

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG VỚI NẤM *Colletotrichum* sp. GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN HÀNH LÁ

• Nguyễn Thị Liên^(*), Hà Trọng Nhân^(*), Trần Thị Xuân Mai^(*),
Nguyễn Thị Pha^(*), Nguyễn Lam Minh^(*)

Tóm tắt

*Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên cây hành lá. Từ đất vùng rẫy hành được thu tại tỉnh Sóc Trăng và thành phố Cần Thơ đã tuyển chọn được 55 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên hành lá. Năm dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng mạnh nhất đều có đầy đủ bốn cơ chế đối kháng và là những dòng vi khuẩn triển vọng để ứng dụng trong việc phòng trừ sinh học bệnh thán thư trên cây hành lá.*

*Từ khóa: *Colletotrichum* sp., hành lá, phân lập, thán thư, vi khuẩn đối kháng.*

1. Đặt vấn đề

Hành lá (*Allium fistulosum* L.) là một loại gia vị quan trọng trong các món ăn ở Châu Á Không những được dùng làm gia vị, hành lá còn được sử dụng như một nguồn dược liệu để hỗ trợ điều trị các bệnh như ho, cảm, sốt trừ đờm, lợi tiểu, sát trùng [2]. Trên thế giới, hành lá được trồng rộng rãi trong các khu vực ôn đới và cận nhiệt đới, đặc biệt là ở Hàn Quốc [7]. Ở Nam Mỹ, hành lá được trồng để xuất khẩu sang thị trường châu Âu và được trồng nhiều ở khu vực Río Colorado Valley [8].

Tuy nhiên khí hậu nóng ẩm ở nước ta đã tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của nhiều loại sâu bệnh, đặc biệt là nấm *Colletotrichum* sp. gây ra bệnh thán thư trên cả hành lá và hành củ. Đây là loại bệnh xuất hiện phổ biến và gây hại nghiêm trọng trên cây hành lá. Nấm tấn công bất cứ vị trí nào trên cây từ chóp lá đến phần gốc gần sát đất. Khi bị nấm tấn công, cây sẽ bị giảm sức sống, nếu bị nặng cây sẽ chết. Nấm còn gây ra những vết bệnh trên lá làm giảm giá trị thương phẩm, kinh tế của cây. Nếu không phát hiện bệnh kịp thời và xử lý đúng cách bệnh sẽ lan rộng và gây mất năng suất rất lớn [4].

Biện pháp trị bệnh thán thư cho hành phổ biến hiện nay là sử dụng các loại thuốc hóa học chứa chất kháng nấm như benomyl, thyophanate-methyl, azoxystrobin, mancozeb, propineb để phun lên lá. Tuy nhiên việc sử dụng các loại thuốc hóa học không những tạo ra các dòng vi khuẩn kháng thuốc,

ảnh hưởng đến chất lượng nông sản và ảnh hưởng đến môi trường mà còn tiềm ẩn nguy cơ gây ra các bệnh nguy hiểm cho người sử dụng. Hiện nay, xu thế của thế giới là sản xuất nông sản hữu cơ không sử dụng bất cứ loại phân bón, thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc hóa học nào. Các loại thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc từ vi sinh vật đối kháng đang được quan tâm, đặc biệt là các loại vi sinh vật vùng rẫy với khả năng tiết enzyme có khả năng phân giải vách tế bào nấm bệnh. Các thuốc trừ sâu bệnh sinh học này vừa có hiệu quả lâu dài vừa an toàn cho sức khỏe người sử dụng. Những nghiên cứu về vi khuẩn đối kháng tại Việt Nam đã được thực hiện trên các đối tượng như trên bắp cải [14], trên lúa [9]... Tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào về vi khuẩn đối kháng được thực hiện trên cây hành lá. Trên cơ sở đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn những dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên hành lá, làm cơ sở và nguồn vật liệu để thực hiện những nghiên cứu ứng dụng những dòng vi khuẩn này trong sản xuất chế phẩm phục vụ phòng trị bệnh thán thư trên cây hành lá thay cho các loại thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc hóa học hiện nay.

2. Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu

- Mẫu cây hành lá bị bệnh thán thư được thu tại ruộng hành thuộc ấp Phú Tân, xã Phú Lộc, huyện Thạnh Trị, tỉnh Sóc Trăng.

- Mẫu đất: Thu đất vùng rẫy hành lá ở ấp Phú Tân, xã Phú Lộc, huyện Thạnh Trị, tỉnh Sóc Trăng;

^(*) Trường Đại học Cần Thơ.

phường Lê Bình và phường Ba Láng, quận Cái Răng, thành phố Cần thơ.

- Các môi trường phân lập, nuôi cấy nấm, vi khuẩn và thử nghiệm khả năng đối kháng và các đặc tính đối kháng nấm của vi khuẩn.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập nấm bệnh

Cắt lá hành có vết bệnh thán thư và rửa sạch bụi bẩn dưới vòi nước. Khử trùng mẫu lá bằng cồn 70% (khoảng 1,5-2 phút). Rửa sạch lại với nước cất vô trùng khoảng 3 lần. Cho mẫu lá bệnh vào đĩa giấy cho thấm khô nước. Cắt mẫu lá khoảng 1x1 cm (vết cắt ngang qua vết bệnh) và đặt vào đĩa môi trường PDA (20% khoai tây, 2% Dextrose và 2% Agar). Ủ đĩa mẫu trong khoảng 24 - 48 giờ ở 30°C. Khi nấm xuất hiện, dùng kim cấy tách sợi nấm chuyển sang đĩa môi trường mới. Ủ đĩa nấm trong khoảng 72 giờ ở 30°C. Dùng phương pháp cấy ria để cấy truyền nấm sang đĩa môi trường PDA mới. Tiếp tục ủ đĩa trong 72 giờ ở 30°C tới khi nấm mọc. Chọn khuẩn lạc rời của nấm cấy truyền sang đĩa môi trường PDA mới. Quan sát độ thuần chủng của nấm (độ đồng nhất của hình dạng khuẩn ty và bào tử) dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 400 lần. Nấm *Collectotricum* sp. gây bệnh thán thư trên cây hành lá có các đặc điểm hình thái đặc trưng như bào tử hình liềm hoặc trụ, khuẩn ty nấm phân nhánh, có vách ngăn và dịch trong suốt [3]. Thực hiện quy trình Kock để xác định chính xác nấm bệnh.

2.2.2. Phân lập vi khuẩn đối kháng

- **Thu mẫu đất vùng rễ của cây hành lá:** Loại bỏ lớp đất mặt 2-3 cm, giữ lại lớp đất ở dưới. Ở mỗi ruộng hành, đất được thu tại 5 vị trí (4 vị trí ở 4 góc ruộng và 1 vị trí ở giữa) trộn với nhau thành 1 mẫu, hoặc theo đường thẳng thì lấy 3 vị trí (đầu, giữa và cuối) trộn thành 1 mẫu.

- **Phân lập vi khuẩn:** Trộn đều mẫu đất, nghiền nhỏ; Cân 10 g đất cho vào 90 ml nước cất vô trùng cho vào bình tam giác có dung tích 250 ml, khuấy đều trên máy khuấy từ (khoảng 30 phút). Để lắng mẫu khoảng 4 - 6 giờ rồi tiến hành pha loãng mẫu dịch đất với các nồng độ 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} . Hút 50 μ l dung dịch đã pha loãng cho vào đĩa petri có sẵn môi trường NA (Beef Extract 0,3%, Peptone 0,5% và Agar 1,5%), dùng que trải thủy tinh cấy trải mẫu. Ủ mẫu ở 30°C đến khi xuất hiện khuẩn

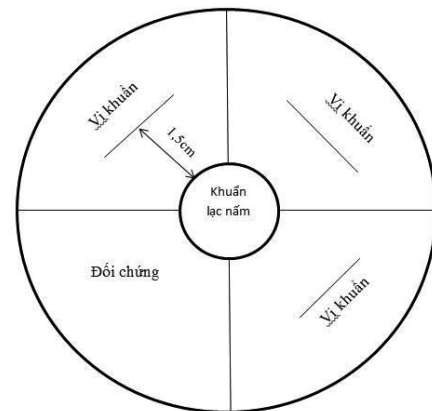
lạc (khoảng 24 giờ sau khi cấy), chọn những khuẩn lạc rời có đặc điểm khác nhau cấy truyền sang môi trường NA chứa nấm *Colletotrichum* sp. và ủ ở nhiệt độ 30°C từ 3-5 ngày. Chọn những khuẩn lạc có khả năng ngăn chặn sự phát triển của khuẩn ty nấm *Colletotrichum* sp., đây là những dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng. Tiến hành làm thuần các dòng vi khuẩn này trên môi trường NA.

2.2.3. *Khảo sát khả năng đối kháng nấm của vi khuẩn*

Tiến hành bằng phương pháp cấy kếp: nấm được cấy vào đĩa petri chứa môi trường và ủ ở nhiệt độ 30°C trong 2 ngày. Sau 2 ngày, tiến hành cấy vi khuẩn lên bề mặt đĩa nấm đã ủ (sơ đồ Hình 1), chia đĩa làm 4 phần, dùng que cấy cấy vi khuẩn lên 3 điểm (1 điểm không cấy vi khuẩn dùng làm đối chứng) trên đĩa cách bìa sợi nấm 1,5 cm. Sau 5 ngày quan sát sự hình thành vùng kháng nấm và tính hiệu suất ức chế sự phát triển của nấm bởi vi khuẩn được tính theo công thức [8]:

$$I = \frac{R - r}{R} \times 100$$

(*I*: hiệu suất đối kháng của vi khuẩn; *R*: bán kính của hệ sợi nấm đối chứng (cm); *r*: bán kính của hệ sợi nấm trên đĩa có chủng vi khuẩn (cm)).



Hình 1. Sơ đồ thử khả năng đối kháng nấm của vi khuẩn

2.2.4. Khảo sát các đặc tính đối kháng

Khả năng sản sinh siderophore: Được xác định dựa theo phương pháp do Schwyn và Neilands (1987) [12] mô tả. Các dòng vi khuẩn sẽ được nuôi cấy trên môi trường CAS-blue agar. Sau thời gian 3 ngày tiến hành đo đường kính vòng halo màu vàng xung quanh khuẩn lạc để đánh giá khả năng sản sinh siderophore của vi khuẩn. Công thức tính

khả năng sản sinh siderophore: (Đường kính vòng halo - Đường kính khuẩn lạc).

Xác định khả năng phân hủy chitin: Thực hiện trên môi trường YEG (4 g Yeast extract, 20 g Glucose, 20 g Agar) bổ sung 1% dịch huyền phù chitin. Ủ 3 ngày ở nhiệt độ 30°C. Xác định khả năng phân giải chitin của vi khuẩn bằng cách nhuộm với dung dịch Lugol. Vi khuẩn phân giải chitin sẽ tạo vòng halo không bắt màu xung quanh khuẩn lạc, đo đường kính vòng halo để xác định khả năng phân hủy chitin trong môi trường. Công thức tính khả năng phân hủy chitin: (Đường kính vòng halo - Đường kính khuẩn lạc).

Xác định khả năng phân hủy cellulose: Thí nghiệm được thực hiện trên môi trường CMC agar (10 g CMC; 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1 g K_2HPO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,001 g NaCl; 15 g Agar). Vi khuẩn phân giải CMC sẽ tạo vòng halo không màu xung quanh khuẩn lạc sau khi nhuộm với dung dịch Congo Red 0,1% và rửa lại bằng NaCl 1 M [13]. Công thức tính khả năng phân hủy cellulose: (Đường kính vòng halo - Đường kính khuẩn lạc).

Xác định khả năng phân hủy protein: Thí nghiệm được thực hiện trên môi trường SMA (Skim Milk Agar) được bổ sung 2% agar [10]. Xác định khả năng phân giải protein của vi khuẩn bằng cách dùng thước đo đường kính vòng halo phân giải protein. Công thức tính khả năng phân hủy protein: (Đường kính vòng halo - Đường kính khuẩn lạc).

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

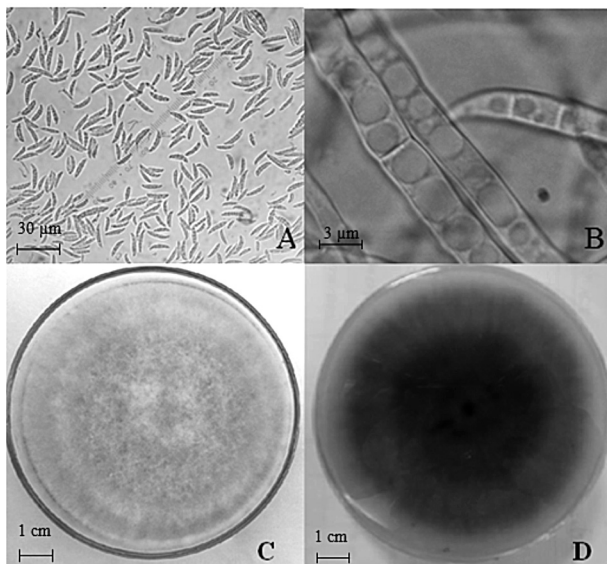
Dùng phần mềm Microsoft Excel để nhập và xử lý số liệu; phần mềm Minitab để phân tích thống kê ANOVA.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả phân lập nấm gây bệnh

Từ mẫu hành lá bị bệnh thán thư được thu tại huyện Thạnh Trị, tỉnh Sóc Trăng đã phân lập được nấm *Colletotrichum* sp.. Bào tử của nấm bệnh có dạng hình lưới liềm, kích thước 2,5-3 × 16-20 (μm). Khuẩn ty nấm có vách ngăn ngang, phân nhánh và có giọt dầu bên trong khuẩn ty. Hệ sợi nấm dạng len, có dạng bìa sợi, 4 vòng tròn đồng tâm, mặt dưới khuẩn lạc nấm ban đầu có màu hồng nhạt sau đó chuyển

dần sang nâu (Hình 2). Độ cao của hệ sợi nấm là 0,3 cm. Vào ngày thứ hai sau khi cấy, hệ sợi nấm có đường kính 3 cm. Sau khi tiến hành chủng bệnh nhân tạo vào cây hành lá theo quy trình Koch, cho thấy có xuất hiện vết bệnh vào ngày thứ 3 sau khi chủng. Sau 10 ngày chủng bệnh lá hành bị héo vàng và chết. Vết bệnh do nấm gây ra có biểu hiện đặc trưng của bệnh thán thư. Điều đó chứng tỏ nấm *Colletotrichum* sp. đã phân lập được có khả năng gây bệnh trên cây hành lá.



Hình 2. Đặc điểm của nấm *Colletotrichum* sp. (A: Bào tử, B: Khuẩn ty, C: Khuẩn lạc mặt trên, D: Khuẩn lạc mặt dưới)

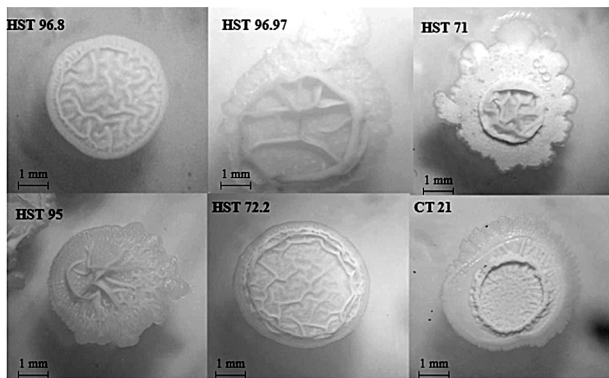
3.2. Kết quả phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng đối kháng nấm

Từ 9 mẫu đất vùng rễ hành lá thu được ở tỉnh Sóc Trăng và thành phố Cần Thơ, chọn ra 147 dòng vi khuẩn có đặc điểm khác nhau để khảo sát khả năng đối kháng sơ bộ, kết quả đã tuyển chọn được 55 dòng vi khuẩn thể hiện khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. (Bảng 1).

Bảng 1. Thống kê số mẫu và số dòng vi khuẩn phân lập được từ đất vùng rễ hành lá

STT	Địa điểm	Số mẫu	Số dòng vi khuẩn đã được chọn để khảo sát sơ bộ	Số dòng vi khuẩn đối kháng nấm <i>Colletotrichum</i> sp.
1	Huyện Thạnh Trị, tỉnh Sóc Trăng	7	120	47
2	Quận Cái Răng, thành phố Cần Thơ	2	27	8
	Tổng	9	147	55

Trong số 147 dòng vi khuẩn đã chọn để khảo sát sơ bộ khả năng đối kháng, tuyển chọn được 55 dòng vi khuẩn thể hiện khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. (chiếm 36,84%). Trong đó hầu hết là các dòng vi khuẩn được phân lập từ tinh Sóc Trăng (85,71%). Một phần nguyên nhân đến từ số lượng mẫu từ tinh Sóc Trăng chiếm đa số (77,78%). Tuy nhiên nguyên nhân chính là do Sóc Trăng là vùng chuyên canh trồng hành lá lâu đời nên có thể đã xuất hiện số dòng vi khuẩn đối kháng nhiều hơn so với các vùng khác.



Hình 3. Hình dạng khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng nấm *Colletotrichum* sp.

Trong số 55 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng nấm có 26 dòng vi khuẩn có bề mặt khuẩn lạc dạng khô, nhăn (chiếm 46,43%), 14 dòng có bề mặt khuẩn lạc khô (chiếm 25%). Hình dạng khuẩn lạc không đều chiếm 51,79% (29 dòng), dạng bìa nguyên, gợn sóng hoặc chia thùy. Màu sắc đa số là màu trắng (73,21%) (Hình 3). Hình dạng tế bào dạng hình que có 48 dòng (chiếm 85,71%), hầu hết các dòng có dạng liên kết đơn (chiếm 96,43%).

3.3. Kết quả khảo sát khả năng đối kháng nấm *Colletotrichum* sp. của các dòng vi khuẩn phân lập được

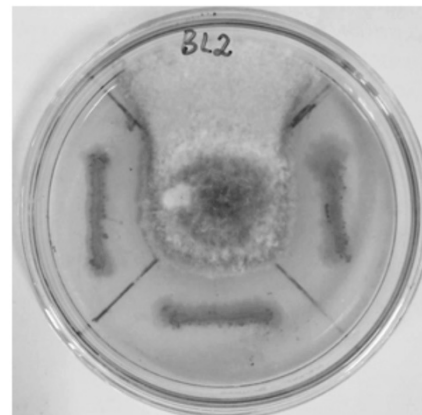
Tại thời điểm 3 ngày sau khi cấy vi khuẩn lên đĩa nấm đã có 55 dòng vi khuẩn thể hiện khả năng đối kháng nấm (Bảng 2, Hình 4), trong đó chỉ có 16 dòng vi khuẩn cho hiệu suất đối kháng từ 40% trở lên (chiếm 28,57%). Tới thời điểm 5 ngày sau khi cấy vi khuẩn, số dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng giảm xuống còn 43 dòng, tuy nhiên ở thời điểm này số dòng vi khuẩn đạt hiệu suất đối kháng trên 40% lại tăng lên 26 dòng (chiếm 46,43%). Số lượng dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng giảm xuống còn 41 sau 7 ngày cấy vi khuẩn và số dòng

đạt hiệu suất từ 40% trở lên cũng giảm còn 19 dòng (chiếm 33,93%). Cũng ở thời điểm 7 ngày sau cấy thì hiệu suất đối kháng của các dòng vi khuẩn có xu hướng giảm so với ở thời điểm 5 ngày theo dõi. Do đó, trong phạm vi nghiên cứu với nấm bệnh này, thời điểm 5 ngày sau khi cấy vi khuẩn là thời điểm tốt nhất để ghi nhận khả năng đối kháng của vi khuẩn vùng rễ đối với nấm *Colletotrichum* sp.

Ngoài ra, theo ghi nhận thì những dòng vi khuẩn chỉ thể hiện khả năng đối kháng ở thời điểm 3 ngày sau khi cấy đều là những dòng có hiệu suất đối kháng rất thấp (từ 8% đến dưới 35%). Những dòng này không còn khả năng đối kháng ở thời điểm 5 ngày và 7 ngày sau khi cấy vi khuẩn.

Bảng 2. Số lượng dòng vi khuẩn và hiệu suất đối kháng theo thời gian

	Thời gian theo dõi		
	3 ngày sau cấy	5 ngày sau cấy	7 ngày sau cấy
Số dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng	55	43	41
Số dòng vi khuẩn đạt hiệu suất đối kháng trên 40%	16	26	19



Hình 4. Khả năng đối kháng nấm của dòng vi khuẩn BL2 sau 20 ngày cấy

Hầu hết các dòng có khả năng đối kháng mạnh với hiệu suất đối kháng trên 50% (tại thời điểm 5 ngày sau khi cấy) đều giữ được khả năng đối kháng ở thời điểm 7 ngày sau khi cấy. Tiếp tục khảo sát khả năng đối kháng của 5 dòng vi khuẩn cho hiệu suất đối kháng mạnh nhất ở thời điểm 20 ngày sau khi cấy cho thấy hiệu suất đối kháng vẫn còn được

duy trì. Điều này có ý nghĩa rất quan trọng trong việc ứng dụng các dòng vi khuẩn này vào thực tế sản xuất chế phẩm vi sinh.

3.4. Kết quả khảo sát các đặc tính đối kháng

Trong 55 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng nấm bệnh được khảo sát, có 47 dòng vi khuẩn thể hiện khả năng phân hủy cellulose (chiếm 83,92%) (Hình 5B). Nghiên cứu của Lê Thị Huyền Trang và Nguyễn Thị Liên (2013) về vi khuẩn vùng rễ lúa có khả năng đối kháng với nấm *Pyricularia oryzae* cho kết quả thấp hơn với khả năng phân hủy cellulose từ 0,47-1,12 cm [4]. Một số nghiên cứu đều cho thấy hầu hết các dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm bệnh đều tiết ra enzyme cellulase. Điều này cho thấy enzyme cellulase đóng một vai trò nhất định trong các chất đối kháng do các vi khuẩn vùng rễ tiết ra.

Trong 55 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng nấm bệnh được khảo sát, 44 dòng vi khuẩn thể hiện khả năng phân hủy chitin (chiếm 78,57%) (Hình 5C). Nghiên cứu của Ashwini và Srividya cũng cho thấy chitinase từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* có thể hạn chế 57% sự phát triển của nấm *Colletotrichum gloeosporioides* [1]. Điều đó cho thấy enzyme chitinase là một enzyme quan trọng do vi khuẩn tiết ra để ức chế sự phát triển của nấm bệnh nói chung và nấm *Colletotrichum* sp. nói riêng.

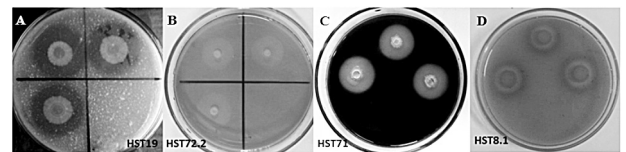
Kết quả khảo sát cho thấy có 50 dòng vi khuẩn sản sinh ra enzyme protease (chiếm 89,29%) (Hình 5A). Khả năng phân hủy protein của các dòng vi khuẩn dao động từ 0,16-2,3 cm. Kết quả này thấp hơn so với kết quả nghiên cứu của Lê Thị Huyền Trang và Nguyễn Thị Liên (2013) [15] về vi khuẩn vùng rễ lúa đối kháng nấm *Pyricularia oryzae* với khả năng phân hủy protein của các dòng vi khuẩn phân lập được là 0,77-2,63 cm. Điều đó cho thấy tuy các dòng vi khuẩn đối kháng với các nấm bệnh khác nhau nhưng đều sản sinh enzyme protease như là một enzyme quan trọng trong cơ chế đối kháng.

Số dòng vi khuẩn thể hiện khả năng sản sinh siderophore là 41 (chiếm 73,21%) (Bảng 3) và dao động từ 0,1-1,7 cm. Khả năng sản sinh siderophore thể hiện khả năng hấp thụ ion Fe^{3+} vốn cần thiết cho quá trình phát triển của tất cả các sinh vật nhưng lại rất thiếu trong môi trường. Siderophore không những cạnh tranh sắt với nấm bệnh mà còn có khả năng tập trung sắt ở vùng rễ, từ đó kích thích cây

trồng tăng trưởng, tăng sức sống cho cây (Hình 5D). Hầu hết các dòng vi khuẩn đạt hiệu suất đối kháng trên 30% đều có thể sản sinh ra siderophore. Theo nghiên cứu của Santos-Villalobos và cộng sự (2012), vi khuẩn *Burkholderia cepacia* XXVI chỉ có một cơ chế đối kháng là siderophore đã đạt hiệu suất đối kháng 94,9% với nấm *Colletotrichum gloeosporioides* trên đĩa thạch [11]. Thí nghiệm của Viswanathan và Samiyappan cũng cho kết quả tương tự với vi khuẩn *Pseudomonas* tiết siderophore cho hiệu suất đối kháng 72,1% trên đĩa thạch với nấm *Colletotrichum falcatum* [16]. Điều đó cho thấy rằng siderophore là một cơ chế đối kháng quan trọng và có hiệu quả đối kháng cao.

Bảng 3. Tổng hợp các đặc tính đối kháng của các dòng vi khuẩn

	Các đặc tính đối kháng			
	Khả năng phân hủy cellulose	Khả năng phân hủy chitin	Khả năng phân hủy protein	Khả năng sản sinh siderophore
Số lượng dòng vi khuẩn	47	44	50	41



Hình 5. Kết quả khảo sát các đặc tính đối kháng của các dòng vi khuẩn

(A: Khả năng phân hủy protein của dòng HST19; B: Khả năng phân hủy cellulose của dòng HST72.2; C: Khả năng phân hủy chitin của dòng HST71; D: Khả năng sản sinh siderophore của dòng HST8.1)

Năm dòng HST96.6, BL2, HST1, HST11, CT9 có hiệu suất đối kháng nấm *Colletotrichum* sp. cao nhất. Cả 5 dòng vi khuẩn này đều có đầy đủ bốn cơ chế đối kháng là tiết ra các enzyme protease, cellulase, chitinase và có khả năng sản sinh siderophore (Bảng 4). Mặc dù siderophore đóng vai trò quyết định, tuy nhiên các enzyme protease, cellulase, chitinase cũng có một vai trò không nhỏ. Các nghiên cứu đều cho thấy các dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng nấm bệnh cao nhất đều có bốn cơ chế đối kháng bằng các chất tiết protease,

cellulase, chitinase, siderophore. Ngoài ra, kết quả cho thấy: việc kết hợp giữa các đặc tính đối kháng lại với nhau cho thấy hiệu quả ức chế nấm bệnh hơn hẳn một đặc tính đối kháng riêng lẻ. Nghiên cứu của Han và cộng sự (2015) cũng cho rằng sự kết hợp của chitinase, protease, siderophore và khả năng hòa

tan lân đã tạo nên tính đối kháng cao của các dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. đối với nấm *Colletotrichum acutatum* và nấm *Colletotrichum gloeosporioides* [5]. Bằng việc kết hợp cả bốn đặc tính đối kháng này các dòng vi khuẩn đã ngăn chặn và ức chế nấm bệnh một cách hiệu quả nhất.

Bảng 4. Tổng hợp đặc tính của 5 dòng vi khuẩn đối kháng mạnh nhất

Dòng vi khuẩn	Hiệu suất đối kháng (%)	Các đặc tính đối kháng				Số đặc tính đối kháng
		Khả năng phân hủy cellulose (cm)	Khả năng phân hủy chitin (cm)	Khả năng phân hủy protein (cm)	Khả năng sản sinh siderophore (cm)	
BL2	56,06	0,8	1,47	0,53	2,27	4
CT9	55,81	0,63	1,73	0,70	1,73	4
HST1	54,81	0,93	1,40	0,43	1,57	4
HST11	55,56	1,63	1,73	1,77	1,47	4
HST96.6	58,52	1,16	1,37	1,30	1,87	4

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 55 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên cây hành lá. Khảo sát các đặc tính đối kháng cho thấy: 50/55 dòng có khả năng sản sinh enzyme protease, 47/55 dòng có khả năng sinh enzyme

cellulase, 44/55 dòng vi khuẩn có thể tổng hợp enzyme chitinase và 41/55 dòng vi khuẩn có khả năng sản sinh ra siderophore. Các dòng vi khuẩn có hiệu suất đối kháng nấm bệnh mạnh nhất là HST96.6 (58,52%), BL2 (56,06%), HST11 (55,56%), HST1 (54,81%), CT9 (55,81%) đều có đầy đủ bốn đặc tính đối kháng./.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Ashwini, N. and Srividya, S. (2014), "Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1", *3 Biotechnology*, 4 (2), p. 127-136.
- [2]. Nguyễn Mạnh Chinh và Nguyễn Đăng Nghĩa (2007), *Trồng - chăm sóc và phòng trừ sâu bệnh ở rau gia vị*, NXB Nông nghiệp.
- [3]. Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Văn Thành (2008), *Giáo trình Nấm học*, NXB Đại học Cần Thơ.
- [4]. Trần Văn Hai, Trần Thị Ba, Nguyễn Lê Quỳnh Thiện và Võ Thị Bích Thủy (2005), *Rau ăn toàn: kỹ thuật trồng, sâu bệnh hại và biện pháp phòng trị*, NXB Trường Đại học Cần Thơ.
- [5]. Han, J. H., Shim, H., Shin, J. H. and Kim, K. S. (2015), "Antagonistic activities of *Bacillus* sp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* in south Korea", *Plant Pathology*, 31 (2), p. 165-175.
- [6]. Kiehr, M., Delhey, R. and Azpilicueta, A. (2012), "Smudge and other diseases of onion caused by *Colletotrichum circinans* in southern Argentina", *Phyton*, 81 (2), p. 161-164.
- [7]. Kim, W. G., Hong, S. K. and Kim, J. H. (2008), "Occurrence of anthracnose on welsh onion caused by *Colletotrichum circinans*", *Mycobiology*, 36 (4), p. 274-276.
- [8]. Lamsal, K., S. W. Kim, Y. S. Kim and Y. S. Lee (2012), "Application of rhizobacteria for plant growth promotion effect and biocontrol of anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* on pepper", *Mycobiology*, 40 (4), p. 244-251.
- [9]. Nguyễn Thị Thu Nga và Phạm Văn Kim (2003), "Khảo sát khả năng đối kháng của vi khuẩn *Burkholderia cepacia* TG17 đối với nấm *Rhizoctonia solani* gây bệnh đốm vằn trên lúa", *Kỷ yếu Hội thảo quốc gia bệnh hại thực vật*, tr. 136-153.

- [10]. Priest, F. G. (1993), *Systematics and Ecology of Bacillus*, In Sonenshein A, Hoch J, Losick R (ed), *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria*, ASM Press, Washington, DC, p. 3-16.
- [11]. Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, G .C., Miranda-Salcedo, M. A., and Peña-Cabriales, J. J. (2012), “*Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28 (8), p. 2615-2623.
- [12]. Schwyn, B. and Neilands, J. B. (1987), “Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores”, *Analytical biochemistry*, 160 (1), p. 47-56.
- [13]. Teather, R. M. and Wood, P. J. (1982), “Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen”, *Appl. Environ. Microbiol.*, (43), p. 777-780.
- [14]. Phạm Thị Thắm, Mai Phương Như và Nguyễn Thị Thu Nga (2012), “Khả năng gây hại của các chủng *Erwinia caratovora* trên bắp cải và bước đầu sử dụng vi khuẩn vùng rễ để phòng trị bệnh”, *Kỹ yếu Hội thảo quốc gia bệnh hại thực vật*, tr. 88-97.
- [15]. Lê Thị Huyền Trang và Nguyễn Thị Liên (2013), “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* từ vùng đất rễ lúa có khả năng đối kháng với *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa”, *Kỹ yếu Hội thảo Công nghệ sinh học vùng Đồng bằng sông Cửu Long 2013*, tr. 367-373.
- [16]. Viswanathan, R. and Samiyappan, R. (2007), “Siderophores and iron nutrition on the *pseudomonas* mediated antagonism against *Colletotrichum falcatum* in sugarcane”, *Sugar Tech*, 9 (1), p. 57-60.

**ISOLATING AND SELECTING ANTAGONISTIC BACTERIA
FROM RHIZOSPHERE SOIL AGAINST *Colletotrichum* sp.
CAUSING ANTHRACNOSE IN ONIONS**

Summary

This study was conducted to isolate and select bacterial strains ably antagonistic to *Colletotrichum* sp. causing anthracnose in onions. From rhizosphere soil samples collected in Soc Trang province and Can Tho city, 55 bacteria strains are found ably antagonistic to *Colletotrichum* sp. causing anthracnose on onions. The 5 antagonistically-strongest strains all have four antagonistic strategies, and are promising for use to treat anthracnose in onions.

Key words: *Colletotrichum* sp., onion, isolate, anthracnose, antagonistic bacteria.

Ngày nhận bài: 08/12/2016; Ngày nhận lại: 15/3/2017; Ngày duyệt đăng: 25/4/2017.