

TUYỂN CHỌN CHỦNG VI SINH VẬT ĐỐI KHÁNG VI KHUẨN VÀ NẤM GÂY BỆNH ĐỐM LÁ TRÊN CÂY HOA HỒNG

Hoa Thị Minh Tú¹, Đặng Thị Thùy Dương¹, Trịnh Thị Hoa¹,
Bạch Thị Mai Hoa^{1,2}, Phạm Thanh Huyền¹, Lê Thị Minh Thành^{1,2},
Hồ Tuyên^{1,2}, Nguyễn Phương Nhuệ^{1,2}

TÓM TẮT

Mục đích nghiên cứu này là tuyển chọn các chủng vi sinh vật đối kháng mạnh với tác nhân gây bệnh đốm lá trên cây hoa hồng. Từ bộ sưu tập 183 chủng vi sinh vật, 3 chủng đối kháng mạnh nhất được xác định gồm BST, HD-V22, HD-N12 với đường kính vòng đối kháng chủng kiểm định *Pseudomonas* sp. HDB-V11 lần lượt là 17,4; 17,9 và 18,1 mm và hiệu lực đối kháng chủng kiểm định *Colletotrichum* sp. HDT-N28 lần lượt là 79,6; 77,7 và 75,85%. Ba chủng này không đối kháng lẫn nhau và có tiềm năng ứng dụng cao. Dựa trên đặc điểm hình thái và phân tích trình tự gen 16S rDNA và ITS, 2 chủng vi khuẩn HD-V22 và BTS và chủng vi nấm HD-N12 lần lượt được định danh là *Pseudomonas fluorescens* HD-V22, *Bacillus subtilis* BST và *Metarhizium anisopliae* HD-N12. Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học để tạo chế phẩm vi sinh vật đối kháng ứng dụng kiểm soát sinh học hiệu quả bệnh trên cây hoa hồng.

Từ khóa: *Colletotrichum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Metarhizium*, đốm lá hoa hồng, đối kháng

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoa hồng (*Rosa* sp.) là loại cây vườn phổ biến nhất trên thế giới với giá trị ước tính của thị trường hoa hồng trên thế giới là 11,7 tỷ đô la mỗi năm (Debener and Byrne, 2014). Theo số liệu điều tra năm 2020, Việt Nam có khoảng 45.000 hecta hoa, cây cảnh, trong đó hoa hồng chiếm tỉ lệ 15% hoa cung cấp ra thị trường (Đặng Văn Đông và Nguyễn Văn Tĩnh, 2020).

Cây hoa hồng thường dễ bị tổn thương bởi nhiều tác nhân gây bệnh như nấm, vi khuẩn, vi rút, tuyến trùng (Gudin, 2000). Các tác nhân này gây ra một số loại bệnh trên cây như đốm lá, gỉ sắt, đốm đen, phấn trắng... Bệnh đốm lá do vi khuẩn *Xanthomonas* sp., *Pseudomonas syringae* hoặc nấm *Cercospora puderi* Davis, *Alternaria alternate*, *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butl Bisby. gây ra. Bệnh gây hại chủ yếu trên lá hồng, từ lá non đến lá trưởng thành, vết bệnh ban đầu chỉ là một vết nhỏ, màu nâu nhạt, sau đó vết bệnh phát triển theo các gân lá thành dạng đốm có góc cạnh (Nguyễn Kim Vân, 2006). Mầm bệnh làm giảm sự phát triển, gây chết hoặc giảm giá trị thẩm mỹ của cây, dẫn đến thiệt hại lớn về kinh tế. Cho đến nay, tại Việt Nam chưa có thuốc đặc trị bệnh đốm lá hoa hồng mà chỉ có thể hạn chế bệnh bằng cách cắt tỉa cành, tiêu hủy cây bệnh, kết hợp với các loại thuốc bảo vệ thực vật hóa học như Amistar

Top 325C, Anvil 250SC, Marshal... Đây chỉ là giải pháp tình thế và giảm thiểu chứ không trị triệt để bệnh. Để quản lý hiệu quả bệnh đốm lá theo hướng an toàn, bền vững với môi trường và sức khỏe con người thì lựa chọn tốt nhất là áp dụng biện pháp sinh học, dùng vi sinh vật để phòng ngừa và kiểm soát mầm bệnh.

Trong tự nhiên có nhiều nhóm vi sinh vật (VSV) đối kháng với các tác nhân gây bệnh trên các cây trồng khác nhau, gồm vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm mốc, trong đó nhiều nghiên cứu cho thấy các chi *Bacillus* và *Pseudomonas*, vi nấm có hiệu quả đáng kể trong phòng trừ bệnh đốm lá. Các VSV đối kháng chủng gây bệnh cây trồng nhờ khả năng sinh tổng hợp một số chất như siderophore, enzyme, kháng sinh... (Han et al., 2015). Ở Việt Nam có rất ít nghiên cứu về VSV đối kháng bệnh hoa hồng. Do vậy, chúng tôi tiến hành sàng lọc VSV bản địa từ các vùng đất trồng cây hoa hồng kết hợp với một số chủng tiềm năng có sẵn trong phòng thí nghiệm, tuyển chọn chủng đối kháng với các chủng gây bệnh đốm lá phân lập từ cây hoa hồng bị bệnh. Kết quả này nhằm định hướng tạo chế phẩm VSV đối kháng kiểm soát hiệu quả bệnh đốm lá cây hoa hồng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

¹ Viện Công nghệ sinh học (IBT), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST)

² Học viện Khoa học và Công nghệ (GUST), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

*Tác giả chính: E-mail: npnhue@ibt.ac.vn

Vi sinh vật sử dụng trong nghiên cứu gồm 126 chủng phân lập từ mẫu đất thu thập ở các vùng trồng hoa hồng tại Hà Nội, và 57 chủng từ bộ sưu tập giống VSV của phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chủng kiểm định gồm vi khuẩn *Pseudomonas* sp. HDB-V11 và nấm *Colletotrichum* sp. HDT-N28 gây bệnh đốm lá được phân lập từ cây hoa hồng bệnh, thuộc đề tài mã số: 01C-05/06-2019-3 cấp Sở Khoa học và Công nghệ Hà Nội. Xác định đặc điểm sinh học và giải trình tự gen 16S rRNA (với vi khuẩn) và ITS (với nấm) để định danh. Tiến hành lây nhiễm lại trên cây hoa hồng khỏe mạnh, cho thấy chủng HDB-V11 và HDT-N28 gây ra một số triệu chứng như trên lá xuất hiện những chấm nhỏ có màu nâu, về sau lan rộng có màu nâu nhạt, nhiều vết bệnh tập hợp lại thành mảng phủ đầy trên mặt lá làm cho lá bị khô, cây kém phát triển hơn cây đối chứng. Các dấu hiệu này tương đồng với triệu chứng bệnh đốm lá từ các mẫu thu thập và quan sát được trên đồng ruộng nơi thu thập mẫu bệnh, đồng thời giống với mô tả về bệnh đốm lá do vi khuẩn và nấm *Colletotrichum* ở cây hoa hồng trong các tài liệu đã công bố.

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn LB (g/L): Pepton 5; Caomen 5; NaCl 3; agar 20, nước cất 1 L; pH 6,5 - 7. Môi trường nuôi cấy nấm mốc Czapek (g/L): K_2HPO_4 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1; $NaNO_3$ 2,0; KCl 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1; pectin 5,0; agar 20; nước cất 1 L, pH 6,5.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tuyển chọn sơ bộ vi sinh vật đối kháng

Các chủng vi khuẩn nghiên cứu được nuôi trong môi trường LB trong 24 giờ và nấm trong Czapek trong 48 giờ. Nhỏ 100 μ L dịch nuôi cấy đã loại tế bào vào lỗ thạch trong các đĩa petri chủng vi sinh vật kiểm định đã chuẩn bị sẵn. Nuôi các đĩa ở 37°C trong 24 giờ với vi khuẩn, ở 30°C trong 72 giờ với nấm. Khả năng đối kháng được xác định thông qua đường kính vòng đối kháng (ĐKVĐK). $\text{ĐKVĐK (mm)} = D - d$, trong đó: D là đường kính vòng đối kháng và d là đường kính lỗ thạch.

2.2.2. Đánh giá hoạt lực đối kháng

Cấy chủng nấm kiểm định vào giữa đĩa petri chứa môi trường Czapek, cấy chủng VSV đối kháng vào 3 điểm cách đều nhau trên đĩa petri và nuôi ở 30°C để VSV phát triển. Đo ĐKVĐK và tính

hiệu lực đối kháng (%). Đối chứng là đĩa chỉ cấy vi sinh vật kiểm định. Hiệu lực đối kháng (%) = $[(Dc - Dt)/Dc] \times 100$, trong đó: Dc : đường kính khuẩn lạc VSV gây bệnh ở mẫu đối chứng; Dt : đường kính khuẩn lạc VSV gây bệnh ở mẫu thí nghiệm.

2.2.3. Đánh giá hoạt tính đối kháng lẫn nhau

Các chủng tiềm năng được thử hoạt tính đối kháng lẫn nhau bằng phương pháp cấy vạch cắt nhau trên cùng một đĩa môi trường thạch, nuôi ở 30°C trong 48 giờ (Johnson *et al.*, 1959).

2.2.4. Định danh vi sinh vật theo phương pháp truyền thống

Chủng vi khuẩn được nuôi trên môi trường LB ở 30°C trong 24 giờ và xác định đặc điểm sinh lý, sinh hóa và quan sát đặc điểm hình thái theo sổ tay phân loại của Bergey (1989) (được trích dẫn trong Holt and Williams, 1989). Đặc điểm hình thái của chủng nấm mốc, bao gồm: màu sắc của khuẩn ty khí sinh, khuẩn ty cơ chất, đặc điểm bào tử, hình thái hệ sợi, chuỗi giá bào tử được quan sát dưới kính hiển vi sau 7 ngày nuôi trên môi trường Czapek ở 30°C theo phương pháp của Bùi Xuân Đồng (1986).

2.2.5. Định danh vi sinh vật theo phương pháp sinh học phân tử

Chủng vi nấm được nuôi cấy trong môi trường Czapek, lắc 200 vòng/phút ở 30°C, trong 72 giờ, ly tâm thu sinh khối. DNA tổng số được tách bằng kit Zymo Reseach (Mỹ). Chủng vi khuẩn được nuôi trong 50 ml môi trường LB, lắc 200 vòng/phút trong 14 giờ, ly tâm thu sinh khối. DNA của vi khuẩn được tách bằng kit ThermoFisher. Cặp mồi ITS1/ITS4 dùng trong phân loại nấm mốc; 27F/1492R dùng trong phân loại vi khuẩn. Trình tự gen 16S rDNA, ITS được phân tích tự động bằng máy đọc trình tự gen PRISM@3700 Genetic Analyzer (Thermo Fihser Scientific, Hoa Kỳ), phân tích bằng phần mềm BioEdit, so sánh với dữ liệu trên NCBI bằng chương trình BLAST. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA X.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 11 năm 2019 đến tháng 03 năm 2020 tại Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, số 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tuyển chọn các chủng vi sinh vật đối kháng vi sinh vật gây bệnh đốm lá trên cây hoa hồng

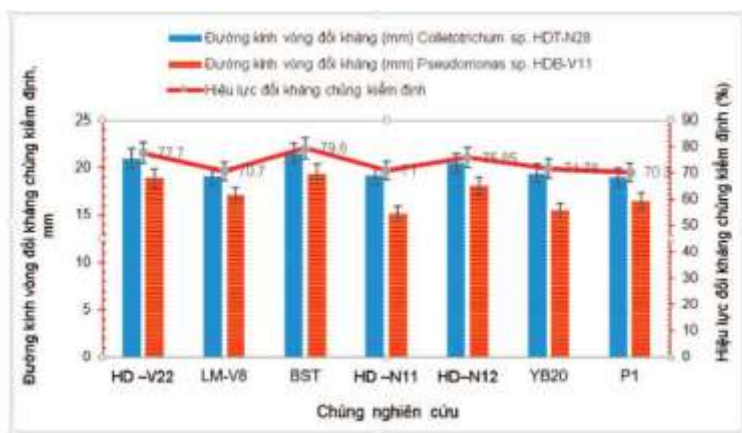
Từ 183 chủng VSV, sàng lọc khả năng đối kháng với hai chủng kiểm định *Pseudomonas* sp. HDB-V11 và *Colletotrichum* sp. HDT-N28 gây bệnh đốm lá hoa hồng. Kết quả chỉ ra 106/183 chủng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. HDT-N28. Trong đó có 13/183 chủng (chiếm 7,1%) đối kháng mạnh với ĐKVĐK trên 15 mm và có 93/183 chủng (chiếm 50,82%) có ĐKVĐK dao động trong khoảng từ 10 đến 15 mm. Tương tự với chủng kiểm định *Pseudomonas* sp. HDB-V11, đã có 91/183 chủng có khả năng kháng, trong đó có 16/183 chủng (chiếm

8,74%) đối kháng mạnh với ĐKVĐK trên 15mm và 75/183 chủng (chiếm 40,98%) có ĐKVĐK từ 10 đến 15mm (Bảng 1).

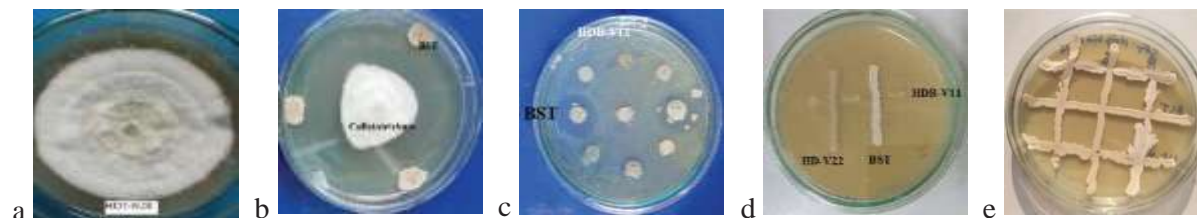
Các chủng có khả năng đối kháng mạnh với hai chủng kiểm định có ĐKVĐK trên 15 mm được tiếp tục nghiên cứu. Trong đó, đã xác định được 29 chủng bao gồm 13 chủng kháng mạnh với *Colletotrichum* sp. HDT-N28 và 16 chủng với *Pseudomonas* sp. HDB-V11. Đáng chú ý, đã tuyển chọn được 7/29 chủng VSV có khả năng kháng mạnh với cả 2 chủng kiểm định, ĐKVĐK từ 15,5 đến 20 mm, gồm 3 chủng vi khuẩn HD-V22, BST, LM-V8 và 4 chủng nấm HD-N11, HD-N12, YB20, P1 (Hình 1).

Bảng 1. Kết quả tuyển chọn chủng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. HDT-N28 và vi khuẩn *Pseudomonas* sp. HDB-V11 gây bệnh đốm lá hoa hồng

Đường kính vòng đối kháng (ĐKVĐK, mm)	<i>Colletotrichum</i> sp. HDT-N28		<i>Pseudomonas</i> sp. HDB-V11	
	Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)
≥ 15 mm	13	7,10	16	8,74
10 - 15 mm	93	50,82	75	40,98
< 10 mm	54	29,51	60	32,79
Không đối kháng	33	18,03	32	17,49
Tổng	183	100	183	100



Hình 1. Khả năng đối kháng chủng VSV gây bệnh đốm lá hoa hồng của 7 chủng VSV tuyển chọn



Hình 2. (a,b) Khuẩn lạc chủng nấm *Colletotrichum* HDT-N28 khi mọc riêng lẻ (mẫu đối chứng) và cấy chung BST; (c,d) Chủng HD-V22 và BST đối kháng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. HDB-V11, (e) Khả năng không đối kháng lẫn nhau của 3 chủng HD-V22, BST, HD-N12.

Hiệu lực đối kháng của 7 chủng HD-V22, BST, HD-N11, HD-N12, YB20 và P1 với chủng nấm *Colletotrichum* sp. HDT-N28 dao động trong khoảng 70,43% đến 75,1%. Trong đó, 3 chủng HD-V22, BST, HD-N12 có hiệu quả kháng nấm cao nhất với tỷ lệ lần lượt đạt 77,7; 79,6 và 75,85% sau 7 ngày thử nghiệm (Hình 1 và Hình 2a, 2b, 2c). Kết quả trong nghiên cứu này tương đồng với một số công bố trong và ngoài nước. Theo nghiên cứu của Ngullie và cộng tác viên (2010), chủng *P. fluorescens* có khả năng ức chế 67,42% sự phát triển của nấm *C. gloeosporioides* trên thực vật. Nguyễn Bá Thọ và cộng tác viên (2020) đã phân lập được chủng *B. subtilis* ĐR2B1 từ đất vườn cà phê tại Đắk-Nông đối kháng tốt với *Colletotrichum* CC1.5 gây bệnh khô cành và quả cà phê với hiệu lực đối kháng đạt 67,41% và ĐKVĐK đạt 24,67 mm sau 6 ngày nuôi trên môi trường PDA. Tương tự, Trần Thùy Trang và cộng tác viên (2020) đã sàng lọc được chủng *B. subtilis* BHCM 8.3 đối kháng mạnh với nấm *C. scovillei* gây bệnh thán thư trên cây ớt với hiệu quả đối kháng là 81,58% sau 15 ngày khảo sát. Trương Chí Hiền và Lê Thanh Toàn (2020) đã chọn được bốn chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. ức chế nấm *C. gloeosporioides* gây bệnh trên cây đậu xanh, với hiệu suất đối kháng dao động từ 48,34 - 61,77%.

Hiện nay, chưa có công trình công bố về VSV đối kháng VSV gây bệnh trên cây hoa hồng ở Việt Nam. Do vậy, những kết quả này có ý nghĩa quan trọng làm tiền đề cho nghiên cứu tạo chế phẩm VSV đối kháng VSV gây bệnh đốm lá trên hoa hồng.

3.2. Khả năng ức chế lẫn nhau của chủng tiềm năng

Từ kết quả trên, 3 chủng HD-V22, BST, HD-N12 được xác định có nhiều đặc tính quý như ức chế mạnh cả 2 chủng kiểm định, hiệu lực đối kháng nấm bệnh cao từ 75,85 đến 79,6%. Kết quả thử nghiệm khả năng ức chế lẫn nhau cho thấy, cả 3 chủng HD-V22, BST, HD-N12 không đối kháng lẫn nhau, có khả năng sinh trưởng và tồn tại tốt trong điều kiện thí nghiệm (Hình 2d), do vậy 3 chủng trên được lựa chọn để tạo thành tổ hợp tiềm năng nhằm tạo chế phẩm phòng trừ bệnh đốm lá trên hoa hồng.

3.3. Phân loại chủng có tiềm năng ứng dụng

3.3.1. Phân loại chủng vi khuẩn HD-V22 và BST

Đặc điểm hình thái: chủng HD-V22 có khuẩn lạc dạng tròn, lồi, nhày, bề mặt nhẵn, màu trắng

ngà, đường kính 0,5 - 3 mm, Gram âm, tế bào hình que, không sinh bào tử, có khả năng di động, sinh trưởng ở 25 - 35°C, tốt nhất ở 30°C, pH 6,5 - 7,0 (Hình 3b). Chủng BST là vi khuẩn Gram dương, kích thước khuẩn lạc 0,4 - 2,7 mm, khuẩn lạc tròn không đều, màu trắng kem, bề mặt hơi khô và nhẵn, mép răng cưa, tế bào hình que ngắn, sinh bào tử, có khả năng di động, sinh trưởng ở 28 - 45°C, tốt nhất ở 37°C, pH 6 - 8 (Hình 3a). So sánh với khóa phân loại của Bergey (1989) có thể phân loại sơ bộ chủng vi khuẩn HD-22 thuộc chi *Pseudomonas* và BST thuộc chi *Bacillus*.

Phân tích trình tự gen: Trình tự gen 16S rDNA được sử dụng phân loại chính xác đến loài 2 chủng nói trên. Trình tự 16S rDNA của 2 chủng vi khuẩn có kích thước khoảng 1.500 bp (Hình 4a). Kết quả phân tích trình tự gen 16S rDNA và so sánh với các trình tự đã công bố trên GenBank bằng công cụ BLAST (NCBI) cho thấy, HD-V22 có độ tương đồng 99,93% với loài *Pseudomonas fluorescens* (accession number NR 115715.1), chủng BST có độ tương đồng 99,18% với loài *Bacillus subtilis* (accession number NR117946.1). Kết hợp đặc điểm hình thái với phân tích trình tự gen 16S rDNA chỉ ra chủng HD-V22, BST lần lượt được định danh là *Pseudomonas fluorescens* HD-V22 và *Bacillus subtilis* BST. Mối quan hệ phát sinh chủng loại của 2 chủng nghiên cứu với một số đại diện được trình bày ở hình 4b.

3.3.2. Phân loại chủng vi khuẩn HD-N12

Đặc điểm hình thái: Khuẩn lạc chủng HD-N12 có kích thước 1 - 3 cm, mép trơn, hệ sợi mọc dạng mịn, ban đầu có màu trắng ngà, sau đó chuyển dần sang vàng nhạt rồi màu xanh lục. Khuẩn ty phân nhánh hoặc dạng cây, cuống sinh bào tử và bào tử xuất hiện sau 3 ngày nuôi cấy. Bào tử đính liền trên đỉnh cuống, thể bình hình trụ hoặc hình elip. Bào tử hình cầu, chuỗi dài tỏa theo các hướng (Hình 3c, 3d). Dựa vào khóa phân loại vi nấm của Bùi Xuân Đồng (1986), chủng HD-N12 thuộc chi *Metarhizium*, có thể thuộc loài *Metarhizium anisopliae*.

Phân tích trình tự gen ITS: Trình tự một phần đoạn ITS1-5,8S-ITS4 của chủng nấm HD-N12 có kích thước 500 bp (Hình 4a). Kết quả chỉ ra chủng HD-N12 có độ tương đồng cao nhất (100%) với chủng *Metarhizium anisopliae* (accession number AY 763221). Kết hợp với đặc điểm hình thái theo

khóa phân loại của Bùi Xuân Đồng (1986) (Hình 3c, 3d) có thể kết luận chủng HD-N12 thuộc

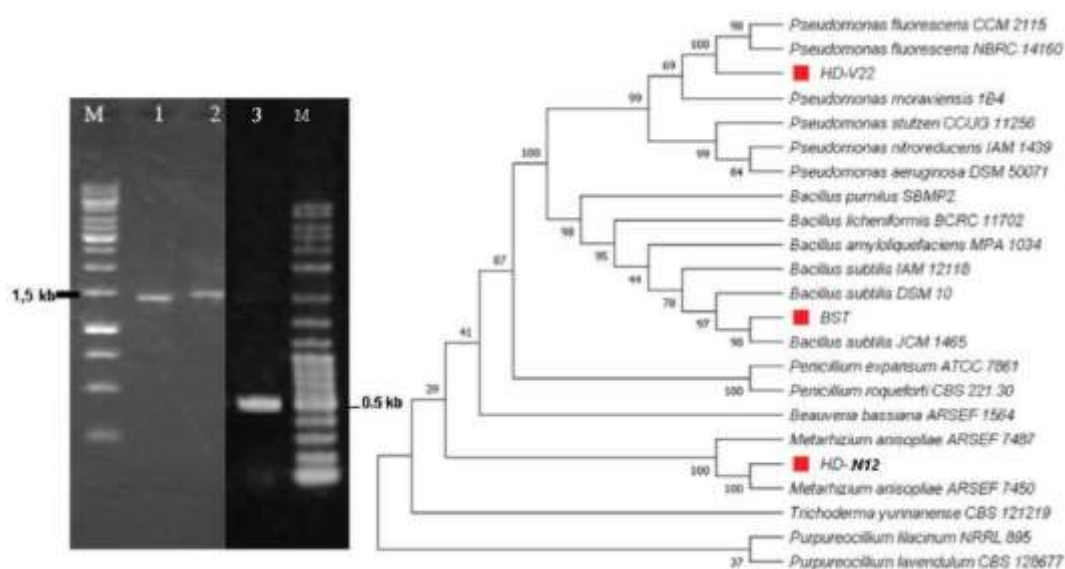
loài *Metarhizium anisopliae* và được ký hiệu là *Metarhizium anisopliae* HD-N12 (Hình 4b).



Hình 3. Khuẩn lạc của chủng (a) BST và (b) HD-V22 trên môi trường LB sau 24 giờ và (c) HD-N12 trên môi trường Czapek sau 7 ngày, (d) Hệ sợi và bào tử, cuống sinh bào tử của chủng HD-N12

Theo Ganga và cộng tác viên (2017), *M. anisopliae* ức chế sự phát triển của *C. gloeosporioides* và *P. mangiferae* gây bệnh thán thư, cháy lá trên xoài. Theo Picardal và cộng tác viên (2019), *M. anisopliae* đối kháng chủng kiểm định *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo xanh với hiệu lực đối kháng đạt 31,27%. Ở

Việt Nam đã có rất nhiều công trình nghiên cứu về nấm *M. anisopliae* có khả năng diệt nấm bệnh và côn trùng, ứng dụng phòng và trị bệnh hại một số loại cây như lúa, cà phê, ... Đây là công trình đầu tiên nghiên cứu khả năng đối kháng của nấm *M. anisopliae* với VSV gây bệnh ở hoa hồng.



Hình 4. (a): Sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8% của 3 chủng: M: Maker, 1: HD-V22; 2: BST; 3: HD-N12. (b): Cây phát sinh loài của 3 chủng: HD-V22; BST; HD-N12. Các giá trị tin cậy bootstrap được tạo bằng cách sử dụng 100 hoán vị

Theo danh mục vi sinh vật an toàn sinh học, ba chủng vi sinh vật đối kháng lựa chọn đã được phân loại đều là các chủng an toàn cấp 1 (tham khảo trong U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, and National Institutes of Health, 2009), có thể dùng cho nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh vật phòng trừ bệnh trên hoa hồng.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Từ bộ sưu tập 183 chủng VSV gồm 126 chủng phân lập từ mẫu đất thu thập từ các vùng trồng hoa hồng tại Hà Nội và 57 chủng từ Bộ sưu tập giống của phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ

Việt Nam, đã tuyển chọn được 3 chủng HD-V22, BST, HD-N12 có khả năng đối kháng mạnh với chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. HDB-V11 và chủng nấm *Colletotrichum* sp. HDT-N28 gây bệnh đốm lá cây hoa hồng, ĐKVĐK với *Pseudomonas* sp. HDB-V11 lần lượt là 17,9; 17,4 và 18,1 mm, và hiệu lực đối kháng chủng *Colletotrichum* sp. HDT-N28 lần lượt là 77,7; 79,6 và 75,85%. Dựa trên đặc điểm hình thái và phân tích trình tự gen 16S rDNA, chủng HD-22 và BST được định danh là *Pseudomonas fluorescens* HD-22 và *Bacillus subtilis* BST. Chủng nấm HD-N12 phân loại dựa trên đặc điểm hình thái và phân tích trình tự gen ITS được định danh là *Metarhizium anisopliae* HD-N12. Kết quả nghiên cứu này góp phần hữu ích định hướng ứng dụng chủng tiềm năng tạo chế phẩm vi sinh vật đối kháng để kiểm soát an toàn, hiệu quả bệnh trên cây hoa hồng.

4.2. Đề nghị

Cần tiếp tục nghiên cứu điều kiện nhân sinh khối và tạo chế phẩm vi sinh vật đối kháng từ 3 chủng tuyển chọn để ứng dụng trong kiểm soát bệnh trên cây hoa hồng.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được thực hiện thuộc đề tài “Nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh phòng trừ một số bệnh hại trên hoa lily và hoa hồng tại Hà Nội”, mã số: 01C-05/06-2019-3 cấp Sở Khoa học và Công nghệ Hà Nội, hỗ trợ máy móc thiết bị của Phòng Công nghệ lên men và Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen Quốc gia, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bùi Xuân Đồng, 1986. *Nhóm nấm Hyphomycetes ở Việt Nam*, tập 2. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

Đặng Văn Đông và Nguyễn Văn Tinh, 2020. *Rực trạng, tiềm năng và định hướng nghiên cứu, phát triển hoa cây cảnh Việt Nam*, ngày truy cập 17/8/2021. Địa chỉ: <https://hoinhap.vanhoavaphattrien.vn/thuc-trang-tiem-nang-va-dinh-huong-nghien-cuu-phat-trien-hoa-cay-can-viet-nam-a5880.html>.

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.

Nguyễn Bá Thọ, Nguyễn Thị Liên, Võ Đình Quang, 2020. Phân lập một số chủng *Bacillus* sp. đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh khô cành khô quả trên cây cà phê ở tỉnh Đắk Nông. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Rực phẩm*, 20 (3): 94-102.

Trần Thùy Trang, Nguyễn Thị Ánh Nguyệt, Lê Thị Mai Châm, Nguyễn Tấn Đức, Phạm Nguyễn Đức Hoàng, Dương Hoa Xô, 2020. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus subtilis* có khả năng đối kháng tốt với nấm *Colletotrichum scovillei* gây bệnh thán thư trên ớt ở Thành phố Hồ Chí Minh. *Tạp chí Khoa học Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh*, 15 (7): 69-83.

Nguyễn Kim Vân, 2006. Bệnh hại cây hoa lan, hồng, cúc tại vùng Hà Nội và phục cận năm 2005. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 4: 24-27.

Debener, T., Byrne, D.H., 2014. Disease resistance breeding in rose: current status and potential of biotechnological tools. *Plant Science*, 228: 107-117.

Ganga, V.P.N., Frenita, L., Darshana, C.N., Swathi, C.L., Krisnamoorthy, A., 2017. Antagonistic effect of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (IIHR strain) on plant pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotia mangiferae* and *Botrydiplodia theobromae*. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*, 23 (2): 179-181.

Gudin, S., 2000. Rose genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews*, 17: 159-89.

Han, J.H., Shim, H., Shin, J.H., Kim, K.S., 2015. Antagonistic Activities of *Bacillus* spp. Strains Isolated from Tidal Flat Sediment Towards Anthracnose Pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. *Re Plant Pathology Journal*, 31 (2): 165-175.

Holt, J.G. and Williams, S.T., 1989. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 4, Lippincott Williams & Wilkins.

Johnson, L.F., Curl, E.A., Bond, J.H., Fribourg H.A., 1959. *Methods of studying soil microflora and plant disease relationships*. Burges Publishing Co., Minneapolis, Minnesota.

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.

Picardal, J.P., Tundag E.D., Picardal M.T., Goc-ong G., 2019. Antagonistic activity of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) against phytopathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Schlecht.) as a biological control. *CNU J Higher Education*, 13: 25-33.

U.S. Department of Health and Human Services,
Centers for Disease Control and Prevention,
and National Institutes of Health, 2009
Biosafety in Microbiological and Biomedical

Laboratories (BMBL), 5th Edition. HHS Publication
No. (CDC) 21-1112. U.S. Government Printing
Office, Washington DC.

Selection of antagonistic microorganism against pathogenic bacteria and fungi causing rose leaf spot disease

Hoa Thi Minh Tu, Dang Thi Thuy Duong, Trinh Thi Hoa,
Bach Thi Mai Hoa, Pham Thanh Huyen, Le Thi Minh Thanh,
Ho Tuyen, Nguyen Phuong Nhue

Abstract

This study was conducted to select microbial strains strongly antagonistic against rose leaf spot disease strains. Three strongest potential strains including BST, HD-V22, HD-N12 were selected from the collection of 183 microorganisms which had a diameter of inhibition zone against the pathogenic strain *Pseudomonas* sp. HDB-V11 of 17.4; 17.9; 18.1 mm and the efficacy against *Colletotrichum* sp. HDT-N28 of 79.6; 77.7; 75.85%, respectively. These three strains did not inhibit each other in the same medium, exhibiting high potential for application. Based on morphological characteristics, 16S rDNA and ITS gene sequence analysis, two bacterial strains HD-V22, BTS and the fungal strain HD-N12 were identified as *Pseudomonas fluorescens* HD-V22, *Bacillus subtilis* BST, *Metarhizium anisopliae* HD-N12, respectively. This result is the scientific basis to produce antagonistic microbial preparations as potential biological control against diseases on rose plants.

Keywords: *Colletotrichum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Metarhizium*, rose leaf spots, antagonistic

Ngày nhận bài: 25/7/2021
Ngày phản biện: 20/8/2021

Người phản biện: TS. Phạm Bích Hiền
Ngày duyệt đăng: 30/8/2021