

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CHỦNG *Bacillus* sp. ĐỐI KHÁNG VỚI VI KHUẨN *Ralstonia solanacearum* GÂY BỆNH HÉO XANH TRÊN DƯA LEO

Lê Thanh Bình^{1,2*}, Nguyễn Bá Thọ¹, Trương Minh Ngọc¹,
Võ Đình Quang¹, Phan Thị Phượng Trang²

¹Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TP.HCM

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia TP.HCM

*Email: thanhbinhbio99@gmail.com

Ngày nhận bài: 23/4/2021; Ngày chấp nhận đăng: 04/7/2021

TÓM TẮT

Bệnh héo xanh vi khuẩn là một trong những bệnh gây thiệt hại nhất đối với cây dưa leo. Nghiên cứu được tiến hành nhằm xác định chủng vi sinh vật gây bệnh héo xanh trên cây dưa leo và tuyển chọn được các chủng *Bacillus* có khả năng đối kháng mạnh vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên dưa leo. Kết quả cho thấy, chủng vi khuẩn DLHX4 được lựa chọn dựa vào các đặc điểm hình thái và sinh hóa, có khả năng gây bệnh héo xanh trên cây dưa leo nhanh và trình tự vùng 16S ribosome DNA tương đồng 99,00% với *Ralstonia solanacearum*. Kết quả nghiên cứu đã tuyển chọn được 3 chủng *Bacillus* DB8.7, DB2.1, DB9.9 có khả năng đối kháng cao với *R. solanacearum* bằng phương pháp khuếch tán qua lỗ thạch, hiệu quả đối kháng của 3 chủng này lần lượt là 31,87 mm, 21,89 mm và 21,67 mm. Kết quả phân tích trình tự gen 16S ribosome DNA, 3 chủng *Bacillus* DB8.7, DB2.1, DB9.9 được xác định lần lượt là *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis* và *Bacillus amyloliquefaciens*.

Từ khóa: Bệnh héo xanh vi khuẩn, *Ralstonia solanacearum*, dưa leo, *Bacillus* sp.

1. MỞ ĐẦU

Cây dưa leo (*Cucumis sativus*) là loại rau ăn quả quan trọng, được trồng lâu đời trên thế giới và trở thành thực phẩm của nhiều nước [1]. Ở Việt Nam, cây dưa leo được trồng khá phổ biến, trong đó ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long diện tích trồng cây dưa leo đang dần mở rộng trong nhiều năm gần đây. Đặc biệt trong bối cảnh hiệu quả trồng lúa rất thấp thì cây dưa leo là một trong những lựa chọn thay thế tốt. Tuy nhiên, dưa leo cũng bị nhiều mầm bệnh khác nhau. Bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây ra là một trong những loại bệnh gây hậu quả nghiêm trọng trên cây dưa leo [2] và bệnh phát triển mạnh ở vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới và những vùng có khí hậu ôn đới [3, 4]. Khả năng gây bệnh của vi khuẩn *R. solanacearum* khác nhau tùy theo vật chủ, giống cây trồng, khí hậu, loại đất, kỹ thuật trồng trọt. Vi khuẩn *R. solanacearum* tồn tại trong đất, trong tàn dư cây bệnh và cỏ dại. Khi vi khuẩn *R. solanacearum* xâm nhập vào cây qua vết thương cơ giới hoặc qua lỗ mở tự nhiên ở rễ cây và được nhân lên nhanh chóng trong mạch dẫn, vi khuẩn có thể tiếp tục xâm nhập vào những mô lân cận. Trong quá trình này, vi khuẩn sản sinh ra exopolysaccharide làm tắc mạch xylem, cản trở vận chuyển nước, dinh dưỡng trong cây, làm cho cây bị héo [5]. Vi khuẩn tồn tại tốt ở đất đủ ẩm, thoáng khí, nhưng bị kìm hãm ở đất khô và đất bị ngập nước, lây lan chủ yếu qua đất nhưng cũng dễ dàng truyền lan theo nguồn nước, qua mưa gió và qua những vết thương cơ giới, qua dụng cụ sản xuất của con người, cũng có thể qua vết

thương ở rễ do côn trùng và tuyến trùng gây ra. Ngoài gây hại trên cây dưa leo, vi khuẩn *R. solanacearum* còn gây hại trên 450 loài cây thuộc 54 họ thực vật khác nhau [6, 7].

Hiện nay, biện pháp phòng trị bệnh héo xanh trên cây dưa leo chủ yếu là sử dụng các thuốc hóa học nhưng cũng không mang lại hiệu quả cao vì thuốc không thể thấm sâu xuống đất và sử dụng các thuốc hóa học có thể gây hình thành các chủng vi sinh kháng thuốc, cũng như gây ô nhiễm môi trường và an toàn vệ sinh thực phẩm. Theo một số nghiên cứu trong và ngoài nước cho thấy, các chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng đối kháng được với bệnh héo xanh trên cây khoai tây [8], trên cây lạc [9]. Do đó, việc nghiên cứu chọn lựa những chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cây dưa leo là phù hợp với xu hướng nông nghiệp bền vững.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*

Thu thập mẫu cây dưa leo bị bệnh héo xanh vi khuẩn điển hình. Các mẫu cây bị bệnh được rửa dưới vòi nước để loại bỏ đất và làm khô bằng giấy vô trùng. Mẫu thân dưa leo được cắt từ phần cổ rễ lên 5-6 cm và được khử trùng bằng ethanol 70% trong 3 phút, sau đó rửa nhiều lần với nước vô trùng trong 5 phút. Mẫu thân đã khử trùng được ngâm từ 2-3 cm vào 5 mL nước cất vô trùng. Sau 10 phút, nước trong ống nghiệm bị đục do dòng vi khuẩn màu trắng sữa tuôn ra từ mạch dẫn ở đầu mẫu bệnh. Sau đó dịch huyền phù vi khuẩn được pha loãng liên tiếp trong nước cất vô trùng, tiếp theo hút lấy 100 μ L dịch vi khuẩn ở các nồng độ pha loãng cây trang lên môi trường TZCA (Peptone: 10 g/L; Casein hydrolysate: 1 g/L; Cao nấm men: 1 g/L; Glucose: 5 g/L; Agar: 20 g/L; pH 7,0; TZC (Triphenyl tetrazolium clorua) 50 μ g/mL được thêm vào môi trường sau khi hấp). Ủ các đĩa petri đã cấy ở nhiệt độ 28 °C và theo dõi cho đến khi hình thành các khuẩn lạc vi khuẩn. Các khuẩn lạc có hình dạng bất định, sinh nhày màu trắng đục và ở giữa có màu phớt hồng trên môi trường TZCA là đặc trưng của vi khuẩn *R. solanacearum* [10].

2.2. Thử nghiệm sàng lọc *Ralstonia solanacearum*

Các chủng vi khuẩn được phân lập từ các cây dưa leo bị bệnh héo xanh được sàng lọc bằng các thử nghiệm sinh hóa: thử nghiệm potassium hydroxide 3%, thử nghiệm catalase, oxidase, khả năng tiết lipase trên môi trường Tween 80 agar.

2.3. Thử nghiệm độ độc của chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*

Các chủng vi khuẩn nghi ngờ *R. solanacearum* được nuôi cấy lắc 100 vòng/phút trên môi trường SPA lỏng (Pepton: 5 g/L; saccharose: 20 g/L; K_2HPO_4 : 0,5 g/L; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$: 0,25 g/L) ở 28 °C trong 24-36 giờ. Sau đó, tưới 300 mL dịch vi khuẩn với nồng độ 10^8 CFU/mL (ở OD 600 nm là 0,1) vào xung quanh gốc cây dưa leo được 3-4 lá thật (trồng trong chậu nhựa chiều cao 18 cm, đường kính miệng chậu 20 cm, đường kính đáy chậu 14,5 cm có chứa 3 kg đất vô trùng), cây đối chứng được tưới nước cất vô trùng. Cuối cùng tiến hành sát thương rễ cây dưa leo. Theo dõi tỷ lệ bệnh của cây dưa leo hằng ngày sau khi gây bệnh. Mỗi chủng phân lập nghi ngờ là vi khuẩn *R. solanacearum* được thử nghiệm ở 10 cây dưa leo, thử nghiệm được lặp lại 3 lần. Các chủng phân lập nào gây chết cây trong thời gian càng ngắn thì càng có độc tính cao [11].

Chủng vi khuẩn có khả năng gây độc cao được định danh đến loài bằng phương pháp định danh với cặp mồi 16S-rDNA (9F: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1541R: 5'-AAGGAGGTGATCCAACC-3'). Chu trình PCR gồm: bước biến tính 2 phút ở 96 °C, sau đó là 30 chu kỳ ở (1) biến tính 95 °C, 1 phút; (2) bắt cặp 55 °C, 1 phút; (3) kéo dài 72 °C, 2 phút và bước cuối cùng là 10 phút ở 72 °C [12].

2.4. Phương pháp phân lập vi khuẩn *Bacillus*

Các mẫu vi khuẩn *Bacillus* được thu nhận ở khu vực đất dưa leo khỏe mạnh, không có dấu hiệu của bệnh héo xanh và đất tại khu vực đất nguyên sinh thuộc tỉnh An Giang. Mẫu đất được đun ở nhiệt độ 80 °C trong 10 phút để loại bỏ tế bào sinh dưỡng chỉ giữ lại những chủng có sinh bào tử. Pha loãng mẫu đất đến nồng độ thích hợp bằng nước muối sinh lý 0,85-0,9%, cấy trải trên đĩa petri có chứa môi trường LB - agar (pepton: 10 g/L; cao nấm men: 5 g/L; NaCl: 10 g/L; agar: 20 g/L) nuôi cấy ở 37 °C trong 24 giờ. Chọn các khuẩn lạc đặc trưng của vi khuẩn *Bacillus* và tiến hành làm thuần bằng cách cấy ria trên môi trường LB - agar. Các chủng vi khuẩn đã thuần được: nhuộm gram, catalase, oxidase và khả năng di động.

2.5. Phương pháp đối kháng giữa vi khuẩn *Bacillus* và vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*

Tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng đối kháng bằng phương pháp khuếch tán qua lỗ thạch. Các chủng vi khuẩn *Bacillus* được nuôi cấy lắc ở 100 vòng/phút trong môi trường LB lỏng. Sau 48 giờ, dịch tăng sinh *Bacillus* được ly tâm 8000 vòng/phút, hút 100 µL dịch nổi cho vào 3 giếng (đường kính 7 mm) trên đĩa thạch môi trường SPA đã được trang 100 µL dịch vi khuẩn *R. solanacearum* ($OD_{600\text{ nm}} = 0,08-0,1$) được nuôi cấy trong môi trường SPA lỏng ở 28 °C trong 48 giờ. Các đĩa đối kháng được ủ ở 28 °C trong 48 giờ. Quan sát và đo đường kính vòng đối kháng (vòng tròn trong suốt bao quanh lỗ thạch). Hoạt tính đối kháng được tính theo công thức:

$$\text{Kích thước vòng đối kháng} = D - d$$

Trong đó: D (mm) là đường kính vòng đối kháng; d (mm) là đường kính lỗ thạch.

Chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng mạnh được định danh bằng phương pháp định danh với cặp mồi 16S-rDNA (9F: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1541R: 5'-AAGGAGGTGATCCAACC-3'). Chu trình PCR gồm: bước biến tính 2 phút ở 96 °C, sau đó là 30 chu kỳ ở (1) biến tính 95 °C, 1 phút; (2) bắt cặp 55 °C, 1 phút; (3) kéo dài 72 °C, 2 phút và bước cuối cùng là 10 phút ở 72 °C [12].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*

3.1.1. Phân lập và làm thuần

Từ phần thân của 8 mẫu dưa leo có biểu hiện héo xanh (Hình 1A) thu nhận ở 4 huyện của tỉnh An Giang (Chợ Mới, Phú Tân, Châu Thành, Châu Phú), được ngâm vào nước cất vô trùng, sau 5 phút đều có xuất hiện dòng vi khuẩn trắng đục chảy ra từ thân dưa leo (Hình 1B), phần thân sau khi ngâm được giải phẫu cho thấy mạch xylem trong thân bị vỡ và có màu nâu (Hình 1C). Dịch huyền phù vi khuẩn của 8 mẫu được trải trên môi trường TZCA và được ủ ở 28 °C, sau 24 giờ nuôi cấy kết quả xuất hiện 2 nhóm khuẩn lạc có hình thái khác nhau trong đó nhóm 1: khuẩn lạc có tâm màu đỏ sẫm, không nhày (Hình 2A) và nhóm 2: khuẩn lạc trắng đục nhày, kích thước không đồng đều; sau 48 giờ nuôi cấy các khuẩn lạc nhóm 2 có đặc điểm của vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*, với đặc điểm khuẩn lạc nhày có tâm màu hồng hoặc đỏ nhạt, rìa khuẩn lạc màu trắng đục, kích thước không đồng đều (Hình 2B). Kết quả trên tương tự với các nghiên cứu của Roop Singh (2017) [10].

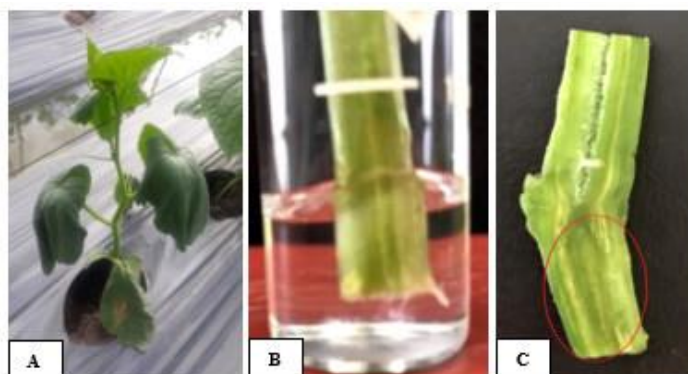
Tất cả 8 chủng vi khuẩn thuộc nhóm 2 được thử nghiệm sinh hóa. Kết quả cho thấy tất cả 8 chủng đều là vi khuẩn gram âm hình que, tạo dịch nhày với thử nghiệm KOH, sinh hơi trong phản ứng catalase, xuất hiện màu tím xanh ở thử nghiệm oxidase và tạo vòng phân giải

ở thử nghiệm khả năng tiết enzyme lipase (Bảng 1, Hình 3). Dựa vào các kết quả thử nghiệm sinh hóa, cho thấy tất cả 8 chủng có thể là vi khuẩn *R. solanacearum*.

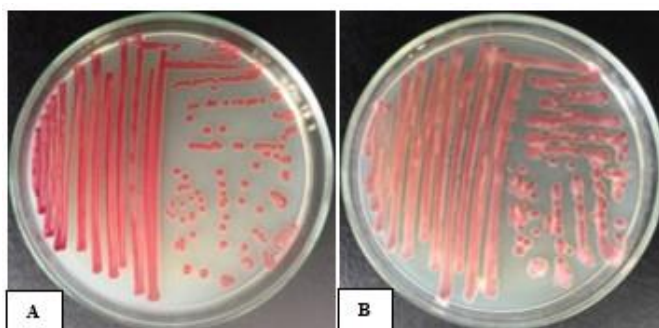
Bảng 1. Kết quả thử nghiệm sinh hóa sàng lọc vi khuẩn *R. solanacearum* phân lập tại các huyện của tỉnh An Giang

Ký hiệu mẫu	Địa điểm phân lập	Gram	Catalase (Sinh hơi)	Oxidase (Xuất hiện màu tím xanh)	KOH (Sinh nhầy)	Lipase (Vòng phân giải)
DLBHX 1	Chợ Mới	-	+	+	+	+
DLBHX 2	Chợ Mới	-	+	+	+	+
DLBHX 3	Phú Tân	-	+	+	+	+
DLBHX 4	Phú Tân	-	+	+	+	+
DLBHX 5	Châu Thành	-	+	+	+	+
DLBHX 6	Châu Thành	-	+	+	+	+
DLBHX 7	Châu Phú	-	+	+	+	+
DLBHX 8	Châu Phú	-	+	+	+	+

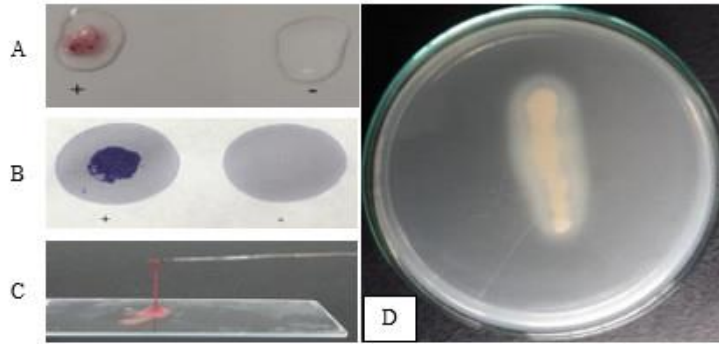
Ghi chú: (-): âm tính; (+): dương tính



Hình 1. A/ Cây dưa leo 14 ngày tuổi bị bệnh héo xanh; B/ Dịch vi khuẩn chảy ra từ thân dưa leo bị bệnh héo xanh; C/ Mặt cắt dọc phần thân cây dưa leo bị héo xanh.



Hình 2. Kết quả phân lập vi khuẩn trên môi trường TZCA
A/ Khuẩn lạc vi khuẩn nhóm 1; B/ Khuẩn lạc vi khuẩn nhóm 2.



Hình 3. Kết quả kiểm tra sinh hóa của chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*:
A/ Phản ứng Catalase; B/ Phản ứng Oxidase; C/ Phản ứng KOH; D/ Phản ứng Lipase

3.1.2. Thử nghiệm độ độc của vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*

Tất cả 8 chủng được tiến hành thử nghiệm độ độc trên cây dưa leo được 3-4 lá thật bằng phương pháp gây sát thương ở rễ với dịch vi khuẩn ở nồng độ 3×10^8 CFU/mL. Kết quả thí nghiệm cho thấy sau 5 ngày gây bệnh, cây dưa leo bắt đầu xuất hiện những lá héo ở dưới gốc nhưng vào lúc sáng sớm và chiều mát thì tươi trở lại, thân cây dưa leo có xuất hiện những vết sọc trắng chạy dọc thân. Đến 10 ngày sau khi gây bệnh, cây dưa leo héo hoàn toàn và không thể phục hồi. Trong khi đó, ở thí nghiệm đối chứng vẫn không quan sát thấy biểu hiện của bệnh héo xanh (Hình 4).

Kết quả đánh giá độc lực của 8 chủng vi khuẩn được thể hiện ở Bảng 2 cho thấy sau 5 ngày gây bệnh, tỷ lệ bệnh từ 36,67 % - 66,67 %, trong đó chủng DLBHX 4 có tỷ lệ bệnh cao là 66,67 %. Đến thời điểm 10 ngày sau khi gây bệnh, cả 8 chủng đều có tỷ lệ gây bệnh trên cây dưa leo là 100 %. Nghiệm thức đối chứng hoàn toàn không xuất hiện bệnh qua các giai đoạn khảo sát.

Bảng 2. Tỷ lệ bệnh trên cây dưa leo theo thời gian sau khi lây nhiễm 8 chủng phân lập

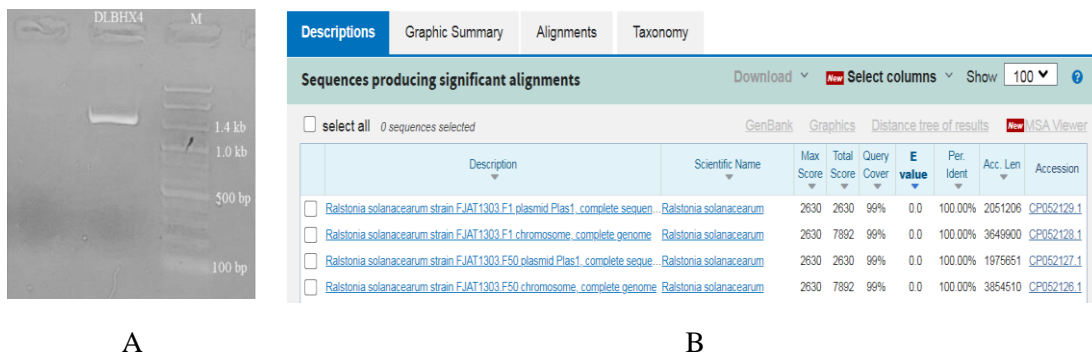
STT	Nghiệm thức	Tỷ lệ bệnh trên cây dưa leo (%)	
		Sau 5 ngày	Sau 10 ngày
1	Đối chứng	0,00 ^a	0,00 ^a
2	DLBHX 1	56,67 ^{de}	100,00 ^b
3	DLBHX 2	50,00 ^{cd}	100,00 ^b
4	DLBHX 3	63,33 ^e	100,00 ^b
5	DLBHX 4	66,67 ^e	100,00 ^b
6	DLBHX 5	50,00 ^{cd}	100,00 ^b
7	DLBHX 6	36,67 ^b	100,00 ^b
8	DLBHX 7	63,33 ^e	100,00 ^b
9	DLBHX 8	43,33 ^{bc}	100,00 ^b

(^{abcde}: Các ký tự theo hàng dọc khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa $p \leq 0,05$)



Hình 4. Kết quả gây bệnh của chủng DLBHX4 trên dưa leo sau 5 ngày gây bệnh

Chủng vi khuẩn DLBHX4 được định danh bằng cặp mồi 16S-rDNA, kết quả điện di của phản ứng PCR trên gel agarose, cho thấy xuất hiện một băng vạch sáng rõ với kích thước 1426 bp (Hình 5A). Sản phẩm PCR được phân tích trình tự và so sánh trên cơ sở dữ liệu NCBI-Blast cho kết quả là vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* với độ tương đồng 99,00 % (Hình 5B).



A

B

Hình 5. Kết quả định danh vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* DLBHX4

A/ Kết quả điện di sản phẩm PCR đoạn 16S-rDNA của chủng vi khuẩn DLBHX4 (M: thang DNA 3kb)

B/ Kết quả so sánh trình tự 16S-rDNA được giải trên NCBI-Blast

3.2. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*

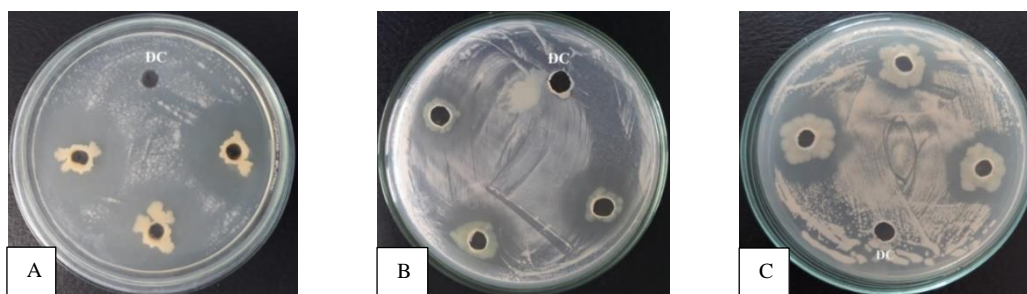
Dựa vào hình thái khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường LB và các thử nghiệm sinh hóa, chúng tôi đã phân lập được 80 chủng vi khuẩn *Bacillus*. Các chủng vi khuẩn *Bacillus* này được đánh giá khả năng kháng vi khuẩn *R. solanacearum* bằng phương pháp khuếch tán qua lỗ thạch thông qua dịch của các chủng tiết ra. Kết quả thí nghiệm (Bảng 3) cho thấy có 11 chủng có khả năng đối kháng khá mạnh với *R. solanacearum* và có sự chênh lệch rõ rệt về khả năng đối kháng của từng chủng. Có 3 chủng có khả năng sinh hoạt chất đối kháng mạnh nhất lần lượt là chủng DB8.7 (kích thước vòng kháng khuẩn là 31,78 mm), chủng DB2.1 (kích thước vòng kháng khuẩn là 21,89 mm) và chủng DB9.9 (kích thước vòng kháng khuẩn

là 21,67 mm) (Hình 6). Các chủng vi khuẩn *Bacillus* còn lại có kích thước vòng kháng khuẩn dao động trong khoảng 9,11 mm - 16,78 mm.

Bảng 3. Kết quả đối kháng của một số chủng *Bacillus* với vi khuẩn *R. solanacearum*

STT	Ký hiệu chủng	Kích thước vòng kháng khuẩn (mm)
1	DB1.3	13,67 ^{bc}
2	DB2.1	21,89 ^d
3	DB8.7	31,78 ^e
4	DB9.4	14,22 ^{bc}
5	DB9.6	15,56 ^{bc}
6	DB9.7	15,22 ^{bc}
7	DB9.9	21,67 ^d
8	DB10.4	9,11 ^a
9	DB14.4	9,22 ^a
10	DB17.1	16,78 ^c
11	DB28.3	12,33 ^{ab}

(*abcd*: Các ký tự theo hàng dọc khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa $p \leq 0,05$)

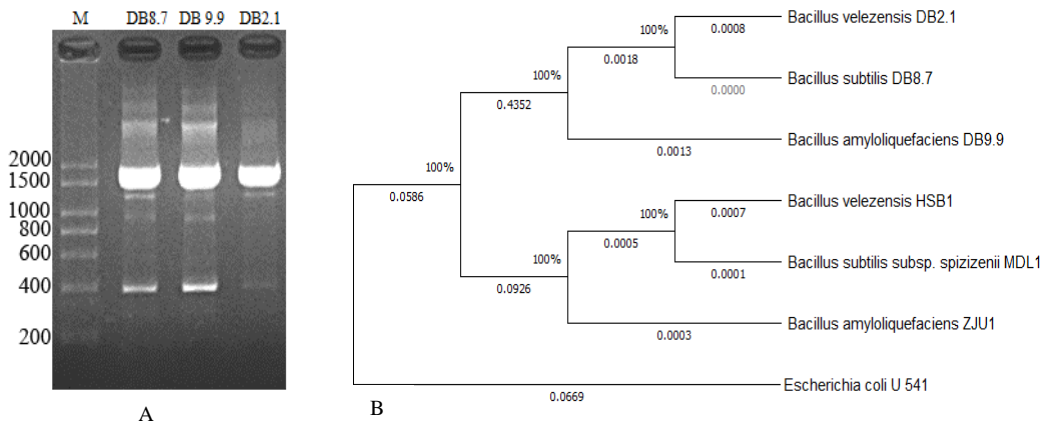


Hình 6. Hoạt tính đối kháng của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. với vi khuẩn *R. solanacearum* bằng phương pháp khuếch tán qua lỗ thạch trên môi trường SPA sau 48 giờ ở 28 °C.
A/ Chủng DB8.7; B/ Chủng DB2.1; C/ Chủng DB9.9

So sánh với kết quả nghiên cứu của Lê Thị Thanh Thủy và cộng sự (2008), chủng *Bacillus* Ba5.1 đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum* phân lập trên cây ớt có kích thước vòng kháng khuẩn đạt 15,0 mm [13]; nghiên cứu của Lê Như Kiều và cộng sự (2010) cho thấy chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* CX5 có khả năng đối kháng vi khuẩn *R. solanacearum* phân lập trên lạc và cùng với kích thước vòng kháng khuẩn là 18,0 mm [9] và nghiên cứu của Shiyong Tan và cộng sự (2013) vòng đối kháng của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* với *R. solanacearum* là 11,7 mm [14]. Như vậy, các chủng vi khuẩn *Bacillus* mà chúng tôi phân lập được có khả năng kháng *R. solanacearum* mạnh hơn các chủng vi khuẩn *Bacillus* của các nghiên cứu trước đạt được.

Từ kết quả trên, chúng tôi chọn ra 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* có hoạt tính kháng cao nhất là DB8.7, DB2.1 và DB9.9 để thực hiện định danh. Kết quả điện di sản phẩm PCR của 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* với cặp mồi 16S-rDNA trên gel agarose, cho thấy cả 3 băng vạch sáng rõ ràng và đều có kích thước tương đương nhau khoảng 1,5 kb (Hình 7A), các sản phẩm này được phân tích trình tự và so sánh trên NCBI-Blast cho thấy chủng DB8.7 là *Bacillus subtilis* (độ tương đồng 100%), DB2.1 là *Bacillus velezensis* (độ tương đồng 100%)

và DB9.9 là chủng *Bacillus amyloliquefaciens* (độ tương đồng 99,72%). Các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. này đều an toàn với con người và môi trường.



Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi 16S-rDNA và cây phát sinh loài của 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* được tuyển chọn: A/ Kết quả điện di sản phẩm PCR đoạn 16S-rDNA của chủng DB8.7; DB9.9 và DB2.1 (M: thang DNA 2kb); B/ Cây phả hệ mối tương quan giữa các chủng *Bacillus* bằng giải trình tự 16S-rDNA của 3 chủng tuyển chọn (DB8.7; DB9.9; DB2.1) và các chủng *Bacillus* tham khảo và sử dụng trình tự của vi khuẩn *E. coli* U541 làm nhóm ngoài.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập và xác định được chủng vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên cây dưa leo trên địa bàn tỉnh An Giang là chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*.

Kết quả phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* từ vùng trồng dưa leo và đất rừng nguyên sinh tại tỉnh An Giang đã tuyển chọn được 11 chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng đối kháng được vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*. Trong đó, có 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* tạo vòng đối kháng mạnh lần lượt là chủng *Bacillus subtilis* DB8.7 (31,78 mm), chủng *Bacillus velezensis* DB2.1 (21,89 mm) và chủng *Bacillus amyloliquefaciens* DB9.9 (21,67 mm). Với khả năng đối kháng cao với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cây dưa leo và an toàn với môi trường, cả 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* được phân lập trong nghiên cứu này có tiềm năng rất lớn trong kiểm soát bệnh héo xanh trên cây dưa leo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ren Y., Zhang Z., Liu J., Staub J. E., Han Y., Cheng Z., & Huang S.- An integrated genetic and cytogenetic map of the cucumber genome, *PloS one* **4** (6) (2009) e5795.
2. Wicker E., Grassart L., Mian D., Coranson Beaudu R., Dufeal D., Guilbaud C., & Prior P. - *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita moschata*, and *Anthurium* spp., new hosts of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies), *Bacterial Wilt Newsletter* **17** (2002) 20-21.
3. Hayward A. C. - The hosts of *Pseudomonas solanacearum*, in: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*, 9-24 CAB International Wallingford, UK (1994).
4. Prior P., & Fegan M. - Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*, *Acta Horticulturae* **695** (2004) 127-136.
5. Denny T.P. - *Ralstonia solanacearum* a plant pathogen in touch with its host, *Trends in Microbiology* **8** (11) (2000) 486-489.

6. Chandrashekara K.N, Prasnnakumar M.K. - New host plants for *Ralstonia solanacearum* from India, *Plant Pathol* **59** (6) (2010) 11-78.
7. Lin C. H., Chuang M. H., Wang J. F. - First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on chard in Taiwan, *Plant Disease* **99** (2) (2015) 282-282.
8. Ding C., Shen Q., Zhang R., Chen, W. - Evaluation of rhizosphere bacteria and derived bio-organic fertilizers as potential biocontrol agents against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) of potato, *Plant and Soil* **366** (1) (2013) 453-466.
9. Lê Như Kiều, Trần Quang Minh, Lê Thị Thanh Thủy, Nguyễn Văn Huân - Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh lục và vàng, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* **48** (3) (2010) 33-42.
10. Singh R., Jagtap G.P. - In vitro evaluation of antibacterial chemicals and bioagents against *Ralstonia solanacearum* infecting bacterial wilt in Ginger, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **6** (5) (2017) 2034-2045.
11. Seleim M.A.A., Saeed F.A., Abd-El-Moneem K.M.H., Abo-Elyousr K.A.M. - Biological control of bacterial wilt of tomato by plant growth promoting rhizobacteria, *Plant Pathology Journal* **10** (4) (2011) 146-153.
12. Tamura T., Hatano K. - Phylogenetic analyses on the strains belonging to invalidated genera of the order *Actinomycetales*, *Actinomycetologica* **12** (1) (1998) 15-28.
13. Lê Thị Thanh Thủy, Phạm Bích Hiền, Phạm Văn Toàn, Vũ Thúy Nga, Nguyễn Thu Hằng, Nguyễn Thị Yên - Tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả năng đối kháng vi khuẩn và nấm gây bệnh héo xanh, héo vàng thối quả hại ớt, *Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* **6** (2008) 26-31.
14. Tan S., Jiang Y., Song S., Huang J., Ling N., Xu Y., & Shen Q. - Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanacearum* and promoting tomato plant growth, *Crop Protection* **43** (2013) 134-140.

ABSTRACT

ISOLATION AND SELECTION OF ANTAGONISTIC *Bacillus* sp. AGAINST *Ralstonia solanacearum* CAUSING BACTERIAL WILT DISEASE IN CUCUMBER

Le Thanh Binh^{1,2*}, Nguyen Ba Tho¹, Truong Minh Ngoc¹,
Vo Dinh Quang¹, Phan Thi Phuong Trang²

¹National Center for Technological Progress - HCM branch

²University of Sciences - Viet Nam National University Ho Chi Minh City

*Email: thanhbinhbio99@gmail.com

Bacterial wilt disease is one of the most damaging diseases of cucumber. The aim of this study is to determine strains that cause bacterial wilt disease in cucumber and to select some *Bacillus* that is capable of antagonism to *Ralstonia solanacearum*, causing the wilt disease in cucumber. The result showed that the strain DLHX4 bacterium was selected which based on morphological and biochemistry characteristics, pathogenic causing the wilt disease quickly in cucumber and 16S ribosomal DNA region sequences showed 99.00% similarity to *Ralstonia solanacearum*. The resulting study was that the 3 strains selected were *Bacillus* DB8.7, DB2.1, DB9.9 which high antagonistic effect on *Ralstonia solanacearum* by agar well diffusion method. The antagonistic effect of strain DB8.7, DB2.1, DB9.9 were 31.87 mm, 21.89 mm, 21.67 mm. Result of a detailed analysis of 16S rDNA gene segments, strain DB8.7, DB2.1, DB9.9 showed similarity to *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*.

Keywords: Bacterial wilt disease, *Ralstonia solanacearum*, cucumber, *Bacillus* sp.