

TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ *Pilidium* sp. MD1 GÂY BỆNH ĐÓM LÁ DÂU TÂY (*Fragaria ananassa*)

HỨA HUỖNH MINH THẢO¹, LÊ THỊ VY HIỀN¹, ĐỖ HUY NHẬT MINH^{1,2}, NGUYỄN VIỆT QUỐC^{1,3}, TRẦN QUỐC VIỆT^{1,3}, NGUYỄN NGỌC DUYÊN^{1,4}, BÙI NHẬT TÂM¹, NGUYỄN NGỌC AN¹, PHẠM TẤN VIỆT¹, NGUYỄN THỊ DIỆU HẠNH^{1*}

¹Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công Nghiệp Tp. Hồ Chí Minh

²Viện Paster Tp. Hồ Chí Minh

³Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa

⁴Trường THPT Phú Nhuận

*Tác giả liên hệ: nguyenthidieuhanh@iuh.edu.vn

Tóm tắt: Bệnh đốm lá là một loại bệnh hại ảnh hưởng nghiêm trọng đến mùa màng do nấm gây ra. Nấm *Pilidium* là một trong những tác nhân gây bệnh nguy hiểm cho thực vật với phổ vật chủ rộng. Chúng có thể tác động trên lá, quả và rễ cây. Việc quản lý các bệnh thực vật và kiểm soát dịch bệnh chưa chặt chẽ dẫn đến việc lạm dụng thuốc bảo vệ thực vật gây ảnh hưởng đến hệ sinh thái và sức khỏe con người. Do đó, việc xác định được tác nhân gây bệnh và tìm kiếm các chủng đối kháng hướng đến kiểm soát sinh học là xu thế hiện nay trong xây dựng nền nông nghiệp xanh. Trong nghiên cứu này, chủng nấm mốc *Pilidium* sp. MD1 đã được phân lập từ mẫu bệnh đốm lá dâu tại Đà Lạt. Khi phân tích trình tự vùng gene ITS, chủng này được xác định thuộc chi *Pilidium* và tương đồng 99.5% với *P. concavum*. Qua thí nghiệm sàng lọc vi khuẩn đối kháng với *Pilidium* sp. MD1, chúng tôi thu được 8/50 chủng có hoạt tính, trong đó, chủng vi khuẩn D18 có hoạt tính mạnh nhất. Khi phân tích đặc điểm đại thể, vi thể, khả năng sinh tổng hợp catalase và trình tự 16S rRNA cho thấy chủng D18 tương đồng 100% với *B. subtilis*. Với các kết quả đạt được, chủng D18 cho thấy tiềm năng trong nghiên cứu ứng dụng sản xuất chế phẩm vi sinh nhằm kiểm soát, phòng trừ nấm mốc trên cây dâu tây, góp phần vào việc phát triển nền nông nghiệp bền vững.

Từ khóa: bệnh đốm lá dâu tây, *Bacillus subtilis*, kháng mốc, *Pilidium*

SCREENING OF ANTAGONISTIC BACTERIA STRAINS AGAINST *Pilidium* sp. MD1 CAUSING STRAWBERRY (*Fragaria ananassa*) LEAF SPOT

Abstract: Leaf spot is a common fungal disease that seriously affects crops, resulting in significant economic losses. *Pilidium* is a dangerous plant pathogen that has a broad plant host spectrum as well as several plant infection parts such as leaves, fruits, and roots. The improbable management of plant diseases and disease control has led to the misuse of chemical pesticides, threatening the ecosystem and human health. Therefore, the identification of pathogens and screening of antagonistic microbial strains towards biological control is the current trend in developing eco-friendly agriculture. In this study, the mold strain MD1 was isolated from leaf spot disease strawberry samples in Da Lat. ITS sequence analysis indicated that this mold belongs the genus *Pilidium* and was 99.5% identical to *P. concavum*. In screening test for antifungal effect against *Pilidium* sp. MD1, 8/50 bacterial strains were shown to have the antagonistic activity, and among those, the strongest strain is D18. Upon analyzing the macroscopic and microscopic characteristics, the ability to biosynthesize catalase, and the 16S rRNA sequence, the strain D18 is determined to be 100% identical to *B. subtilis*. In conclusion, The *Pilidium* sp. D18 is a potential strain for applied research in order to produce bio-control products prevent leaf spot disease on strawberry and other putative plant diseases caused by *Pilidium*, contributing to the development of sustainable agriculture.

Keywords: antifungal, *Bacillus subtilis*, *Pilidium*, strawberry leaf spot

1. GIỚI THIỆU

Dâu tây (*Fragaria ananassa*) là cây ăn quả thuộc họ Rosaceae, chi *Fragaria*, được thị trường ưa chuộng bởi giá trị dinh dưỡng cao cũng như hương vị thơm ngon. Dâu tây có hàm lượng chất xơ, vitamin C, acid folic, kali và các chất chống oxy hóa dồi dào [1]. Do đó, dâu tây là cây trồng mang lại lợi nhuận kinh tế cao

cho các ngành nông nghiệp, thực phẩm và du lịch. Ở nước ta, dâu tây là đặc sản của thành phố Đà Lạt, đã được trồng hàng chục năm qua. Theo báo cáo năm 2016 của Phòng Kinh tế Đà Lạt, diện tích canh tác dâu tây tại đây từ 100 đến 120 ha, tổng sản lượng bình quân khoảng 1400 tấn [2]. Tuy nhiên, hiện nay việc trồng dâu tây ở Đà Lạt chưa được thực hiện một cách hiệu quả vì thiếu quản lý đất đai và kiểm soát dịch bệnh. Dâu tây là cây trồng nhạy cảm, dễ bị mầm bệnh tấn công trên lá và quả. Trên thế giới, đặc biệt là các khu vực khí hậu ôn đới đến cận nhiệt đới và nhiệt đới ở những thời điểm có độ ẩm cao, nhiệt độ từ 20-25°C, bệnh đốm lá chiếm hơn 50% các loại bệnh thường gặp về lá ở dâu tây [3]. Tại Đà Lạt, bệnh đốm lá do nấm mốc gây ra ảnh hưởng đến 14.6% năng suất và chất lượng dâu tây [4].

Chi *Pilidium* gồm 2 loài lớn là *P. acerinum* và *P. concavum* [5]. Nhóm nghiên cứu Sutton và Gibson (1977) đã xác định *P. concavum* là tác nhân gây bệnh thối rễ, thối trái và đốm lá dâu tây [6]. Các nghiên cứu sau này của Palm (1991), Geng và cộng sự (2012), Han và cộng sự (2017) đã cho thấy *P. concavum* là tác nhân gây bệnh với phổ vật chủ rộng, trong đó có dâu tây [7-9]. Đối với dâu tây, chúng có khả năng gây bệnh trên trái và lá làm thiệt hại nặng nề đến năng suất và chất lượng cây trồng. Tuy nhiên, trong nghề trồng dâu tây bệnh này vẫn chưa được nghiên cứu nhiều dẫn đến các khuyến cáo và biện pháp phòng trừ bệnh vẫn còn hạn chế [10].

Hiện nay bệnh thực vật do nấm được chủ yếu điều trị bằng các thuốc hóa học diệt nấm như muối đồng, metalaxyl, methyl thiophanate, penthiopyrad, iprodione, propiconazole và chlorothalonil [11]. Mặc dù thuốc bảo vệ thực vật có bản chất hóa học đã đóng vai trò quan trọng trong kiểm soát bệnh hại cây trồng, việc sử dụng dài hạn các hóa chất khó phân hủy này gây tích tụ, ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người. Đồng thời, việc dùng thuốc hóa học một cách không kiểm soát như hiện nay gây đột biến, gia tăng các chủng nấm kháng thuốc [12]. Trong bối cảnh đó, nhằm giảm thiểu các rủi ro cũng như thỏa mãn các mối quan tâm về môi trường và sức khỏe con người, các biện pháp thay thế liên tục được tìm kiếm và nghiên cứu. Trong đó, việc sử dụng chủng vi sinh vật sống hoặc các sản phẩm thứ cấp sinh tổng hợp từ vi sinh vật có hoạt tính đối kháng lại tác nhân gây bệnh, kiểm soát sinh học được xem như là một biện pháp thay thế đầy tiềm năng.

Do đó đề tài này được thực hiện nhằm tuyển chọn được chủng vi khuẩn có khả năng ức chế sự phát triển nấm mốc gây bệnh đốm lá dâu tây. Từ đó ứng dụng chủng vi sinh này cũng như các hợp chất thứ cấp vào sản xuất chế phẩm phòng trừ nấm hại trên dâu tây nói riêng và trên thực vật nói chung một cách có hiệu quả, an toàn, thân thiện với môi trường.

2. VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập nấm mốc

Từ các mẫu lá dâu bệnh đốm lá thu nhận tại vườn dâu Đà Lạt, các chủng nấm mốc được phân lập. Lá dâu được khử trùng bề mặt lần lượt với nước cất vô trùng, 1% sodium hypochlorite (1-2 phút), nước cất vô trùng và được thấm khô bằng bông gòn vô trùng. Các mô bệnh khoảng 0.5-1 cm² được đặt lên môi trường PGA (Potato glucose agar), ủ ở nhiệt độ phòng. Các chủng nấm mốc được cấy chuyển và làm thuần trên môi trường PGA và MEA (Malt extract agar). Đặc điểm hình thái vi thể được quan sát bằng tiêu bản phòng ẩm dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400X và 1000X [13]. Các chủng nấm mốc được lưu trữ bằng phương pháp đông sâu trong môi trường PG chứa 20% glycerol tại điều kiện -80°C

2.2. Tái nhiễm và tái phân lập nấm mốc gây bệnh đốm lá dâu tây

Nhằm xác định chính xác đối tượng gây bệnh, thí nghiệm tái nhiễm và tái phân lập nấm mốc được thực hiện dựa theo phương pháp Koch. Các mảnh thạch chứa tơ nấm 6 ngày tuổi được đặt lên các lá dâu sạch bệnh đã tạo vết thương. Mẫu được giữ trong các hộp phòng ẩm vô trùng và quan sát biểu hiện bệnh trên lá mỗi ngày. Các mẫu lá có kết quả gây bệnh tương tự như lá bệnh tại vườn được ghi nhận và nấm mốc bệnh được tái phân lập. Nấm mốc tái phân lập phải có đặc điểm đại thể, vi thể tương tự như chủng gây bệnh tương ứng trên lá dâu. Khi đó, chủng nấm phân lập từ mẫu bệnh ban đầu được xác định có khả năng gây bệnh đốm lá trên dâu tây [14]. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.3. Định danh nấm mốc

Vùng gene ITS được xem như là mã vạch DNA trong định danh vi sinh vật bởi tính bảo tồn cao. Do đó, các chủng nấm mốc được giải trình tự vùng gene ITS với cặp mồi: V9D: 5'-TTAAGTCCCTGCCCTTGTA-3' và LS266: 5'-GCATTCCCAAACAACACTCGACTC-3'. Mẫu được giải trình tự tại công ty TNHH Dịch Vụ và Thương Mại Nam Khoa. Các trình tự gene tương đồng được truy xuất từ Genbank (NCBI, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov]) và sắp giống bằng Clustal X2.1. Cây phát sinh

loài được xây dựng dựa trên thuật toán Neighbor-Joining với bootstrap 1000 lần lặp bằng phần mềm Mega5 [15].

2.4. Tuyển chọn vi khuẩn có khả năng ức chế nấm mốc gây bệnh đốm lá dâu tây

Năm mươi chủng vi khuẩn được phân lập từ nhiều mẫu đất thu thập từ nhiều địa phương khác nhau (Bến Tre, Tây Ninh, Lâm Đồng, Tp. Hồ Chí Minh) và được kiểm tra khả năng ức chế nấm mốc gây bệnh đốm lá dâu đã được phân lập. Khả năng ức chế nấm mốc của dịch nuôi cấy vi khuẩn được đánh giá dựa trên phương pháp khuếch tán trên giếng thạch. Các chủng vi khuẩn được hoạt hóa trong môi trường LB (Luria Bertani) lỏng, lắc 150 vòng/phút, 37°C. Sau 16 giờ nuôi ủ, dịch nuôi cấy được thu nhận bằng phương pháp ly tâm 13000 rpm trong 10 phút và lọc bằng màng lọc vô trùng 0,20 µm. Đối với nấm mốc, môi trường PGA được sử dụng để hoạt hóa ở nhiệt độ phòng. Các mảnh thạch giống mốc 6 ngày tuổi có đường kính 5.0 mm được đặt vào tâm đĩa thí nghiệm (môi trường PGA với 10 mL/đĩa ϕ = 8 cm). Sau 2 ngày, trên các đĩa này được đục các giếng thạch cách mép đĩa 1.0 cm đồng thời nhỏ 100 µL dịch nuôi cấy của các chủng vi khuẩn, ủ ở nhiệt độ phòng. Hoạt tính kháng nấm được đánh giá dựa trên bán kính vùng ức chế sự phát triển hệ sợi tơ nấm ($R = D-d$, mm). Trong đó, D là độ dài hệ sợi tơ nấm khi được phát triển bình thường và d là độ dài hệ sợi tơ nấm khi có sự hiện diện của dịch nuôi cấy vi khuẩn. Hiệu số R với các giá trị lần lượt là $R \geq 10.0$ mm, $2.0 \leq R < 10.0$ mm và $R < 2.0$ mm tương ứng cho mức độ ức chế mạnh, trung bình hay yếu của dịch nuôi cấy vi khuẩn [16]. Dựa vào kết quả này, chủng vi khuẩn có khả năng ức chế chủng nấm mốc gây bệnh được tuyển chọn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các chủng vi khuẩn được lưu trữ bằng phương pháp đông sâu trong môi trường LB chứa 20% glycerol tại điều kiện -80°C

2.5. Định danh vi khuẩn

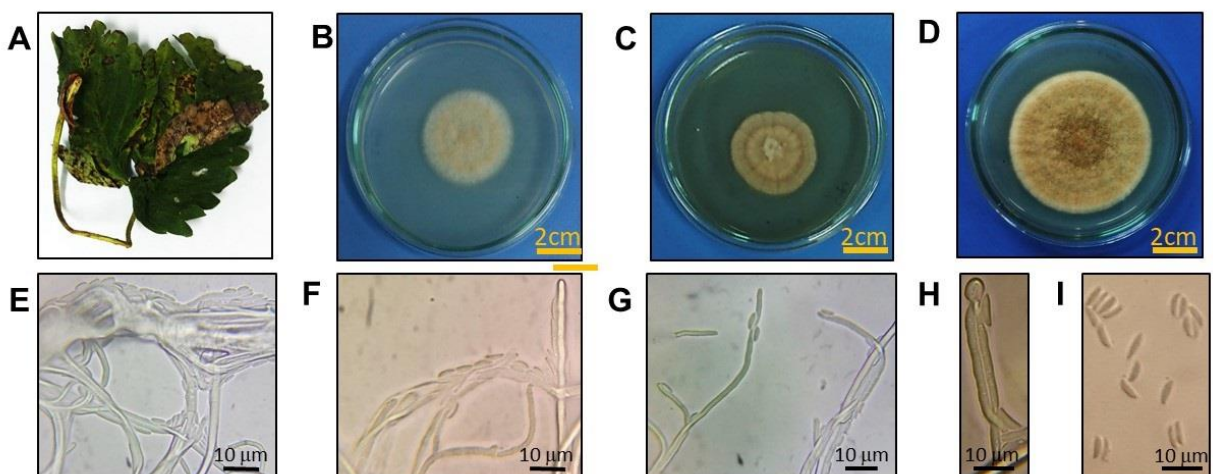
Chủng vi khuẩn có khả năng ức chế nấm mốc gây bệnh được định danh bằng đặc điểm hình thái đại thể, vi thể, khả năng sinh tổng hợp catalase và phân tích trình tự vùng gene 16S rRNA. Vùng gene 16S rRNA được giải trình tự với cặp mồi 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' và 1540R: 5'-AAGGAGGTGATCCAACCGCA-3'. Mẫu được giải trình tự tại công ty TNHH Dịch Vụ và Thương Mại Nam Khoa. Các trình tự gene tương đồng được truy xuất từ Genbank (NCBI, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov]) và sắp giống bằng Clustal X2.1. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên thuật toán UPGMA với Bootstrap 1000 lần lặp bằng phần mềm Mega5 [17].

2.6. Phương pháp thống kê và xử lý số liệu

Số liệu thu thập được tính giá trị trung bình các lần lặp lại, độ lệch chuẩn. Tất cả các số liệu được xử lý trên Excel và thống kê bằng phần mềm Statgraphics XVIII.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập nấm mốc gây bệnh đốm lá



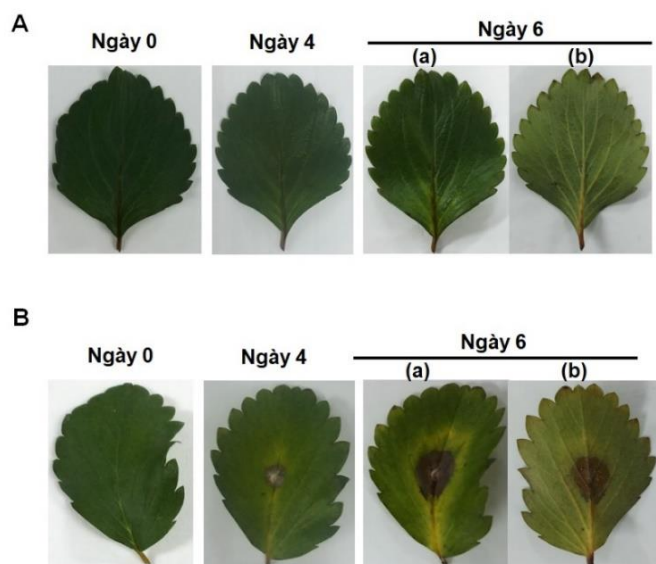
Hình 1: Hình thái đại thể và vi thể (X400) chủng MD1 được phân lập từ mẫu bệnh đốm lá dâu. Mẫu lá dâu bị bệnh đốm lá (A). Khuẩn lạc chủng MD1 trên môi trường PGA và MEA sau 4 ngày nuôi cấy (B-C). Khuẩn lạc chủng MD1 trên môi trường PGA sau 6 ngày nuôi cấy (D). Conidiomata chủng MD1 (E). Cuống sinh bào tử (F-G-H). Bào tử (I).

Bệnh đốm lá thường bắt đầu tại mặt trên phiến lá với các vết bệnh nhỏ, hình tròn, màu nâu đến nâu sẫm, đường kính từ 2-5 mm rồi lan dần xuống mặt dưới. Đôi khi, vị trí trung tâm đốm bệnh có hiện tượng khô, bạc màu. Đồng thời, mô lá xung quanh vị trí bệnh bắt đầu chuyển màu từ vàng sang nâu sẫm, héo và khô dần [10]. Tại vườn dâu Đà Lạt, Lâm Đồng, những mẫu có triệu chứng đặc trưng của bệnh đốm lá đã được thu nhận (Hình 1A). Chủng nấm mốc MD1 đã được phân lập và làm thuần từ những mẫu lá bệnh này. Sau 4 đến 6 ngày nuôi cấy trên môi trường PGA và MEA ở nhiệt độ phòng, đặc điểm hình thái đại thể và vi thể của MD1 đã được ghi nhận và đối chiếu với nghiên cứu của Palm và cộng sự (1991) [7].

Khuẩn lạc chủng MD1 sau 4 ngày nuôi cấy trên môi trường PGA có kích thước khoảng 5 cm, màu hồng cam, bề mặt dạng bông mịn, có các vòng tròn đồng tâm (Hình 1B). Tuy nhiên, khi nuôi cấy chủng MD1 ở cùng nhiệt độ và thời gian nuôi cấy, trên môi trường MEA, khuẩn lạc MD1 có nhiều điểm khác biệt. Khuẩn lạc có kích thước nhỏ hơn, bề mặt chia thùy, các vòng tròn đồng tâm xuất hiện nhiều và rõ rệt hơn, màu sắc khuẩn lạc từ vàng đến nâu, bề mặt dạng nhung (Hình 1C). Khi nuôi cấy chủng MD1 trên môi trường PGA đến 6 ngày, khuẩn lạc có kích thước khoảng 7 cm, màu nâu cam, bề mặt xuất hiện các vòng tròn đồng tâm, chia thùy và bắt đầu hình thành quả thể vô tính (pycnidial conidiomata) màu nâu đậm đặc trưng cho bộ Sphaeropsidales (Ngành Nấm bất toàn, lớp Coelomycetes) (Hình 1D-E). Hệ sợi tơ trong suốt, phân nhánh, không có vách ngăn. Đầu sợi tơ nấm hình thành thể bình mang bào tử trần, dạng đơn bào, hơi cong và nhọn ở hai đầu (Hình 1F-I). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Palm và cộng sự (1991) khi lần đầu phân tích về đặc điểm phân loại và hình thái của *Pilidium concavum* [7]. Năm 2004, Rossman và cộng sự đã nghiên cứu về đặc điểm đại thể, vi thể và phân tích di truyền bằng các kỹ thuật sinh học phân tử các loài thuộc chi *Pilidium* cũng đã cho kết quả tương tự [6]. Do đó, chủng MD1 được dự đoán thuộc chi *Pilidium*.

3.2. Tái nhiễm và tái phân lập nấm mốc MD1

Thí nghiệm tái nhiễm và tái phân lập MD1 được bố trí theo phương pháp Koch nhằm kiểm tra khả năng gây bệnh đốm lá dâu của chủng MD1. Sau 4 ngày gây nhiễm bởi MD1, vị trí gây bệnh đã bắt đầu xuất hiện triệu chứng tổn thương. Mô lá xung quanh vùng nhiễm nấm trở nên sậm màu và có dấu hiệu hoại tử. Mô bệnh phát triển lan rộng, biểu hiện rõ rệt ở 2 mặt lá sau 6 ngày lây bệnh (Hình 2B). Đối chiếu với mẫu đối chứng, vết thương sau 6 ngày đã khô, các mô xung quanh không có sự khác biệt rõ rệt với mẫu lá ban đầu (Hình 2A). Các dấu hiệu bệnh trên tương đồng với nghiên cứu về *P. concavum* gây bệnh đốm lá dâu tây tại Trung Quốc và Hàn Quốc [8, 9].

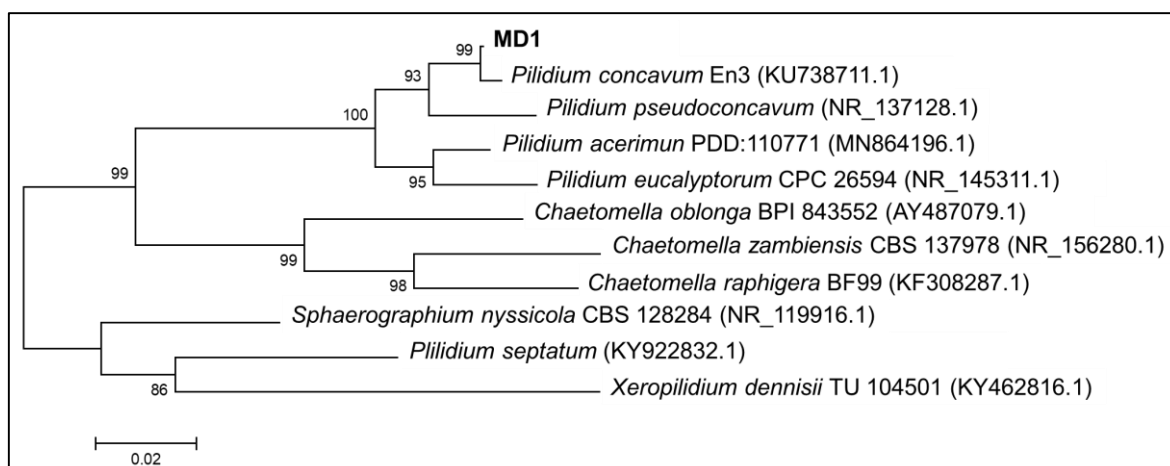


Hình 2. Khả năng gây bệnh đốm lá dâu tây của chủng MD1 sau 4 và 6 ngày gây nhiễm. (A) Mẫu đối chứng; (B) Mẫu gây bệnh, (a) mặt trên của lá, (b) mặt dưới của lá.

Đồng thời, theo phương pháp Koch, mẫu lá bệnh trên được sử dụng để tái phân lập chủng nấm mốc gây bệnh. Kết quả cho thấy chủng nấm mốc sau khi được tái phân lập trên môi trường PGA và nuôi ủ ở nhiệt độ phòng có đặc điểm đại thể, vi thể hoàn toàn tương đồng với chủng MD1. Từ các kết quả trên, chúng tôi kết luận chủng mốc MD1 là tác nhân gây bệnh đốm lá dâu tây.

3.3. Định danh nấm mốc

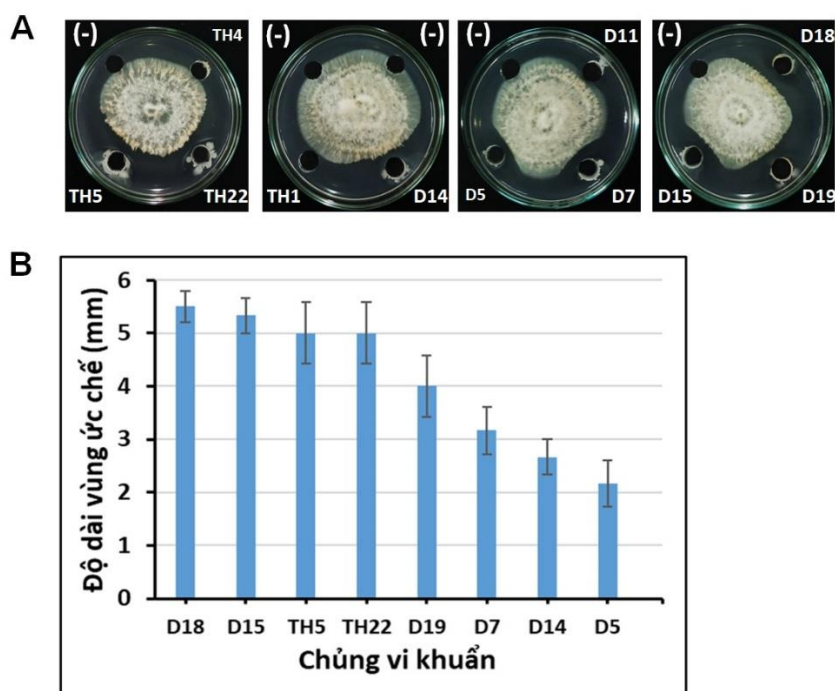
Sau khi định danh sơ bộ bằng hình thái đại thể, vi thể, vùng gene ITS của chủng MD1 đã được giải trình tự hai chiều để định danh đến loài (805 bp). Khi so sánh đoạn trình tự này với các trình tự có sẵn ở Ngân hàng dữ liệu Genbank trên NCBI kết quả cho thấy chủng nấm mốc MD1 thuộc chi *Pilidium* và tương đồng 99.5% với chủng *Pilidium concavum* En3 (KU738711.1). Đồng thời cây phát sinh loài dựa trên vùng gene ITS với 10 taxa cũng được xây dựng. Cây phát sinh loài cho thấy chủng MD1 xếp chung nhóm với loài *Pilidium concavum* En3 với hệ số Bootstrap là 99% (Hình 3). Từ các kết quả trên đã cho thấy chủng MD1 thuộc chi *Pilidium* và được đặt tên *Pilidium* sp. MD1.



Hình 3. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên vùng trình tự ITS bằng phần mềm Mega5 với phương pháp Neighbor Joining, Bootstrap 1000 lần lặp

3.4. Tuyển chọn vi khuẩn có khả năng ức chế *Pilidium* sp. MD1

Thí nghiệm sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển hệ sợi tơ nấm *Pilidium* sp. MD1 đã được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Từ 50 chủng vi khuẩn phân lập được, chúng tôi đã thu nhận được 8 chủng có khả năng đối kháng với *Pilidium* sp. MD1 với vùng ức chế sự phát triển hệ sợi tơ nấm là 2-10 mm (Hình 4).

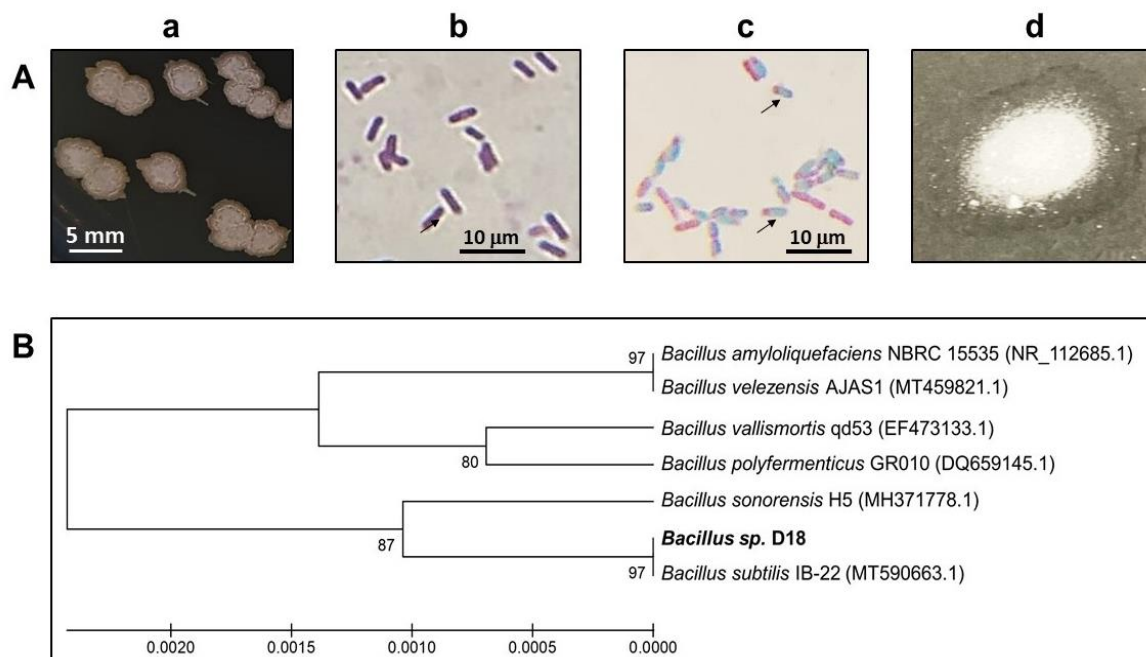


Hình 4. Khả năng ức chế *Pilidium* sp. MD1 của các chủng vi khuẩn

Kết quả phân tích thống kê Anova đơn yếu tố của độ dài vùng ức chế với độ tin cậy 95%, giá trị $p < 0.05$ cho thấy các chủng vi khuẩn D18, D15, TH5 và TH22 có khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi tơ nấm *Pilidium* sp. MD1 tương tự nhau. Đồng thời dựa vào khả năng sinh trưởng nhanh và ức chế MD1 tương đối ổn định, chủng vi khuẩn D18 được tiếp tục kiểm tra hình thái và định danh theo phương pháp sinh học phân tử.

3.5. Định danh chủng vi khuẩn D18

Với tiềm năng đối kháng nấm mốc *Pilidium* sp. MD1, chủng vi khuẩn D18 đã được định danh đến cấp độ chi. Để định danh chủng D18, các đặc điểm hình thái vi thể, đại thể và đặc điểm sinh hóa của chủng này được thực hiện theo khóa phân loại Bergey. Về hình thái đại thể, sau 2 ngày nuôi cấy trên môi trường LB, pH 7.0, nuôi ở 37°C, chủng vi khuẩn D18 hình thành khuẩn lạc với đường kính khoảng 3-5mm (Hình 5A-a). Khuẩn lạc D18 khô, màu trắng đục, bờ không đều, bất định và bề mặt có lớp màng nhầy đặc trưng. Khi phân tích đặc điểm vi thể, chủng vi khuẩn D18 thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương (Hình 5A-b), có khả năng sinh nội bào tử bắt màu xanh lá của thuốc nhuộm xanh malachite. Nội bào tử này có xu hướng nằm lệch về một cực của tế bào (Hình 5A-c). Từ đó, để phân biệt chủng D18 thuộc chi *Bacillus* hay *Clostridium*, thí nghiệm khảo sát khả năng sinh tổng hợp catalase đã được thực hiện. Kết quả cho thấy chủng D18 có khả năng sinh tổng hợp enzyme này qua phản ứng phân giải H_2O_2 tạo thành H_2O và bọt khí O_2 (Hình 5A-d) [18]. Căn cứ trên khóa phân loại Bergey về vi khuẩn Gram dương, với các đặc tính hình thành bào tử và khả năng sinh enzyme catalase, chủng vi khuẩn D18 sẽ được xếp vào chi *Bacillus*.



Hình 5. Chủng *Bacillus* sp. D18. (A) Định danh sơ bộ. (a) Hình thái khuẩn lạc chủng D18 sau 2 ngày nuôi cấy trên môi trường LB, ở 37°C; (b) Tế bào sinh dưỡng bắt màu tím sau nhuộm Gram; (c) Hình thái nội bào tử (màu xanh, mũi tên) trong tế bào (màu hồng); (d) Khả năng sinh tổng hợp catalase; (B) Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên vùng trình tự 16S rRNA bằng phần mềm Mega5 với phương pháp UPGMA, Bootstrap 1000 lần lặp.

Sau khi định danh đến chi, vùng gene 16s rRNA của chủng D18 đã được giải trình tự (1448 bp). Kết quả phân tích bằng công cụ BLAST trên Ngân hàng dữ liệu Genbank (NCBI) cho thấy chủng D18 tương đồng 100% với chủng *Bacillus subtilis* IB-22 (MT590663.1). Đồng thời, cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng gene 16s rRNA với 6 loài khác thuộc chi *Bacillus* cũng được xây dựng và cho thấy chủng D18 xếp chung nhóm với *Bacillus subtilis* IB-22 với hệ số Bootstrap là 97% (Hình 6B). Hơn nữa, chi *Bacillus*, đặc biệt là loài *B. subtilis*, được biết đến là nhóm vi khuẩn có nhiều hoạt tính sinh học và được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Trong những năm gần đây, vi khuẩn *B. subtilis* được nghiên cứu nhiều về khả năng đối kháng các loại nấm gây bệnh thực vật [19-22]. Như vậy, với sự tương đồng với chủng *Bacillus subtilis*, chủng *Bacillus* D18 thể hiện được tiềm năng trong hoạt động đối kháng với chủng nấm mốc gây bệnh đốm lá dâu, và có thể được ứng dụng xa hơn trong các chế phẩm bảo vệ thực vật.

4. KẾT LUẬN

Bệnh đốm lá gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến chất lượng và năng suất dâu tây. Tuy nhiên, hiện nay việc quản lý và kiểm soát bệnh này vẫn chưa được chú trọng. Do đó việc xác định nấm bệnh cũng như tìm kiếm các chủng vi sinh vật đối kháng nhằm hướng đến thay thế dần các biện pháp hóa học là điều thiết yếu. Trong đề tài này, chủng *Pilidium* sp. MD1 gây bệnh đốm lá lần đầu tiên đã được phân lập từ các mẫu dâu tây ở Đà Lạt, Việt Nam. Bên cạnh đó, chủng *Bacillus* sp. D18 có khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi tơ nấm *Pilidium* sp. MD1 tốt nhất trong 8 chủng được tuyển chọn và là ứng cử viên tiềm năng trong các chế phẩm sinh học phòng trừ nấm bệnh *Pilidium*, góp phần phát triển nền nông nghiệp xanh, bền vững.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] F. Giampieri, T.Y.F. Hernandez, M. Gasparini, ... and M. Battino, "Strawberry as a health promoter: an evidence based review," *Food Function*, 6, 5, 1386-1398, 2015. DOI: 10.1039/c5fo00147a
- [2] Văn Việt, "Xây dựng nhãn hiệu chứng nhận Dâu tây Đà Lạt," 2016. [Trực tuyến]. Địa chỉ: <http://khuyennong.lamdong.gov.vn/tin-tuc-su-kien/1426-xay-dung-nhan-hieu-chung-nhan-dau-tay-da-lat>.
- [3] C. Garrido, M. Carbú, F.J.F. Fernández-Acero, V.E. González-Rodríguez and J.M. Cantoral, "New insights in the study of strawberry fungal pathogens," *Genes Genomes Genomics*, 5, 1, 24-39, 2011.
- [4] P.T.M. Tâm, "Ứng dụng công nghệ GIS trong điều tra tình hình phân bố bệnh hại trên dâu tây tại Thành phố Đà Lạt," 2015. [Trực tuyến]. Địa chỉ: <http://iasvn.org/tin-tuc/Ung-dung-cong-nghe-GIS-trong-dieu-tra-tinh-hinh-phan-bo-benh-hai-tren-dau-tay-tai-TP-Da-Lat-8031.html>.
- [5] E.S. Del Fosse, "Proceedings of the Fifth International Symposium on Biological Control of Weeds," 1980. [Online]. Available: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300350086>
- [6] A.Y. Rossman, M.C. Aime, D.F. Farr, ... and R. Leahy, "The coelomycetous genera *Chaetomella* and *Pilidium* represent a newly discovered lineage of inoperculate discomycetes," *Mycological Progress*, 3, 4, 275-290, 2004. DOI:10.1007/s11557-006-0098-4
- [7] M.E. Palm, "Taxonomy and morphology of the synanamorphs *Pilidium concavum* and *Hainesia lythri* (coelomycetes)," *Mycologia*, 83, 6, 787-796, 1991. DOI: 10.1080/00275514.1991.12026084
- [8] W.L. Geng, P. Hu, Z. Ma, X. Y. Zhao, and Y. M. Wei, "First report of *Pilidium concavum* causing tan-brown leaf spot on strawberry in China," *Plant disease*, 96, 9, 1377-1377, 2012. DOI: 10.1094/PDIS-03-12-0310-PDN
- [9] M.J. Park, C.G. Back, J.H. Park, ... and K.S. Han, "Occurrence of Tan-brown Leaf Spot Caused by *Pilidium concavum* on *Fragaria ananassa* in Korea," *The Korean Journal of Mycology*, 45, 4, 377-380, 2017. DOI: 10.4489/KJM.20170044.
- [10] J.S. Baggio, J.C. Mertely and N.A. Peres, "Leaf Spot Diseases of Strawberry," *UF/IFAS Extension*, PP359, 2020.
- [11] J.E. Woodward, T.B. Brenneman and R.C. Kemera Jr, "Chemical control of peanut diseases: targeting leaves, stems, roots, and pods with foliar-applied fungicides", In *Fungicides—showcases of integrated plant disease management from around the world*, Mizuho Nita, Ed. Place of publication: IntechOpen, 2013, 55-76.
- [12] Z. Ma, Y. Luo and T.J. Michailides, "Resistance of *Botryosphaeria dothidea* from pistachio to iprodione," *Plant disease*, 85, 2, 183-188, 2001. DOI: 10.1094/PDIS.2001.85.2.183
- [13] L.X. Ran, C.Y. Liu, G.J. Wu, L.C. van Loon, P.A.H.M. Bakker, "Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China," *Biological Control*, 32, 1, 111-120, 2005. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2004.08.007

- [14] R. Scheper, P. Wood and B. Fisher, "Isolation spore production and Kochs postulates of *Elsinoe pyri*," *New Zealand Plant Protection*, 66, 308-316, 2013. DOI:10.30843/nzpp.2013.66.5669
- [15] M.T.V. Hoang, L. Irinyi, S.C.A. Chen, ... and W. Meyer, "Dual DNA barcoding for the molecular identification of the agents of invasive fungal infections," *Frontiers in microbiology*, 10, 1647, 1-13, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01647
- [16] N. C. Paul, W.K. Kim, S.K. Woo, M.S. Park, and S.-H. Yu, "Fungal endophytes in roots of *Aralia* species and their antifungal activity," *The Plant Pathology Journal*, 23, 4, 287-294, 2007. DOI: 10.5423/ppj.2007.23.4.287.
- [17] N.J. Fredriksson, M. Hermansson, and B.M. Wilén, "The choice of PCR primers has great impact on assessments of bacterial community diversity and dynamics in a wastewater treatment plant," *PloS one*, 8, 10, p. e76431, 2013.
- [18] M.J. Leboffe, and B.E. Pierce, *Microbiology: laboratory theory and application*. Morton Publishing Company, 2015.
- [19] K. Ntushelo, L.K. Ledwaba, M.E. Rauwane, O.A. Adebo, and P.B. Njobeh, "The Mode of Action of *Bacillus* Species against *Fusarium graminearum*, Tools for Investigation, and Future Prospects," *Toxins (Basel)*, 11, 10, p.606, 2019. DOI: 10.3390/toxins11100606
- [20] J. Zhu, T. Tan, A. Shen, ... and L. Zeng, "Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* IBFCBF-4 against *Fusarium* wilt of watermelon," *Journal of Plant Pathology*, 102, 433-441, 2020. DOI: 10.1007/s42161-019-00457-6
- [21] S. Andrić, T. Meyer, and M. Ongena, "Bacillus Responses to Plant-Associated Fungal and Bacterial Communities," *Frontiers in microbiology*, 11, 1350, 1-9, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01350
- [22] Ç.B. Albayrak, "Bacillus Species as Biocontrol Agents for Fungal Plant Pathogens", In *Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol*, M. T. Islam, M. M. Rahman, P. Pandey, M. H. Boehme, and G. Haesaert, Ed. Place of publication: Springer, 2019, 239-265.

Ngày nhận bài: 10/11/2021

Ngày chấp nhận đăng: 31/03/2022