

PHÂN LẬP VI KHUẨN NỘI SINH TỪ CÂY CÀ CHUA ĐỐI KHÁNG VỚI *Ralstonia solanacearum*

Nguyễn Minh Lý*, Kiều Đức Toàn

Khoa Sinh-Môi trường, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng

*Tác giả liên hệ: nmly@ued.udn.vn

Nhận bài: 17/01/2023 Hoàn thành phản biện: 28/03/2023 Chấp nhận bài: 30/03/2023

TÓM TẮT

Vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* là tác nhân gây ra bệnh héo xanh ở trên hơn 200 loài thực vật, bao gồm cây cà chua. Cho đến nay, mặc dù đã có nhiều biện pháp phòng chống loại bệnh này, tuy nhiên, kết quả áp dụng đạt được vẫn còn hạn chế. Trong nghiên cứu này, đã tiến hành phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn nội sinh từ cây cà chua có khả năng đối kháng cao với *R. solanacearum*. Kết quả thu được 10 chủng vi khuẩn nội sinh từ thân cây cà chua được trồng tại xã Hòa Ninh, huyện Hòa Vang, thành phố Đà Nẵng. Trong đó, đã tuyển chọn và định danh được 01 chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* B02 có khả năng đối kháng cao với *R. solanacearum*. Đường kính vòng đối kháng trên đĩa thạch đạt $16,67 \pm 0,33$ mm. Khi xử lý hạt cà chua bằng chủng *B. amyloliquefaciens* B02 có thể làm giảm tỉ lệ nhiễm bệnh ở giai đoạn cây con lên đến 83,33%.

Từ khóa: *Bacillus* spp., Đối kháng, Héo xanh, *Ralstonia solanacearum*, Vi khuẩn nội sinh

ISOLATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA IN TOMATO PLANTS AGAINST *Ralstonia solanacearum*

Nguyen Minh Ly*, Kieu Duc Toan

Faculty of Biology and Environmental Science, The University of Danang –

University of Science and Education

ABSTRACT

Ralstonia solanacearum is the causative agent of bacterial wilt disease in more than 200 plant species, including tomato. Up to now, many measures have been used to prevent this disease, but they have not been completely effective. In this study, we isolated endophytic bacteria in tomato plants and selected the endophytic strain against *R. solanacearum*. According to the research results, 10 endophytic strains were isolated. In which, 01 strain was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* B02 has a high antagonistic ability to *R. solanacearum*. The diameter of the zone of inhibition on the agar plate is 16.67 ± 0.33 mm. Treating tomato seeds with *B. amyloliquefaciens* strain B02 can reduce the infection rate at seedling stage up to 83.33%.

Keywords: Antagonistic ability, Bacterial wilt, *Bacillus* spp., Endophytic bacteria, *Ralstonia solanacearum*

1. MỞ ĐẦU

Bệnh héo xanh do phức hợp các loài vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* (*Ralstonia solanacearum* species complex - RSSC) gây ra, là một trong những bệnh hại rất phổ biến và nghiêm trọng đối với quá trình sản xuất các loại cây trồng nông nghiệp. RSSC có phạm vi phân bố rộng, bao gồm các vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới và nhiều khu vực ôn đới trên thế giới (Peeters và cs., 2013). Đây là loại vi khuẩn có nhiều chủng sinh lý và sinh học khác nhau với có phổ ký chủ rất rộng, có khả năng gây hại trên 200 loại cây, đặc biệt gây hại nặng trên cây họ Cà (Prior và cs., 2016). Vì mức độ gây thiệt hại nặng nề, cũng như khó khăn trong việc phòng chống, bệnh vi khuẩn héo xanh chịu sự kiểm soát chặt chẽ của kiểm dịch Quốc tế, nhất là các nước thuộc cộng đồng Châu Âu (Trương Thị Bích Vân và cs., 2019).

Hiện nay, công tác phòng chống bệnh héo xanh vi khuẩn còn gặp rất nhiều khó khăn (Aslam và cs., 2017). Các biện pháp phòng chống bệnh héo xanh được áp dụng bao gồm giống cây trồng kháng bệnh, biện pháp canh tác (luân canh, gốc ghép), thuốc bảo vệ thực vật hóa học, nano kim loại (nano bạc, nano đồng), và kiểm soát sinh học bằng các chủng vi sinh vật đối kháng với RSSC (Agarwal và cs., 2020). Tuy nhiên, cho đến nay hiệu quả của các biện pháp phòng chống bệnh héo xanh vi khuẩn vẫn còn hạn chế do sự phức tạp trong hệ thống phân loại của RSSC, khả năng biến đổi nhanh, tồn tại lâu dài của chúng trong các điều kiện khác nhau với phổ ký chủ rộng (Mohamed và cs., 2020). Ngoài ra, việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật hóa học còn có thể gây ảnh hưởng xấu tới môi trường sinh thái, chất lượng sản phẩm và sức khỏe cộng đồng (Lê Thị Thanh Thủy, 2015). Vì vậy, ở nhiều địa phương việc sản xuất cây trồng, đặc biệt là cà chua còn gặp nhiều khó khăn.

Trong đó, tại Đà Nẵng gần như không thể phát triển diện tích lớn cho canh tác cà chua.

Trong những năm gần đây, đã có nhiều nghiên cứu về việc sử dụng vi khuẩn nội sinh như một biện pháp kiểm soát các loại bệnh hại ở nhiều loại cây trồng (Eid và cs., 2021). Theo Amaresan và cs. (2012), các vi khuẩn nội sinh đối kháng lại *R. solanacearum* thuộc nhiều chi khác nhau như: *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*. Bahmani và cs. (2021) đã phân lập được 8 chủng vi khuẩn nội sinh thuộc các loài *Pseudomonas brassicacearum*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas putida*, *Paenibacillus peoriae*, và *Bacillus pumilus* có thể kiểm soát bệnh héo xanh trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*. Trong điều kiện nhà kính, vi khuẩn nội sinh *Bacillus subtilis* có khả năng bảo vệ tốt cây dâu chống lại *R. solanacearum* (Ji và cs., 2008). Vi khuẩn nội sinh phân lập từ *Gnetum gnemon* được ứng dụng không chỉ để bảo vệ cây con, mà còn tăng cường sinh trưởng ở cà chua (Agarwal và cs., 2020). Vi khuẩn *Bacillus cereus* đã hạn chế biểu hiện của bệnh héo xanh và giảm tỷ lệ bệnh đến 80,0% (Achari và cs., 2018).

Tại Việt Nam đã có một số vi khuẩn gram dương thuộc chi *Bacillus* và vi khuẩn gram âm thuộc chi *Agrobacterium* và *Pseudomonas* đã được phân lập từ một số loại cây trồng thuộc cây họ Cà thể hiện hoạt tính đối kháng cao với *R. solanacearum* trong điều kiện *in vitro* (Nguyễn Thị Hồng Hải, 2006). Tuy nhiên, hiệu quả ứng dụng của các chủng này trong thực tế vẫn còn hạn chế và khác biệt ở các chủng vi khuẩn gây bệnh khác nhau. Vì vậy, trong nghiên cứu đã tiến hành phân lập chủng vi khuẩn nội sinh mới có khả năng đối kháng cao với chủng *R. solanacearum* ở Đà Nẵng.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vi khuẩn nội sinh được phân lập từ cây cà chua tại xã Hòa Ninh, huyện Hòa Vang, thành phố Đà Nẵng.

Chủng vi khuẩn *R. solanacearum* phân lập ở thành phố Đà Nẵng được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Sinh học tế bào thuộc khoa Sinh - Môi trường, trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng.

Giống cà chua bi Cherry do Công ty TNHH Giống cây trồng Phú Nông sản xuất được sử dụng trong thử nghiệm khả năng đối kháng của vi khuẩn nội sinh với vi khuẩn *R. solanacearum*.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thu mẫu: 05 mẫu thân chiều dài 20-30 cm được thu ngẫu nhiên từ cây cà chua không nhiễm bệnh ở giai đoạn sinh trưởng khoảng 60 ngày sau gieo và cho vào túi zip, bao kín, đánh dấu, ghi địa điểm, thời gian lấy mẫu và chuyển về phòng thí nghiệm để phục vụ cho việc phân lập mẫu trong vòng 24 giờ.

Phương pháp phân lập vi khuẩn nội sinh: Mẫu thân cây được rửa dưới vòi nước chảy trong 15 phút để loại bỏ bụi bẩn. Sau đó cắt mẫu thành những đoạn nhỏ 2-3 cm và tiến hành khử trùng bề mặt bằng ethanol 70% trong 3 phút, tiếp tục dùng sodium hypochloride (NaOCl) 0,5% trong 3 phút và ethanol 70% trong 30 giây. Cuối cùng rửa lại mẫu bằng nước cất vô trùng 5 lần (Agarwal và cs., 2020). Để kiểm tra hiệu quả khử trùng bề mặt nguồn mẫu, đối với mỗi mẫu lấy 0,1 ml nước rửa mẫu lần cuối cấy trang trên đĩa petri chứa môi trường Luria-Bertani (LB) (pepton 10 g/l; NaCl 10 g/l; cao nấm men 5 g/l; agar 18 g/l). Đặt các đĩa petri này trong tủ nuôi ở 30°C trong 48 giờ đồng thời với các đĩa cấy mẫu thân. Nếu không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm trong các đĩa này chứng tỏ việc khử trùng đã đạt yêu cầu. Các mẫu thân được cắt nhỏ

sau đó nghiền với 5 ml nước cất, hút 50 µl dịch huyền phù nuôi cấy trên đĩa petri chứa môi trường LB và nuôi ở 30°C trong 48-96 giờ. Các khuẩn lạc xuất hiện được chọn và cấy ria trên môi trường LB mới để làm thuần. Hình thái khuẩn lạc được quan sát và mô tả.

Phương pháp nhuộm gram: Làm tiêu bản vết bôi mẫu cần nhuộm khi cố định mẫu bằng ngọn lửa đèn cồn. Sau đó nhuộm bằng crystal violet trong 1 phút, rửa bằng nước cất (tối đa 5 giây), thấm khô. Thêm dung dịch lugol trong 1 phút. Rửa bằng cồn 90% trong 15 giây, rửa lại bằng nước và thấm khô. Nhuộm bổ sung bằng fuchsin trong 1 phút, rửa nước cất, thấm khô, và quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 100X. Ghi nhận khả năng bắt màu thuốc nhuộm.

Định danh vi khuẩn nội sinh bằng phương pháp giải trình tự 16S-23S: Tiến hành tách chiết DNA theo phương pháp CTAB (Phillips và cs., 2011). 20 µl phản ứng PCR với thành phần: PCR buffer 2X, mỗi xuôi (1493F 5'-AGTCGTAACAAGGTAGCCGT - 3') 1 pmol, mỗi ngược (23R 5'-GTGCCAAGGCATCCACC - 3) 1 pmol, DNA 50 ng (Li và de Boer, 1995). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR bao gồm: Biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ gồm: biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn mẫu ở 58°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 30 giây; và kết thúc ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong dung dịch đệm 1X TAE, ở hiệu điện thế 100V trong 30 phút. Kết quả điện di được quan sát trên máy soi UV. Giải trình tự DNA được tiến hành bởi công ty First BASE - Malaysia. Trình tự giải mã được so sánh trên ngân hàng gen NCBI (National Center for Biotechnology Information) bằng công cụ BLASTN (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool).

Phương pháp đánh giá hoạt lực đối kháng của vi khuẩn nội sinh được tiến hành

theo phương pháp khuếch tán lỗ thạch. Cây trang 0,1 ml dịch vi khuẩn *R. solanacearum* vào đĩa petri chứa môi trường Sucrose Peptone Agar (SPA) (sucrose 20 g/l, pepton 5 g/l, K₂HPO₄ 0,25 g/l, MgSO₄.7H₂O 0,25 g/l, agar 15g/l) đã chuẩn bị sẵn. Đục lỗ thạch đường kính 1 cm ở phần tâm của đĩa Petri. Tiếp theo, cây 0,1 ml dịch vi sinh vật đối kháng vào các giếng đã được chuẩn bị và giữ ở điều kiện thích hợp tùy thuộc từng chủng giống vi sinh vật đối kháng (từ 28°C đến 30°C không ít hơn 2 ngày đối với vi khuẩn) (Yuan và cs., 2022). Mỗi mẫu được cấy lặp lại không ít hơn 3 lần. Hoạt tính đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum* được thể hiện thông qua kích thước vòng đối kháng.

Kích thước vòng đối kháng (mm) của vi khuẩn nội sinh được tính theo công thức: Kích thước vòng đối kháng (mm) = D – d. Trong đó, D là đường kính vòng đối kháng (mm), d là đường kính lỗ giếng (mm).

Phương pháp lây bệnh nhân tạo được tiến hành trên cây con từ 6-7 ngày tuổi (Singh và cs., 2018). Ngâm hạt giống trong dung dịch vi khuẩn nội sinh đối kháng ở mật độ 10⁸ CFU/ml và ủ trong đĩa petri ẩm trong 6 ngày. Sau đó, nhúng rễ các cây con 6-7 ngày vào các dịch chứa vi khuẩn *R. solanacearum* ở mật độ 10⁸ CFU/ml. Sau đó, để cây có rễ đã được tiếp xúc với vi khuẩn ngoài không khí 5 phút. Tiếp tục đưa các cây từ môi trường vào các ống eppendorf đã vô trùng rồi cho thêm 1,5 – 2 ml nước cất vô trùng. Ngoài ra, trong thí nghiệm cũng sử dụng mẫu đối chứng âm là mẫu chỉ bổ sung vi khuẩn nội sinh và đối chứng dương mà mẫu chỉ bổ sung vi khuẩn *R. solanacearum*. Mỗi nghiệm thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần gồm 30 cây. Khả năng đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum* được tính theo công thức: Tỷ

lệ bệnh (%) = [Số cây bị bệnh/Tổng số cây thí nghiệm] × 100

Phương pháp tái phân lập vi khuẩn R. solanacearum. Mẫu cây con có triệu chứng và không có triệu chứng bệnh sau thí nghiệm lây bệnh nhân tạo được rửa sạch bằng nước cất và khử trùng bề mặt bằng ethanol 70%. Sau đó nghiền trong 200 µl nước cất vô trùng. Hút 100 µl mẫu dịch vi khuẩn đã pha loãng và nhỏ lên 03 đĩa petri chứa môi trường Tetrazolium chloride (TZC) (peptone 10g/l; glucose 5g/l; casein 1g/l; 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride 0,05g/l; agar 17g/l, penicillin 0,5 mg/l, pH = 7 - 7,2 ở 28°C) và tiến hành cấy trang. Sau đó ủ mẫu ở 28°C trong tủ ẩm từ 24 - 48 -72 giờ (Zheng và cs., 2022). Các khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường TZC được quan sát hình thái và định danh phân tử.

Định danh phân tử vi khuẩn R. solanacearum được tiến hành theo phương pháp PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu 759/760 (5'-GTCGCCGTCAACTCACTTTCC - 3'; 5'-GTCGCCGTGAGCAATGCGGGAATCG - 3') (Opina và cs., 1997).

Xử lý số liệu: Số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 22.0 để so sánh sự khác biệt giữa các số liệu với giá trị p=0,05.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn nội sinh

Từ các mẫu cây không nhiễm bệnh đã phân lập được 10 chủng vi khuẩn nội sinh (Bảng 1). Trước đây một số tác giả đã chỉ ra rằng các loài thuộc chi *Bacillus* là một trong số những loài vi khuẩn nội sinh chiếm ưu thế được phân lập ở thực vật (Latha và Rajeswari, 2019).

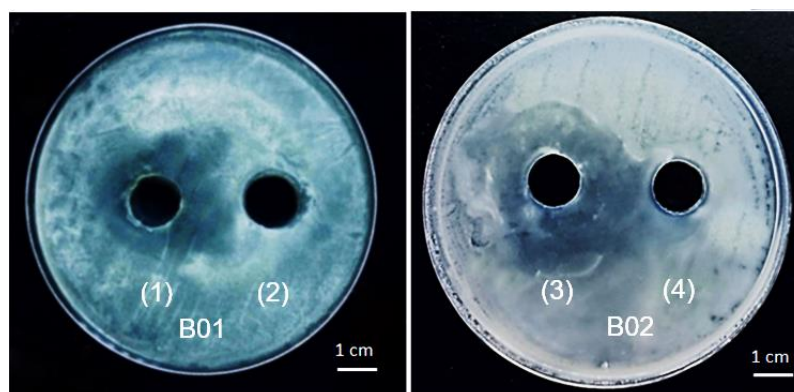
Bảng 1. Đặc điểm khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ cây cà chua

Kí hiệu chủng vi khuẩn	Mô tả hình thái khuẩn lạc	Gram
B01	Khuẩn lạc to tròn, có bề mặt khô ráp, xù xì, viền ngoài nhiều nếp nhăn màu trắng sữa	+
B02	Khuẩn lạc màu trắng sữa, xù xì, khô ráp, tròn, bề mặt nhăn khô, tâm lõi sần sùi	+
B03	Khuẩn lạc có màu hồng nhạt, bề mặt tròn nhỏ, trơn bóng	-
B04	Khuẩn lạc có bề mặt khô ráp, xù xì, màu trắng sữa	+
B05	Khuẩn lạc khô, dẹt, có tâm ở giữa màu trắng đục, đậm hơn với viền ngoài	+
B06	Khuẩn lạc tròn, bề mặt nhăn, khô, sần sùi, màu trắng sữa	+
B07	Khuẩn lạc to tròn, nhăn và khô xung quanh bề mặt, có màu trắng sữa	+
B08	Khuẩn lạc màu trắng kem, nhiều nếp nhăn, khô	+
B09	Khuẩn lạc tròn, nhỏ màu trắng sữa, bề mặt trơn nhăn	+
B10	Khuẩn lạc màu trắng đục, bề mặt nhăn, khô	+

3.2. Khảo sát khả năng đối kháng của vi khuẩn nội sinh với vi khuẩn *R. solanacearum*

Trong nghiên cứu của Amaresan và cs. (2012) đã chỉ ra rằng các vi khuẩn có hoạt tính đối kháng với *R. solanacearum* chiếm ưu thế thường liên quan đến các chi *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, và *Agrobacterium*. Với 10 chủng vi khuẩn nội

sinh phân lập từ mẫu cây cà chua, tiến hành khảo sát hoạt tính đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum* trên môi trường SPA và theo dõi đường kính vòng đối kháng sau 48 giờ và 72 giờ. Kết quả thử nghiệm hoạt tính đối kháng bằng phương pháp khuếch tán lỗ thạch, cho thấy trong 10 chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập, chỉ có 2 chủng vi khuẩn B01 và B02 là có khả năng đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum* (Hình 1, Bảng 2).



Hình 1. Kết quả thử nghiệm bằng phương pháp khuếch tán lỗ thạch
(1): Dịch vi khuẩn chủng B01; (2): Đối chứng âm;
(3): Dịch vi khuẩn chủng B02; (4): Đối chứng âm

Bảng 2. Hoạt lực đối kháng ($X \pm SE$) của 2 chủng vi khuẩn nội sinh B01, B02 với vi khuẩn *R. solanacearum*

Tên chủng vi khuẩn	Đường kính vòng đối kháng (mm)	
	48 giờ	72 giờ
B01	10,33 $\pm$ 0,33 ^a	13,67 $\pm$ 0,33 ^b
B02	14,33 $\pm$ 0,33 ^b	16,67 $\pm$ 0,33 ^c
Đối chứng	0	0

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với $p = 0,05$.

Hoạt tính đối kháng của 2 chủng vi khuẩn được tuyển chọn thể hiện qua đường kính vòng ức chế của chúng với vi khuẩn *R. solanacearum*. Có sự khác biệt về khả năng đối kháng giữa chủng B01 và chủng B02, chủng B01 cho khả năng đối kháng thấp hơn so với chủng B02 là 4 mm ở 48 giờ và 3 mm ở 72 giờ. Thời gian khảo sát cũng cho thấy sự sai khác về khả năng đối kháng. Mức độ đối kháng của các chủng vi khuẩn cũng tăng dần từ 48 đến 72 giờ. Trong quá trình sinh trưởng và phát triển, vi khuẩn nội sinh vừa cạnh tranh dinh dưỡng vừa có thể đã tiết ra một số chất gây ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* (Latha và Rajeswari, 2019).

Như vậy, các chủng vi khuẩn B01 và B02 được tiếp tục sử dụng để khảo sát khả năng kháng bệnh trên cây cà chua.

3.3. Khảo sát khả năng kháng vi khuẩn *R. solanacearum* của vi khuẩn nội sinh ở giai đoạn cây con

Để bước đầu đánh giá khả năng sử dụng các chủng vi khuẩn nội sinh trong thực tiễn phòng chống bệnh héo xanh, đã tiến hành thí nghiệm khảo sát trên cây con cà chua 6-7 ngày tuổi. Kết quả thu được cho thấy có sự khác biệt đáng kể về tỉ lệ héo của cây con ở các nghiệm thức. Ngoài ra giữa các thời điểm quan sát cũng ghi nhận tỉ lệ héo của cây con khác nhau (Bảng 3).

Bảng 3. Khả năng đối kháng ($X \pm SE$) của vi khuẩn nội sinh B01, B02 đối với *R. solanacearum* trên cây cà chua 6-7 ngày tuổi.

Nghiệm thức thí nghiệm	Tỉ lệ bệnh (%) sau khi lây nhiễm <i>R. solanacearum</i>	
	3 ngày	7 ngày
ĐC (-)	0 $\pm$ 0,00 ^a	0 $\pm$ 0,00 ^a
B01	0 $\pm$ 0,00 ^a	26,7 $\pm$ 0,33 ^c
B02	0 $\pm$ 0,00 ^a	16,67 $\pm$ 0,33 ^b
ĐC (+)	72,22 $\pm$ 10,01 ^b	100 $\pm$ 0,00 ^d

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với $p = 0,05$.

Trong nghiệm thức đối chứng dương khi không xử lý hạt bằng vi khuẩn nội sinh đã bắt đầu quan sát thấy triệu chứng héo xanh sau 1 ngày lây nhiễm vi khuẩn *R. solanacearum*. Sau 3 ngày lây nhiễm tỉ lệ bệnh đã đạt rất cao lên đến 72,22%. Trong khi đó, ở các nghiệm thức đối chứng âm và hạt giống được xử lý bằng các chủng vi khuẩn nội sinh B01, B02 vẫn chưa quan sát thấy sự xuất hiện triệu chứng héo ở cây con.

Sau 3 ngày, số cây con ở nghiệm thức đối chứng dương bị héo hoàn toàn, với tỉ lệ bệnh đạt 100%. Đối với nghiệm thức được xử lý hạt bằng vi khuẩn nội sinh B01, B02 có tỉ lệ bệnh thấp hơn nhiều so với nhóm đối

chứng dương, lần lượt là 26,7% và 16,67%. Sự khác biệt về hiệu quả kháng bệnh giữa chủng vi khuẩn có ý nghĩa thống kê. Đồng thời ở nghiệm thức đối chứng âm không ghi nhận triệu chứng héo xanh ở cây con. Điều này chứng tỏ vi khuẩn *R. solanacearum* là tác nhân gây ra triệu chứng héo xanh ở các nghiệm thức thí nghiệm và các chủng vi khuẩn nội sinh B01 và B02 có tiềm năng trong phòng trừ bệnh héo xanh trên cây cà chua.

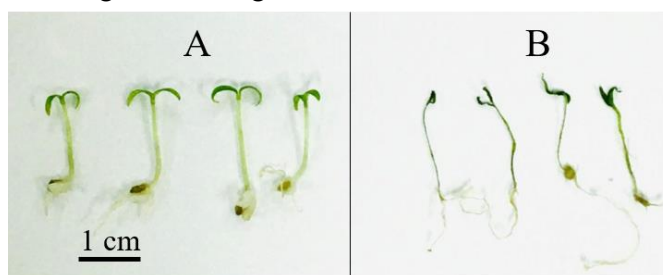
Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng vi khuẩn B01 và B02 là 2 chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng ức chế vi khuẩn *R.*

solanacearum và làm giảm tỉ lệ cây chết do bị héo. Khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* của vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* cũng được báo cáo bởi Agarwal và cs. (2020). Theo giả thuyết của một số nghiên cứu trước đây, khả năng ức chế RSSC có thể do chủng vi khuẩn đã sản xuất enzyme protease, amylase và các peptide kháng khuẩn (Agarwal và cs., 2020). Trong đó, các peptide kháng khuẩn có thể là bacillomycin, iturin, fengycin và surfactin. Sự biểu hiện của các gen liên quan đến quá trình tổng hợp sinh học của các peptide kháng khuẩn này có liên hệ trực tiếp với khả năng kiểm soát sinh học đối với nhiều vi sinh vật gây bệnh. Ngoài ra, các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* cũng có khả năng

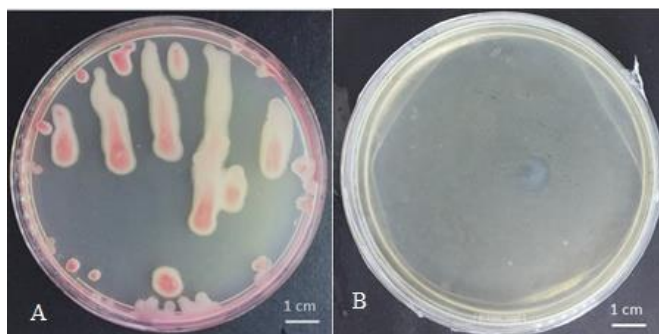
sản xuất phytohormone thúc đẩy sự tăng trưởng ở thực vật (Eid và cs., 2021). Điều này cũng góp phần làm tăng cường khả năng chống chịu với tác nhân gây hại.

3.4. Tái phân lập vi khuẩn và xác định tác nhân gây bệnh héo xanh

Để khẳng định các giống cây trong các nghiệm thức bị héo xanh là do độc tính của vi khuẩn gây nhiễm, đã thực hiện tái phân lập từ cây có triệu chứng héo xanh (Hình 2). Kết quả tái phân lập của các chủng vi khuẩn cho thấy, từ các cây có biểu hiện bệnh đã thu được một loại khuẩn lạc có hình thái tương tự với khuẩn lạc ban đầu. Trong khi từ các cây không có biểu hiện bệnh không phát hiện tác nhân gây bệnh.



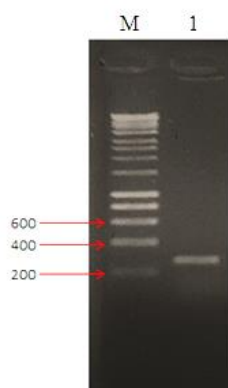
Hình 2. Cây cà chua không có biểu hiện (A) và có biểu hiện bệnh héo xanh (B)



Hình 3. Tái phân lập vi khuẩn *R. solanacearum* trên môi trường TZC. A. Phân lập từ cây cà chua biểu hiện bệnh. B. Phân lập từ cây cà chua không có biểu hiện bệnh

Tiếp tục định danh phân tử khuẩn lạc thu được trên đĩa pettri bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc (Colony PCR) với cặp mồi đặc hiệu 759/760. Kết quả cho thấy, từ mẫu khuẩn lạc ở cây nhiễm bệnh đã thu được sản phẩm PCR với kích thước khoảng từ 280 bp đặc trưng cho vi khuẩn RSSC (Hình 4). Điều này cho thấy, vi khuẩn thu được khi phân lập từ cây nhiễm bệnh héo xanh là vi khuẩn *R. solanacearum*.

Kết hợp các dữ liệu đã thu được, có thể khẳng định độ đáng tin cậy của thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo và các cây héo xanh là do vi khuẩn *R. solanacearum* gây ra. Các chủng vi khuẩn nội sinh B01, B02 có khả năng đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum*. Trong đó, chủng B02 có khả năng đối kháng mạnh hơn chủng B01.



Hình 4. Điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc với cặp mồi 759/760. M: ladder 1kB; 1: Mẫu vi khuẩn tái phân lập

3.5. Định danh phân tử chủng vi khuẩn nội sinh B02

Chủng B02 có khả năng đối kháng cao với chủng vi khuẩn *R. solanacearum* vì vậy, trong nghiên cứu đã tiến hành định danh phân tử chủng này để ứng dụng trong các nghiên cứu và ứng dụng tiếp theo. Dựa vào kết quả so sánh với các trình tự 16S-23S

đã có trên GenBank của NCBI bằng phần mềm BLAST, chủng B02 được xác nhận là vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* với mức độ tương đồng 100% (Hình 5). Trong nhiều công bố trước đây cũng đã phân lập được các chủng vi khuẩn nội sinh thuộc loài *Bacillus amyloliquefaciens* có khả năng đối kháng cao với vi khuẩn *R. solanacearum* (Tan và cs., 2013; Singh và cs., 2022).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☐ Bacillus amyloliquefaciens strain BM27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus amyloliquefaciens	2121	2121	100%	0.0	98.58%	1261	MZ436124.1
☐ Bacillus sp. (in: Bacteria) strain BR16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: firmicutes)	2109	2109	99%	0.0	98.41%	1237	MW677565.1
☐ Bacillus sp. hb77 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. hb77	2108	2108	99%	0.0	98.34%	1451	KF863868.1
☐ Bacillus sp. (in: Bacteria) strain BR37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: firmicutes)	2106	2106	99%	0.0	98.41%	1237	MW828613.1

Hình 5. Kết quả so sánh trình tự 16S-23S của chủng B02 với các trình tự có sẵn trên GenBank

4. KẾT LUẬN

Trong kết quả nghiên cứu, đã phân lập được 10 chủng vi khuẩn nội sinh từ mẫu thân cây cà chua. Trong đó, đã xác định được một chủng vi khuẩn nội sinh *Bacillus amyloliquefaciens* B02 có khả năng đối kháng cao với vi khuẩn *R. solanacearum* khi đánh giá bằng phương pháp khuếch tán lỗ thạch và gây bệnh nhân tạo trong điều kiện *in vitro*. Việc xử lý hạt cà chua bằng chủng *B. amyloliquefaciens* B02 cho phép giảm tỉ lệ cây con bị bệnh héo xanh lên tới 83,33% so với nghiệm thức không xử lý. Kết quả này là tiền đề để tiếp tục thực hiện đánh giá khả năng đối kháng của chủng *B. amyloliquefaciens* B02 với *R. solanacearum* ở ngoài đồng ruộng và ứng dụng trong phòng trừ bệnh héo xanh do *R. solanacearum* trên cây cà chua.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

Nguyễn Thị Hồng Hải, Hoàng Hoa Long, Nguyễn Linh Chi và Nguyễn Ngọc Cường (2006), Đặc điểm sinh học và ứng dụng vi khuẩn nội sinh thực vật trong phòng trừ bệnh héo xanh cây trồng (do *Ralstonia solanacearum*). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 18(2), 77-79.

Trương Thị Bích Vân, Nguyễn Ngọc Hải Uyên, Nguyễn Song Hân, Nguyễn Thanh Như Ngọc, Nguyễn Văn Trúc, Lê Tuấn Kiệt, Mã Ngọc Thiên, Nguyễn Thị Bích Hiền, Nguyễn Hoàng Vũ, Lê Hoàng Bảo Ngọc, & Lê Văn Khôi Nguyên (2019), Phân lập thực khuẩn thể từ đất trồng cây được liệu có khả năng ức chế vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 55(2), 65-73.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Achari, G. A., & Ramesh, R. (2018), Colonization of Eggplant by Endophytic Bacteria Antagonistic to *Ralstonia solanacearum*, the Bacterial Wilt Pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 89, 585-593.

Agarwal, H., Dowarah, B., Baruah, P. M., Bordoloi, K. S., Krishnatreya, D. B., & Agarwala, N. (2020), Endophytes from *Gnetum gnemon* L. can protect seedlings against the infection of phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* as well as promote plant growth in tomato. *Microbiological Research*, 238, 126503.

Amaresan, N., Jayakumar, V., Kumar, K., & Thajuddin, N. (2012), Endophytic bacteria from tomato and chili, their diversity and antagonistic potential against *Ralstonia solanacearum*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45(3), 344-355.

Aslam, M. N., Mukhtar, T., Hussain M. A., & Raheel, M. (2017), Assessment of resistance to bacterial wilt incited by *Ralstonia solanacearum* in tomato germplasm. *Journal Plant Disease Protection*, 124(6), 585-590.

Eid, A.M., Fouda, A., Abdel-Rahman, M.A., Salem, S.S., Elsaied, A., Oelmüller, R., Hijri, M., Bhowmik, A., Elkelish, A., & Hassan, S.E.-D. (2021), Harnessing Bacterial Endophytes for Promotion of Plant Growth and Biotechnological Applications: An Overview. *Plants*, 10(5), 935.

Ji, X., Lu, G., Gai, Y., Zheng, C., & Mu, Z. (2008), Biological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic *Bacillus subtilis* strain. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(3), 565-573.

Latha, P., Karthikeyan, M., & Rajeswari, E. (2019), Endophytic Bacteria: Prospects and Applications for the Plant Disease Management. In: Ansari, R., Mahmood, I. (eds) *Plant Health Under Biotic Stress*. Springer, Singapore.

Li, X., & de Boer, S. H. (1995). Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *spedonicus*. *Phytopathology*, 85(8), 837-842.

Mohamed, A. F., Oloyede, A. L., & Odeseeye, A. O. (2020), Biological control of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* using *Pseudomonas* species isolated from the rhizosphere of tomato plants. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 53(1-2), 1-16.

Opina, N., Tavner, F., Hollway, G., Wang, J. F., Li, T. H., Maghirang, R., Fegan, M., Hayward, A. C., Krishnapillai, V., Hong, W.

- F., Holloway, B. W., & Timmins, J. (1997), A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia pacific journal of molecular biology and biotechnology*, 5(1), 19–30.
- Peeters, N., Guidot, A., Vailleau, F., & Valls, M. (2013), *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post genomic era. *Molecular Plant Pathology*, 14(7), 651–662.
- Phillips, N., Smith, C. M., & Morden, C. W. (2001). An effective DNA extraction protocol for brown algae. *Phycological research*, 49(2), 97-102.
- Prior, P, Ailloud, F, Dalsing, B. L., Remenant, B., Sanchez, B., & Allen, C. (2016), Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. *BMC genomics*, 17(1), 1-11.
- Singh, D., Devappa, V., & Yadav, D. K. (2022), Suppression of Tomato Bacterial Wilt Incited by *Ralstonia pseudosolanacearum* Using Polyketide Antibiotic-Producing *Bacillus* spp. isolated from Rhizospheric Soil. *Agriculture*, 12, 2009.
- Singh, N., Phukan, T., Sharma, P. L., Kabyashree, K., Barman, A., Kumar, R., Sonti, R. V., Genin, S., & Ray S. K. (2018), An Innovative Root Inoculation Method to Study *Ralstonia solanacearum* Pathogenicity in Tomato Seedlings. *Phytopathology*, 108(4), 436-442.
- Tan, S., Dong, Y., Liao, H., Huang J., Song, S., Xu. Y., & Shen, Q. (2013), Antagonistic bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* induces resistance and controls the bacterial wilt of tomato. *Pest Management Science*, 69(11), 1245–1252.
- Yuan, W., Ruan, S., Qi, G., Wang, R., & Zhao, X. (2022), Plant growth-promoting and antibacterial activities of cultivable bacteria alive in tobacco field against *Ralstonia solanacearum*. *Environmental microbiology*, 24(3), 1411–1429.
- Zheng, X., Wang, Z., Chen, M., Chen, Z., Wang, J., & Zhu., Y. (2022), Genetic stability of virulent, intermediate, and avirulent strains of *Ralstonia solanacearum* after extensive, consecutive subculturing. *Biological Control*, 167, 104845.