

- Thierry, M., Milazzo, J., Adreit, H., Ravel, S., Borron, S., Sella, V., Ioos, R., Fournier, E., Tharreau, D. and Gladieux, P., 2021. *Ecological differentiation and incipient speciation in the fungal pathogen causing rice blast*. bioRxiv The preprint server for biology, 38 pp. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.02.129296>.
- Thuan, N.T.N., Bigirimana, J., Roumen, E., Van, D.D. and Hofte, M., 2006. Molecular and pathotype analysis of the rice blast fungus in North Vietnam. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 381-396.
- Thuy, N.T.T., Long, N.T., Lieu L.T., Giang H.T., Trung K.H., Xuan T.D., Tran H.D., Hoi P.X., Trung N.T., Tuan N.T., Duong V.X. and Khanh T.D., 2020. Evaluation of genetic diversity of rice blast fungus (*Magnaporthe oryzae* Barr) isolates collected from South central coast areas of Viet Nam. *Chiang Mai Journal of Science*, 47 (6): 1102-1117.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. and Taylor, J.W. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York: 315-322.
- Zhong, Z., Chen, M., Lin, L., Han, Y., Bao, J., Tang, W., Lin, L., Lin, Y., Somai, R., Lu, L., Zhang, W., Chen, J., Hong, Y., Chen, X., Wang, B., Shen, W., Lu, G., Norvienyeku, J., Ebbola, J.D. and Wang, Z., 2018. Population genomic analysis of the rice blast fungus reveals specific events associated with expansion of three main clades. *The ISME Journal*, 12: 1867-1878.

Collection and isolation of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in Northern and Central Vietnam

Le Thi Lieu, Henri Adreit, Michel Lebrun,
Elisabeth Fournier, Hoang Thi Giang

Abstract

Rice blast disease caused by the fungus *Magnaporthe oryzae* leads to serious damage to rice production in the world and in Vietnam. It is necessary to have deep knowledge of the genetic diversity and evolution of *M. oryzae* population in a specific eco-region for developing effective and durable blast-resistant rice varieties. To study the genetic biodiversity of this fungal population, a total of 214 blast diseased samples were systematically collected from 39 provinces across five out of seven agro-ecological zones, including: North Midlands and Mountains, and Red River Delta belonging to the North (148 samples); North Central, South Central Coast, and Central Highlands belonging to the Central (66 samples). Based on the morphological characteristics of the spores, a total of 945 isolates were isolated from 124 out of 214 collected samples. The isolates were used to extract DNA and identified as *M. oryzae* based on the primer pairs ITS5/ITS4. The isolates were preserved under mycelium on filter paper at -20°C and genomic DNAs for the study of the population genetics of blast fungus.

Keywords: Rice blast, fungus *Magnaporthe oryzae*, rice, isolate

Ngày nhận bài: 05/8/2022

Ngày phản biện: 15/8/2022

Người phản biện: PGS.TS. Trịnh Xuân Hoạt

Ngày duyệt đăng: 28/8/2022

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ XÁC ĐỊNH CHỦNG VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG VỚI NẤM *Sclerotium rolfii* GÂY BỆNH TRÊN CÂY LẠC

Đinh Trường Sơn¹, Tạ Hà Trang¹, Nguyễn Khánh Ly¹, Dương Văn Hoàn¹,
Trần Thị Đào¹, Nguyễn Thanh Huyền¹, Mai Thanh Tinh²,
Vũ Hiền Anh¹, Nguyễn Xuân Cảnh^{1*}

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm tuyển chọn và định danh một số chủng vi khuẩn đối kháng với nấm *Sclerotium rolfii* gây bệnh thối gốc lạc. Trong số 57 chủng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu đất thu thập tại tỉnh Thái Bình

¹ Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Công ty Cổ phần Tập đoàn Đức Hạnh Marphavet

* Tác giả liên hệ, e-mail: nxcanh@vnua.edu.vn, xuancanh79@yahoo.com

và Nam Định, hai chủng vi khuẩn ký hiệu TB1 và H14 có khả năng đối kháng nấm *Sclerotium rolfsii* cao nhất với hoạt tính đối kháng đạt 46,28% và 52,77%, làm chậm quá trình hình thành hạch nấm 2 - 5 ngày so với đối chứng. Chủng vi khuẩn TB1 và H14 có khả năng tổng hợp enzyme chitinase và cellulase với đường kính vòng phân giải đạt 18 mm và 17 mm (chủng H14), 8 mm và 5 mm (chủng TB1). Hai chủng vi khuẩn TB1 và H14 được định danh là *Bacillus altitudinis* TB1 và *Bacillus subtilis* H14, hai chủng vi khuẩn này đều thuộc nhóm vi sinh vật an toàn sinh học cấp độ 1.

Từ khóa: Cây lạc, bệnh thối gốc lạc, nấm *Sclerotium rolfsii*, vi khuẩn đối kháng

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây lạc (*Arachis hypogaea* L.) hay còn gọi là đậu phộng được trồng rộng rãi trên thế giới với hơn 100 quốc gia ở cả vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Theo số liệu thống kê của FAO năm 2022, tổng sản lượng lạc trên thế giới năm 2020 đạt 42,5 triệu tấn; dự kiến năm 2022 đạt 45,3 triệu tấn, xếp thứ 4 trong các loại cây lấy dầu - sau đậu nành, cải và hướng dương. Việt Nam là nước có diện tích trồng lạc đứng thứ 5 trong tổng số 25 quốc gia châu Á trồng lạc, trong các loại cây trồng chính, hàng năm cây lạc luôn chiếm diện tích được trồng lớn với khoảng 10.000 ha/năm. Tuy nhiên, những năm gần đây việc sản xuất lạc bị ảnh hưởng nhiều bởi dịch bệnh hại do nhiều loại vi sinh vật gây ra như bệnh thối gốc, bệnh lở cổ rễ; bệnh đốm lá nâu, đốm lá đen. *Sclerotium rolfsii* là một trong những loài nấm đất điển hình hại cây lạc - gây bệnh thối gốc, thiệt hại có thể lên đến 80% ở điều kiện thuận lợi (Deepthi, 2013). Nguồn bệnh của nấm *S. rolfsii* tồn tại chủ yếu trong đất, trong tàn dư thực vật, cây ký chủ và trong các vật liệu giống nhiễm bệnh dưới dạng sợi nấm, hạch nấm. Việc phòng trừ nấm *S. rolfsii* hiện nay chủ yếu dựa vào biện pháp hóa học. Tuy nhiên, biện pháp này không bền vững và gây ảnh hưởng không tốt đến môi trường. Hiện nay, nhiều nghiên cứu đã và đang được thực hiện với mục đích ứng dụng vi khuẩn đối kháng để sản xuất các chế phẩm sinh học thân thiện với môi trường nhằm giảm thiểu lượng phân bón và thuốc hóa học vào môi trường nông nghiệp (Nguyễn Thị Vân và *ctv.*, 2019). Nhiều chủng vi khuẩn đã được báo cáo có khả năng đối kháng với nấm *S. rolfsii* thông qua các hoạt chất kháng nấm như: lipopeptides bacillomycin A, surfactin A và fengycin A. Hiệu quả kiểm soát nấm bệnh của tác nhân sinh học đạt 62,6 - 70,8% (Chen *et al.*, 2020; Paramasivan *et al.*, 2019).

Mục đích của nghiên cứu này là phân lập, tuyển chọn và xác định một số chủng vi khuẩn đối kháng với nấm *Sclerotium rolfsii* gây bệnh thối thân trên cây lạc, góp phần vào định hướng ứng dụng trong

sản xuất các chế phẩm sinh học kiểm soát sinh học thân thiện với môi trường.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng các chủng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu đất trồng lạc thu thập tại các địa phương khác nhau. Chủng nấm kiểm định *Sclerotium rolfsii* được cung cấp từ bộ sưu tập giống lưu trữ tại Bộ môn Công nghệ Vi sinh, Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu thập, bảo quản mẫu đất

Các mẫu đất được thu thập từ vùng rễ của các cây lạc khỏe mạnh, không có biểu hiện bị bệnh. Mỗi điểm lấy 100 gram đất ở độ sâu từ 10 - 15 cm so với mặt đất, các mẫu đất thu thập được kí hiệu và bảo quản riêng biệt.

2.2.2. Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn đối kháng nấm *Sclerotium rolfsii* gây bệnh thối gốc lạc

Các chủng vi khuẩn được phân lập theo phương pháp được mô tả bởi Ramkumar và cộng tác viên (2015). Các khuẩn lạc có hình dạng khác nhau được cấy chuyển nhiều lần trên môi trường LB ủ ở 30°C trong 48 giờ cho đến khi thu được khuẩn lạc riêng rẽ.

Khả năng đối kháng nấm *Sclerotium rolfsii* của các chủng vi khuẩn phân lập được khảo sát theo phương pháp đồng nuôi cấy được mô tả bởi Živković và cộng tác viên (2010). Một thỏi thạch chứa nấm *S. rolfsii* với đường kính 5 mm được đặt ở trung tâm đĩa Petri có chứa môi trường PDA. Các chủng vi khuẩn được cấy thành một vạch ngang cách thỏi thạch chứa nấm một khoảng 3 cm. Ủ mẫu ở 30°C và quan sát kết quả sau 3 ngày nuôi cấy. Khả năng kháng nấm của các chủng vi khuẩn được thể hiện bởi vùng vô nấm quanh vạch vi khuẩn. Thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp lại, môi trường chỉ cấy nấm được chọn làm mẫu đối chứng.

Tỷ lệ phần trăm ức chế sinh trưởng nấm *S. rolfsii* được tính theo công thức:

$$I = \frac{(R - r) \times 100\%}{R}$$

Trong đó: *I* là tỷ lệ phần trăm ức chế sinh trưởng của các chủng vi khuẩn đến nấm *S. rolfsii* (%); *R* là bán kính tán nấm ở công thức đối chứng; *r* là bán kính tán nấm bị ức chế.

2.2.3. Xác định khả năng tổng hợp enzyme ngoại bào

Khả năng tổng hợp enzyme ngoại bào được xác định theo phương pháp khuếch tán đĩa thạch được mô tả bởi Phạm Văn Ty (2006). Vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng, lắc 200 vòng/phút ở 30°C trong 24 giờ. Dịch enzyme thô được thu bằng cách ly tâm dịch nuôi cấy với tốc độ 10.000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút. Hoạt tính enzyme cellulase, chitinase được xác định với các nguồn cơ chất lần lượt là CMC và chitin (bổ sung 10,0 g cơ chất, 20,0 g agar trong 1 lít đệm phosphate (pH = 7)). Hai trăm microlit dung dịch enzyme thô được bổ sung vào các giếng thạch trên các môi trường cơ chất, sau đó đặt ở 4°C trong 2 giờ để khuếch tán toàn bộ dịch enzyme thô vào môi trường và tiếp tục ủ ở 30°C trong 24 giờ. Hoạt tính các enzyme được xác định bằng vùng không bắt màu sau khi nhuộm màu bằng thuốc thử Lugol.

2.2.4. Định danh các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi cấy trên môi trường LB để quan sát đặc điểm hình thái, màu sắc khuẩn lạc. Đặc điểm hình thái tế bào sau đó được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi. Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nghiên cứu một số đặc điểm sinh học như khả năng di động, phản ứng MR-VP, khả năng sử dụng citrate (Islam *et al.*, 2014).

Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được định danh sơ bộ theo phương pháp truyền thống và xác định bằng kỹ thuật giải trình tự gen. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường LB lỏng ở 30°C, sinh khối của các chủng vi khuẩn sau 48 giờ nuôi cấy được ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút. DNA tổng số của các chủng vi khuẩn được tách chiết theo phương pháp của Masoomi và cộng tác viên (2016) có sửa đổi. Vùng gen mã hóa 16S rRNA của các chủng vi khuẩn được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3').

Thực hiện phản ứng theo chu trình nhiệt: (1) 95°C trong 5 phút, (2) 94°C trong 30 giây, (3) 55°C trong 30 giây, (4) 72°C trong 1 phút, lặp lại từ (2) - (4) 29 chu kỳ, (5) 72°C trong 10 phút, (6) giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên agarose gel 1,5% trong đệm TAE 1X. Sản phẩm PCR được giải trình tự tại công ty First Base (Singapore). Mức độ tương đồng của đoạn gen 16S rRNA của các chủng trong nghiên cứu này được so sánh với trình tự nucleotide đã được đăng ký trên Genbank bằng công cụ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) trên NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) và xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm MegaX 10.2.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

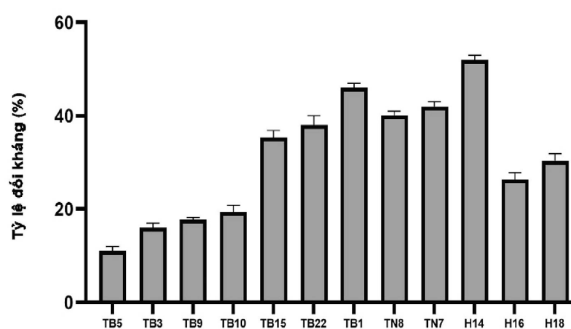
Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam từ tháng 10/2021 đến tháng 5/2022.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

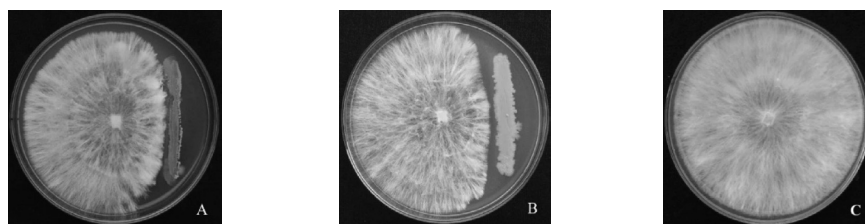
3.1. Phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn đối kháng với nấm *Sclerotium rolfsii*

Từ các mẫu đất thu thập tại huyện Hưng Hà, Thái Bình và huyện Ý Yên, Nam Định phân lập được 57 chủng vi khuẩn có đặc điểm hình thái khác nhau. Các chủng vi khuẩn có hình dạng và màu sắc khá đa dạng, trong đó chiếm ưu thế là màu trắng với 56,14%, sau đó là màu vàng với 33,34%, 10,52% còn lại có màu cam và hồng.

Kết quả kiểm tra khả năng đối kháng với nấm *S. rolfsii* của 57 chủng vi khuẩn xác định, trong 12 chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng nấm bệnh, 2 chủng vi khuẩn ký hiệu TB1, H14 có hoạt tính cao nhất, với tỷ lệ đối kháng đạt 46,28% và 52,77%. Kết quả nghiên cứu được thể hiện trong hình 1 và minh họa tại hình 2.



Hình 1: Khả năng đối kháng nấm *S. rolfsii* của các chủng vi khuẩn tuyển chọn



Hình 2. Hình ảnh đối kháng nấm *Sclerotium rolfsii* (C) của chủng vi khuẩn TB1 (A) và H14 (B) sau 72 giờ nuôi cấy ở 30°C

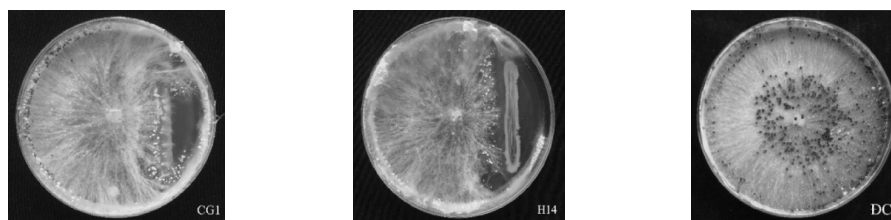
Hoạt tính đối kháng của 2 chủng vi khuẩn phân lập nêu trên tương đương với hoạt tính đối kháng của các chủng vi khuẩn nội sinh phân lập từ rễ và hạt cây lạc đã được Botlagunta (2021) công bố, trong đó xác định 2 chủng vi khuẩn ký hiệu GSE-4 và GSE-10 có hoạt tính đối kháng nấm *Sclerotium rolfsii* đạt 50,83% và 48,33%, thấp hơn so với hai chủng *Aeromonas hydrophyla* và *Pantoea* sp. 2 do Safni và Antastia (2018) phân lập, tuyển chọn với tỷ lệ ức chế sự phát triển của nấm bệnh đạt 64,83% và 63,13%.

3.2. Khả năng ức chế hình thành hạch nấm của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Hạch nấm có thể tồn tại trong đất trong nhiều năm kể cả ở điều kiện khắc nghiệt. Mặt khác, hạch nấm có thể lan rộng hàng ki-lô-mét dưới tác động của gió và hoạt động nông nghiệp (Kator *et al.*, 2015). Do đó, khả năng ức chế sự hình thành và sự tồn tại của hạch nấm có ý nghĩa lớn trong việc

kiểm soát tác nhân gây bệnh thối gốc lạc.

Khả năng ức chế hình thành hạch nấm thể hiện ở hình 3 cho thấy, hai chủng vi khuẩn tuyển chọn đều có tác dụng ức chế khả năng hình thành và kéo dài thời gian hình thành hạch nấm. Ở công thức đối chứng, hệ sợi bắt đầu biến thái hình thành hạch non ở ngày nuôi cấy thứ 3, đến ngày thứ 5 hạch chuyển già ngả sang màu nâu hạt chè. Trong khi đó, các tản nấm bị ức chế bởi chủng vi khuẩn TB1, H14 bắt đầu hình thành hạch non lần lượt từ ngày thứ 5 và ngày thứ 8. Hạch nấm bắt đầu chuyển thành hạch già 2 ngày sau đó. Như vậy dưới tác động của các chủng vi khuẩn tuyển chọn, thời gian hình thành hạch chậm hơn 2 - 5 ngày so với đối chứng. Bên cạnh đó, có thể quan sát thấy chủng vi khuẩn TB1 và H14 có tác dụng ức chế sinh trưởng, phát triển của nấm bệnh, trong đó sợi nấm phát triển thưa và mỏng và ở vị trí tiếp giáp với vi khuẩn sợi nấm bị co lại.



Hình 3. Khả năng ức chế hình thành hạch nấm *S. rolfsii* (C) của chủng vi khuẩn TB1 (B) và chủng vi khuẩn H14 (A) sau 8 ngày nuôi cấy ở 30°C

Các nghiên cứu trước đây đều chỉ ra rằng, các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *S. rolfsii* theo cơ chế kéo dài thời gian hình thành và làm giảm số lượng hạch nấm. Kết quả trên tương đồng với nghiên cứu của Chen và cộng tác viên (2020) về vi khuẩn *Bacillus velezensis* LHSB1 khả năng ức chế sinh trưởng của hệ sợi nấm *S. rolfsii*, đồng thời giảm đáng kể số lượng và sự nảy mầm của hạch nấm. Kết quả tương tự cũng được Paramasivan và cộng tác viên (2019) công bố khi sử

dụng các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* SBHRBS1 và *Bacillus subtilis*, trong đó số lượng hạch khi có mặt của 02 chủng vi khuẩn *B. subtilis* SBHRBS1, *B. subtilis* SBHRBS2 lần lượt là 54,27 và 52,29 hạch, trong khi đó ở công thức đối chứng số lượng hạch được hình thành lên đến 148,01. Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn TB1 và H14 có khả năng ức chế hệ sợi đồng thời kéo dài thời gian hình thành hạch nấm của chủng nấm *S. rolfsii* được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Enzyme ngoại bào là các hoạt chất sinh học có tác dụng trực tiếp hoặc gián tiếp ức chế, tiêu diệt vi sinh vật gây bệnh (Keswani *et al.*, 2020). Kết quả nghiên cứu thể hiện tại Hình 4 cho thấy cả 2 chủng vi khuẩn H14 và TB1 đều có khả năng tổng hợp enzyme chitinase và cellulase với đường kính vòng phân giải đạt 18 mm và 17 mm (chủng H14), 8 mm và 5 mm (chủng TB1).



Hình 4. Khả năng sinh enzyme cellulase (A) và chitinase (B) của hai chủng vi khuẩn tuyển chọn

Chitin được biết đến là thành phần cấu tạo nên thành tế bào hầu hết các loại nấm. Castillo và cộng tác viên (2013) cho biết *Bacillus* spp. là tác nhân kiểm soát sinh học có thể ức chế các tác nhân gây bệnh trong đất - *S. rolfii* thông qua cơ chế đối kháng trực tiếp và tổng hợp một số enzyme làm suy giảm thành tế bào. Theo Edreva (2005), khả năng tổng hợp enzyme chitinase của vi sinh vật có thể làm suy yếu và phân hủy thành tế bào của nhiều loài vi sinh vật gây hại và côn trùng. Một số loài *Bacillus* như *B. pumilus*, *B. licheniformis* LHH100, *B. thuringiensis* đã được biết đến về khả năng phân hủy chitin (Agarwal *et al.*, 2017; Laribi-Habchi *et al.*, 2015; Gomaa, 2012).

3.4. Định danh các chủng vi khuẩn tuyển chọn

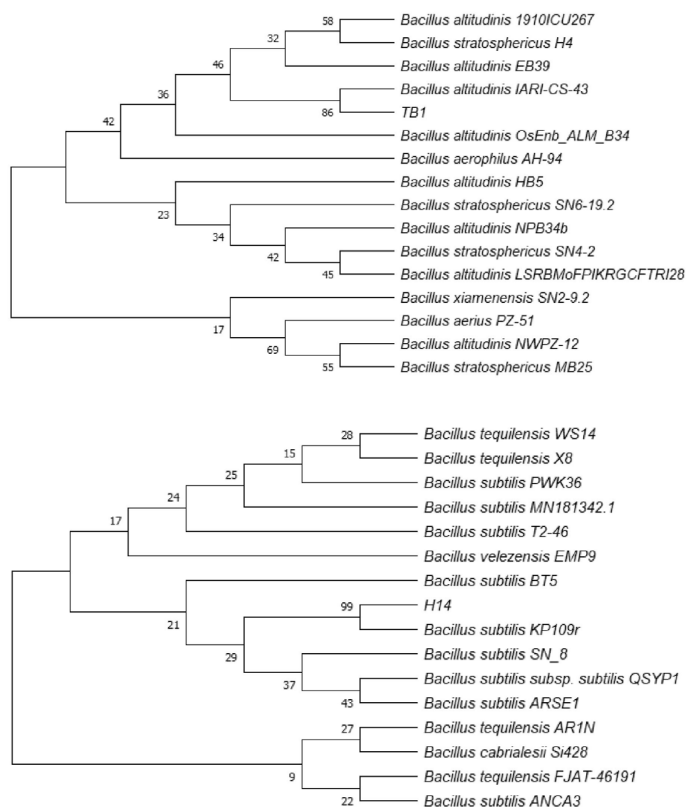
Kết quả nghiên cứu này trình bày tại bảng 1 cho thấy, hai chủng vi khuẩn TB1 và H14 có nhiều đặc điểm hình thái tế bào, khuẩn lạc và đặc điểm sinh học giống nhau, đặc biệt cả 2 chủng đều là trực khuẩn Gram+, di động và sinh nội bào tử. Căn cứ khóa phân loại truyền thống, có thể sơ bộ xác định hai chủng vi khuẩn TB1 và H14 thuộc chi *Bacillus*.

Hai chủng vi khuẩn TB1 và H14 được định danh phân tử bằng phương pháp nhân đoạn gen 16S rRNA với cặp mồi 27F/1492R. Kết quả điện di sản phẩm PCR của gen 16S rRNA cho băng vạch duy nhất, rõ ràng, có kích thước khoảng 1.500 bp. Kết quả thể hiện trên cây phát sinh loài (Hình 6) cho thấy, chủng vi khuẩn TB1 nằm cùng nhánh với chủng vi khuẩn *Bacillus altitudinis* IARI-CS-43 với giá trị bootstrap là 86%, kết quả căn trình tự vùng gen 16S rRNA trên BLAST cho thấy mức độ tương đồng là 99,75%. Chủng vi khuẩn H14 nằm cùng nhánh với chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* KP109r với giá trị bootstrap là 99%, kết quả căn trình tự vùng gen 16S rRNA cho thấy mức độ tương đồng là 99,03% (Hình 7). Kết hợp các đặc điểm sinh học và sinh học phân tử cho thấy chủng vi khuẩn TB1 có quan hệ họ hàng gần gũi với *Bacillus altitudinis*, chủng H14 có quan hệ họ hàng với *Bacillus subtilis* và được đặt tên lần lượt là *Bacillus altitudinis* TB1 và *Bacillus subtilis* H14 thuộc nhóm vi sinh vật an toàn sinh học cấp độ 1 theo TRBA 466 của Cộng hòa Liên bang Đức (TRBA 466, 2015), có thể lựa chọn cho sản xuất chế phẩm sinh học hay phân bón vi sinh.

Bảng 1. Một số đặc điểm tế bào, khuẩn lạc và phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Đặc điểm sinh học	TB1	H14
Hình thái khuẩn lạc	Trắng ngà, mép nguyên, nhân lõi và nhân, khuẩn lạc tròn đều	Trắng trong, mép nguyên, phẳng, tâm màu trắng đục, khuẩn lạc hình tròn
Gram	Trực khuẩn Gram (+)	Trực khuẩn Gram (+)
Khả năng di động	+	+
Phản ứng MR	+	+
Phản ứng VP	+	+
Khả năng sử dụng citrate	+	+
Khả năng sinh nội bào tử	+	+

Chú thích: (+) dương tính



Hình 6. Cây phân loại dựa trên trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn TB1 (A), H14 (B)

Sunar và cộng tác viên (2015); Trần Thùy Trang và cộng tác viên (2020) cho biết các vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng đối kháng cao với các tác nhân gây bệnh cho thực vật, bao gồm cả có nấm *S. rolfisii*.

IV. KẾT LUẬN

Từ 57 chủng vi khuẩn phân lập từ các mẫu đất thu thập ở các địa phương khác nhau, 2 chủng vi khuẩn ký hiệu TB1 và H14 có khả năng đối kháng với nấm *Sclerotium rolfisii* gây bệnh thối gốc lác với hoạt tính đạt 46,28 và 52,77%, có tác động làm chậm thời gian hình thành hạch nấm 2 - 5 ngày so với đối chứng. Cả hai chủng vi khuẩn phân lập đều có khả năng tổng hợp enzyme chitinase và cellulase với đường kính vòng phân giải đạt 5-18 mm. Hai chủng vi khuẩn TB1 và H14 được định danh là *Bacillus altitudinis* TB1 và *Bacillus subtilis* H14 thuộc nhóm vi khuẩn an toàn sinh học cấp độ 1.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí từ đề tài trọng điểm cấp Học viện Nông nghiệp Việt Nam mã số T2021-12-13TĐ. Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Trần Thùy Trang, Nguyễn Thị Ánh Nguyệt, Nguyễn Tấn Đức, Phạm Nguyễn Tuấn Hoàng, Dương Hoa Xô, 2020. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus subtilis* có khả năng đối kháng tốt với nấm *Colletotrichum scovillei* gây bệnh thán thư trên ớt ở Thành phố Hồ Chí Minh. *Tạp chí Khoa học Đại học mở thành phố Hồ Chí Minh - Kỹ thuật và Công nghệ*, 15 (1): 72-86.
- Phạm Văn Ty, 2006. *Công nghệ Sinh học - Công nghệ vi sinh và môi trường*. NXB Giáo dục, TP. HCM.
- Nguyễn Thị Vân, Đinh Thị Ngọc Mai, Lê Thị Hoàng Yến, Nguyễn Hồng Minh, Nguyễn Kim Nữ Thảo, 2019. Khảo sát khả năng đối kháng với bốn loại nấm gây bệnh trên thực vật của xạ khuẩn được phân lập từ Vườn quốc gia Cúc Phương và Ba Bể. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 17(1): 1-9.
- Agarwal, M., Dheeman, S., Dubey, R.C., Kumar, P., Maheshwari, D.K., & Bajpai, V.K., 2017. Differential antagonistic responses of *Bacillus pumilus* MSUA3 against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* causing fungal diseases in *Fagopyrum esculentum* Moench. *Microbiological research*, 205: 40-47.
- Botlagunta N., 2021. Molecular characterization of antagonistic endophytic bacterium against *Sclerotium rolfisii* (scc.) causing stem rot in groundnut. *SPAST Abstracts*, 1 (01). Retrieved from <https://spast.org/techrep/article/view/2420>.

- Castillo H.F., Reyes C.F., Morales G.G., Herrera R.R., & Aguilar C., 2013. Biological control of root pathogens by plant growth promoting *Bacillus* spp. *Weed and Pest Control-conventional and New Challenges*: 79-103.
- Chen L., Wu Y.D., Chong X.Y., Xin Q.H., Wang D.X., & Bian, K., 2020. Seed-borne endophytic *Bacillus velezensis* LHSB1 mediate the biocontrol of peanut stem rot caused by *Sclerotium rolfii*. *Journal of Applied Microbiology*, 128 (3): 803-813.
- Depthi K.C., 2013. Effect of potential biocontrol agents against *Sclerotium rolfii* causing stem rot of groundnut. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 2 (2): 58-65.
- Edreva A., 2005. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *General and Applied Plant Physiology*, 31 (1-2): 105-24.
- Gomaa, E.Z., 2012. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. *The Journal of Microbiology*, 50(1): 103-111.
- Islam, M.S., Aktar, M.B., Rahman, M.M. and Uddin, K.M., 2014. Isolation and characterization of *Streptomyces* spp. collected from Bangladeshi soils on the basis of morphological and biochemical studies. *Department of Microbiology, University of Dhaka. Dhaka*, 3 (11): 734-742.
- Kator L., Hosea Z.Y., & Oche O.D., 2015. *Sclerotium rolfii* causative organism of southern blight, stem rot, white mold and sclerotia rot disease. *Annals of Biological Research*, 6: 78-89.
- Keswani C., Singh H.B., Garcia-Estrada C., Caradus J., He Y.W., Mezaache-Aichour S., Glare T.R., Borriss R., Sansinenea E., 2020. Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important bacteria as next-generation pesticides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104: 1013-1034.
- Laribi-Habchi, H., Bouanane-Darenfed, A., Drouiche, N., Pauss, A., & Mameri, N. 2015. Purification, characterization, and molecular cloning of an extracellular chitinase from *Bacillus licheniformis* strain LHH100 isolated from wastewater samples in Algeria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72: 1117-1128.
- 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. <https://doi.org/10.21203/rs.2.1347/v2>.
- Paramasivan M., Thaveedu S., Jhonson I., & Karthikeyan M., 2019. Screening of rhizosphere and phyllo plane bacterial antagonist against *Sclerotium rolfii* (Sacc.) in tropical sugar beet ecosystems. *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*, 6: 947-952.
- Ramkumar B., Nampoothiri K., Sheeba U., Jayachandran P., Sreeshma N., Sneha S., Meenakumari K. & Sivaprasad P., 2015. Exploring Western Ghats microbial diversity for antagonistic microorganisms against fungal phytopathogens of pepper and chickpea. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 4 (2): 207-2018.
- Safni I. & Antastia W., 2018. *In vitro* antagonism of five rhizobacterial species against *Athelia rolfii* collar rot disease in soybean. *Open Agriculture*, 3 (1): 264-272.
- Sunar K., Dey P., Chakraborty U., & Chakraborty B., 2015. Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills, India. *Journal of Basic Microbiology*, 55 (1): 91-104.
- Živković S., Stojanović S., Ivanović Ž., Gavrilović V., Popović T. & Balaž J., 2010. Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Archives of Biological Sciences*, 62 (3): 611-623.
- TRBA 466, 2015. Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen, Ausgabe August 2015. Accessed on 27/8/2022. Available from: <http://www.gda-portal.de/VorschriftenRegeln/VorschriftenRegeln.html>.

Isolation, selection, and identification of bacteria strains against *Sclerotium rolfii* causing peanut root rot

Dinh Truong Son, Ta Ha Trang, Nguyen Khanh Ly, Duong Van Hoan, Tran Thi Dao, Nguyen Thanh Huyen, Mai Thanh Tinh, Vu Hien Anh, Nguyen Xuan Canh

Abstract

This study aimed to isolate, select and identify bacterial strains that are antagonistic to the *Sclerotium rolfii* causing peanut root rot. Among 57 strains isolated from soil samples collected from Thai Binh and Nam Dinh provinces, two strains labeled as TB1 and H14 had the highest antagonistic ability against *S. rolfii*, with antagonistic activities of 46,28%, and 52,77%, respectively, and were capable to reduce the time of sclerotia formations by 2 - 5 days compared to the control. Bacterial strains TB1 and H14 are capable of synthesizing chitinase and cellulase with the diameters of clearing zone of 18 mm and 17 mm (strain H14), 8 mm and 5 mm (strain TB1). Bacterial strains TB1 and H14 were identified as *Bacillus altitudinis* TB1 and *B. subtilis* H14 belonging to the microorganisms of biosafety class 1.

Keywords: Peanut, root rot, *Sclerotium rolfii*, antagonistic bacteria

Ngày nhận bài: 09/8/2022

Ngày phản biện: 15/8/2022

Người phản biện: GS.TS. Phạm Văn Toàn

Ngày duyệt đăng: 28/8/2022

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ PHÒNG BỆNH ĐẠO ÔN LÚA VÀ XÌ MỦ SẦU RIÊNG CỦA CHẾ PHẨM VI SINH Ở ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI

Lê Thị Thanh Thủy¹, Lê Như Kiều¹, Nguyễn Hồng Tuyền²,
Nguyễn Thị Bích Ngọc², Nguyễn Thúy Hạnh², Nguyễn Thị Thúy²

TÓM TẮT

Nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn lúa, nấm *Phytophthora palmivora* gây thối rễ sầu riềng, xì mù, thối trái sầu riềng. Bài báo này trình bày về hiệu quả của chế phẩm vi sinh CP1, CP4 trong việc kiểm soát bệnh đạo ôn lúa và bệnh xì mù sầu riềng trong điều kiện nhà kính. Kết quả cho thấy đối với cây lúa: Sau 30 ngày xử lý bằng CP1 tỷ lệ nhiễm bệnh đạo ôn giảm 43,0% (thuốc Beam 75 WP là 44,1%), chỉ số bệnh là 9,38% (thuốc Beam 75WP là 7,65%). Hiệu quả xử lý cao nhất với thuốc Beam 75 WP là 70,6%, chế phẩm vi sinh CP1 là 68,6%. Như vậy, khi sử dụng chế phẩm CP1 cho lúa làm giảm chỉ số bệnh đạo ôn gần như tương đương với Beam 75 WP và tốt hơn nhiều so với không sử dụng chế phẩm CP1. Đối với sầu riềng: Sau 90 ngày sử dụng chế phẩm vi sinh CP4, tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh tăng chậm (tỷ lệ bệnh từ 66,67 đến 77,78%; chỉ số bệnh từ 11,11 đến 13,58%), trong khi đó đối với Ridomil gold 68WG tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh không thay đổi theo thời gian (tỷ lệ bệnh = 77,78%; chỉ số bệnh = 9,88%); còn ở đối chứng không được bổ sung chế phẩm, tỉ lệ bệnh tăng khá nhanh (tỷ lệ bệnh = 100%, chỉ số bệnh tăng từ 23,46% lên 32,10%).

Từ khóa: Bệnh đạo ôn lúa, bệnh xì mù sầu riềng, chế phẩm vi sinh

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Pyricularia oryzae thuộc lớp nấm túi (Ascomycetes), là tác nhân gây bệnh đạo ôn lúa và là một trong những nguyên nhân gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng nhất trên thế giới (Ou, 1980). Khi cây lúa bị nhiễm bệnh, tất cả các mô lá có thể bị nấm tấn công, đặc biệt khi bệnh gây hại trên bông có thể dẫn đến mất hoàn toàn năng suất. Thiệt hại trung bình khoảng 20 - 60%, ở những vùng nhiễm nặng có thể mất hoàn toàn năng suất (Zeigler *et al.*, 1995). Thuốc trừ nấm là biện pháp chủ yếu thường được sử dụng để kiểm soát bệnh đạo ôn, tuy nhiên, sử dụng thuốc diệt nấm thường gây ra hiện tượng kháng thuốc, đồng thời dư lượng của thuốc còn ảnh hưởng đến sức khỏe con người và gây ô nhiễm môi trường (Minh Tuong Le *et al.*, 2010). Bệnh đạo ôn gây thiệt hại nặng nhất trong giai đoạn làm đòng đến trổ. Theo báo cáo của Cục Bảo vệ Thực vật (2020) cho thấy: bệnh đạo ôn hại lá có diện tích nhiễm 23.796 ha (giảm 9.721 ha so với 2019), phân bố chủ yếu tại các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long và các tỉnh Duyên hải Nam Trung Bộ; Bệnh đạo ôn cổ bông có diện tích nhiễm 854 ha (giảm 1.269 ha so với 2019), tập trung các tỉnh phía Nam.

Nấm *P. palmivora* thuộc lớp nấm trứng (Oomycetes) tồn tại trong đất, gây hại trên nhiều loại cây trồng. Trên cây sầu riềng *P. palmivora* gây ra bệnh thối gốc xì mù từ giai đoạn vườn ươm đến cây trưởng

thành và cây đang cho quả, hại trên rễ, ngoài ra nấm còn gây hại trên thân, lá, hoa và quả. Năm 2016, bệnh thối rễ xì mù đã làm chết gần 500 ha sầu riềng đang trong giai đoạn cho trái ở huyện Krông Pắc, tỉnh Đắk Lắk (tương đương 50% diện tích sầu riềng của huyện và gần 20% diện tích sầu riềng của cả tỉnh). Bệnh xì mù sầu riềng gây hại khoảng 1.196,9 ha tại Đạ Huoai, Đạ Tẻh (trong đó 340,1 ha nhiễm nặng), giảm 171,6 ha so với kỳ trước, TLB 16,2 - 43,3% (Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật tỉnh Lâm Đồng, 2020). Trạm Bảo vệ thực vật huyện Krông Pắc cho biết trên địa bàn huyện đã có hàng trăm héct-a sầu riềng chết chưa rõ nguyên nhân, tập trung chủ yếu ở các xã Ea Kênh, Ea Yông và thị trấn Phước An,... Cây sầu riềng chết hàng loạt đã gây thiệt hại lớn cho nông dân (Báo Nhân dân, 2017). Hiện nay, tình trạng sầu riềng chết hàng loạt vẫn đang tiếp tục lan rộng, toàn huyện có gần 1.000 ha sầu riềng, chủ yếu là sầu riềng ghép giống Dona, Mong Thong, Ri6,... được trồng xen trong vườn cà-phê.

Người dân thường sử dụng thuốc gốc clorua đồng, acibenzolar-S-methyl và nấm *Colletotrichum* sp. hoặc nấm *Chaetomium* sp. phòng bệnh đạo ôn, hiệu quả giảm bệnh đạo ôn được xử lý với clorua đồng là 68,7%, acibenzolar-S-methyl là 68,4%, *Colletotrichum* sp. là 60,2%. Phòng trị bệnh xì mù sầu riềng người dân thường được khuyến cáo sử dụng thuốc có hoạt chất như Metalaxyl, Mancozeb,

¹ Viện Thổ nhưỡng Nông hóa

² Viện Bảo vệ Thực vật

* Tác giả liên hệ, e-mail: lethuysfri@gmail.com