

Tuyển chọn chủng vi khuẩn tiềm năng đối kháng nấm *Sclerotium rolfsii* gây bệnh trên lạc

Nguyễn Thanh Huyền, Đặng Việt Hưng, Đặng Thị Thanh Tâm*
Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Selection of antifungal bacteria against *Sclerotium rolfsii* causing white stem rot in peanuts

Nguyen Thanh Huyen, Dang Viet Hung, Dang Thi Thanh Tam*

Vietnam National University of Agriculture

*Corresponding author: thanhtram@vnua.edu.vn

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.13.6.2024.011-019>

TÓM TẮT

Bệnh thối gốc lạc do nấm *Sclerotium rolfsii* gây ra là một trong những bệnh hại cây trồng ảnh hưởng rất lớn tới năng suất cây lạc. Tuy nhiên, biện pháp chủ yếu để kiểm soát bệnh thối gốc lạc đang được sử dụng vẫn là thuốc hóa học, điều này khiến cho môi trường hệ sinh thái, cũng như sức khỏe của con người bị ảnh hưởng. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích tuyển chọn chủng vi khuẩn đối kháng mạnh tiềm năng với nấm *S. rolfsii* để ứng dụng trong phòng trừ bệnh héo rũ lạc. Nghiên cứu đã tuyển chọn được 3 chủng vi khuẩn HN2, HN4 và GL11 có khả năng đối kháng nấm *S. rolfsii* mạnh. Dịch nuôi cấy các chủng vi khuẩn tuyển chọn thể hiện khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi nấm, cũng như sự nảy mầm của hạch nấm. Tuy nhiên các hoạt chất kháng nấm do ba chủng vi khuẩn tuyển chọn tiết ra không bền với nhiệt. Dựa trên phân tích trình tự gen 16S rRNA và cặp mồi đặc hiệu đã xác định được 3 chủng vi khuẩn tuyển chọn đều thuộc loài *B. amyloliquefaciens*. Ngoài ra, chủng GL11 thể hiện sự kích thích sinh trưởng đối với cây lạc thể hiện qua khối lượng tươi của cây và rễ củ. Kết quả nghiên cứu cho thấy ba chủng vi khuẩn này là những chủng tiềm năng cho hướng nghiên cứu phát triển các tác nhân phòng trừ bệnh héo rũ lạc.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 07/08/2024

Ngày phản biện: 09/09/2024

Ngày quyết định đăng: 30/09/2024

Từ khóa:

Bacillus amyloliquefaciens, *Bacillus* sp., cây lạc, *Sclerotium rolfsii*, vi khuẩn kích thích sinh trưởng.

ABSTRACT

White stem rot disease caused by *Sclerotium rolfsii* is one of the most serious diseases effects on peanut yields. However, the most common controlling method is using chemicals that have negative impacts on the natural environment, ecosystems, and human health. This research aimed to screen potential strong antagonistic bacterial strains against *S. rolfsii* to apply in the management of this disease. As a result, three bacterial strains named HN2, HN4, and GL11, with strong antagonistic activity, were selected. The culture filtrate of these selected strains inhibited mycelial growth and sclerotial germination rates of *S. rolfsii*. However, the data also indicated that antifungal compounds in culture filtrates were heat sensitive. Based on analysis of 16S rRNA gene sequence and PCR testing of specific genes, three selected bacterial strains were identified as *B. amyloliquefaciens*. In addition, *B. amyloliquefaciens* GL11 showed an increased the weight of fresh plants and fresh roots in the treatment. Our data indicated that all three *B. amyloliquefaciens* strains were potential biocontrol agents for controlling steam rot disease.

Keywords:

Bacillus amyloliquefaciens, *Bacillus* sp., growth-promoting bacteria, peanuts, *Sclerotium rolfsii*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây lạc (*Archis hypogaea* L.) là cây lương thực lấy dầu quan trọng và được trồng ở hơn 100 quốc gia, tập trung chủ yếu ở châu Á và châu Phi [1]. Theo số liệu thống kê, Việt Nam là một trong các vùng trồng chính của châu Á [1]. Trong quá trình canh tác lạc, nấm *Sclerotium rolfsii* (*S. rolfsii*) gây thối gốc lạc là một tác nhân làm giảm năng suất, chất lượng nghiêm trọng và cũng là loại bệnh khó quản lý trên đồng ruộng [2]. Nấm *S. rolfsii* là loại nấm tồn tại trong đất, chúng thường tấn công vào hệ mạch dẫn của cây, ngăn cản sự hấp thụ nước và dinh dưỡng khiến cây bị héo và chết [3]. Ngoài ra, ở các vùng trồng bị nhiễm bệnh, nấm có khả năng tồn tại dưới dạng hạch nấm hàng năm và do đó khiến thiệt hại lớn về năng suất [3]. Bên cạnh đó, với phổ kí chủ rộng, nấm *S. rolfsii* rất khó để kiểm soát bởi các biện pháp thông thường. Hiện nay, thuốc diệt nấm hóa học là phương pháp chủ yếu để kiểm soát bệnh hại. Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật trong thời gian dài gây ảnh hưởng xấu đến môi trường và sức khỏe của con người [4]. Chính vì thế, xu hướng ứng dụng các biện pháp kiểm soát sinh học, trong đó có sử dụng các chủng vi sinh vật đang được tập trung nghiên cứu và phát triển. Các nhóm vi sinh vật thường được sử dụng làm các tác nhân sinh học hiệu quả trong kiểm soát bệnh hại do nấm gây ra thường là vi khuẩn và nấm có khả năng tác động tích cực đến sinh trưởng và sức khỏe của cây trồng [5]. Do đó các tác nhân này có khả năng làm tăng sức đề kháng cho cây, kích thích sinh trưởng và thân thiện với môi trường. Việc sử dụng các vi sinh vật đối kháng, đặc biệt là vi khuẩn như các tác nhân kiểm soát sinh học đã và đang được tập trung nghiên cứu, ứng dụng. Các loài vi khuẩn đóng vai trò quan trọng trong kiểm soát sinh học thông thường là các loài thuộc chi *Bacillus* sp., *Pseudomonas* và *Serratia* [5]. Các tác nhân kiểm soát sinh học là vi khuẩn có nhiều cơ chế tương tác như sản sinh các chất kháng, cạnh tranh dinh dưỡng và không gian với bệnh hại, kích thích hệ thống miễn dịch và sinh trưởng ở thực vật, dẫn đến ức chế sự phát triển của

bệnh hại. Do đó, các nghiên cứu ứng dụng, phát triển các vi khuẩn là tác nhân kiểm soát sinh học rất cần thiết và có ý nghĩa cho tương lai của một ngành nông nghiệp bền vững. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tuyển chọn, định danh các chủng vi khuẩn tiềm năng có khả năng đối kháng cao với nấm *S. rolfsii* và đánh giá được tác động của các chủng vi khuẩn này đến sinh trưởng của cây lạc.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

30 chủng vi khuẩn kháng nấm phân lập từ vùng đất rễ của cây được lưu giữ và được sử dụng để sàng lọc các chủng vi khuẩn tiềm năng đối với nấm *S. rolfsii*. Chủng nấm *S. rolfsii* gây bệnh thối gốc lạc phân lập trên cây lạc được cung cấp bởi bộ môn Công nghệ Vi sinh, Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam [6]. Để đánh giá tác động của các chủng tiềm năng đến sinh trưởng của cây lạc, giống lạc Sen có nguồn gốc từ Nghệ An được sử dụng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng nấm *S. rolfsii*

Khả năng đối kháng nấm *S. rolfsii* của các chủng vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đồng nuôi cấy theo mô tả của Nair và cộng sự [7]. Một khối thạch chứa nấm *S. rolfsii* hình tròn với đường kính 5 mm được đặt ở chính giữa đĩa petri chứa môi trường PDA. Sau đó, các chủng vi khuẩn được cấy thành vạch trên môi trường PDA và cách thoi thạch nấm khoảng 3 cm. Ở thí nghiệm đối chứng, trên môi trường PDA chỉ đặt một thoi thạch nấm mà không cấy vi khuẩn. Các đĩa thí nghiệm sau đó được nuôi ủ ở 30°C và đánh giá khả năng đối kháng của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. với nấm *S. rolfsii* sau 3 ngày nuôi cấy. Thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần. Tỷ lệ phần trăm đối kháng nấm *S. rolfsii* được tính theo công thức:

$$S=(R-r)/R*100\%$$

Trong đó:

S là tỷ lệ phần trăm đối kháng nấm *S. rolfsii* của các chủng vi khuẩn (%);

R là bán kính tản nấm ở công thức đối

chứng - đường kính chia đôi;

r là bán kính tản nấm ở công thức thí nghiệm được tính từ vị trí khối thạch đến rìa tản nấm phía sát với đường cấy vi khuẩn.

2.2.2. Đánh giá ảnh hưởng của dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn tuyển chọn đến sự phát triển hệ sợi và sự nảy mầm của hạch nấm *S. rolfsii*

- *Đánh giá tác động của dịch khuẩn đến hệ sợi nấm S. rolfsii*: Chủng vi khuẩn chọn lọc được nuôi lỏng trong môi trường LB trong điều kiện lắc 180 vòng/phút, 35°C. Sau 40 giờ, dịch nuôi cấy vi khuẩn được thu nhận bằng cách ly tâm 10.000 vòng/phút, loại bỏ cặn tế bào. Dịch lọc vi khuẩn được chia làm 2 phần: xử lý nhiệt (hấp khử trùng) và không xử lý nhiệt (lọc qua màng lọc có kích thước 0,22 µm). Tiếp đến, trên đĩa thí nghiệm nhỏ 300 µl dịch lọc khuẩn vào các giếng ở 4 góc của môi trường PDA (đã được đục lỗ 5 mm), nấm *S. rolfsii* được cấy ở chính giữa. Ở thí nghiệm đối chứng, các bước được thực hiện tương tự nhưng dịch môi trường LB được sử dụng thay cho dịch nuôi cấy vi khuẩn. Các đĩa thí nghiệm được nuôi ủ ở điều kiện tối, 30°C và đánh giá khả năng đối kháng của chủng vi khuẩn với nấm *S. rolfsii* sau 3 ngày nuôi cấy. Thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần.

- *Đánh giá hiệu quả ức chế của dịch nuôi cấy vi khuẩn đến sự nảy mầm của hạch nấm S. rolfsii*: Hạch nấm của nấm *S. rolfsii* được thu từ đĩa nuôi cấy trên môi trường PDA sau 30 ngày. Các hạch nấm sử dụng để bố trí thí nghiệm là các hạch có cùng thời gian nuôi cấy, tròn, màu sắc và kích thước đồng đều nhau. Dịch vi khuẩn được chuẩn bị từ dịch nuôi cấy các chủng vi khuẩn chọn lọc trong môi trường LB ở điều kiện lắc 180 vòng/phút, 30°C trong 40 giờ. Dịch nuôi cấy vi khuẩn được thu nhận bằng cách ly tâm 10000 vòng/phút và lọc bằng màng lọc có kích thước 0,22 µm. Sau đó, các hạch nấm được xử lý bằng cách ngâm trong các dịch lọc vi khuẩn trong 72 giờ. Ở công thức đối chứng, các hạch nấm được ngâm trong nước cất khử trùng. Sau quá trình xử lý, các hạch nấm được chuyển sang các đĩa môi trường PDA và nuôi ủ ở điều kiện 30°C. Quan sát và ghi nhận kết quả sau 24-48 giờ nuôi ủ.

2.2.3. Định danh phân tử các chủng vi khuẩn tiềm năng

Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được định danh bằng phân tích trình tự gen 16S rRNA và mỗi đặc hiệu cho vi khuẩn *B. subtilis* và *B. amyloliquefaciens*. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng ở 30°C. Sau 48 giờ, thu nhận sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm dịch nuôi cấy vi khuẩn với tốc độ 10.000 vòng/phút ở 4°C trong 3 phút. DNA tổng số của các chủng vi khuẩn sau khi được tách chiết theo phương pháp cải tiến của Masoomi và cộng sự [8]. Sản phẩm gen 16S rRNA được nhân PCR với cặp mồi 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' và 1492R: 5'-TACGACTTAACCCCAATCGC-3'. Sản phẩm PCR sau đó được giải trình tự tại công ty 1st BASE (Singapore). So sánh mức độ tương đồng về trình tự gen mã hoá gen 16S rRNA trên cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) trên NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Dựa trên kết quả phân tích trình tự, để xác định được chính xác loài cho các chủng chọn lọc, sự có mặt của gen đặc hiệu cho vi khuẩn *B. subtilis* và *B. amyloliquefaciens* cũng được đánh giá dựa trên các cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm gen *aroE* (278 bp) cho vi khuẩn *B. subtilis* được nhân với cặp mồi *aroE*-F: 5'-GGGGAAGGCTTCGTGAAGTC-3' và *aroE*-R: 5'-CCCACAGACGTTGTATGGATG-3' [9]. Sản phẩm gen *gyrA* (747 bp) cho vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* được nhân với cặp mồi *Bamy*-F: 5'-AAATCTGCCCGTATCGTCGGT-3' và *Bamy*-R: 5'-GTGAGCATTGGCGTCACGGCG-3' [10].

2.2.4. Đánh giá tác động của các chủng vi khuẩn chọn lọc đến sự sinh trưởng của cây lạc

Để đánh giá tác động của các chủng vi khuẩn chọn lọc đến sinh trưởng của cây lạc, vi khuẩn được bổ sung trong quá trình ngâm hạt nảy mầm và bổ sung trong bầu đất trồng lạc 03 lần. Hạt lạc sau khi khử trùng bề mặt được ngâm trong nước 6 giờ và tiếp tục ngâm trong dịch nuôi cấy vi khuẩn với giá trị OD₆₀₀ = 0,5 trong 2 giờ, sau đó để hạt nảy mầm trên đĩa petri có giấy thấm ẩm ở điều kiện 25°C. Sau khi hạt nảy mầm và có rễ 1-1,5 cm, hạt lạc

được trồng trực tiếp vào bầu đất (đất thịt (3): trấu hun (1): vụn xơ dừa (1)) đã hấp khử trùng. Mỗi công thức thí nghiệm được trồng 15 cây, công thức đối chứng là công thức hạt lạc chỉ được ngâm trong nước. Cây trồng trong các công thức được tưới nước hàng ngày với lượng nước như nhau. Sau 7 ngày, các bầu cây bắt đầu được tưới dịch nuôi cấy vi khuẩn ($OD_{600} = 0,5$) với thể tích 5 ml/bầu/cây. Ở các công thức đối chứng, bầu đất trồng cây chỉ được tưới bằng nước. Quá trình tưới dịch nuôi cấy khuẩn diễn ra 03 lần, mỗi lần cách nhau 02 tuần. Sau 08 tuần, quan sát và ghi nhận kết quả thí nghiệm dựa theo các tiêu chí: chiều cao của cây lạc (cm); trọng lượng tươi trung bình của cây và rễ củ (g); trọng lượng khô trung bình của cây và rễ củ. Các thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được phân tích dựa trên 3 lần lặp lại, sự sai khác giữa các công thức thực nghiệm được đánh giá bằng phân tích phương sai (ANOVA) dựa trên sự khác biệt bình phương nhỏ nhất (LSD) với độ tin cậy $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng tốt với nấm *S. rolfsii*

Từ 30 chủng vi khuẩn có khả năng kháng nấm lưu trữ, bằng phương pháp đồng nuôi cấy với nấm *S. rolfsii*, 3 chủng vi khuẩn kí hiệu HN2, HN4 và GL11 đã thể hiện hoạt tính kháng nấm mạnh nhất. Tỷ lệ đối kháng của các chủng vi khuẩn HN2, HN4 và GL11 đạt lần lượt là 58,56%, 64,73% và 57,58% sau 3 ngày đồng nuôi cấy (Hình 1). Nấm *S. rolfsii* là nấm phát triển rất mạnh trên môi trường dinh dưỡng nhân tạo PDA. Vì thế, sự ức chế khả năng phát triển nấm *S. rolfsii* trong thời gian 72 giờ của 3 chủng HN2, HN4 và GL11 đều lớn hơn 50% so với đối chứng được đánh giá là ức chế mạnh. Khoảng không gian môi trường trên đĩa thạch giữa nấm và vi khuẩn thấy rõ sự giới hạn hệ sợi của nấm *S. rolfsii* kéo dài. Kết quả này có thể do ba chủng vi khuẩn này tiết ra các hợp chất kháng nấm trên môi trường đĩa thạch và các hợp chất này ức chế sự phát triển của hệ sợi nấm *S. rolfsii*. Từ kết quả sàng lọc này, ba chủng vi khuẩn có khả năng ức chế mạnh đối với nấm là các chủng HN2, HN4 và GL11 được lựa chọn để tiếp tục đánh giá.



Hình 1. Khả năng đối kháng nấm *S. rolfsii* của các chủng vi khuẩn HN2, HN4 và GL11 sau 72 giờ đồng nuôi cấy

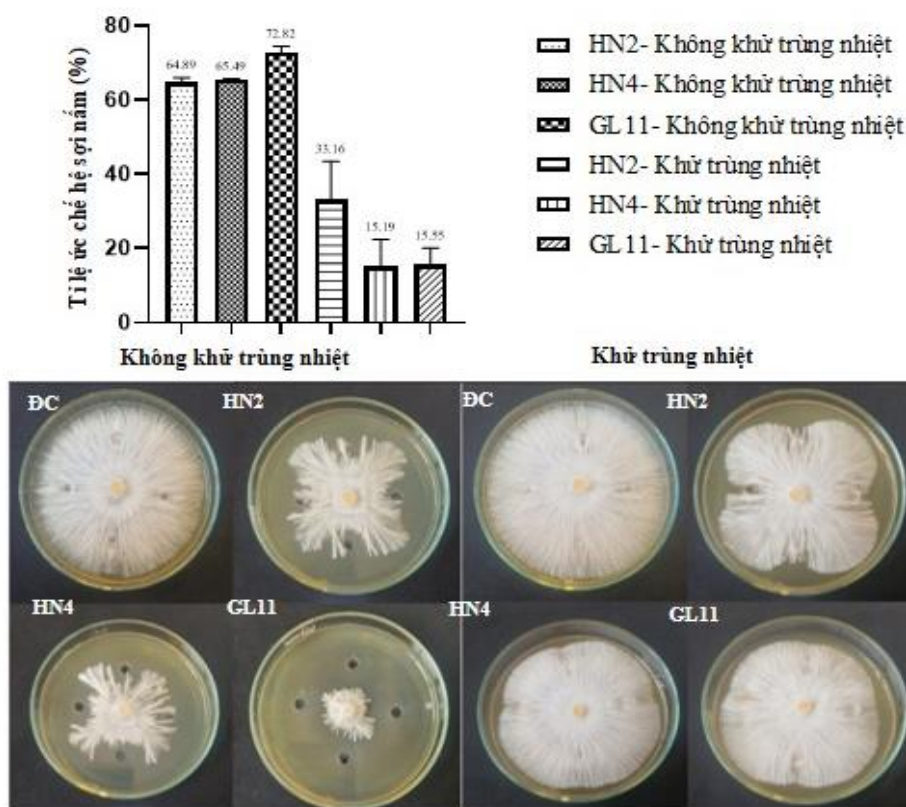
3.2. Đánh giá ảnh hưởng của dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn tuyển chọn đến sự phát triển hệ sợi và sự nảy mầm của hạch nấm *S. rolfsii*

Để xác định được rõ hơn cơ chế kháng nấm *S. rolfsii* của 3 chủng vi khuẩn chọn lọc, tác

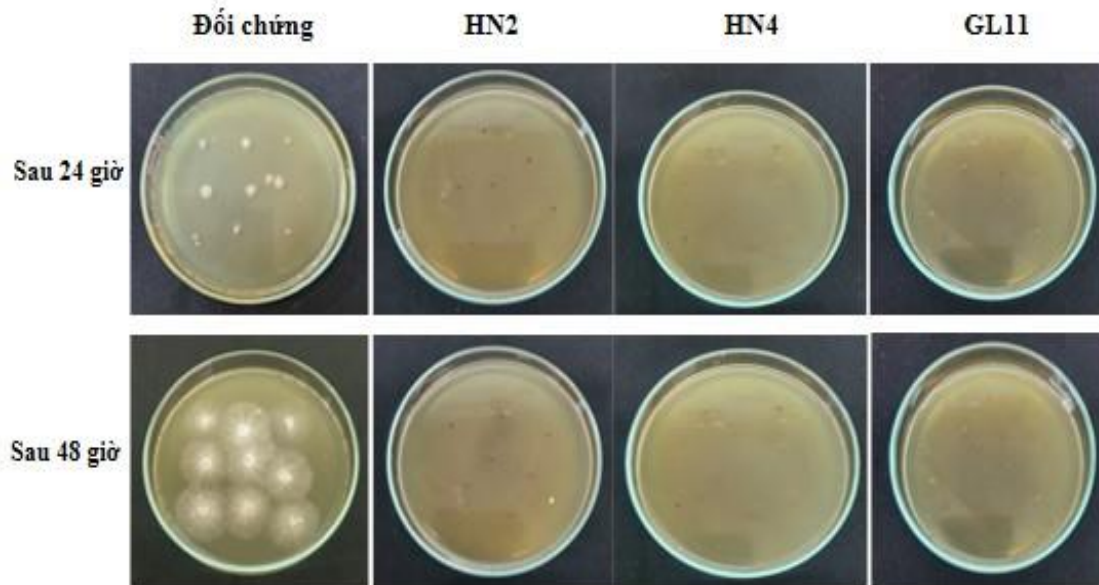
động của dịch nuôi cấy vi khuẩn đến sự phát triển hệ sợi và sự nảy mầm của hạch nấm *S. rolfsii* được đánh giá. Kết quả thể hiện ở hình 2 cho thấy, sau 72 giờ đồng hồ nuôi cấy dịch nuôi vi khuẩn sau khi lọc vô trùng loại bỏ tế

bào đều có khả năng ức chế nấm *S. rolfii* phát triển. Đối với dịch nuôi vi khuẩn không xử lý nhiệt (lọc vô trùng) của cả 3 chủng đều ức chế mạnh đến sự phát triển hệ sợi nấm. Trong đó chủng vi khuẩn GL11 có khả năng ức chế cao nhất, đạt 72,82% so với đối chứng. Hai chủng vi khuẩn HN2 và HN4 đều cho thấy khả năng ức chế nấm của dịch nuôi cấy là như nhau, với tỉ lệ phần trăm kháng nấm lần lượt là 64,89% và 65,49%. Tuy nhiên, khi dịch lọc nuôi cấy vi khuẩn được xử lý nhiệt (khử trùng nhiệt), hoạt tính của các hoạt chất kháng nấm có trong dịch nuôi cấy vi khuẩn HN4 và GL11 hầu như không còn đạt 15,19% và 15,55%, chỉ có hoạt chất kháng nấm có trong dịch nuôi cấy vi khuẩn HN2 vẫn giữ được hoạt tính yếu, hoạt tính kháng nấm giảm còn 33,16% so với đối chứng. Kết quả này cho thấy, ba chủng vi khuẩn tuyển chọn HN2, HN4 và GL11 có khả năng tiết ra các hợp chất ức chế hệ sợi nấm phát triển trong dịch nuôi cấy. Tuy nhiên, các hợp chất do 3 chủng vi khuẩn này tiết ra là không bền với nhiệt (Hình 2).

Nấm *S. rolfii* là loài nấm tồn tại lâu dài trong đất do có khả năng hình thành các hạch nấm, kéo dài sự tồn tại của nó trong tự nhiên. Để đánh giá tác động của ba chủng vi khuẩn chọn lọc, dịch nuôi của các chủng vi khuẩn này được sử dụng để xử lý hạch nấm của nấm *S. rolfii*. Kết quả đánh giá khả năng ức chế sự nảy mầm của hạch nấm của dịch nuôi cấy vi khuẩn tuyển chọn cho thấy, các hạch nấm ở công thức đối chứng được ngâm với nước cất cho tỉ lệ nảy mầm 100% ở ngày thứ nhất và phát triển đồng đều vào ngày thứ 2. Trong khi đó các hạch nấm được ngâm trong dịch lọc vi khuẩn hầu như không thấy có dấu hiệu của sự nảy mầm (Hình 3). Nguyên nhân hạch nấm không thể nảy mầm có thể hạch nấm đã bị các chất kháng nấm trong dịch nuôi vi khuẩn ức chế hoặc phá hủy hạch nấm. Điều này chứng tỏ rằng, cả 3 chủng vi khuẩn tuyển chọn đều thể hiện rõ ràng, hiệu quả trong việc ức chế sự nảy mầm của hạch nấm. Tác động này của ba chủng vi khuẩn nghiên cứu đến hạch nấm của nấm *S. rolfii* là rất có ý nghĩa trong việc kiểm soát các tác nhân gây bệnh này.



Hình 2. Tác động ức chế sự phát triển hệ sợi nấm *S. rolfii* của dịch nuôi cấy được xử lý nhiệt và không xử lý nhiệt của các chủng vi khuẩn tiềm năng



Hình 3. Ảnh hưởng của dịch lọc nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* sp. tuyển chọn đến sự nảy mầm của hạch nấm *S. rolfsii* sau 24 và 48 giờ

Kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả tương đồng với kết quả của các nghiên cứu khác. Nghiên cứu trước đây của Li và cộng sự (2023) cũng chỉ ra rằng, vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng đối kháng với nấm *S. rolfsii* và ức chế sự nảy mầm của các hạch nấm [11]. Kết quả nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng, chủng vi khuẩn *B. velezensis* LHSB1 có khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi nấm *S. rolfsii*, đồng thời làm giảm số lượng, cũng như sự nảy mầm của hạch nấm [12]. Tương tự như vậy, Mookkan và cộng sự (2019) cũng khẳng định, hai chủng *B. subtilis* SBHRBS1 và *B. subtilis* SBHRBS2 đều có khả năng làm giảm sự hình thành và phát triển của hạch nấm *S. rolfsii* [13].

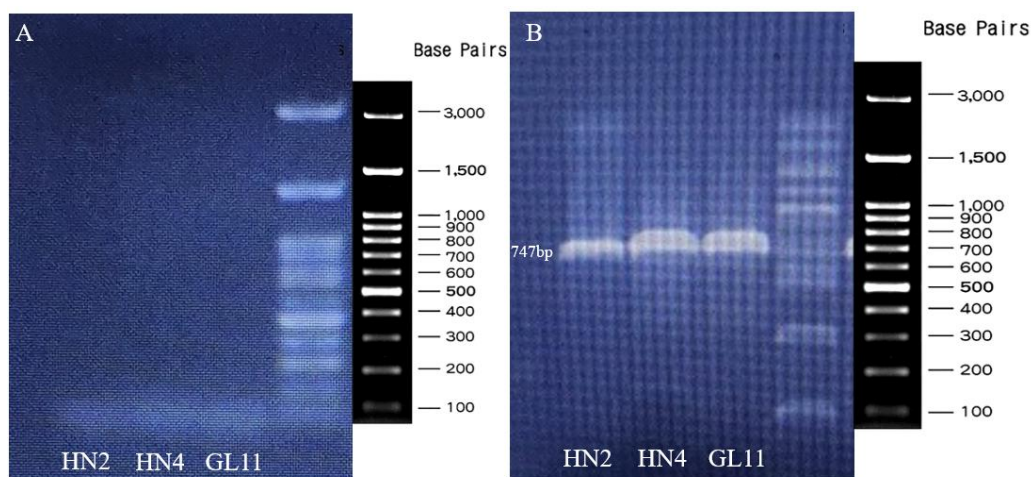
3.3. Định danh phân tử 3 chủng vi khuẩn tiềm năng

Ba chủng vi khuẩn tiềm năng HN2, HN4, GL11 được định danh thông qua phân tích hình thái khuẩn lạc, tế bào, nhuộm gram, trình tự gen 16S rRNA và kiểm chứng sự có mặt của gen đặc hiệu theo loài (Bảng 1, Hình 4). Kết quả phân tích trình tự gen 16S rRNA cho thấy, cả 3 chủng đều có sự tương đồng cao với các

loài trong nhóm *B. subtilis* thuộc chi *Bacillus* sp. (Bảng 1). Tuy nhiên, các nghiên cứu chỉ ra rằng, sử dụng trình tự gen 16S rRNA không thể xác định loài chính xác đối với của các loài trong nhóm *Bacillus subtilis* do có sự tương đồng rất cao (>99%) [10]. Chính vì vậy, đối với các loài trong nhóm *B. subtilis* gồm *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. vallismortis*, *B. atrophaeus*, *B. sonorensis*, và *B. mojavensis* cần phải sử dụng các gen đặc hiệu [10]. Trong nội dung nghiên cứu này đã sử dụng gen đặc hiệu *aroE* cho vi khuẩn *B. subtilis* và *Bamy* cho vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* để đánh giá định danh các chủng vi khuẩn tuyển chọn. Kết quả chạy PCR với gen đặc hiệu cho thấy, kết quả phản ứng âm tính khi chạy với môi trường *aroE* cho vi khuẩn *B. subtilis* và dương tính với môi trường *Bamy* cho vi khuẩn *B. amyloliquefaciens*. Như vậy cả ba chủng vi khuẩn tuyển chọn được xác định là loài *B. amyloliquefaciens* và gọi tên lần lượt là *B. amyloliquefaciens* HN2, *B. amyloliquefaciens* HN4 và *B. amyloliquefaciens* GL11.

Bảng 1. Kết quả so sánh trình tự gen 16S rARN của 03 chủng *Bacillus* sp. tiềm năng trên ngân hàng gen NCBI

Chủng vi khuẩn	Tế bào/ Gram	Phân tích 100 trình tự tương đồng lớn nhất có độ bao phủ > 99%	Kết luận	
HN2	Tế bào hình que, gram (+)	81 trình tự thuộc nhóm <i>Bacillus subtilis</i> (trong đó có 42 trình tự <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) 19 trình tự thuộc <i>Bacillus</i> sp.	Chủng thuộc <i>Bacillus</i> sp.	HN2 chi
HN4	Tế bào hình que, gram (+)	80 trình tự thuộc nhóm <i>Bacillus subtilis</i> (trong đó có 35 trình tự <i>Bacillus velezensis</i> ; 27 trình tự giống <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , 12 trình tự <i>Bacillus subtilis</i>) 20 trình tự thuộc <i>Bacillus</i> sp.	Chủng thuộc <i>Bacillus</i> sp.	HN4 chi
GL11	Tế bào hình que, gram (+)	81 trình tự thuộc nhóm <i>Bacillus subtilis</i> (trong đó có 20 trình tự <i>Bacillus velezensis</i> ; 41 trình tự giống <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , 15 trình tự <i>Bacillus subtilis</i>) 19 trình tự thuộc <i>Bacillus</i> sp.	Chủng thuộc <i>Bacillus</i> sp.	GL11 chi



Hình 4. Kết quả nhân gen đặc hiệu cho vi khuẩn *B. subtilis* (A) và *B. amyloliquefaciens* (B) của 03 chủng vi khuẩn tuyển chọn
(A-Sản phẩm PCR với mồi *aroE*; B-Sản phẩm PCR với mồi *Bamy*)

3.4. Đánh giá tác động của ba chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* tiềm năng đối với sự sinh trưởng của cây lạc

Để đánh giá tác động của chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* đến sinh trưởng cây lạc, dung dịch nuôi cấy 03 chủng vi khuẩn này được sử dụng để ngâm hạt lạc trong giai đoạn nảy mầm và bổ sung vào bầu đất đã được khử trùng trong quá trình trồng. Kết quả nghiên cứu thể hiện rằng, cả 3 chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* tuyển chọn đều không tác động tiêu cực đến sinh trưởng của cây lạc. Chủng *B. amyloliquefaciens* HN2 kích thích cây phát triển chiều cao nhưng không có sự sai khác về khối lượng tươi, khối lượng khô của

cây và rễ củ so với đối chứng. Bên cạnh đó, ở công thức bổ sung chủng *B. amyloliquefaciens* HN4, khối lượng tươi, khối lượng khô của cây không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Đặc biệt khi bổ sung chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* GL11 vào đất, cây lạc ở công thức này tăng về khối lượng tươi và rễ củ so với đối chứng và sai khác này có ý nghĩa thống kê (Bảng 2, Hình 5). Kết quả nghiên cứu cho thấy ba chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* có khả năng đối kháng mạnh với nấm *S. rolfii* và không có tác động tiêu cực đến sinh trưởng của cây lạc là các đặc tính tốt. Khả năng kích thích tăng trưởng khối lượng tươi của chủng *B. amyloliquefaciens*

GL11 có thể giúp cây trồng hạn chế được tác động của chủng nấm gây bệnh khi cây bị nhiễm bệnh như các chủng vi khuẩn khác đã được nghiên cứu [14,15]. Các chủng này là

nguồn vật liệu tiềm năng để tiếp tục đánh giá lây nhiễm nhân tạo và phục vụ hướng nghiên cứu ứng dụng các tác nhân sinh học trong phòng trừ nấm hại thực vật.

Bảng 2. Tác động của các chủng *Bacillus amyloliquefaciens* đến sinh trưởng cây lạc (sau 12 tuần)

Công thức	Chiều cao cây sau 8 tuần (cm)	Khối lượng tươi $\pm$ SD (g)		Khối lượng khô $\pm$ SD (g)	
		Cây	Rễ củ	Cây	Rễ củ
Đối chứng	35 ^a $\pm$ 1,1	11,72 ^a $\pm$ 0,62	4,12 ^a $\pm$ 0,30	2,94 ^a $\pm$ 0,14	0,78 ^a $\pm$ 0,05
Chủng HN2	40 ^b $\pm$ 1,7	13,37 ^{ab} $\pm$ 0,57	4,0 ^a $\pm$ 0,35	2,90 ^a $\pm$ 0,2	0,85 ^a $\pm$ 0,06
Chủng HN4	35 ^a $\pm$ 0,6	12,76 ^{ab} $\pm$ 0,37	4,45 ^{ab} $\pm$ 0,26	2,80 ^a $\pm$ 0,09	0,83 ^a $\pm$ 0,02
Chủng GL11	33 ^a $\pm$ 1,2	14,09 ^b $\pm$ 0,53	5,47 ^b $\pm$ 0,35	2,76 ^a $\pm$ 0,19	0,88 ^a $\pm$ 0,12

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột là sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.



Đối chứng

***B. amyloliquefaciens* HN2**

***B. amyloliquefaciens* HN4**

***B. amyloliquefaciens* GL11**

Hình 5. Hình thái rễ cây lạc ở các công thức thí nghiệm bổ sung các chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* tiềm năng

4. KẾT LUẬN

Từ 30 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. lưu trữ đã tuyển chọn được 3 chủng vi khuẩn HN2, HN4 và GL11 thể hiện khả năng đối kháng mạnh nhất với nấm *S. rolfii*. Dịch nuôi cấy của 3 chủng vi khuẩn tuyển chọn này đều ức chế sự phát triển của hệ sợi và sự nảy mầm của hạch nấm *S. rolfii*. Tuy nhiên hoạt chất có trong dịch nuôi cấy của ba chủng vi khuẩn nghiên cứu hầu như không bền với nhiệt. Dựa trên các phân tích về trình tự gen 16S rRNA và gen đặc hiệu, cả ba chủng vi khuẩn HN2, HN4 và GL11 được xác định đều thuộc loài *B.*

amyloliquefaciens. Trong số 3 chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* tuyển chọn bước đầu đã xác định được chủng *B. amyloliquefaciens* GL11 có khả năng kích thích sự sinh trưởng rễ tươi của cây lạc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. M. T. Variath & P. Janila (2017). Economic and Academic Importance of Peanut. The Peanut Genome. Rajeev K. Varshney, Manish K. Pandey & Naveen Puppala (eds.). Springer International Publishing. 7-26.
- [2]. D. S. Akgül, Hulya Ozgonen & Ali Erkilic (2011). The effects of seed treatments with fungicides on stem rot caused by *Sclerotium rolfii* sacc., in peanut. Pakistan Journal of Botany. 43(6): 2991-2996.

- [3]. J Mullen (2001). Southern blight, southern stem blight, white mold. The Plant Health Instructor. 10(1): 104.
- [4]. A. Kumari, A. H. Tripathi, P. H. Tripathi & A. Pandey (2023). Chapter 7 - Biocontrol: an efficient solution for sustainable agriculture and food production. Advanced Microbial Techniques in Agriculture, Environment, and Health Management. Satish Chandra Pandey, Veni Pande, Diksha Sati & Mukesh Samant (eds.). Academic Press. 119-131.
- [5]. J. Lee, S. K. Kim, H. Jung, B-K. Koo, J. A. Han & H-S. Lee (2023). Exploiting Bacterial Genera as Biocontrol Agents: Mechanisms, Interactions and Applications in Sustainable Agriculture. Journal of Plant Biology. 66(6): 485-498.
- [6]. Đinh Trường Sơn, Tạ Hà Trang, Nguyễn Khánh Ly, Dương Văn Hoàn, Trần Thị Đào, Nguyễn Thanh Huyền, Mai Thanh Tình, Vũ Hiền Anh & Nguyễn Xuân Cảnh (2022). Phân lập, tuyển chọn và xác định chủng vi khuẩn đối kháng với nấm *Sclerotium rolfsii* gây bệnh trên cây lạc. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam. 7(140): 86-93.
- [7]. R. Nair, K. M. Nampoothiri, U. Sheeba, P. Jayachandran, Sreeshma, S. M. Sneha, K. S. Meenakumari & P. Sivaprasad (2015). Exploring Western Ghats microbial diversity for antagonistic microorganisms against fungal phytopathogens of pepper and chickpea. Journal of BioScience and Biotechnology. 4: 207-218.
- [8]. F. Masoomi-Aladizgeh, Leila Jabbari, Reza Nekouei & Ali Aalami (2016). A Simple and Rapid System for DNA and RNA Isolation from Diverse Plants Using Handmade Kit. DOI: 10.21203/rs.2.1347/v2.
- [9]. G. Lee, S. Heo, T. Kim, H-E. Na, J. Park, E. Lee, J-H. Lee & D-W. Jeong (2022). Discrimination of *Bacillus subtilis* from Other *Bacillus* Species Using Specific Oligonucleotide Primers for the Pyruvate Carboxylase and Shikimate Dehydrogenase Genes. Journal of Microbiology and Biotechnology. 32(8): 1011-1016.
- [10]. L. N. Borshchevskaya, A. N. Kalina & S. P. Sineokii (2013). Design of a PCR test based on the *gyrA* gene sequence for the identification of closely related species of the *Bacillus subtilis* group. Applied Biochemistry and Microbiology. 49: 646-655.
- [11]. L. Li, J. Wang, D. Liu, L. Li, J. Zhen, G. Lei, W. Bt & W. Yang (2022). The antagonistic potential of peanut endophytic bacteria against *Sclerotium rolfsii* causing stem rot. Brazilian Journal of Microbiology. 54: 361–370.
- [12]. M. Paramasivan, S. Thaveedu, I. Jhonson & M. Karthikeyan (2019). Screening of rhizosphere and phylloplane bacterial antagonist against *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) in tropical sugar beet ecosystems. Journal of Emerging Technologies and Innovative Research. 6: 947-952.
- [13]. Paramasivan Mookkan, S. Thaveedu, I. Jhonson & M. Karthikeyan (2019). Screening of rhizosphere and phyllo plane bacterial antagonist against *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) in Tropical sugar beet ecosystems. 6: 947-952.
- [14]. J. Yuan, L. Yu, Ni. Ling, W. Raza, Q. Shen & Q. Huang (2015). Plant-growth-promoting traits and antifungal potential of the *Bacillus amyloliquefaciens* YL-25. Biocontrol Science and Technology. 25(3): 276-290.
- [15]. S. A. Soliman, M. M. Khaleil & R. A. Metwally (2022). Evaluation of the Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* and *B. velezensis* and Characterization of the Bioactive Secondary Metabolites Produced against Plant Pathogenic Fungi. Biology (Basel). 11(10): 1390-1411.