

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.122

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN *Pseudomonas* CÓ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG *in vitro* VỚI NẤM *Fusarium solani* VÀ *Colletotrichum gloeosporioides*

Trương Chí Hiền¹ và Lê Thanh Toàn^{2*}

¹Sinh viên BVTV khóa 42, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Lê Thanh Toàn (email: ltoan@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 09/05/2020

Ngày nhận bài sửa: 05/07/2020

Ngày duyệt đăng: 28/10/2020

Title:

Isolation and selection of antagonistic bacteria *Pseudomonas* against *Fusarium solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* under *in vitro* conditions

Từ khóa:

Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. & Sacc., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., khả năng đối kháng, *Pseudomonas*, vi khuẩn kích thích cây trồng tăng trưởng

Keywords:

Colletotrichum gloeosporioides, antagonistic ability, *Fusarium solani*, *Pseudomonas*, plant growth promoting rhizobacteria

ABSTRACT

The results of isolation and purification showed that 56 rhizobacterial strains of *Pseudomonas* were collected. Among 56 purified strains of *Pseudomonas*, nine strains including VLND-0101, VLND-0301, VLND-0901, VLND-0501, VLND-1203, CTND-0301, CTND-0501, CTND-0104, CTND-0902 had high antagonistic efficacy to *Fusarium*, with the efficacy value at approximately 28.34-60.00%. Next, among nine *Pseudomonas* strains, four strains including VLND-1203, CTND-0301, CTND-0501, CTND-0902 highly antagonized against *Colletotrichum*, with efficacy at approximately 48.34-61.77%. Among four *Pseudomonas* strains, root length and shoot height of mungbean seedlings after treating CTND-0501 were highest, significantly different to other treatments. Besides, quantity of sideroots, fresh weight of root and shoot at 5 days after treating CTND-0501 statistically differed to others. Result of identification showed that the strain of CTND-0501 was *Pseudomonas mosselii*.

TÓM TẮT

Kết quả phân lập và làm thuần được 56 dòng vi khuẩn *Pseudomonas*. Trong 56 dòng *Pseudomonas* thuần, chín dòng VLND-0101, VLND-0301, VLND-0901, VLND-0501, VLND-1203, CTND-0301, CTND-0501, CTND-0104, CTND-0902 đối kháng mạnh với *Fusarium*, với hiệu suất đối kháng dao động từ 28,34 - 60,00%. Tiếp theo, trong chín dòng vi khuẩn *Pseudomonas*, bốn dòng vi khuẩn VLND-1203, CTND-0301, CTND-0501, CTND-0902 có khả năng đối kháng mạnh với nấm *Colletotrichum*, với hiệu suất đối kháng dao động từ 48,34 - 61,77%. Trong bốn dòng vi khuẩn *Pseudomonas* này, chiều dài rễ và chồi cây đậu xanh sau khi xử lý với dòng CTND-0501 là cao nhất, khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại. Bên cạnh đó, tổng số rễ phụ cây đậu xanh, khối lượng tươi của rễ và chồi ở 5 ngày sau xử lý của dòng CTND-0501 khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức xử lý còn lại. Kết quả định danh cho thấy dòng CTND-0501 là loài *Pseudomonas mosselii*.

Trích dẫn: Trương Chí Hiền và Lê Thanh Toàn, 2020. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Pseudomonas* có khả năng đối kháng *in vitro* với nấm *Fusarium solani* và *Colletotrichum gloeosporioides*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(5B): 135-142.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh do chi nấm *Fusarium* và *Colletotrichum* trên cây trồng luôn là vấn đề rất nan giải, gây thiệt hại nặng suất đáng kể vì nấm luôn hiện diện trong môi trường sống của cây trồng. Hơn thế nữa, biện pháp sử dụng thuốc hóa học phòng trừ các bệnh này lại thường kém hiệu quả, dễ gây ảnh hưởng xấu đến môi trường sống, tiêu diệt những vi sinh vật có ích trong đất, làm mất cân bằng sinh thái. Bên cạnh đó, hiện chưa có những giống cây trồng kháng với những tác nhân gây bệnh này. Do đó, việc sử dụng các vi sinh vật có ích trong đất sẽ giúp quản lý bệnh do nấm *Fusarium* và *Colletotrichum* được lâu dài và bền vững.

Gần đây, phòng trị bệnh bằng biện pháp sinh học đang được nghiên cứu nhiều (Nguyen Thi Thu Nga *et al.*, 2016; Kohl *et al.*, 2019; Trương Thanh Thảo *và ctv.*, 2019). Phòng trừ bệnh cho cây bằng việc sử dụng vi khuẩn đối kháng với nấm bệnh là biện pháp sinh học đang được quan tâm nghiên cứu nhằm mục đích nâng cao hiệu quả phòng trừ bệnh do nấm và giảm được lượng thuốc hóa học. Vi khuẩn vùng rễ là những vi khuẩn sống ở khu vực xung quanh vùng rễ, có khả năng sống và phát triển tốt với mật số khá phong phú xung quanh vùng rễ. Sự hiện diện của vi khuẩn vùng rễ có thể có tác động trung tính, có hại hoặc có lợi đối với sự phát triển của cây trồng (Antoun and Prévost, 2005). Khoảng 2 - 5% vi khuẩn vùng rễ khi chùng vào đất có vi sinh vật cạnh tranh, biểu hiện có lợi cho sự tăng trưởng của cây trồng được gọi là vi khuẩn vùng rễ kích thích tăng trưởng cây trồng (plant growth promoting rhizobacteria - PGPR) (Kloepper and Schroth, 1978). Siddiqui (2006), Weller (2007), Stockwell and Stack (2007), Trần Thị Thu Thủy *và ctv.* (2014), Nguyễn Hữu Hiệp *và ctv.* (2019) nhận định rằng PGPR là các vi khuẩn sống tự do trong đất mà nó có thể mang đến nhiều ảnh hưởng có lợi cho cây trồng thông qua việc nâng cao sự nảy mầm của hạt, sự phát triển của rễ, sự hấp thu nước và dinh dưỡng khoáng và đóng vai trò quan trọng trong phòng trừ các tác nhân gây bệnh trên cây trồng. Vì vậy, nghiên cứu đã được thực hiện với mục đích phân lập và tìm ra các dòng vi khuẩn *Pseudomonas* đối kháng với nấm bệnh *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. và *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguồn nấm *F. solani* và *C. gloeosporioides* (độc tính cao) được cung cấp từ phòng thí nghiệm

Phòng trừ Sinh học, bộ môn Bảo vệ Thực vật, khoa Nông nghiệp, trường Đại học Cần Thơ.

2.1 Thu mẫu đất, phân lập và xác định vi khuẩn *Pseudomonas*

Một trăm năm mươi mẫu đất được thu tại các ruộng lúa, ruộng bầu bí dưa và vườn cây ăn trái trên địa bàn hai quận Ninh Kiều và Ô Môn thuộc thành phố Cần Thơ và ba huyện Bình Minh, Trà Ôn và Tam Bình thuộc tỉnh Vĩnh Long. Cho vào ống nghiệm 1 g đất và 10 mL nước cất thanh trùng (tỉ lệ 1:10), thực hiện pha loãng lần lượt là 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , lắc đều bằng máy vortex khoảng 5 phút, sau đó 20 μ L huyền phù được rút và chà lên mặt môi trường King's B trong đĩa petri. Đĩa petri được ủ ở nhiệt độ phòng (30°C) trong 3 ngày. Vi khuẩn *Pseudomonas* được xác định thông qua đặc điểm khuẩn lạc, các khuẩn lạc vi khuẩn riêng rẽ được cấy truyền sang môi trường King's B mới.

2.2 Đánh giá khả năng đối kháng *in vitro* của các dòng *Pseudomonas* đối với nấm *F. solani*

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (HTNN) một nhân tố với 4 lần lặp lại. Mỗi nghiệm thức là một dòng vi khuẩn *Pseudomonas*. Nguồn nấm *Fusarium* được nuôi ở 7 ngày trong môi trường PDA. Khoanh giấy thấm thanh trùng đã được nhúng vào huyền phù vi khuẩn *Pseudomonas* hoặc nước cất thanh trùng. Khoanh khuẩn ty nấm *Fusarium* với đường kính là 7 mm được đặt tại tâm đĩa petri, 2 khoanh giấy thấm với đường kính là 5 mm (1 khoanh thấm huyền phù vi khuẩn và 1 khoanh thấm nước cất) được đặt ở 2 điểm đối xứng khoanh nấm, cách tâm 3 cm. Sau đó, đĩa petri được để ở nhiệt độ phòng. Bán kính khuẩn lạc nấm về phía vi khuẩn và bán kính khuẩn lạc nấm về phía đối chứng được đo ở các thời điểm 3, 5 và 7 ngày sau bố trí (NSBT), và xác định hiệu suất đối kháng (HSĐK) theo công thức $HSĐK (\%) = [(BKKLđc - BKKLvK) / BKKLđc] * 100\%$, trong đó BKKLvK là bán kính khuẩn lạc nấm về phía vi khuẩn (mm), BKKLđc là bán kính khuẩn lạc nấm về phía đối chứng (mm). Thí nghiệm được thực hiện hai lần với kết quả tương tự nhau. Các dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng mạnh được chọn để tiếp tục bố trí cho thí nghiệm tiếp theo.

2.3 Đánh giá khả năng đối kháng *in vitro* của các dòng vi khuẩn *Pseudomonas* được tuyển chọn đối với nấm *C. gloeosporioides*

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức HTNN một nhân tố, số nghiệm thức là số chủng vi khuẩn có HSĐK cao được chọn từ thí nghiệm trước, 4 lặp lại.

Phương pháp thực hiện và chỉ tiêu ghi nhận tương tự thí nghiệm trước. Nguồn nấm *Colletotrichum* được nuôi 7 ngày trong môi trường PDA. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và chọn ra các dòng vi khuẩn đối kháng mạnh để thực hiện thí nghiệm tiếp theo.

2.4 Đánh giá hiệu quả kích thích sinh trưởng của các dòng vi khuẩn *Pseudomonas* có triển vọng đối với đậu xanh ở giai đoạn nảy mầm

Thí nghiệm được bố trí HTNN một nhân tố, mỗi dòng vi khuẩn là một nghiệm thức và đối chứng nước cất, 3 lần lặp lại, mỗi lặp lại là 10 hạt. Nguồn vi khuẩn *Pseudomonas* được nuôi 7 ngày trong môi trường King’s B. Trước khi ngâm, hạt đậu xanh được làm sạch bằng cách ngâm trong ethanol 95% trong 1 phút và rửa với nước cất vô trùng 5 lần. Hạt đậu xanh được ngâm trong huyền phù vi khuẩn với mật số là 10^8 cfu/mL trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, hạt đậu được ủ trong đĩa petri có lót giấy thấm bổ sung 5 mL huyền phù vi khuẩn cho giấy đủ ướt, ở nhiệt độ phòng. Chiều dài rễ và chồi được đo ở 3 và 5 ngày sau xử lý (NSXL), tổng số rễ phụ, khối lượng tươi của rễ và chồi được ghi nhận ở 5 NSXL. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và chọn ra một dòng vi khuẩn hiệu quả nhất để xác định tên loài.

2.5 Định danh vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR

Một dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng tốt nhất được chọn để gửi mẫu định danh ở công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa, quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ.

2.6 Xử lý số liệu

Tất cả số liệu của thí nghiệm đều tính toán xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS 20 và được kiểm định khác biệt qua phép thử Duncan.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả thu mẫu đất, phân lập và xác định vi khuẩn *Pseudomonas*

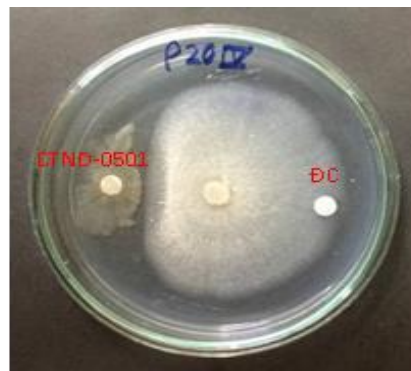
Tổng số 150 mẫu đất đã được thu tại các ruộng lúa, ruộng bầu bí dưa và vườn cây ăn trái trên địa bàn hai quận Ninh Kiều và Ô Môn thuộc thành phố Cần Thơ và ba huyện Bình Minh, Trà Ôn và Tam Bình thuộc tỉnh Vĩnh Long. Kết quả đã phân lập, làm thuần được 56 dòng vi khuẩn *Pseudomonas*. Trong đó, có 27 dòng được phân lập tại Vĩnh Long và 29 dòng được phân lập tại Cần Thơ.

3.2 Khả năng đối kháng *in vitro* của các dòng *Pseudomonas* đối với nấm *F. solani*

Trong 56 dòng vi khuẩn *Pseudomonas* đã phân lập, chỉ có 33 dòng vi khuẩn thể hiện đối kháng, 23

dòng còn lại không có khả năng đối kháng với nấm *F. solani*. Trong 33 dòng vi khuẩn đối kháng, Bảng 1 cho thấy ở thời điểm 3 NSBT, 2 dòng VLND-0901, CTND-0501 có hiệu suất đối kháng lần lượt là 54,80 và 54,88%, cao hơn và khác biệt không có ý nghĩa so với các dòng VLND-0501, CTND-0301 nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại. Sang thời điểm 5 NSBT, hiệu suất đối kháng của các dòng vi khuẩn *Pseudomonas* khác biệt ở mức ý nghĩa 1%. Trong đó, dòng CTND-0501 có hiệu suất đối kháng là 65,76%, cao hơn và khác biệt không có ý nghĩa so với các dòng VLND-0101, VLND-1203, CTND-0301, CTND-0902, nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại trong thí nghiệm. Ở thời điểm 7 NSBT, hiệu suất đối kháng của dòng CTND-0501 là cao nhất (60,00%) và có khác biệt không ý nghĩa so với các dòng VLND-0501, VLND-1203, CTND-0301, CTND-0104, CTND-0902 nhưng khác biệt có ý nghĩa so với các dòng còn lại. Dòng CTND-0501 có hiệu suất đối kháng cao và khác biệt so với các dòng còn lại ở hầu hết các thời điểm khảo sát, đặc biệt là duy trì hiệu suất khả năng đối kháng cao đến thời điểm 7 NSBT (Bảng 1).

Kết quả nghiên cứu phù hợp với công trình của Bora *et al.* (2004) đối với bệnh héo ở dưa lưới do *F. oxysporum* f.sp. *melonis*. Tác giả cho biết vi khuẩn *Pseudomonas putida* có thể ngăn chặn sự phát triển của *F. oxysporum* f.sp. *melonis* trong điều kiện *in vitro* trong 2 năm liên tiếp. Trong các thí nghiệm ngoài đồng được tiến hành vào năm 2001 và 2002, xử lý hạt giống với *P. putida* dòng 30 và dòng 180 cho hiệu quả kiểm soát bệnh lần lượt là 63% và 46 – 50% ở thời điểm 90 ngày sau khi trồng. Ngoài ra, Yasmin *et al.* (2017) cho biết vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* dòng BRp3 được phân lập từ vùng rễ có khả năng đối kháng nhiều mầm bệnh khác nhau trên cây lúa.



Hình 1: Khả năng đối kháng của dòng vi khuẩn *Pseudomonas* CTND-0501 đối với nấm *F. solani* tại thời điểm 5 NSBT

Kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng đối kháng của 33 dòng *Pseudomonas* với nấm *F. solani* cho thấy dòng vi khuẩn CTND-0501 có biểu hiện đối kháng vượt trội hơn so với các dòng còn lại. Dòng CTND-0501 biểu hiện khả năng đối kháng sớm và duy trì hơn so với các dòng còn lại. Tiếp theo là các

dòng VLND-0101, VLND-0301, VLND-0901, VLND-0501, VLND-1203, CTND-0301, CTND-0104, CTND-0902 cũng có hiệu suất đối kháng tương đối cao (Hình 1). Chín dòng vi khuẩn này được sử dụng để thực hiện thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 1: Hiệu suất đối kháng (%) của 33 dòng *Pseudomonas* đối với nấm *F. solani* qua các thời điểm khảo sát

Vi khuẩn	Thời điểm khảo sát			
	3 NSBT	5 NSBT	7 NSBT	Trung bình
VLND-0101	40,16 bc	51,54 abc	35,83 c-f	42,51 b-d
VLND-0301	34,42 b-f	48,04 bcd	40,00 b-e	40,82 b-e
VLND-0901	54,80 a	39,79 c-g	28,34 e-h	40,97 b-e
VLND-1101	26,03 d-h	35,42 d-g	26,67 e-h	29,37 d-g
VLND-0501	41,97 ab	47,58 bcd	48,33 abc	45,96 bc
VLND-0601	23,61 d-h	33,32 d-g	25,00 e-h	27,31 e-j
VLND-0701	27,66 c-g	33,64 d-g	26,67 e-h	29,32 d-g
CTND-0101	26,36 c-g	37,25 c-g	31,67 d-g	31,76 d-f
CTND-0201	28,94 b-g	39,00 c-g	25,00 e-h	30,98 d-f
CTND-1904	28,02 c-g	37,84 c-g	31,67 d-g	32,51 c-f
CTND-0401	21,80 f-j	34,32 d-g	28,34 e-h	28,15 e-i
CTND-2704	22,88 e-j	32,99 d-h	28,34 e-h	28,07 e-i
CTND-0102	24,96 d-h	37,81 c-g	23,34 e-h	28,70 d-h
CTND-0801	10,72 i-k	27,69 g-j	29,17 e-h	22,53 f-l
VLND-1203	38,61 bcd	56,04 ab	47,50 a-d	47,38 b
CTND-0402	11,65 i-k	14,29 j	13,34 h	13,10 j-e
CTND-0803	17,32 g-k	30,68 e-i	27,50 e-h	25,17 f-l
CTND-0301	42,37 ab	56,25 ab	53,33 ab	50,65 ab
CTND-1901	11,44 i-k	23,94 g-j	22,50 f-h	19,30 f-l
CTND-0501	54,88 a	65,76 a	60,00 a	60,21 a
VLND-1102	12,92 h-k	29,11 f-j	25,00 e-h	22,34 f-l
VLND-2101	20,06 g-k	35,64 d-g	24,17 e-h	26,62 e-k
VLND-2902	6,25 j	16,00 ij	15,00 gh	12,42 kl
CTND-0104	37,01 b-e	45,65 b-e	45,84 a-d	42,83 b-d
CTND-0703	18,20 g-k	45,20 b-f	31,67 d-g	31,69 d-f
CTND-1702	13,34 h-k	16,33 ij	17,50 gh	15,72 g-l
CTND-0902	31,19 b-g	56,41 ab	51,67 abc	46,42 b
VLND-0204	11,44 i-k	17,55 h-j	14,17 gh	14,39 h-l
VLND-0705	17,54 g-k	25,92 g-j	15,00 gh	19,48 f-l
VLND-0904	10,00 jk	15,39 ij	15,83 gh	13,74 i-l
CTND-2403	10,26 jk	29,04 f-j	15,83 gh	18,38 f-l
CTND-2501	11,33 i-k	16,95 ij	15,83 gh	14,70 h-l
CTND-2202	10,00 jk	13,34 j	11,67 h	11,67 l
F	**	**	**	**
CV (%)	26,80	22,10	24,60	37,90

Trong cùng một cột, các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 1% (**). NSBT: ngày sau bố trí. Số liệu đã được chuyển sang arcsin√x khi phân tích thống kê

3.3 Khả năng đối kháng in vitro của chín dòng vi khuẩn *Pseudomonas* được tuyển chọn đối với nấm *C. gloeosporioides*

Bảng 2 cho thấy ở 3 NSBT, dòng CTND-0902 có khả năng ức chế sự phát triển của nấm

Colletotrichum vượt trội nhất, thể hiện qua hiệu suất đối kháng là 54,34%, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với các dòng còn lại. Tiếp theo là 3 dòng CTND-0301, CTND-0501, VLND-0101 có khả năng đối kháng cao hơn 40% tương ứng là 43,31; 42,76 và 40,16%.

Đến thời điểm 5 NSBT, tất cả các dòng vi khuẩn đều duy trì hiệu suất đối kháng trên 30%. Trong đó, dòng CTND-0501 có hiệu suất đối kháng cao nhất (56,41%) và khác biệt có ý nghĩa so với các dòng còn lại. Hai dòng CTND-0902, VLND-0101 lần lượt có hiệu suất đối kháng từ 54,34%; 40,16% ở 3 NSBT giảm còn 44,87%; 36,25%. Dòng CTND-0104 có khả năng đối kháng thấp nhất (33,78%) và khác biệt có ý nghĩa so với các dòng còn lại (Bảng 2).

Ở thời điểm 7 NSBT, bốn dòng VLND-1203, CTND-0301, CTND-0501, CTND-0902 đều duy trì khả năng đối kháng nắm so với thời điểm 3 và 5 NSBT. Trong đó, dòng CTND-0501 có hiệu suất đối kháng cao nhất là 61,77% và khác biệt có ý nghĩa so với các dòng còn lại. Ở chỉ tiêu trung bình HSĐK qua ba thời điểm khảo sát, hai dòng CTND-0501 và CTND-0902 biểu hiện khả năng đối kháng vượt trội so với các dòng còn lại, lần lượt 53,65% và 51,85%. Đặc biệt dòng CTND-0501 có hiệu suất đối kháng cao nhất và duy trì liên tục đến thời điểm 7 NSBT (Bảng 2, Hình 2).

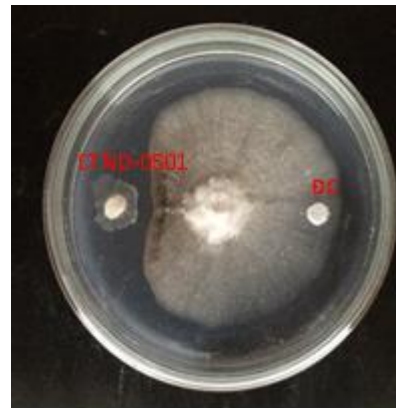
Bảng 2: Hiệu suất đối kháng (%) của 9 dòng vi khuẩn *Pseudomonas* với nấm *C. gloeosporioides* qua các thời điểm khảo sát

Thời điểm	Thời điểm khảo sát			
	3 NSBT	5 NSBT	7 NSBT	Trung bình
VLND-0101	40,16 cd	36,25 ef	34,17 e	36,86 e
VLND-0301	32,29 f	42,50 cd	37,50 d	37,43 e
VLND-0901	32,29 f	37,29 e	30,63 f	33,40 f
VLND-0501	22,08 g	47,58 b	32,29 ef	33,98 f
VLND-1203	38,61 de	43,83 cd	55,24 b	45,89 c
CTND-0301	43,31 b	41,13 d	48,34 c	44,26 d
CTND-0501	42,76 bc	56,41 a	61,77 a	53,65 a
CTND-0104	37,01 e	33,78 f	31,67 f	34,15 f
CTND-0902	54,34 a	44,87 bc	56,35 b	51,85 b
Mức ý nghĩa	**	**	**	**
CV (%)	22,90	15,90	27,50	18,40

Trong cùng một cột, các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 1% (**). NSBT: ngày sau bố trí. Số liệu đã được chuyển sang arcsin√x khi phân tích thống kê

Kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng đối kháng của 9 dòng *Pseudomonas* với nấm *C. gloeosporioides* cho thấy dòng CTND-0501 có biểu hiện đối kháng vượt trội hơn so với các dòng còn lại về HSĐK. Khả năng ức chế sự phát triển của nấm của dòng CTND-0105 biểu hiện sớm và duy trì đến ngày thứ 7 sau bố trí. Tiếp theo là các dòng CTND-0902, VLND-1203, CTND-0301 có khả năng đối kháng tương đối cao. Theo Nuggie *et al.* (2010), *P. fluorescens* có khả năng ức chế sự phát triển của khuẩn ty nấm *C. gloeosporioides* cao nhất (67,42%). Nguyễn Thị Liên và *ctv.* (2016) đã báo cáo khả năng đối kháng của các dòng vi khuẩn vùng rễ với nấm *Colletotrichum* sp. dao động khoảng 7,78-53,34%.

Bốn dòng vi khuẩn CTND-0105, CTND-0902, VLND-1203, CTND-0301 được chọn để thực hiện thí nghiệm tiếp theo trên hạt đậu xanh.



Hình 2: Khả năng đối kháng của dòng vi khuẩn *Pseudomonas* CTND-0501 đối với nấm *C. gloeosporioides* tại thời điểm 7 ngày sau thí nghiệm

3.4 Hiệu quả kích thích sinh trưởng của các dòng vi khuẩn Pseudomonas có triển vọng đối với đậu xanh ở giai đoạn nảy mầm

Chiều dài rễ đậu xanh ở thời điểm 3 và 5 NSXL khi được xử lý trong huyền phù vi khuẩn CTND-0501 là cao nhất (lần lượt là 71,03 mm; 204,30 mm), khác biệt có ý nghĩa so với khi được ngâm trong các huyền phù CTND-0902, VLND-1203, CTND-0301 và đối chứng (nước cất). Chiều dài rễ đậu xanh khi được ngâm trong nước ở thời điểm 3 và 5 NSXL lần

lượt là 44,13 mm và 158,83 mm, thấp hơn có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 3, Hình 4).

Chiều dài chồi đậu xanh ở thời điểm 3 và 5 NSXL sau khi xử lý hạt với huyền phù CTND-0902 lần lượt là 94,97 và 198,67 mm, cao hơn có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại nhưng thấp hơn có ý nghĩa so với khi được ngâm bởi CTND-0501 (105,73 mm và 205,63 mm). Chiều dài chồi ở nghiệm thức đối chứng thấp hơn có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại (lần lượt 49,53 mm và 171,43 mm) (Bảng 3, Hình 3).

Bảng 3: Chiều dài chồi và rễ đậu xanh của các nghiệm thức ở 3 và 5 NSBT

Nghiệm thức	Chiều dài chồi (mm)		Chiều dài rễ (mm)	
	3 NSBT	5 NSBT	3 NSBT	5 NSBT
VLND-1203	52,23 c	180,90 c	54,33 c	174,40 c
CTND-0301	52,37 c	176,67 cd	51,07 d	164,47 d
CTND-0501	105,73 a	205,63 a	71,03 a	204,30 a
CTND-0902	94,97 b	198,67 b	61,70 b	188,83 b
Đối chứng	49,53 d	171,43 d	44,13 e	158,83 e
Mức ý nghĩa	**	**	**	**
CV (%)	35,4	7,4	17,10	9,70

Trong cùng một cột, các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 1% (**). NSBT: ngày sau bố trí



Hình 3: Khả năng kích thích sinh trưởng đậu xanh của các dòng Pseudomonas triển vọng ở 5 NSXL

Tổng khối lượng tươi của rễ và chồi đậu xanh được xử lý với huyền phù CTND-0501 cao nhất, đạt lần lượt là 0,51 và 2,78 g, khác biệt có ý nghĩa thống

kê so với nghiệm thức đối chứng. Kế đến là nghiệm thức xử lý với huyền phù CTND-0501 có khối lượng tươi của rễ khoảng 0,61 g, của chồi khoảng 3,20 g, đều cao hơn có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng. Hai nghiệm thức còn lại bao gồm huyền phù VLND-1203 chỉ có khối lượng tươi của rễ, và huyền phù CTND-0301 chỉ có khối lượng tươi của chồi cao hơn có ý nghĩa so nghiệm thức đối chứng. Tổng khối lượng tươi của rễ và chồi khi được ngâm trong nước cất (đối chứng) là thấp nhất (lần lượt là 0,25 g; 1,81 g). Số lượng rễ phụ của đậu xanh khi được ngâm bởi CTND-0501 ở thời điểm 5 NSXL là cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại. Tiếp theo là các nghiệm thức CTND-0902 và VLND-1203. Tổng số rễ phụ của đậu xanh khi được ngâm bởi CTND-0301 và nước cất (đối chứng) là thấp nhất (Bảng 4).

Bảng 4: Tổng số rễ phụ và khối lượng khô rễ và chồi của các nghiệm thức ở 5 NSXL

Nghiệm thức	Khối lượng tươi (g)		Số rễ phụ
	Rễ	Chồi	
VLND-1203	0,36 c	1,84 cd	14,67 c
CTND-0301	0,27 d	1,99 c	12,67 d
CTND-0501	0,61 a	3,20 a	20,00 a
CTND-0902	0,51 b	2,78 b	17,33 b
Đối chứng	0,25 d	1,81 d	12,67 d
Mức ý nghĩa	**	**	**
CV (%)	7,80	10,20	19,40

Trong cùng một cột, các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 1% (**).

Các loài PGPR có thể thúc đẩy tăng trưởng thực vật có thể ảnh hưởng đến sự phát triển của thực vật bằng các cơ chế trực tiếp và gián tiếp khác nhau (Vessey, 2003; Glick, 2012). PGPR ảnh hưởng đến việc thúc đẩy tăng trưởng trực tiếp của thực vật bằng cách cố định đạm trong khí quyển, hòa tan phosphate không hòa tan, tiết ra các hormone như IAA, GAS và Kinetin bên cạnh việc sản xuất deaminase của ACC (1-Aminocycloprapane-1carboxylic) của etylen (Glick *et al.*, 2007). Kích kháng toàn thân (ISR), kháng sinh, cạnh tranh dinh dưỡng, ký sinh, sản xuất các chất chuyển hóa (hydro cyanide, siderophores) là những cơ chế gián tiếp từ PGPR có lợi cho sự phát triển của thực vật.

Bốn dòng vi khuẩn VLND-1203, CTND-0301, CTND-0501 và CTND-0902 đều có khả năng kích

thích sinh trưởng của đậu xanh so với đối chứng. Trong đó, dòng vi khuẩn CTND-0501 có biểu hiện tốt nhất ở cả hai thời điểm 3 và 5 NSXL. Do đó, dòng CTND-0501 được tiếp tục định danh bằng phương pháp sinh học phân tử.

3.5 Kết quả định danh dòng *Pseudomonas* CTND-0501 bằng phương pháp sinh học phân tử

Dòng vi khuẩn *Pseudomonas* có hiệu suất đối kháng mạnh (CTND-0501) được tiến hành ly trích DNA, khuếch đại vùng gene 16S rDNA, bằng cặp mồi 03F và 03R của công ty Sinh hóa Phù Sa. Kết quả so sánh trình tự DNA của vi khuẩn trên NCBI bằng công cụ tìm kiếm BLAST cho thấy mẫu dòng vi khuẩn CTND-0501 là loài *Pseudomonas mosselii* với mức độ tương đồng loài là 99,79% (Hình 4).

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas mosselii strain CFML 90-53 16S ribosomal RNA, partial sequence	2593	2593	97%	0.0	99.79%	NR_024824.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas entomophila L46 16S ribosomal RNA, partial sequence	2571	2571	97%	0.0	99.50%	NR_102854.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas plecoglossicida strain NBRC 103162 16S ribosomal RNA, partial sequence	2566	2566	97%	0.0	99.43%	NR_114226.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas taiwanensis DSM 21245 strain BCRC 17751 16S ribosomal RNA, partial sequence	2566	2566	97%	0.0	99.43%	NR_116172.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas plecoglossicida strain FPC951 16S ribosomal RNA, partial sequence	2566	2566	97%	0.0	99.43%	NR_024662.1

Hình 4: Kết quả so sánh mức độ tương đồng của dòng *Pseudomonas* CTND-0501 với các dòng vi khuẩn trên cơ sở dữ liệu NCBI

Loài vi khuẩn này có khả năng giúp tăng khả năng sản sinh indole-3-acetic-acid, giúp hòa tan lân khó tan trong đất, tăng hoạt tính enzyme nitrogenase ở cây dứa sọt (*Agave americana* L.) (Torre-Ruiz *et al.*, 2016), cũng như là tác nhân phòng trừ sinh học bệnh cháy lá ở cây lúa (Wu *et al.*, 2018).

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Tất cả 56 dòng *Pseudomonas* được phân lập và làm thuần từ 150 mẫu đất ruộng lúa, bầu bí, dưa và vườn cây ăn trái ở Cần Thơ và Vĩnh Long. Trong đó, 9 dòng *Pseudomonas* là VLND-0101, VLND-0301, VLND-0901, VLND-0501, VLND-1203, CTND-0301, CTND-0501, CTND-0104, CTND-0902 có khả năng đối kháng cao với nấm *F. solani*. Trong đó, bốn dòng *Pseudomonas* VLND-1203, CTND-0301, CTND-0501, CTND-0902 đều có khả năng đối kháng với nấm *C. gloeosporioides*, với dòng CTND-0501 có khả năng đối kháng cao nhất. Bốn 4 dòng VLND-1203, CTND-0301, CTND-0501, CTND-0902 đều có khả năng kích thích sinh trưởng và duy trì so với đối chứng, với dòng CTND-0501 có biểu hiện tốt nhất. Kết quả định danh của dòng *Pseudomonas* CTND-0501 là loài *Pseudomonas mosselii*.

Các cơ chế phòng trừ sinh học và hiệu quả phòng trừ bệnh ở nhà lưới của dòng vi khuẩn *Pseudomonas mosselii* sẽ được thực hiện trong các nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Antoun, H. and Prévost, D., 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Siddiqui, Z.A. (Ed.). PGPR: biocontrol and biofertilization. Springer. The Netherlands, pp. 1-38.

Bora, T., Özaktao, H., Göre, E. and Aslan, E., 2004. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* by wettable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*. Journal of Phytopathology. 152(8-9): 471-475.

Glick, B.R., 2012. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. Scientifica. 963401: 1-15.

Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J. and Duan, J., 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. Eur. J. Plant Pathol. 119(3): 329-339.

Kloepper, J.W. and Schroth, M.N., 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Kloepper, J.W. (Ed.). Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic

- Bacteria vol 2, 27 August–2 September 1978. INRA, Angers, France, pp. 879-882.
- Kohl, J., Kolnaar, R. and Ravensberg, W.J., 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*. 10(845): 1-19.
- Ngullie, M., Daiho, L. and Upadhyay, N.D., 2010. Biological management of fruit rot in the world's hottest chilli (*Capsicum chinense* Jacq.). *Journal of Plant Protection Research*. 50(3): 269-273.
- Nguyễn Hữu Hiệp, Trần Thị Ngọc Sơn và Nguyễn Thị Bé Thương, 2019. Hiệu quả của hai dòng vi khuẩn cố định đạm và hòa tan lân lên sinh trưởng và năng suất lúa IR 50404 tại xã Hiếu Nhơn, huyện Vũng Liêm, tỉnh Vĩnh Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 55(2): 141-150.
- Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Thị Yến Như, Trần Thị Xuân Mai và Nguyễn Thị Pha, 2016. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn từ đất vùng rễ ớt có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên ớt. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 47b: 16-23.
- Nguyen Thi Thu Nga, Doan Thi Kieu Tien, Hans Jorgen Lyngs Jorgensens *et al.*, 2016. Actinomyces promising rhizobacteria for biological control of plant diseases. *In: Tuat, N.V., Reddy, M.S., Sarma, Y.R., Kloepper, J.W., Batchelor, W.D. and Bergvinson, D. (Eds.). The 4th Asian Conference on Plant Growth Promoting Rhizobacteria and other microbials, May 3-6, 2015, Hanoi, Vietnam.* p 179-191.
- Siddiqui, Z.A., 2006. PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer. Netherlands, 318 pages.
- Stockwell, V.O. and Stack, J.P., 2007. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. *Phytopathology*. 97(2): 244-249.
- Torre-Ruiz, N.D.L., Ruiz-Valdiviezo, V.M., Rincón-Molinab, C.I. *et al.*, 2016. Effect of plant growth-promoting bacteria on the growth and fructan production of *Agave americana* L. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47(3): 587-596.
- Trần Thị Thu Thủy, Lê Thị Mai Thảo, Tsutomu Arie và Tohru Teraoka, 2014. Phân lập và đánh giá khả năng đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* đối với nấm *Fusarium moniliforme* gây bệnh lúa von tại đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 4: 204-211.
- Trương Thanh Thảo, Võ Quốc Cảnh và Nguyễn Thị Thu Nga, 2019. Phân lập và tuyển chọn những chủng xạ khuẩn triển vọng đối kháng với tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong điều kiện phòng thí nghiệm. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 55(2B): 19-27.
- Vessey, J.K., 2003. Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*. 255(2): 571-586.
- Weller, D.M., 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*. 97(2): 250-256.
- Wu, L., Xiaob, W., Chena, G. *et al.*, 2018. Identification of *Pseudomonas mosselii* BS011 gene clusters required for suppression of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Biotechnology*. 282: 1-9.
- Yasmin, S., Hafeez, F.Y., Mirza, M.S. *et al.*, 2017. Biocontrol of bacteria leaf blight of rice and profiling of secondary metabolites produced by rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* BRp3. *Frontiers in Microbiology*. 8(article 1895): 18-95.