháng cao nhất bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA hoặc bằng KIT API đến các loài: *Paenibacillus* sp; *Paenibacillus xylanilyticus*; *Bacillus subtilis*; *Burkholderia cepacia*; *Pseudomonas luteola*; *Streptomyces diastatochromogenes*; *Streptomyces antimycoticus*. Đã tiến hành xác định hoạt tính đối kháng *F.oxysporum* *in vivo* trong điều kiện phòng thí nghiệm trên mô hình cây cà chua của một số chủng tuyển chọn. Kết quả nhận được cho thấy các chủng tuyển chọn không những có khả năng ức chế sinh trưởng của *F.oxysporum*, mà còn kích thích sinh trưởng của cây cà chua trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Từ khóa: *Bacillus* sp, *Burkholderia* sp, nấm bệnh thực vật, *Paenibacillus* sp, PCR, *Pseudomonas* sp, *Streptomyces* sp.

1. MỞ ĐẦU

Hàng năm trên thế giới và ở Việt Nam, cây trồng bị tấn công bởi hàng loạt các loại bệnh mà nguyên nhân gây bệnh khác nhau, trong đó các nguồn bệnh chủ yếu có nguồn gốc từ nấm, vi khuẩn và virus: như nhóm *Phytophthora*, *Fusarium*, *Xanthomonas*, *Erwinia*.... Ước tính khoảng 40 % cây trồng các loại bị hủy hoại bởi bệnh dịch thực vật [1]. Bệnh do nấm gây ra rất khó phòng trừ vì chúng có khả năng tồn tại lâu trong đất. Hơn nữa, nhiều loại nấm có thể phát triển trong khoảng pH rất rộng, từ pH axit cho đến pH kiềm cao [2].

Vi khuẩn có ích giữ vai trò quan trọng trong cải tạo đất và trong đời sống của cây trồng. Chúng phân giải chất hữu cơ làm thức ăn cho cây trồng, làm tăng độ mùn xốp, tăng khả năng giữ nước cho đất, nhờ đó cây hấp thụ chất dinh dưỡng tốt hơn, giảm tác hại của kí sinh gây bệnh, bảo vệ cây trồng. Một số vi khuẩn như: *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*; *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*; *Pimelobacter* sp; *Agrobacterium radiobacter* k84 không gây bệnh và một số loại vi khuẩn đối kháng khác đã và đang được sử dụng hiệu quả trong phòng trừ bệnh hại cây trồng [3].

Streptomyces là chi vi khuẩn sợi thường gặp trong đất và bùn. Đặc tính nổi bật nhất của chúng là khả năng sinh rất nhiều loại kháng sinh khác nhau. Các hợp chất có hoạt tính sinh học từ *Streptomyces* có ứng dụng quan trọng trong y học và trong tự nhiên, chúng được biết là những hợp chất cốt yếu cho sinh trưởng của vi khuẩn. Mật độ *Streptomyces* đối kháng cao ức chế nguồn bệnh trong nhiều loại đất. *Streptomyces* được biết có khả năng ức chế nấm gây bệnh thực vật nguồn gốc từ đất hoặc không khí. Một số chủng bảo vệ rễ thực vật bằng cách tiết ra các enzymes phân hủy thành tế bào nấm gây bệnh hoặc các hợp chất kháng nấm, và bằng cách đó ức chế sinh trưởng của các nguồn bệnh nấm [4]. Những nghiên cứu về khả năng sinh chất kháng sinh của các chủng xạ khuẩn có hoạt tính chống nấm gây bệnh ở thực vật được tiến hành ở nhiều nước trên thế giới cũng như ở Việt Nam.

Trong công tác bảo vệ thực vật hiện nay, phòng trị bệnh bằng biện pháp hóa học là phổ biến. Các nghiên cứu về ứng dụng biện pháp phòng trừ sinh học cho cây trồng trong và ngoài nước còn rất hạn chế. Mặc dù vậy, tiềm năng sử dụng vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm tự nhiên đối kháng để thay thế hoặc bổ sung vào các thuốc trừ sâu hóa học được đề cập đến trong nhiều nghiên cứu.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các mẫu đất và rễ quanh cây tiêu bị bệnh từ 2 huyện Cam Lộ và Vĩnh Linh của tỉnh Quảng Trị. Đất và rễ nhỏ lấy ở tầng sâu 5-30 cm, các mẫu được đánh số thứ tự và được chia nhỏ cho vào các túi nilon sạch (khoảng 10 g/ túi). Mẫu được giữ ở 4 °C, tiến hành phân lập vi sinh vật.

Môi trường để phân lập và nuôi cấy vi khuẩn gồm MPA, King B và cho xạ khuẩn là ISP₄; môi trường Czapek-Dox nuôi cấy nguồn nấm gây bệnh, môi trường MS cho cây cà chua. Các loại hóa chất để khử trùng, xử lí mẫu; các hormone, vitamin.... được khử trùng riêng bằng lọc và sau đó bổ sung vào môi trường.

Hạt giống cà chua.

Cặp mồi để nhân bản gen 16S rRNA của vi khuẩn và xạ khuẩn (bảng 1).

Bảng 1. Trình tự và thông số cặp mồi sử dụng cho phản ứng PCR.

Mã hiệu	Trình tự	T _m (°C)	%GC
Cặp mồi để khuếch đại gen 16S rRNA vi khuẩn [6]			
16SF	AGA GTT TGA TCA TGG CTC A	51	42
16SR	AAG GAG GTG ATC CAG CC	56	59
Cặp mồi để khuếch đại gen 16S rRNA xạ khuẩn [5]			
27F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	53.2	50
1525R	AAA GGA GGT GAT CCA GCC	54.5	56

2.2. Đối tượng

Các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn được phân lập từ các mẫu đất và rễ trên.

Nguồn nấm gây bệnh thực vật đã được phân lập và định danh: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora* sp.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp phân lập vi khuẩn, xạ khuẩn đối kháng

Mẫu đất, rễ nhỏ (10 g) lấy ở xung quanh vùng rễ cây bị bệnh được loại bỏ rác, nghiền nhỏ trong cối chày sứ vô trùng, bổ sung 90 ml nước cất vô trùng và chuyển sang bình nón, lắc trên máy lắc 200 vòng/phút trong 10 - 20 phút. Lấy 1 ml dung dịch chuyển sang ống nghiệm có 9 ml nước muối sinh lí vô trùng, và tiếp tục pha loãng tới 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Từ các ống nghiệm với nồng độ pha loãng khác nhau (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}), cấy trải 100 μ l lên môi trường MPA hoặc King B (để phân lập vi khuẩn) và môi trường ISP4 (cho xạ khuẩn). Nuôi ở 30 °C và 37 °C, sau 1 - 2 ngày quan sát sự phát triển của các khuẩn lạc.

2.3.2. Phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh trong dịch nuôi

Các chủng vi sinh vật phân lập được nuôi lắc trong môi trường dịch thể thích hợp. Sau 1 - 2 ngày, lọc lấy dịch trong, nhỏ 100 μ l vào lỗ thạch đã đục sẵn trong đĩa petri đã cấy vi sinh vật kiểm định. Để tủ lạnh 30 phút cho chất kháng sinh khuếch tán vào thạch, sau đó nuôi ở nhiệt độ thích hợp cho từng chủng phân lập. Sau 1 - 3 ngày, xác định đường kính vòng ức chế sinh trưởng nguồn bệnh nấm. HTKS = D-d (mm); trong đó D: Đường kính vòng kháng khuẩn; d: Đường kính lỗ thạch; HTKH – hoạt tính kháng sinh.

2.3.2. Phương pháp nhuộm Gram

2.3.3. Phương pháp định danh vi khuẩn: theo kit API 20NE cho vi khuẩn G(-) và API 50 CHB cho vi khuẩn G(+)

2.3.4. Phương pháp định danh bằng kỹ thuật giải trình tự gen 16S rRNA

Bao gồm các kỹ thuật sau: tách chiết DNA genom của vi khuẩn và của xạ khuẩn; xác định nồng độ DNA nhờ máy quang phổ tử ngoại; kỹ thuật PCR; điện di DNA trên gel agarose; tinh

sạch sản phẩm PCR; xác định trình tự nucleotit của gen; xử lý trình tự DNA và phân tích số liệu bằng phần mềm máy tính [5].

Hỗn hợp phản ứng PCR cho một mẫu với tổng thể tích 25 μ l bao gồm các thành phần như bảng 2.

Bảng 2. Các thành phần cho PCR.

Thành phần phản ứng	Vi khuẩn		Xạ khuẩn	
	Nồng độ	Lượng (μ l)	Nồng độ	Lượng (μ l)
H ₂ O khử ion vô trùng		15,7		17,1
Buffer		2,5	10X	2,5
DNTP	5 nM	2,5	2.5 mM	2,0
27F	10 pmol/ μ l	1,5	10 pmol/ μ l	1,0
1525R	10 pmol/ μ l	1,5	10 pmol/ μ l	1,0
Taq-polymerase	5 U/ μ l	0,3	5 U/ μ l	0,4
DNA khuôn	50 ng/ μ l	1,0	50 ng/ μ l	1,0

Chu trình nhiệt để nhân gen 16S rRNA vi khuẩn: 94 °C - 5 phút; 94 °C - 1 phút; 56 °C - 50 giây; 72 °C - 1 phút 30 giây; 30 chu kỳ (từ bước 2 đến bước 4); 72 °C - 7 phút; kết thúc ở 4 °C.

Chu trình nhiệt để nhân gen 16S rRNA xạ khuẩn: 94 °C - 3 phút; 94 °C - 1 phút; 64 °C - 1 phút; 72 °C - 1 phút 30 giây; 32 chu kỳ (từ bước 2 đến bước 4); 72 °C - 10 phút; kết thúc ở 4 °C.

2.3.5. Phương pháp xác định hoạt tính đối kháng nguồn bệnh nấm thực vật của các chủng tuyển chọn trên cây cà chua

- Gieo hạt cà chua: Khử trùng hạt bằng ethanol 70 % trong 1 phút, rửa qua bằng nước cất khử trùng 1 lần; Tiếp đó cho dung dịch Javen 30 % vào, lắc đều (không cần liên tục) trong vòng 20 phút, chắt hết phần nước Javen, rửa bằng nước cất khử trùng nhiều lần (5 lần). Thấm khô hạt bằng giấy lọc vô trùng, đặt hạt lên đĩa petri có chứa giấy thấm nước vô trùng với độ ẩm khoảng 40% và đưa vào tủ ẩm 28 °C trong 48 giờ.

- Hoạt hóa các chủng vi sinh vật: nấm chùng vi khuẩn (bao gồm *Paenibacillus* sp; *Paenibacillus xylanilyticus*; *Bacillus subtilis*; *Burkholderia cepacia*; *Pseudomonas luteola*) được hoạt hóa và nuôi cấy trong môi trường MPA, nhiệt độ 30 hoặc 37 °C, tùy chủng; hai chủng xạ khuẩn (*Streptomyces diastatochromogenes*; *Streptomyces antimycoticus*) được hoạt hóa và nuôi trong môi trường ISP₄, nhiệt độ 28 - 30 °C; các chủng nấm gây bệnh thực vật (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora* sp) được hoạt hóa và nuôi trên môi trường Czapek-Dox, nhiệt độ 26 - 28 °C.

- Xâm nhiễm bệnh: cây cà chua sau 2 ngày tuổi, nhúng rễ vào nguồn nấm gây bệnh (nồng độ 10⁵ bào tử/ml) trong khoảng 1 phút. Chuyển vào các bình tam giác có chứa môi trường MS (đã được bổ sung vi khuẩn và xạ khuẩn đối kháng). Nuôi trong buồng sinh trưởng (25 °C, 16 giờ chiếu sáng/ngày), theo dõi sự phát triển của cây trong 2 tuần. Sau 2 tuần, các cây còn xanh được chuyển sang môi trường tái sinh có bổ sung 1 mg/lít zeatin, điều kiện nuôi cấy tương tự, theo dõi sự phát triển sau 1 tháng. Sơ đồ thí nghiệm được bố trí như bảng 3.

Bảng 3. Sơ đồ thí nghiệm.

Lô thí nghiệm	Chủng vi sinh vật	Lô thí nghiệm	Chủng vi sinh vật
CT1	<i>F.oxysporum</i> + <i>B. subtilis</i>	CT7	<i>F.oxysporum</i> + <i>S. antimycoticus</i>
CT2	<i>F.oxysporum</i> + <i>P. luteola</i>	CT8	<i>F.oxysporum</i> + (<i>S. diastatochromogenes</i> & <i>S. antimycoticus</i>)
CT3	<i>F.oxysporum</i> + <i>B. cepacia</i>	CT9	<i>F.oxysporum</i> + (<i>S. diastatochromogenes</i> & <i>B. subtilis</i>)
CT4	<i>F.oxysporum</i> + <i>Paenibacillus</i> sp	CT10	<i>F.oxysporum</i> + (<i>B.subtilis</i> & <i>S.diastatochromogenes</i> & <i>S. antimycoticus</i>)
CT5	<i>F.oxysporum</i> + <i>P. xylanilyticus</i>	CT11	<i>F.oxysporum</i>
CT6	<i>F.oxysporum</i> + <i>S. diastatochromogenes</i>		

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn có hoạt tính đối kháng nguồn bệnh nấm thực vật

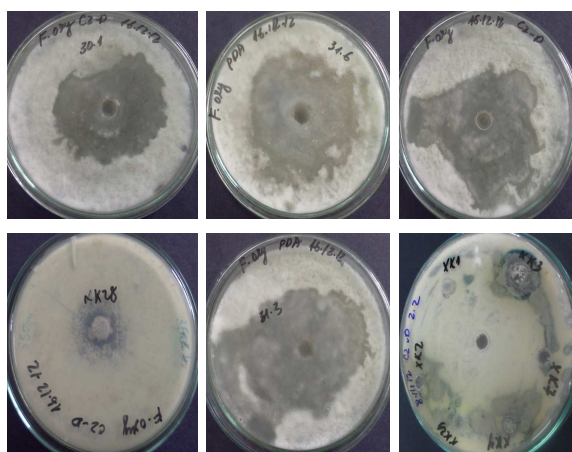
Từ các mẫu đất, rễ của cây tiêu ở 2 huyện Cam Lộ và Vĩnh Linh của tỉnh Quảng Trị (nơi xảy ra bệnh chết nhanh và chết chậm khá nghiêm trọng) đã được phân lập được 94 chủng vi khuẩn và 29 chủng xạ khuẩn trên môi trường riêng biệt cho vi khuẩn và xạ khuẩn. Bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, các chủng phân lập được sơ tuyển khả năng ức chế sinh trưởng của *F. oxysporum*, *F. solani*, *Phytophthora* sp. Kết quả cho thấy có 31 chủng vi khuẩn và 5 chủng xạ khuẩn có hoạt tính đối kháng *F. oxysporum*, 37 chủng vi khuẩn và 2 chủng xạ khuẩn kháng *F. solani*, 10 chủng vi khuẩn và 6 chủng xạ khuẩn kháng *Phytophthora* sp. Các chủng vi khuẩn phân lập có tế bào hình que, hình cầu, chủ yếu là Gram (-). Một số chủng có khả năng ức chế sinh trưởng của cả *F. oxysporum*, *F. solani*, *Phytophthora* sp. mạnh (trừ chủng 31.3 không ức chế sinh trưởng của *Phytophthora* sp), với vòng kháng khuẩn > 10mm, trong đó có 5 chủng vi khuẩn và 2 chủng xạ khuẩn (bảng 4).

Bảng 4. Hình thái tế bào và khả năng kháng nấm bệnh của một số chủng phân lập.

Kí hiệu chủng	Đặc điểm hình thái	Màu sắc khuẩn lạc	Hoạt tính đối kháng (D-d, mm)		
			<i>F. solani</i>	<i>Phytophthora</i> sp	<i>F.oxysporum</i>
28.5	Gr (+); Que ngắn, đơn, bé	Hơi vàng	40	10	20
30.1	Gr (+); Que dài, đôi, chuỗi, lớn	Trắng đục	50	20	40
31.3	Gr (+); Que dài, đôi, chuỗi, lớn	Trắng đục	30	-	30
31.6	Gr(-); Que ngắn, đơn, đôi, bé	Trắng	45	13	40
31.8	Gr(-); Que ngắn, đơn, bé	Trắng	40	15	50

XK3	Cuống sinh bào tử dạng thẳng, bề mặt bào tử xù xì	Màu trắng	10	15	18
XK28	Cuống sinh bào tử dạng xoắn, bề mặt bào tử có gai	Màu xám	15	20	15

Do khả năng ức chế sinh trưởng của cả 3 nguồn bệnh nấm thực vật rất tốt, với vòng kháng khuẩn lên đến 40 - 50 mm (chủng 31.8 và chủng 30.1 với *F. solani* và *F. oxysporum*), nên các chủng tuyển chọn trên bảng 4 được tiếp tục định danh đến loài để làm cơ sở cho nghiên cứu ứng dụng sau này. Riêng chủng 31.3 mặc dù không ức chế sinh trưởng của *Phytophthora* sp, nhưng hoạt tính đối kháng *F. oxysporum* và *F. solani* khá mạnh (D-d = 30 mm), vì vậy chủng này cũng được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo (hình 1).



Hình 1: Khả năng đối kháng của chủng vi khuẩn và xạ khuẩn phân lập với nấm *F.oxysporum*.



Hình 2. Khả năng ức chế sinh trưởng lẫn nhau của các chủng vi khuẩn đối kháng.

Các chủng vi sinh vật tuyển chọn được xác định khả năng đối kháng lẫn nhau khi sinh trưởng trong cùng một môi trường. Bằng phương pháp cấy vạch thẳng góc, đã xác định được 4 chủng 30.1; 31.6; 31.8; 31.3 không ức chế sinh trưởng của nhau, riêng chủng 28.5 bị các chủng khác ức chế sinh trưởng khi nuôi cấy trên cùng một môi trường (hình 2).

3.2. Kết quả định danh vi khuẩn và xạ khuẩn

3.2.1. Kết quả định danh vi khuẩn bằng kit API

Ba chủng vi khuẩn đối kháng 30.1; 31.6; 31.8 được nhận dạng bằng kit API theo hướng dẫn của hãng. Hai chủng 30.1 và 31.6 có Gram (+) vì vậy được nhận dạng bằng Kit API 50CHB; chủng 31.8 là vi khuẩn Gram (-) nên được định danh theo Kit API 20NE. Kết quả nhận được cho thấy chủng 30.1 có các tính chất giống với *Bacillus subtilis*; chủng 31.6 được xếp vào loài *Burkholderia cepacia*; và chủng 31.8 là *Pseudomonas luteola*.

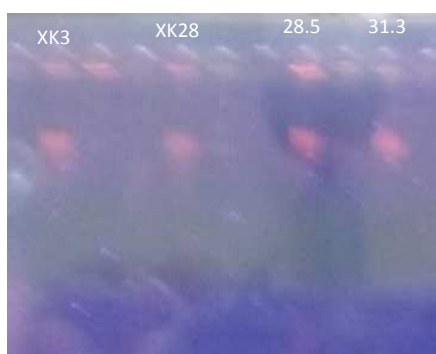
3.2.2. Kết quả định danh vi khuẩn và xạ khuẩn nghiên cứu bằng phương pháp sinh học phân tử

Tách DNA genome của vi khuẩn và xạ khuẩn

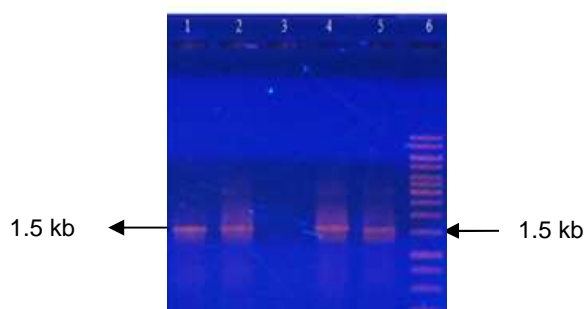
Từ 1,5 ml dịch nuôi cấy của các chủng 28.5; 31.3; XK3; XK28, theo phương pháp mô tả, đã thu được DNA genom của các chủng nghiên cứu. Độ tinh sạch của sản phẩm được kiểm tra bằng phổ hấp thụ tử ngoại và điện di trên gel agarose 1 % (bảng 5, hình 3). Với giá trị A_{260}/A_{280} dao động từ 1,82 đến 1,9 cho thấy các mẫu DNA tách chiết có độ tinh sạch cao. Điện di đồ cũng cho thấy các mẫu DNA khá sạch, ít bị đứt gãy, có thể sử dụng làm khuôn trong PCR để nhân gen 16S rRNA.

Bảng 5. Kết quả xác định tỉ lệ A_{260}/A_{280} và nồng độ DNA ($\mu\text{g/ml}$) của các chủng nghiên cứu.

Tên chủng	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	Nồng độ DNA ($\mu\text{g/ml}$)
28.5	0,246	0,135	1,82	615,0
31.3	0,346	0,185	1,87	865,0
XK3	0,215	0,118	1,82	537,5
XK28	0,256	0,140	1,83	640,0



Hình 3. Điện di đồ DNA genom của các chủng nghiên cứu.



Hình 4. Điện di đồ sản phẩm PCR gen 16 S-rRNA của các chủng nghiên cứu
Giếng 1,2,4,5: PCR của chủng 28.5; 31.3; XK3; XK28 tương ứng.
Giếng 6: thang DNA chuẩn

Nhân gen 16S RNA riboxom

DNA genom của 4 chủng nghiên cứu và hai cặp mồi 16SF, 16SR (cho các chủng vi khuẩn) và 27F, 1525R (cho các chủng xạ khuẩn) đã được sử dụng để PCR khuếch đại đoạn gen 16S rRNA, với chu trình nhiệt đã nêu.

Các cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự bảo thủ của gen 16S RNA riboxom của vi khuẩn và xạ khuẩn, theo lí thuyết, sản phẩm PCR có độ dài xấp xỉ 1500 bp. Điện di đồ sản phẩm PCR (hình 4) cho thấy chỉ xuất hiện một băng duy nhất với kích thước khoảng 1500 bp. Như vậy, chu trình nhiệt thiết lập cho PCR để khuếch đại đoạn gen 16S DNA riboxom của các chủng 28.5; 31.3; XK3; XK28 là hoàn toàn phù hợp.

Giải trình tự gen của 4 chủng nghiên cứu

Trình tự của gen được xác định theo phương pháp của Sanger và cs bằng máy giải trình tự tự động. Sau khi xử lí các dữ liệu thu được qua chương trình GENE DOC, chúng tôi nhận được trình tự các gen 16S rRNA của 4 chủng 28.5; 31.3; XK3; XK28. Chương trình BLAST đã được sử dụng để so sánh trình tự các đoạn gen nhận được với các trình tự gen 16S rRNA của vi khuẩn

và xạ khuẩn khác trong Ngân hàng gen quốc tế. Kết quả định danh bốn chủng vi sinh vật tuyển chọn bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA được trình bày trong bảng 6.

Bảng 6. Kết quả nhận dạng các chủng vi sinh vật nghiên cứu sau khi so sánh bằng BLAST.

Kí hiệu chủng	Tên chủng trong ngân hàng gen	Độ tương đồng (%)
28.5	<i>Paenibacillus</i> sp.	99
31.3	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	98
XK3	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	99,2
XK28	<i>Streptomyces antimycoticus</i>	99,8

Từ kết quả định danh trên cho thấy các chủng định danh thuộc các chi *Paenibacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* và *Streptomyces*. Các loài thuộc chi *Streptomyces* được biết rõ là các nhân tố kiểm soát sinh học ức chế nguồn bệnh nấm thực vật từ đất hoặc không khí. Hoạt tính đối kháng của *Streptomyces* đến nguồn bệnh nấm thường liên quan đến sự sản xuất các hợp chất đối kháng nấm. Ví dụ chủng *Streptomyces* sp. 5406 được sử dụng ở Trung Quốc để bảo vệ mùa bông chống lại nguồn bệnh nấm. Chủng *Streptomyces lydicus* WYEC108 là nhân tố kiểm soát sinh học để kiểm soát *Pythium* gây bệnh thối rễ và hạt...[6].

Các chủng vi khuẩn chi *Burkholderia* được chứng minh sinh nhiều hợp chất khác nhau ức chế sinh trưởng nấm bệnh thực vật. Tenorio-Salgado và cs (2013) đã nhận dạng được 18 hợp chất bay hơi do vi khuẩn *Burkholderia tropica* sinh ra tham gia vào cơ chế ức chế sinh trưởng của nấm, trong đó có α -pinene và limonene. Ngoài ra, rất nhiều chủng *Burkholderia tropica* sinh siderophore trong quá trình phát triển trên các nguồn cacbon khác nhau [7].

Pseudomonas spp là vi khuẩn định cư hiệu quả ở rễ thực vật và là các nhân tố kiểm soát sinh học do chúng sản sinh các kháng sinh và các chất trao đổi chống nấm như hydrogen cyanide, siderophore gắn sắt, và các enzymes như gluconase, các enzymes phân hủy cellulose và chitin. Chủng *P. fluorescens* được khai thác để ức chế nguồn bệnh thực vật. Chủng *P. aeruginosa* được chứng minh sinh ra chất diệt nấm như HCN. Chủng *Pseudomonas* sp được biết sinh các hợp chất bay hơi. Hiệu quả ức chế nhiều nguồn bệnh của các chủng *pseudomonads* huỳnh quang đã được báo cáo, trong đó có các nguồn bệnh nấm như *Fusarium*, *Rhizoctonia* [8].

Ngoài ra, các chủng vi khuẩn đối kháng thuộc chi *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* được quan tâm hơn cả bởi chúng tổng hợp một số chất trao đổi ngoại bào có khả năng ngăn cản sự phát triển hệ sợi nấm của *Pythium* sp, *F. oxysporum* và *Rhizoctonia solani*. *Pseudomonas* tổng hợp các hợp chất ngoại bào syringomycin, syringostatin, syringotoxin, cepacin A, cepacin B, phenazine và pyrrolnitrin. *Burkholderia* tổng hợp các hợp chất cepacin và pyrrolnitrin, trong khi đó *Bacillus* tổng hợp các hợp chất surfacin, bacilysin, bacillomycin, mycobacillin. Những hợp chất này có hoạt tính kháng nấm chống lại *R.solani* và *F.oxysporum* [9].

3.3. Đánh giá hoạt tính đối kháng nguồn bệnh *F.oxysporum* của các chủng tuyển chọn trên mô hình cây cà chua

Cà chua sau khi nảy mầm, ra rễ, được xử lí với *F.oxysporum* như phương pháp mô tả, sau đó đưa vào môi trường nhân giống đã được bổ sung 1 ml dung dịch vi sinh vật đối kháng có mật độ 10^5 CFU/ml.

Các cây trong bình thí nghiệm được chuyển sang môi trường có hoocmon sinh trưởng thực vật và tiếp tục nuôi trong 1 tháng. Các chỉ số như lượng lá, lượng rễ và chiều cao trung bình của cây được đo đếm (bảng 7).

Bảng 7. Ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật tuyển chọn lên sinh trưởng của cây cà chua.

Lô thí nghiệm	Số lượng rễ trung bình trên một cây		Chiều cao trung bình của cây (cm)		Số lá trung bình của cây	
	14 ngày	30 ngày	14 ngày	30 ngày	14 ngày	30 ngày
CT1	5	7	3,3 ± 0,3	14,5 ± 0,9	2	8
CT2	4	7	3,2 ± 0,1	13,5 ± 1,2	2	6
CT3	4	6	3,0 ± 0,1	12,8 ± 1,2	2	6
CT4	4	6	2,9 ± 0,1	14,1 ± 0,6	2	7
CT5	3	5	3,3 ± 0,3	13,3 ± 1,0	2	5
CT6	4	7	3,2 ± 0,1	14,1 ± 0,7	2	6
CT7	3	6	3,3 ± 0,3	14,1 ± 0,6	2	7
CT8	3	6	3,1 ± 0,2	13,6 ± 0,2	2	7
CT9	5	7	3,1 ± 0,2	13,3 ± 1,1	2	6
CT10	4	7	3,2 ± 0,3	14,5 ± 0,5	2	9
CT11	2	2	1,5 ± 0,2	0	2	0
CV (%)			17,30	4,00		
(LSD)			0,52	0,55		



Hình 5. Khả năng đối kháng *F.oxysporum* của các chủng 30,1; XK3, XK26

- | | |
|--|--|
| (1) Môi trường MS +30.1 (sau 2 tuần) | (5) Môi trường MS +30.1 (sau 1 tháng) |
| (2) Môi trường MS + XK3 (sau 2 tuần) | (6) Môi trường MS + XK3 (sau 1 tháng) |
| (3) Môi trường MS + XK28 (sau 2 tuần) | (7) Môi trường MS + XK28 (sau 1 tháng) |
| (4) Môi trường MS + <i>F.oxysporum</i> . | |

Kết quả trên hình 5 cho thấy, sau 14 ngày trong buồng sinh trưởng các bình đối chứng không bổ sung các chủng vi sinh vật đối kháng, cây cà chua không phát triển được, cây chết sau 1 - 2 ngày, hoặc phát triển còi cọc, phần thân dưới và rễ bị thối và thâm đen, cây đổ gập sau 2 tuần nuôi cấy và bị nấm *F.oxysporum* mọc bao phủ (hình 5, bình 4). Trong các bình thí nghiệm

có bổ sung vi sinh vật đối kháng, cây phát triển bình thường, cao, xanh và đặc biệt trên bề mặt thạch không thấy sự phát triển của sợi nấm (hình 5, bình 1, 2, 3). Như vậy, các chủng 28,5, 30,1, 31,3, 31,6, 31,8, XK3 và XK28 có khả năng ức chế sinh trưởng *F.oxysporum in vivo* rất tốt. Sự có mặt của các chủng vi sinh vật đối kháng đã ức chế sự phát triển của *F.oxysporum*, làm tăng sức kháng bệnh của cây, cây phát triển khỏe mạnh, thân cây thẳng, lá xanh. Sau khi được chuyển sang môi trường có hormone sinh trưởng (Zeatin 1 mg/l), cây phát triển nhanh và khỏe, lượng rễ/cây tương đối đồng đều, trừ CT11. Kết quả tương tự đối với số lá trung bình/cây. Có vẻ như chủng *B.subtilis* có tác dụng tốt hơn đối với cây cà chua không những trong việc ức chế nguồn bệnh *F. oxysporum*, mà còn cả lên sinh trưởng của cây so với những chủng nghiên cứu khác (CT1 và CT11).

Ở Việt Nam, hàng tỉ đồng đã bị mất do các bệnh nấm gây ra cho các loại nông sản quan trọng trong nông nghiệp như ngô, khoai tây, đậu, đỗ tương...Hiện nay các sản phẩm sinh học từ các chủng vi khuẩn đối kháng ngày càng được các nhà sản xuất quan tâm để kiểm soát các nguồn bệnh nấm gây hại cho cây trồng.

Từ các kết quả nghiên cứu trên cho thấy: năm chủng vi khuẩn là *Paenibacillus* sp, *P. xylanilyticus*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas luteliola*, *Bacillus subtilis* và hai chủng xạ khuẩn *S. diastatochromogenes*, *S. antimycoticus* phân lập được có khả năng ức chế sự phát triển của một số nấm gây bệnh thực vật như *F. oxysporum*, *F. solani*, *Phytophthora* sp. Tuy nhiên để định hướng sử dụng các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn đối kháng này cho việc sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ nấm bệnh hại cây trồng thì cần phải có các nghiên cứu tiếp theo để đảm bảo độ an toàn của chế phẩm hoặc cho các mục đích khác khi sử dụng các chủng vi sinh vật đối kháng này.

5. KẾT LUẬN

Đã tuyển chọn được 7 chủng vi sinh vật, trong đó có 2 chủng xạ khuẩn và 5 chủng vi khuẩn có khả năng ức chế sinh trưởng đồng thời 2 - 3 nguồn nấm bệnh với đường kính vòng kháng khuẩn cao (từ 10 đến 50 mm, tùy thuộc vào từng chủng và từng nguồn nấm bệnh). Các chủng tuyển chọn đã được định danh bằng Kit API 20 NE và API 50 CHB hoặc bằng kỹ thuật giải trình gen 16S rRNA. Kết quả 2 chủng vi khuẩn có độ tương đồng trình tự gen 16S rRNA khoảng 99 % với các loài thuộc chi *Paenibacillus* (chủng 28.5 là *Paenibacillus* sp., chủng 31.3 là *Paenibacillus xylanilyticus*); hai chủng xạ khuẩn được định danh tới loài với độ tương đồng trình tự gen 16S rRNA so với các gen tương tự trong Ngân hàng gen Quốc tế hơn 99 % (chủng XK3 thuộc *Streptomyces diastatochromogenes*, chủng XK28 thuộc *Streptomyces antimycoticus*). Ba chủng vi khuẩn được định danh đến loài bằng các Kit API cho thấy chủng 30.1 thuộc *Bacillus subtilis*, chủng 31.6 thuộc *Burkholderia cepacia* và chủng 31.8 thuộc *Pseudomonas luteliola*.

Kết quả thí nghiệm *in vivo* trên mô hình cây cà chua trong điều kiện phòng thí nghiệm cho thấy, cả 7 chủng vi sinh vật nghiên cứu đều có khả năng ức chế sinh trưởng của *F.oxysporum*, ngăn nguồn bệnh nhiễm lên cây cà chua non và cả 7 chủng đều không ảnh hưởng đến sinh trưởng của cà chua.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Thị Minh Đức - Thực tập Vi sinh vật học, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội, Hà Nội, 2001, tr.5-7.

2. Nguyễn Như Hiền, Trịnh Xuân Hậu - Tế bào học, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội, Hà Nội, 2000, tr. 1-15.
3. Lê Gia Hy - Nghiên cứu xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* sinh chất kháng sinh chống nấm gây bệnh đạo ôn và thối cổ rễ phân lập ở Việt Nam, Luận án Tiến sĩ, Hà Nội, 1994, tr. 32-58.
4. Robati R and Mathivanan N. - Antagonistic activity of *Streptomyces Sp. MML1715* against *Rhizoctonia solani*, *Annals of Biological Research* **4** (2013) 156-158.
5. Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T. - Molecular cloning I, II, III: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
6. Babu G. P. and Paramageetham C - Biocontrol of *Sclerotium rolfsii* – a polyphagous plant pathogen by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from forest litter *International Journal of Research in Plant Science* **3** (2013) 1-4.
7. Tenorio-Salgado S, Raunel Tinoco, Rafael Vazquez-Duhalt, Jesus Caballero-Mellado and Ernesto Perez-Rueda - Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens, *Bioengineered* **4** (2013) 236–243.
8. Bhattacharya D and Lal B - Evaluation of microbial diversity of three oily sludge contaminated sites situated in different geoclimatic region. Submitted, Center for Bioresources and Biotechnology, TERI School of Advanced Studies, Lodhi Road, New Dehli, Dehli 110007, India, 2003, pp. 212-217.
9. Prasanna K. C. - Culture independent survey of marine bacterial community from OMZ of southeast coast of India. Submitted Center of Advanced Study in Marine Biology, Faculty of Marine Science, Annamalai University, Annankovil Road, Parangipettai, Tamil Nadu 608502, India, 2012, pp. 231-236.

ABSTRACT

ISOLATION OF ANTAGONISTIC MICROORGANISMS AGAINST SOME PLANT FUNGAL PATHOGENS AND EVALUATION OF THEIR ACTIVITY *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Nguyen Thi Kim Cuc^{1,*}, Tran Thi Hong², Pham Thi Thuy Hoai², Pham Viet Cuong²

¹*Institute of Marine Biochemistry, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi*

²*Mien Trung Institute for Scientific Research, VAST, Hue city*

*Email: kcnnguyenthi@gmail.com

Currently, over 80,000 species of fungi are known to be pathogenic to plants, among them *F.oxysporum*, *F.solani*, *Phytophthora* sp are the most damaging species, that they can destroy the entire crop of important cultivated plants such as pepper, coffee, tomatoes ... With the rapid development of science and technology, many scientists around the world have investigated biological measures for application in plant pest control, using antagonistic activity of fungi, bacteria, and actinomycetes for eliminating of plant harmful diseases. In this study, 37 bacterial strains and 10 actinomycete strains were isolated from soil and root samples of diseased pepper

plants in Quang Tri province and their growth inhibitory activity against some fungal plant pathogens was evaluated by agar diffusion method. The obtained results showed that 31 bacterial isolates and 5 actinomycete isolates antagonized *F. oxysporum*, all 37 bacterial isolates and 2 actinomycete isolates inhibited *F. sonali* growth, 10 bacterial isolates and 6 actinomycete isolates exhibited antagonistic activity against *Phytophthora* sp. Using sequencing technique 16S rRNA gene or Kit API, 5 bacterial strains and 2 actinomycetes isolates with highest antagonistic activity were identified as *Paenibacillus* sp; *Paenibacillus xylanilyticus*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas luteola*; *Streptomyces diastatochromogenes*, and *Streptomyces antimycoticus*. Antagonistic activity of selected strains against *F. oxysporum* *in vivo* in laboratory conditions on tomato plant was determined. The obtained results show that selected strains not only capable of inhibiting the *F.oxysporum* growth, but also can stimulate the growth of tomato plants in laboratory conditions.

Keywords: *Bacillus* sp, *Burkholderia* sp, plant fungal pathogens, *Paenibacillus* sp, PCR, *Pseudomonas* sp, *Streptomyces* sp.