

# PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG *Ralstonia solanacearum* GÂY BỆNH HÉO XANH CÀ CHUA VÀ KHOAI TÂY

Nguyễn Thị Kim Thoa<sup>1</sup>, Trần Quang Minh<sup>1</sup>

Lê Thị Thanh Thủy<sup>1</sup>, Lê Như Kiều<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

Sử dụng vi sinh vật có khả năng đối kháng với các tác nhân gây bệnh cho cây trồng đã được nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới và Việt Nam quan tâm, bởi vì chúng không gây ô nhiễm môi trường nhưng an toàn cho người và động vật hữu ích. Trong bài viết này nhóm tác giả đã cung cấp một số kết quả phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn, những chủng này có khả năng đối kháng mạnh với vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cà chua và cây khoai tây và kết quả thử nghiệm trong phòng thí nghiệm và nhà lưới. Đã phân lập và tuyển chọn được 2 chủng vi khuẩn đối kháng: Chủng H4 (Đường kính của vòng ức chế là 25-27 mm) và D9 (Đường kính của vòng ức chế là 18-19 mm) có hoạt tính đối kháng mạnh, ổn định, an toàn sinh học. Những chủng này có thể được sử dụng cho sản xuất chế phẩm vi sinh vật đối kháng. Chế phẩm này có khả năng hạn chế hơn 70% bệnh héo xanh vi khuẩn trên cà chua và khoai tây trong điều kiện nhà kính.

Từ khóa: Vi khuẩn đối kháng, bệnh héo rũ do vi khuẩn, khoai tây, cà chua.

## I. MỞ ĐẦU

Hiện nay, cà chua và khoai tây được trồng rất rộng rãi ở các nước trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng, đây là hai loại cây rau màu ngắn ngày nhưng cho hiệu quả kinh tế cao trên một đơn vị diện tích. Song thực tế sản xuất hai loại cây trồng này gặp rất nhiều khó khăn, trong đó bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây ra là một trở ngại rất lớn. Ở nước ta bệnh héo xanh vi khuẩn đã phát sinh ở hầu hết các địa phương có trồng cà chua và khoai tây như: Hà Nội, Vĩnh Phúc, Bắc Ninh, Bắc Giang, Thanh Hóa, ....[1]. Có nơi, có lúc bệnh nặng đã gây thiệt hại nặng tới mức gây chết 100% cây trồng. Mặc dù người nông dân đã áp dụng nhiều biện pháp phòng trừ bệnh, kể cả sử dụng các loại thuốc bảo vệ thực vật hóa học nhưng hiệu quả thu được không như mong muốn, trái lại còn gây ảnh hưởng rất lớn tới môi trường sinh thái, sức khỏe cộng đồng. Đáng ngại hơn là sự tùy tiện về liều lượng cũng như thời gian phun thuốc khá cao trong các sản phẩm nông nghiệp và gây ra những vụ ngộ độc ảnh hưởng lớn tới sức khỏe con người.

Thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc sinh học ra đời đã khắc phục được những điểm yếu vốn có của thuốc bảo vệ thực vật hóa học và tăng cường bảo vệ môi trường. Trong đó hướng sử dụng các nhóm vi

sinh vật có khả năng đối kháng với các tác nhân gây bệnh cho thực vật đã được quan tâm đặc biệt ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới và ở Việt Nam [2]. Dưới đây là một số kết quả phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng cao với vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh cà chua và khoai tây để sản xuất các chế phẩm vi sinh đối kháng ứng dụng trong sản xuất cà chua và khoai tây ở Việt Nam.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu

Chủng vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh BT1 và BP1 được Bộ môn Vi sinh vật, Viện Thổ nhưỡng Nông hóa cung cấp.

- Các mẫu đất được lấy tại các vùng chuyên canh cây cà chua và khoai tây ở Hà Nội.

Hóa chất, dụng cụ thí nghiệm được Bộ môn Vi sinh vật - Viện Thổ nhưỡng Nông hóa cung cấp.

### 2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân lập vi khuẩn đối kháng theo Geel và Schippers-1983 [4].

Phương pháp đánh giá hoạt tính đối kháng của vi sinh vật có khả năng đối kháng vi khuẩn... gây bệnh héo xanh cây trồng cạn, theo 10CTN 714-2006 [3].

<sup>1</sup> Viện Thổ nhưỡng Nông hóa

**III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**1. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn đối kháng**

Từ các mẫu đất, cây cà chua và khoai tây được

thu thập ở các huyện Mê Linh và Thường Tín (Hà Nội), đã phân lập và tuyển chọn được 7 chủng vi sinh vật có hoạt tính đối kháng với *R. solanacearum* là: H4, H7, C3, C7, Đ9, Đ5, H9.

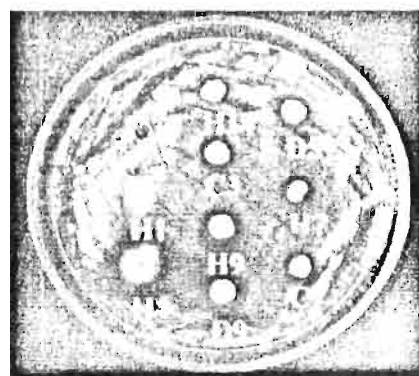
**Bảng 1. Nguồn gốc và hình thái khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn phân lập**

STT	Ký hiệu chủng	Nguồn gốc	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc
1	H4	Đất và cây cà chua tại huyện Mê Linh	Tròn đều, nhày, trắng đục
2	H7		Nhày, hình ôvan, trắng hồng
3	H9		Tròn, có đường tròn đồng tâm, trung bình, trắng đục
4	Đ5	Đất và cây khoai tây tại huyện Thường Tín	Trắng, có vành ở mép, tâm lõm, nhày
5	Đ9		Hình bầu dục, bề mặt nhăn nheo, trắng ngà
6	C3	Đất và cây khoai tây tại huyện Thường Tín	Tròn, nhẵn, nhày, nhỏ, trắng đục
7	C7		Tròn, nhẵn, nhày, nhỏ, trắng đục

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, quần thể vi sinh vật rất đa dạng về hình thái cũng như màu sắc khuẩn lạc; trong 7 chủng phân lập được thì mỗi chủng đều có những đặc điểm hình thái khuẩn lạc đặc trưng riêng. Hầu hết khuẩn lạc của các chủng được tuyển chọn đều có hình tròn đến ôvan, màu sắc đa dạng từ màu trắng đến đỏ, bề mặt trơn, nhẵn, hoặc xù xì, mép nhẵn hoặc có hình răng cưa.

Để có thể xác định và tuyển chọn được các chủng vi sinh vật có hoạt tính đối kháng cao và ổn định để sản xuất chế phẩm vi sinh, đã tiến hành đánh giá lại hoạt lực đối kháng của các chủng vi khuẩn lựa chọn với vi khuẩn *R. solanacearum* bằng phương pháp thạch đục lỗ đối với 2 chủng vi khuẩn *R. solanacearum* là BT1 (Gây bệnh héo xanh cà chua) và BP1 (Gây bệnh héo xanh khoai tây). Hoạt

lực đối kháng của các chủng vi khuẩn này với vi khuẩn *R. solanacearum* được xác định thông qua kích thước vòng vô khuẩn. Kết quả được tổng hợp tại bảng 2.

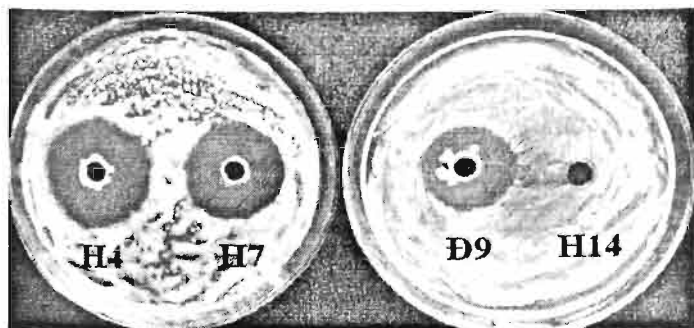


**Hình 1. Hoạt tính đối kháng của các chủng vi khuẩn với vi khuẩn *R. solanacearum***

**Bảng 2. Hoạt lực đối kháng của các chủng vi khuẩn đối kháng trong điều kiện in vitro**

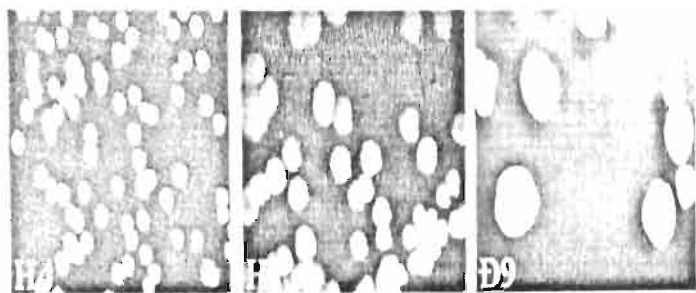
STT	Chủng vi khuẩn <i>R.solanacearum</i>	Hoạt lực đối kháng của các chủng vi khuẩn đối kháng (D-d; mm)						
		H4	H7	C3	C7	Đ9	Đ5	H9
1	BT1	25	21	2	2	18	-	-
2	BP1	27	22	-	4	19	5	2

Chú thích: (-) không có dấu hiệu đối kháng



**Hình 2. Hoạt lực đối kháng của các chủng vi khuẩn đối kháng**

Số liệu ở bảng 2 cho thấy, trong 7 chủng mới được phân lập thì chủng C3 thể hiện hoạt tính đối kháng thấp với chủng BT1 và không đối kháng chủng BP1; các chủng Đ5 và H9 có hoạt tính đối kháng thấp và chỉ thể hiện hoạt tính đối với chủng BP1; còn chủng C7 tuy có hoạt tính đối kháng với cả 2 chủng vi khuẩn gây bệnh héo xanh khoai tây và cà chua nhưng ở mức độ thấp. Chỉ có 3 chủng: H4, H7 và Đ9 có hoạt tính đối kháng cao với cả 2 chủng vi khuẩn BT1, BP1 gây bệnh héo xanh cà chua và khoai tây.



Hình 3. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc các chủng vi khuẩn đối kháng trên môi trường KB

Như vậy, từ các mẫu đất tại các vùng trồng cà chua và khoai tây của Hà Nội đã phân lập và tuyển chọn được 3 chủng vi khuẩn H4, H7 và Đ9 có hoạt tính đối kháng cao và ổn định, các chủng này có thể được sử dụng để sản xuất chế phẩm vi sinh phòng trừ bệnh héo xanh cà chua và khoai tây.

2. Phân loại các chủng vi sinh vật được lựa chọn bằng phương pháp phân tử (sequence)

Bảng 3. Kết quả định danh các chủng vi khuẩn đối kháng bằng chương trình NCBI BLAST

TT	Ký hiệu chủng	Hoạt tính sinh học	Tên loài
1	H4	Ức chế vi khuẩn gây bệnh	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
2	Đ9	Ức chế vi khuẩn gây bệnh	<i>Bacillus polyfermenticus</i>
3	H7	Ức chế vi khuẩn gây bệnh	<i>Burkholderia anthina</i>

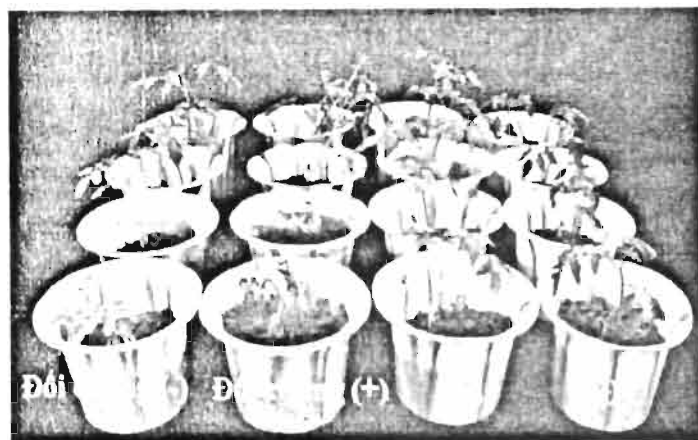
3 chủng vi khuẩn đối kháng là: H4, H7, Đ9 đã được phân loại đến loài bằng phương pháp phân tử (sequence), dựa vào kết quả phân tích trình tự gen 16S rARN. Mỗi mẫu được xác định trình tự với 2 phản ứng dùng mỗi thiết kế đặc biệt. Kết quả đọc trình tự được xử lý trên phần mềm Clustal W 1.83. Trình tự gen đã lắp ráp được so sánh bởi chương trình NCBI

BLAST với các nguồn gen ở GenBank. Kết quả được tổng hợp tại bảng 3.

Các chủng vi khuẩn H4, Đ9 và H7 cũng đã được đánh giá an toàn sinh học dựa trên việc so sánh tên với các chủng vi sinh vật trong danh mục đánh giá độ an toàn của các chủng vi sinh vật; kết quả cho thấy, trong 03 chủng đối kháng trên thì chỉ duy nhất chủng H7 nằm trong nhóm hạn chế sử dụng trong kiểm soát sinh học, 2 chủng H4 và Đ9 đều nằm trong nhóm an toàn cấp độ 1 (có thể sử dụng để sản xuất các chế phẩm sinh học). Như vậy, có thể ứng dụng các chủng H4 và Đ9 vào sản xuất chế phẩm vi sinh vật phòng trừ bệnh héo xanh.

3. Đánh giá tác dụng hạn chế bệnh héo xanh cà chua và khoai tây của các chủng vi khuẩn đối kháng

Trong điều kiện nhà lưới, hạt cà chua và củ khoai tây được ủ lên mầm rồi được tẩm dung dịch vi khuẩn đối kháng ở mật độ  $10^8-10^9$  tb/ml dịch, sau đó được trồng lên đất đã bổ sung vi khuẩn gây bệnh ở mật độ  $10^7$  tb/g đất; theo dõi tỉ lệ cây sống sót sau 40 ngày. Kết quả được tổng hợp tại bảng 4 và 5.



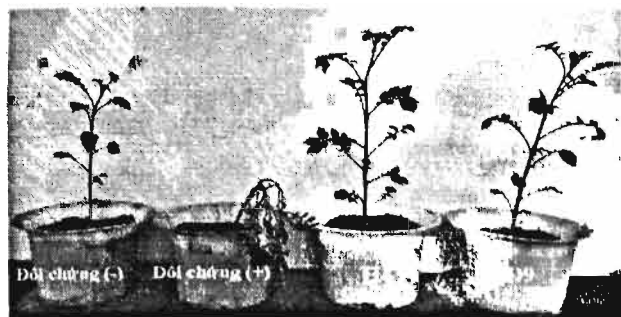
Hình 4. Thí nghiệm đánh giá phòng bệnh héo xanh cà chua của các chủng vi khuẩn đối kháng

Bảng 4. Khả năng phòng trừ bệnh héo xanh cà chua của các chủng vi khuẩn đối kháng

STT	Công thức	Số cây thí nghiệm			Số cây sống sót sau 40 ngày			Tỷ lệ cây sống sót (%)
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 1	Lần 2	Lần 3	
1	ĐC (-)	20	20	20	20	20	20	100
2	ĐC (+)	20	20	20	1	0	2	5,0
3	H4	20	20	20	16	18	17	85,0
4	Đ9	20	20	20	18	18	19	91,6

Số liệu ở bảng 4 cho thấy, ở công thức đối chứng âm (-) không bổ sung vi khuẩn *R. solanacearum* và vi khuẩn đối kháng thì tỷ lệ cây sống sót đạt 100%, trong khi đó ở công thức đối chứng (+) có nhiễm vi khuẩn *R. solanacearum* thì tỉ lệ cây sống sót chỉ là 5,0%. Điều này chứng tỏ rằng

chủng vi khuẩn *R. solanacearum* BT1 có độc tính gây bệnh héo xanh cà chua rất cao. Ở các công thức có nhiễm vi khuẩn đối kháng thì tỷ lệ cây sống sót tăng lên một cách đáng kể, cụ thể như sau: ở công thức có nhiễm chủng H4 thì tỷ lệ sống sót là 85,0%, ở công thức có nhiễm chủng Đ9 thì tỷ lệ sống sót là 91,6%.



Hình 5. Thí nghiệm đánh giá phòng bệnh héo xanh khoai tây của các chủng vi khuẩn đối kháng

Số liệu ở bảng 5 cho thấy, ở công thức đối chứng âm (-) không bổ sung vi khuẩn *R. solanacearum* và vi khuẩn đối kháng thì tỷ lệ cây sống sót đạt 100%,

Bảng 5. Khả năng phòng trừ bệnh héo xanh khoai tây của các chủng vi khuẩn đối kháng

TT	Công thức	Số cây thí nghiệm			Số cây sống sót sau 40 ngày			Tỷ lệ cây sống sót (%)
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 1	Lần 2	Lần 3	
1	ĐC (-)	20	20	20	20	20	20	100
2	ĐC (+)	20	20	20	3	1	0	6,67
3	H4	20	20	20	17	17	15	81,67
4	Đ9	20	20	20	18	18	17	88,33

**IV. KẾT LUẬN**

Đã phân lập và tuyển chọn được 2 chủng vi khuẩn đối kháng: Chủng H4 (Đường kính vòng phân giải 25-27 mm) và Đ9 (Đường kính vòng phân giải 18-19 mm) có hoạt tính đối kháng cao, ổn định, an toàn sinh học và có thể sử dụng để sản xuất chế phẩm vi sinh vật phòng trừ bệnh héo xanh.

Các chủng vi sinh vật được tuyển chọn có khả năng hạn chế bệnh héo xanh cà chua và khoai tây trong điều kiện nhà lưới với tỉ lệ hơn 70%.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Đỗ Tấn Dũng, 2002. Nghiên cứu bệnh héo xanh vi khuẩn (*Pseudomonas solanacearum* Smith) hại một số cây trồng ở ngoại thành Hà Nội và vùng phụ cận. *Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp*. Trường Đại học Nông nghiệp I - Hà Nội.

trong khi đó ở công thức đối chứng dương (+) có nhiễm vi khuẩn *R. solanacearum* thì chỉ là 6,67%. Điều này chứng tỏ rằng chủng vi khuẩn *R. solanacearum* BP1 có độc tính gây bệnh héo xanh khoai tây cao. Ở các công thức có nhiễm vi khuẩn đối kháng thì tỷ lệ cây sống sót tăng lên một cách đáng kể, cụ thể như sau: ở công thức có nhiễm chủng H4 thì tỷ lệ cây sống sót là 81,67%, ở công thức có nhiễm chủng Đ9 thì tỷ lệ cây sống sót là 88,33%.

Như vậy, các chủng vi khuẩn đối kháng được tuyển chọn đều có khả năng làm giảm bệnh héo xanh so với đối chứng, tỉ lệ hơn 70%.

2. Lê Như Kiều, Lê Thị Thanh Thủy, Trần Quang Minh, Nguyễn Thị Kim Thoa, Trần Thị Lụa, Nguyễn Văn Huân, 2009. Ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh đối kháng tới bệnh héo xanh và năng suất lạc, vừng trong nhà lưới và ngoài đồng ruộng. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, số 02(11). 2009. tr 54-60.

3. 10CTN 714-2006- Phương pháp đánh giá hoạt tính đối kháng của vi sinh vật có khả năng đối kháng vi khuẩn..... gây bệnh héo xanh cây trồng cạn.

4. Geels and Schippers, 1983. Selection of Antagonistic Fluorescent *Pseudomonas* sp. and their Root Colonization and Persistence following Treatment of Seed Potato. *Phytopath. Z.*, 108, pp. 193 - 206.

**ISOLATION AND SELECTION THE ANTAGONISTIC BACTERIATO *Ralstonia solanacearum* CAUSING BACTERIAL WILT DISEASE ON TOMATO AND POTATO**

Nguyen Thi Kim Thoa, Tran Quang Minh, Le Thi Thanh Thuy, Le Nhu Kieu

**Summary**

Using antagonistic-microorganisms that capable of resistance to the pathogens for plants has been particular interesting in many laboratories in the world and Vietnam. Because they do not cause pollution, safe for people and useful animal. Within this paper the authors will give some results of isolation and selection the strains of bacteria, those capable of strong resistance to *R. solanacearum*, which causing bacterial wilt disease on tomato and potato plants and some results experiment in the laboratorie and greenhouse. Isolated and selected the two antagonist bacteria strains: strain H4 (Diameters of inhibite round is 25-27 mm) and D9 (Diameters of inhibite round is 18-19 mm) with strongly antagonistic activity, stability, safety biological. This strains can be used for production of antagonistic microbial product. This product was capable of limiting bacterial wilt disease on tomato and potato in greenhouse conditions at a rate of more than 70%.

**Keyword:** *Antagonistic bacteria, bacterial wilt disease, potato, tomato.*

**Người phản biện:** PGS.TS. Nguyễn Văn Tuất