

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH VI KHUẨN TỪ VÙNG SINH THÁI BẢN ĐỊA CÓ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG VỚI *Xanthomonas* spp. GÂY BỆNH ĐỐM LÁ TRÊN CÂY HOA HỒNG (*Rosa* spp.)

Lê Uyển Thanh^{1,2*}, Tô Lan Phương¹,
Trần Đình Giới³, Nguyễn Đức Độ²

TÓM TẮT

Từ 3 vùng sinh thái bản địa là Vườn Quốc gia Tràm Chim, Khu du lịch sinh thái Gáo Giồng, Khu di tích lịch sử văn hóa Xẻo Quýt thuộc tỉnh Đồng Tháp, 543 dòng vi khuẩn được phân lập và được khảo sát khả năng đối kháng đối với 3 dòng *Xanthomonas* spp. (XR9, XR13, XR18) gây bệnh đốm lá trên cây hoa hồng (*Rosa* spp.). Kết quả ghi nhận 17 dòng vi khuẩn bản địa có khả năng đối kháng tích cực (D >15 mm) đối với cả ba dòng gây bệnh. Trong đó, 3 dòng T265, G24, X61 đối kháng triển vọng với đường kính vùng ức chế cao nhất, đã được chọn xác định danh pháp. Qua kỹ thuật MALDI-TOF-MS, 2 dòng X61, G24 được xác định đều thuộc về chi *Bacillus* và dòng X61 được xác định đến loài là *B. subtilis*, trong khi chưa xác định được dòng T265. Hai dòng T265 và G24 tiếp tục được xác định qua kỹ thuật giải trình tự gen 16S rRNA. Kết quả cho thấy dòng T265 có giá trị tương đồng cao nhất với *Paenibacillus elgii* MN160320 (98,50%), *P. elgii* HQ236085 (98,49%), trong khi dòng G24 tương đồng 99,49% với *Bacillus subtilis* MK859998 và EF530208.2. Dòng T265 được đề xuất danh pháp và accession number là *Paenibacillus elgii* MZ841643 và dòng G24 là *Bacillus subtilis* MZ841644. Các dòng vi khuẩn đối kháng này đã thể hiện tiềm năng kiểm soát vi khuẩn gây bệnh đốm lá trên cây hoa hồng ở Đồng Tháp.

Từ khóa: Bệnh đốm lá, hoa hồng, MALDI-TOF-MS, kiểm soát sinh học, *Xanthomonas* spp., 16S rRNA gene.

1. GIỚI THIỆU

Xanthomonas spp. là tác nhân gây bệnh đốm vi khuẩn trên hơn 400 loại thực vật khác nhau [1, 4]. Chúng lây nhiễm trên các loài thuộc họ Hoa hồng (Rosaceae) như: *Xanthomonas fragariae* trên dâu tây [12], *Xanthomonas axonopodis* gây bệnh đốm lá trên cây hoa hồng (*Rosa* spp.) ở Texas và Florida, Hoa Kỳ [4]. Tại Việt Nam, theo Nguyễn Thị Thu Cúc và Trần Thị Thu Thủy (2014) [9] dòng vi khuẩn gây bệnh đốm lá trên cây hoa hồng được xác định là *Xanthomonas* spp.. Bệnh xuất hiện thường xuyên và gây nhiều khó khăn trong canh tác cây hoa hồng, lá bị đốm và rụng do mầm bệnh gây ra đã làm giảm chất lượng và dẫn đến nhiều tổn thất về kinh tế ở làng hoa Sa Đéc, tỉnh Đồng Tháp.

Hiện nay, việc sử dụng thuốc trừ bệnh có hoạt chất hóa học chưa đạt được hiệu quả cao trong phòng trị bệnh này [9], việc sử dụng với nồng độ và tần suất quá cao đã nâng chi phí sản xuất, gây ảnh

hưởng đến sức khỏe cộng đồng và hình thành mầm bệnh kháng thuốc. Phát triển các tác nhân kiểm soát sinh học (Biological control agent - BCA) sẽ là cách tiếp cận thay thế tiềm năng [10]. Mục đích của nghiên cứu này là sàng lọc và xác định các dòng vi khuẩn đối kháng từ một số vùng sinh thái bản địa có khả năng đối kháng mầm bệnh đốm lá trên *Rosa* spp. Sàng lọc hoạt tính đối kháng là bước đánh giá sơ bộ cần thiết nhằm xác định dòng vi khuẩn đối kháng tiềm năng đối với mầm bệnh mục tiêu.

Trong thập kỷ trước, kỹ thuật ion hóa mẫu hấp thụ dựa trên sự hỗ trợ của các chất nền và năng lượng laser (MALDI-TOF-MS) là một kỹ thuật hữu ích, giúp xác định danh pháp vi sinh vật nhanh chóng, chính xác, dễ sử dụng, giá thành thấp, và cho phép xác định các vi sinh vật đến cấp độ loài [11]. Ngoài ra, giải trình tự gen 16S rRNA cũng là một kỹ thuật định danh hiệu quả giữa các sinh vật nhân sơ. Một số vi khuẩn đối kháng đã được xác định thành công bằng kỹ thuật này như [2, 8, 10]: *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter* sp., *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus amyloquelaciens*, *Staphylococcus warneri*, *Pantoea vagans*, *Pantoea*

¹ Trường Đại học Đồng Tháp

² Trường Đại học Cần Thơ

³ Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long

*Email: uyenthanh0809@gmail.com

sp., *Oceanobacillus oncorhynchi*, *Paenibacillus cineris* và *Paenibacillus elgii*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu đất thu thập từ 3 vùng sinh thái đại diện tại tỉnh Đồng Tháp, gồm Vườn Quốc gia Tràm Chim, Khu du lịch Sinh thái Gáo Giồng, Khu di tích Lịch sử văn hóa Xẻo Quýt. Ba dòng vi khuẩn gây bệnh *Xanthomonas* spp. (XR13, XR9 và XR18) được phân lập từ vết bệnh đốm lá cây hoa hồng (*Rosa* spp.) tại làng hoa Sa Đéc, tỉnh Đồng Tháp do Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ cung cấp. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật nutrient agar (NA); dung dịch Saline peptone; môi trường King's B; máy phân tích MALDI-TOF-MS Biotyper (Bruker Daltonics, Đức); máy giải trình tự BigDye Terminator Cycle Sequencing Chemistry và ABI 3730 XL Sequencer (Applied Biosystems).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập các dòng vi khuẩn từ một số vùng sinh thái bản địa tại tỉnh Đồng Tháp

Đất thu được từ nhiều điểm thuộc vùng thu mẫu, lấy mẫu đơn vào buổi sáng khi trời không mưa. Số lượng mẫu thu tại các vùng này theo phương pháp trích dẫn TCVN 5297:1995, đối với Vườn Quốc gia Tràm Chim có 18 mẫu đất do có diện tích lớn vượt trội so với 2 vùng còn lại là Xẻo Quýt và Gáo Giồng (với 9 mẫu đất trên mỗi vùng).

Cần mẫu đất thu được và chuyển vào bình tam giác với tỷ lệ 5 g/50 mL dung dịch saline peptone, tiến hành lắc với tốc độ 150 vòng/phút trong 15 phút. Dung dịch đất ở các độ pha loãng khác nhau được trải lên đĩa petri với môi trường NA và ủ ở 28°C trong 24 giờ. Ở độ pha loãng với khuẩn lạc rõ ràng và khác biệt, mỗi khuẩn lạc được chọn và vạch (ria) theo phương pháp Quadrant. Khuẩn lạc đơn lẻ được bảo quản tạm thời trên các ống nghiệm chứa môi trường NA và lâu dài trong điều kiện lạnh âm (-20°C) với glycerol đã tiệt trùng 30%.

2.2.2. Khảo sát khả năng đối kháng trên đĩa thạch (in vitro) của các dòng vi khuẩn bản địa được phân lập

Các dòng *Xanthomonas* spp. (XR9, XR13, XR18) được nuôi cấy để thử nghiệm đối kháng. Huyền phù vi khuẩn của các dòng này được pha

trong MgSO_4 0,01M ở 10^8 CFU/mL từ các khuẩn lạc đạt 72 giờ nuôi cấy [4], được hút 100 μL lên petri chứa 15 mL môi trường King's B ở 50°C, xoay nhẹ.

Khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn bản địa ở 24 giờ nuôi được pha lần lượt với MgSO_4 0,01 M đã khử trùng tạo huyền phù đạt $\text{OD}_{600}=0,3$ và được chuyển lần lượt vào các đĩa chứa mầm bệnh bằng cách cho các khoan giấy thấm đã khử trùng (đường kính 5 mm) nhúng vào huyền phù, sau đó được đặt lên các đĩa mầm bệnh. Đối chứng dương là khoan giấy thấm với axit oxolinic 20%, trong khi đối chứng âm là khoan giấy thấm với dung dịch MgSO_4 0,01M đã khử trùng. Các đĩa này được ủ ở 30°C trong bóng tối. Sau 24 giờ ủ, ghi nhận và đánh giá hiệu quả của các dòng vi khuẩn đối kháng bằng cách đo đường kính vùng ức chế xung quanh vi khuẩn đối kháng trừ đi đường kính của khoan giấy thấm ở trung tâm của khuẩn lạc. Mỗi dòng vi khuẩn được lặp lại ba lần.

2.2.3. Xác định danh pháp một số dòng vi khuẩn đối kháng triển vọng dựa vào kỹ thuật MALDI-TOF-MS

Các dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng tích cực với đường kính vùng ức chế cao được lựa chọn để nghiên cứu tiếp. Các dòng vi khuẩn này được nuôi trên môi trường NA, ở 30°C trong 24 giờ, thu khuẩn lạc riêng lẻ, khuếch đại khuẩn lạc của từng dòng vi khuẩn lên các đĩa MBT (Bruker Daltonic, Billerica, Massachusetts) bằng tăm bông đã khử trùng, làm khô ở nhiệt độ môi trường, phủ 1 μL dung dịch nền axit α -cyano-4-hydroxycinnamic (CHCA) lên mỗi giếng mẫu và để khô trong vài phút trước khi phân tích. Khối phổ của mỗi mẫu được phân tích bằng cách sử dụng hệ thống tiêu chuẩn tự động hóa được thiết lập trong Biotyper (Bruker Daltonics, Đức). Kết quả phân tích mẫu theo nhà sản xuất được thể hiện với điểm số (score value) từ 0 đến 3. Tiến hành 2 lần thử nghiệm đối với mỗi dòng phân lập, điểm cao nhất của một thử nghiệm so sánh với phổ trong cơ sở dữ liệu được sử dụng để xác định danh pháp. Điểm dưới 1,7 đồng nghĩa chưa xác định được danh pháp; điểm 1,7 được xem là có thể xác định chi và điểm 2,0 được sử dụng để xác định loài.

2.2.4. Xác định danh pháp các dòng vi khuẩn triển vọng dựa vào kỹ thuật giải trình tự gen 16S rRNA

Các dòng vi khuẩn đối kháng triển vọng chưa xác định được danh pháp theo kỹ thuật MALDI-TOF được giải trình tự gen 16S rRNA. Để thực hiện chiết xuất DNA vi khuẩn, eppendorf 1,5 mL chứa huyền phù tế bào vi khuẩn được đun sôi trong 20 phút, sau đó làm lạnh trong nước đá và ly tâm ở tốc độ 13200 vòng/phút trong 5 phút. Sau đó, phần chất lỏng là mẫu DNA của vi khuẩn được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng. Khuếch đại gen 16S rRNA của các mẫu DNA phân lập bằng cách sử dụng các đoạn mồi chung 27F/1492R [14], có trình tự sau: 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3'; 1492R: 5'-TACGGTTACCTTGTACGACT-3' [20]. Hỗn hợp phản ứng PCR (50 µL) chứa các thành phần sau: 37,5 µL BiH2O, 5 µL Buffer 10X, 0,5 µL dNTP 10 mM, 2 µL primer 27F 10 µM, 2 µL primer 1492R, 1 µL Taq polymerase 5000U/mL, 2 µL mẫu DNA của vi khuẩn. Chương trình PCR bao gồm biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ ở 95°C trong 30 giây, 58°C trong 30 giây và 72°C trong 1:45 phút, sau đó ở 72°C trong 5 phút và lần gia hạn cuối cùng ở 25°C trong 2 phút trong máy quay vòng nhiệt T100 (BioRad). Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% ở 50V trong 40 phút. Buffer TAE 1X được sử dụng để chuẩn bị gel cũng như điện di. Sau đó, gel được nhuộm với 0,5 µg/mL ethidium bromide trong 15 phút và được hiển thị dưới máy UV-transilluminator. Các mẫu được giải trình tự qua BigDye Terminator Cycle Sequencing Chemistry and ABI 3730 XL Sequencer (Applied Biosystems). Các chuỗi được căn chỉnh bằng BioEdit phiên bản 7.2.5. Trình tự của các mẫu PCR vi khuẩn được so sánh với cơ sở dữ liệu của ngân hàng gen (NCBI) bằng công cụ BLAST-N. Dựa trên mức độ tương đồng của dòng phân lập có cơ sở dữ liệu trên ngân hàng gen, xác định tên của vi khuẩn và đăng ký số hiệu gia nhập "accession number" trong ngân hàng gen (NCBI).

2.2.5. Phương pháp phân tích thống kê được sử dụng

Dữ liệu được xử lý bằng Microsoft Excel và phân tích bằng phần mềm MINITAB phiên bản 16.1. Các giá trị khác biệt có ý nghĩa được phân tích bằng phép thử Tukey với xác suất là 5% ($P = 0,05$).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng đối kháng với mầm bệnh

Từ tháng 11 năm 2016 đến tháng 10 năm 2017, tiến hành thu thập 36 mẫu đất tại 3 vùng sinh thái bản địa. Dựa trên các đặc điểm khác biệt về hình thái như màu sắc, hình dạng và kích thước khuẩn lạc, 303 dòng vi khuẩn từ Tràm Chim (được đặt tên từ T1 đến T303) và 138 dòng vi khuẩn từ Gáo Giồng (G1 đến G138) và 102 dòng vi khuẩn từ Xẻo Quýt (X1-X102) đã được phân lập.

Qua quá trình sàng lọc khả năng đối kháng *in vitro* của 543 dòng vi khuẩn được phân lập từ các vùng sinh thái này đối với ba dòng *Xanthomonas* spp. (XR9, XR13, XR18) gây bệnh đốm lá trên cây hoa hồng. Sau 24 giờ nuôi cấy, 131 dòng vi khuẩn được ghi nhận có khả năng ức chế ít nhất một dòng *Xanthomonas* spp. dựa trên đường kính vùng ức chế của khuẩn lạc vi khuẩn trên đĩa thạch chứa môi trường King's B và mầm bệnh. Trong đó, 93 dòng vi khuẩn từ Tràm Chim (chiếm 70,99%), 15 dòng vi khuẩn từ Gáo Giồng (chiếm 11,45%) và 23 dòng vi khuẩn từ Xẻo Quýt (chiếm 17,56%).

Đối kháng với cả 3 dòng *Xanthomonas* spp. trên, kết quả ghi nhận 46 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng với số lượng dòng vi khuẩn từ 3 vùng Tràm Chim, Gáo Giồng và Xẻo Quýt lần lượt là 26 (chiếm 56,52%), 12 (chiếm 26,09%), 8 (chiếm 17,39%). Trong đó, 17 dòng vi khuẩn thể hiện hoạt tính đối kháng tích cực (Bảng 1) với $D > 15$ mm với nguồn phân lập từ Tràm Chim (đạt 7 dòng – 41,18%), Gáo Giồng (đạt 6 dòng – 35,29%), Xẻo Quýt (đạt 4 dòng – 23,53%). Khi xét khả năng phân lập các dòng vi khuẩn đối kháng tích cực so với tổng số dòng vi khuẩn được phân lập của từng vùng, Gáo Giồng cho tỷ lệ đạt cao nhất tương ứng 4,3% (với 6/138 dòng), sau đó là Xẻo Quýt đạt 3,92% (với 4/102 dòng) và cuối cùng là Tràm Chim đạt 2,31% (với 7/303 dòng). Từ kết quả thu được ghi nhận tại thời điểm 24 giờ sau khi thử nghiệm (Hình 1), các nghiệm thức của 17 dòng vi khuẩn đều cho thấy khả năng ức chế 3 dòng vi khuẩn *Xanthomonas* spp. qua trung bình đường kính vùng ức chế từ 16,5 đến 31,7 mm. Trong đó, có 3 dòng vi khuẩn thu thập lần lượt từ Tràm Chim (dòng T265), Gáo Giồng (dòng G24), Xẻo Quýt (dòng X61) có trung bình đường kính vùng ức chế cao nhất từ 26,6 đến 31,7 mm, khác biệt so với các dòng vi khuẩn còn lại (Bảng 1), và khác biệt với đối chứng dương sử dụng thuốc trừ bệnh hoạt chất oxolinic acid 20% (28,5 mm).

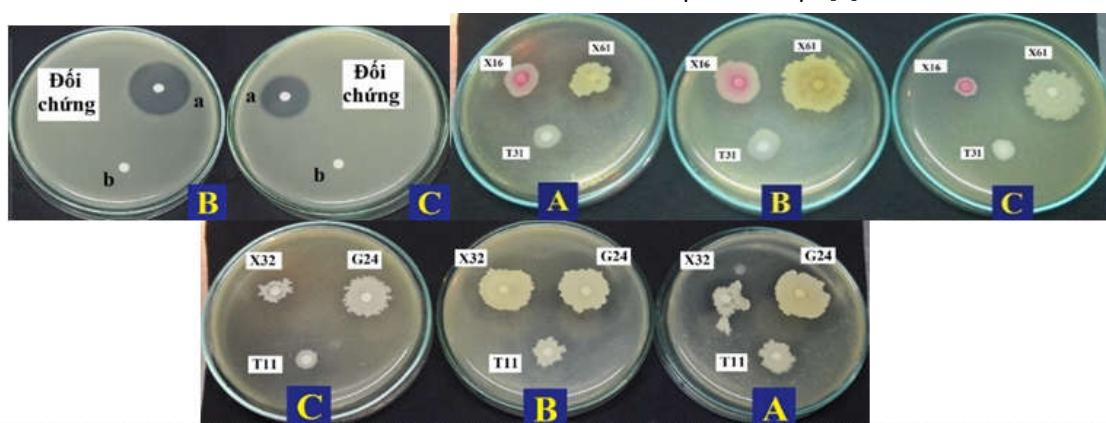
Bảng 1. Đường kính vùng ức chế của 17 dòng vi khuẩn đối kháng triển vọng đối với 3 dòng vi khuẩn gây bệnh *Xanthomonas* spp. (XR13, XR9, XR18)

STT	Nghiệm thức (vi khuẩn)	Đường kính vùng ức chế (mm)			
		XR13	XR9	XR18	TB
1	T11	16,2 ^{fg}	22,5 ^{if}	22,8 ^d	20,5 ^{EFG}
2	T65	15,2 ^e	17,5 ^j	17,8 ^{fg}	16,8 ^{IJ}
3	T88	17,7 ^{ef}	20,0 ^{gh}	22,2 ^d	19,9 ^{FG}
4	T103	15,8 ^{fg}	18,2 ^{hij}	19,5 ^{ef}	17,8 ^{IJ}
5	T169	15,7 ^{fg}	16,7 ⁱ	17,7 ^{fg}	16,7 ^{IJ}
6	T185	16,5 ^{fg}	18,7 ^{hij}	18,3 ^{fg}	17,8 ^{IJ}
7	T265	21,2 ^{cd}	30,2 ^{bc}	28,5 ^b	26,6 ^C
8	G24	28 ^b	32,5 ^b	33,7 ^a	31,4 ^A
9	G32	16,7 ^{fg}	17,5 ^{ij}	19,7 ^{ef}	17,9 ^{HI}
10	G52	17,2 ^{efg}	19,3 ^{hi}	21,5 ^{de}	19,3 ^{GH}
11	G71	15,3 ^e	17,5 ^j	16,7 ^e	16,5 ^J
12	G85	16,7 ^{fg}	18,3 ^{hij}	17,7 ^{fg}	17,6 ^{IJ}
13	G111	19,0 ^{de}	22,2 ^{fg}	21,3 ^{de}	20,8 ^{EF}
14	X16	16,0 ^{fg}	26,0 ^c	25,5 ^c	22,5 ^D
15	X32	19,0 ^{de}	27,2 ^{de}	19,5 ^{ef}	21,9 ^{DE}
16	X61	31,5 ^a	35,0 ^a	28,7 ^b	31,7 ^A
17	X84	16,3 ^{fg}	19,3 ^{hi}	18,2 ^{fg}	17,9 ^{HI}
18	Đối chứng (+)	22,3 ^c	29,0 ^{cd}	34,2 ^a	28,5 ^B
TB		18,7 ^B	22,6 ^A	22,4 ^A	
CV%		23,96	25,41	24,62	

Chú thích: Các số trung bình trong một bảng theo sau bởi một hoặc nhiều chữ in thường giống nhau thì giống nhau hoặc khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% theo phép thử Tukey. Đối với chữ in hoa cũng tương tự cách giải thích. TB: Trung bình; Đối chứng (+): Đối chứng dương sử dụng thuốc trừ bệnh hoạt chất oxolinic acid 20%.

Trong cùng thời gian với các nghiệm thức vi khuẩn, kết quả cũng ghi nhận sự nhạy cảm của 3 dòng vi khuẩn gây bệnh qua trung bình đường kính vùng ức chế từ 18,7 đến 22,6 mm. Trong đó, hai dòng vi khuẩn *Xanthomonas* spp. XR9 và XR18 có sự nhạy cảm và bị ức chế như nhau (trung bình từ 22,4 đến 22,6 mm), khác biệt và cao hơn dòng XR13 (trung bình 18,7 mm). Nhìn chung, ba dòng vi khuẩn đối kháng triển vọng T265, X61, G24 đã được ghi nhận và tuyển chọn. Những dòng vi khuẩn này có tiềm năng trong việc ứng dụng như tác nhân kiểm soát sinh học, tiếp tục được xác định danh pháp nhờ vào phương pháp MALDI-TOF-MS.

Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu về phân lập vi khuẩn từ đất có khả năng đối kháng mầm bệnh do *Xanthomonas* spp. gây ra. Trong đó, 15 dòng *B. velezensis* đã được phân lập từ các vùng sinh thái Hoàng Liên, Cúc Phương, Bạch Mã, Chư Yang Sin và Côn Đảo, được ghi nhận có hoạt tính kháng nhiều loại nấm hại cây trồng và vi khuẩn gây bệnh bạc lá lúa *Xanthomonas oryzae*, với kích thước vòng đối kháng ức chế *X. oryzae* trung bình là 20,8 mm. Ngoài khả năng đối kháng, các dòng này còn có khả năng kích thích sinh trưởng cây trồng [13]. Một nghiên cứu khác nhằm phát huy tiềm năng của trực khuẩn bản địa ở Đài Loan trong việc kiểm soát bệnh thối nhũn trên cây có mùi do *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, các loài thuộc chi *Bacillus* có phổ đối kháng rộng với các mầm bệnh trên lá (phytopathogens) khác nhau đã được phân lập từ thực vật ngoài tự nhiên, từ đất và phát triển thành thuốc trừ bệnh sinh học [6].



Hình 1. Hiệu quả đối kháng của một số dòng vi khuẩn đối kháng đối với ba dòng vi khuẩn gây bệnh *Xanthomonas* spp. sau 24 giờ thử nghiệm

Ghi chú: A: XR18; B: XR9; C: XR13; a: Đối chứng dương- thuốc trừ bệnh hoạt chất oxolinic acid 20%, b: đối chứng âm – môi trường nutrient broth được khử trùng.

3.2. Xác định danh pháp một số dòng vi khuẩn đối kháng triển vọng dựa vào kỹ thuật MALDI-TOF-MS.

Sau khi sàng lọc các dòng vi khuẩn đối kháng *in vitro*, dựa trên kỹ thuật MALDI-TOF-MS, một số dòng vi khuẩn đối kháng tích cực tiếp tục được xác định danh pháp, đặc biệt là trên 3 dòng vi khuẩn đối kháng triển vọng (T265, G24, X61). Kết quả phân tích (Bảng 2) ghi nhận dòng T11 phù hợp nhất với chi *Enterobacter* với giá trị điểm (score value) lớn hơn 1,7 (hay >1,7), đạt 1,726, nhưng với phân tích lần 2 lại chưa xác định được dòng phù hợp. Với giá trị điểm của dòng X32 >1,7 (đạt từ 1,899 đến 1,774) cho 2 lần phân tích cho thấy dòng này phù hợp nhất với chi *Bacillus*. Đồng thời, dòng G24 cũng được ghi nhận phù hợp nhất với chi *Bacillus* với giá trị điểm >1,7 (đạt từ 1,892 đến 1,874). Trong khi đó,

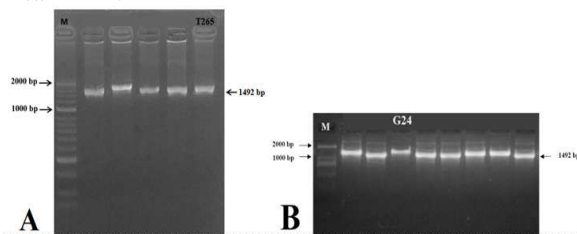
dòng X61 lại được xác định phù hợp nhất đến loài *Bacillus subtilis* với giá trị điểm >2 (đạt 2,012) và phù hợp đến chi *Bacillus* cho lần phân tích thứ hai với giá trị điểm >1,7 (đạt 1,948). Với cả hai lần phân tích đều đạt giá trị điểm >2 (lần lượt là 2,236; 2,176), dòng X16 được ghi nhận phù hợp nhất với loài *Serratia marcescens*. Tuy nhiên, kết quả phân tích lại chưa xác định được danh pháp đối với dòng T265 với giá trị điểm <1,7. Nhìn chung, phần lớn các dòng vi khuẩn trên đều được xác định đến mức độ chi (T11, G24, X32, X61, X16), trong đó hai dòng vi khuẩn được xác định đến mức độ loài (X61, X16). Đối với ba dòng vi khuẩn triển vọng T265, G24, X61, dòng X61 được xác định đến mức độ loài (*Bacillus subtilis*), dòng G24 chỉ đến mức độ chi (*Bacillus* sp.), duy nhất dòng T265 cần được xác định thêm dựa vào các kỹ thuật khác.

Bảng 2. Danh pháp một số dòng vi khuẩn đối kháng triển vọng dựa vào kỹ thuật MALDI-TOF-MS.

Tên phân tích	Tên dòng VK	Dòng vi sinh vật (phù hợp nhất)	Giá trị điểm (SV)	Dòng vi sinh vật (phù hợp thứ hai)	Giá trị điểm (SV)
D8 (+) (B)	T11	<i>Enterobacter radicincitans</i>	1,726	Không xác định được chi và loài	1,668
D9 (+) (B)	T265	Không xác định được chi và loài	1,681	Không xác định được chi và loài	1,669
D10 (+) (B)	X32	<i>Bacillus subtilis</i>	1,899	<i>Bacillus subtilis</i>	1,774
D11 (++) (A)	X61	<i>Bacillus subtilis</i>	2,012	<i>Bacillus subtilis</i>	1,948
D12 (++) (A)	X16	<i>Serratia marcescens</i>	2,236	<i>Serratia marcescens</i>	2,176
E10 (+) (B)	G24	<i>Bacillus subtilis</i>	1,892	<i>Bacillus subtilis</i>	1,874

Chú thích. (+): Ký hiệu thể hiện giá trị điểm từ 1,700 đến 1,999 tương ứng có thể xác định đến chi, (++): Ký hiệu thể hiện giá trị điểm từ 2,000 đến 2,299, tương ứng xác định chính xác chi và có thể xác định đến loài. A: thể hiện kết quả đầu tiên (hay phù hợp nhất) có cùng loài với kết quả thứ hai (có SV >2), hoặc ít nhất cùng chi (có SV >1,7); B: thể hiện đầu tiên (kết quả phù hợp nhất) đạt ít nhất cùng một chi với kết quả thứ hai (có SV >1,7). SV: giá trị điểm (Score value).

3.3. Xác định danh pháp hai dòng vi khuẩn đối kháng triển vọng dựa vào kỹ thuật giải trình tự gen 16S rRNA.



Hình 2. Kết quả điện di của gen 16S rRNA khuếch đại của hai dòng vi khuẩn đối kháng triển vọng T265 và G24

Ghi chú: A: Hình điện di theo dòng T265 với thang chuẩn M (50 kDa, Bioline); B: Hình điện di theo dòng G24 với thang chuẩn M (50 kDa,

DL2000); các dòng thử nghiệm được đặt tên trên mỗi làn (lane) điện di.

Trong 3 dòng vi khuẩn đối kháng triển vọng được tuyển chọn, dòng X61 đã được định danh là *Bacillus subtilis* dựa vào kỹ thuật MALDI-TOF-MS, hai dòng còn lại là T265 và G24 được xác định thêm dựa vào phân tích trình tự gen 16S rRNA (Hình 2). Kết quả phân tích ghi nhận dòng vi khuẩn T265 cho thấy độ tương đồng cao nhất là 98,50%, với giá trị E là 0,0, đối với các dòng *Paenibacillus elgii* có các số hiệu gia nhập (accession number) trên Ngân hàng gen là KT862890 và 98,49% với *Paenibacillus elgii* HQ236085. Trong khi đó, dòng vi khuẩn G24 thể hiện sự tương đồng 99,49% với *Bacillus subtilis* MK859998 và EF530208.2, với giá trị E là 0,0. Nhìn chung, qua phân tích trình tự gen 16S rRNA, dòng

T265 được chỉ định là *Paenibacillus elgii*, trong khi dòng G24 là *B. subtilis*. Các trình tự gen 16S rRNA của dòng vi khuẩn T265 và G24 đã được đăng ký lên GenBank lần lượt với số hiệu gia nhập lần lượt là MZ841643, MZ841644.

Thuốc trừ bệnh hoạt chất hóa học, kiểm soát sinh học đang trở thành phương pháp được ưa chuộng để quản lý bệnh hại cây trồng đang gây ra những tác động bất lợi. Trong nghiên cứu này, *B. subtilis* và *Paenibacillus elgii* ức chế sự phát triển của *Xanthomonas* spp. Những khả năng này phù hợp với kết quả của nhiều nghiên cứu liên quan đến hoạt tính kháng khuẩn của *B. subtilis*, *Paenibacillus* spp. trong việc kiểm soát mầm bệnh vi khuẩn thực vật [2, 10].

Bên cạnh đó, hai dòng *B. subtilis* TKS1-1 đã được đưa ra để giảm sự phát triển của bệnh thối rữa trên cây có múi do *Xanthomonas citri* subsp. *citri* [5]. Mặt khác, trên dưa chuột, *B. subtilis* kiểm soát hiệu quả *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* gây bệnh đốm lá vi khuẩn [15]. Do đó, các dòng vi khuẩn đối kháng triển vọng trong nghiên cứu này có thể khả thi trong việc quản lý bệnh đốm lá do vi khuẩn trên cây hoa hồng (*Rosa* spp.).

Theo Ghazalibiglar *et al.* (2015) [3], dòng vi khuẩn P16 thuộc chi *Paenibacillus* có khả năng làm giảm tỷ lệ bệnh thối đen do hai dòng *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) trên cây bắp cải. Ngoài ra, dòng vi khuẩn này còn được xác định có khả năng kích thích sinh trưởng và kích kháng trên cây bắp cải trước Xcc. Bên cạnh đó, khi Le *et al.* (2020) [7] nghiên cứu trên *Paenibacillus elgii* JCK-5075 đã ghi nhận khả năng sản xuất pelgipeptins (PGPs), hiệu quả kháng khuẩn của môi trường lên men *Paenibacillus elgii* JCK-5075 và các hợp chất kháng khuẩn của nó có khả năng chống lại vi khuẩn gây bệnh thực vật dựa trên các khảo sát *in vitro* và *in vivo*.

4. KẾT LUẬN

Trong điều kiện của một số vùng sinh thái ở tỉnh Đồng Tháp, 17 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng tích cực đối với 3 dòng vi khuẩn *Xanthomonas* spp. (XR9, XR13, XR18) gây bệnh đốm lá vi khuẩn trên cây hoa hồng. Trong đó, 3 dòng vi khuẩn triển vọng là T265, G24 và X61 có khả năng đối kháng cao nhất. Bằng kỹ thuật MALDI-TOF-MS, dòng X61 được xác định là *B. subtilis* và dòng G24 được xác định là *Bacillus* sp.. Qua phân tích kết quả giải trình tự gen 16S rRNA, dòng T265 được xác định là *Paenibacillus*

elgii và dòng G24 là *B. subtilis*. Trình tự gen trên của 2 dòng T265 và G24 được đăng ký accession number trên genbank lần lượt là MZ841643, MZ841644. Kết quả nghiên cứu vi sinh vật bản địa tại Đồng Tháp đã xác định được loài *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus elgii* có khả năng ức chế cao đối với vi khuẩn *Xanthomonas* spp. gây bệnh đốm lá trên cây hoa hồng và cần được tiếp tục nghiên cứu để phát triển thành chế phẩm sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agrios, G. N., 2005. *Plant pathology*. Elsevier Academic Press, p948.
2. Fira, D., Dimkic, I., Berić, T., Lozo, J., & Stankovic, S., 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species, *Journal of Biotechnology*, 285:44–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>.
3. Ghazalibiglar, H., Hampton, J.G., Jong, E. Z., & Holyoake, A., 2015. Evaluation of *Paenibacillus* spp. isolates for the biological control of black rot in *Brassica oleracea* var. *capitata* (cabbage). *Biocontrol Science and Technology*, 26(4):504–515. <https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1129025>.
4. Huang, C.-H., Vallad, G.E., Adkison, H., Summers, C., Margenthaler, E., Schneider, C., Hong, J., Jones, J. B., Ong, K., & Norman, D. J., 2013. A novel *Xanthomonas* sp. causes bacterial spot of rose (*Rosa* spp.). *Plant Disease*, 97:1301-1307. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-12-0851-RE>
5. Huang, T.-P., Tzeng, D.D.-S., Wong, A.C.L., Chen, C.-H., Lu, K.-M., Lee, Y.-H., Huang, W.-D., Hwang, B.-F., & Tzeng, K.-C., 2012. DNA polymorphisms and biocontrol of *Bacillus* antagonistic to citrus bacterial canker with indication of the interference of phyllosphere biofilms. *PLoS ONE*, 7:e42124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042124>
6. Huang, T., Chen, C., Lee, Y., Hwang, B., Tzeng, D., & Tzeng, K., 2011. Genetic diversity of antagonistic *Bacillus subtilis* against citrus canker bacteria. *The 2011 APS-IPPC Joint Meeting, Phytopathology*, Hawaii, 101 (6): S76. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2011.101.6.S1>
7. Le, D. K., Kim, J., Yu, N. H., Kim, B., Lee, C. W., & Kim, J. C., 2020. Biological Control of Tomato Bacterial Wilt, Kimchi Cabbage Soft Rot and Red Pepper Bacterial Leaf Spot Using *Paenibacillus elgii*

- JCK-5075. *Frontiers in Plant Science*, 11:775. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00775>
8. Li, B., Xu, L. H., Lou, M. M., Li, F., Zhang, Y. D., & Xie, G. L., 2008. Isolation and characterization of antagonistic bacteria against bacterial leaf spot of *Euphorbia pulcherrima*. *Letters in Applied Microbiology*, 46:450–455. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02337.x>
9. Nguyễn Thị Thu Cúc, Trần Thị Thu Thủy, 2014. Dịch hại trên hoa Hồng-Cúc-Mai-Vạn thọ. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, p25-26.
10. Maheshwari, D. K. (editor) 2013. *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p495.
11. Ribeiro, D. G., Carmo, L. S. T., Santos, I. R., Almeida, R. F., Silva, L. P., Oliveira-Neto, O. B., Scherwinski-Pereira, J. E., & Mehta, A., 2019. MALDI TOF MS-profiling: Applications for bacterial and plant sample differentiation and biological variability assessment. *Journal of Proteomics*, 213:103619. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103619>
12. Roberts, P. D., Berger, R. D., Jones, J. B., Chandler, C. K., & Stall, R. E., 1997. Disease progress, yield loss, and control of *Xanthomonas fragariae* on strawberry plants. *Plant Disease*. 81:917-921. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.8.917>
13. Trịnh Thành Trung, Đinh Thị Tuyết Vân, Nguyễn Phương Liên, Đào Thị Lương, Dương Văn Hợp, 2017. Tiềm năng ứng dụng tạo chế phẩm làm phân bón hữu cơ sinh học từ các dòng vi khuẩn *Bacillus velezensis* phân lập từ các vùng sinh thái khác nhau tại Việt Nam. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 15(1): 169-179.
14. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J., 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*, 173(2):697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
15. Zerrouh, H., Romero, D., García-Gutiérrez, L., Cazorla, F.M., Vicente, A., & Pérez-García, D., 2011. The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(12):1540–1552. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0162>

ISOLATION AND IDENTIFICATION THE ANTAGONISTIC BACTERIA FROM THE
INDIGENOUS ECOLOGICAL AREA TO INHIBIT *Xanthomonas* spp. CAUSING THE LEAF
SPOT ON ROSE (*Rosa* spp.)

Le Uyen Thanh, To Lan Phuong,
Tran Dinh Gioi, Nguyen Duc Do

Summary

From three indigenous ecological area include Tram Chim National Park, Gao Giong eco-tourism area, and Xeo Quyt National Relic Area in Dong Thap province, 543 bacterial isolates were isolated and tested for their antagonistic ability with three strains of *Xanthomonas* spp. (XR9, XR13, XR18) causing the leaf spot on rose (*Rosa* spp.). The results showed 17 indigenous isolates with diamete of the inhibition zones (D >15 mm) against all three pathogenic strains. In which, three isolates (T265, G24 and X61) are potential antagonists with the highest inhibitory zone diameters, have been selected for identification. Through the MALDI-TOF-MS technique, two isolates of X61 and G24 were identified as belonging to the genus *Bacillus* and only the X61 isolate was identified as *B. subtilis*, while the isolate T265 is not reliable identification. Two isolates of T265 and G24 were further identified through 16S rRNA gene sequencing. The results showed that the T265 isolate were shared the highest similarity values in turn with *Paenibacillus elgii* MN160320 (98.50%), *P. elgii* HQ236085 (98.49%), while the G24 isolate was similar at 99.49% with *Bacillus subtilis* MK859998 and EF530208.2. The T265 is proposed as *Paenibacillus elgii* MZ841643 and the G24 is designed *Bacillus subtilis* MZ841644. These antagonistic isolates have shown potential to control baterial phytopathogens causing leaf spot disease of rose in Dong Thap.

Keywords: Leaf spot disease, rose, MALDI-TOF-MS, biological control, *Xanthomonas* spp, 16S rRNA gene.

Người phản biện: GS.TS. Nguyễn Văn Tuất

Ngày nhận bài: 19/7/2021

Ngày thông qua phản biện: 20/8/2021

Ngày duyệt đăng: 27/8/2021