

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VI KHUẨN NỘI SINH ĐỐI KHÁNG VỚI NẤM *EXOBASIDIUM VEXANS* GÂY BỆNH PHÒNG LÁ CHÈ

ISOLATION AND SELECTION OF ENDOGENOUS BACTERIA THAT ARE ANTAGONISTIC TO THE FUNGUS *EXOBASIDIUM VEXANS* CAUSING TEA LEAF BLISTER DISEASE

Nguyễn Thị Hồng Hải*, Phạm Thị Lý Thu*
Trịnh Thị Thu Hằng†

Ngày tòa soạn nhận được bài báo: 02/03/2022

Ngày nhận kết quả phản biện đánh giá: 05/09/2022

Ngày bài báo được duyệt đăng: 27/09/2022

Tóm tắt: Bệnh phòng lá chè do nấm *Exobasidium vexans* gây hại ở lá non, búp non trên cây chè. Bệnh có mức độ lan nhanh, gây ảnh hưởng nghiêm trọng tới năng suất và chất lượng chè búp. Mục tiêu của nghiên cứu là phân lập tuyển chọn vi khuẩn nội sinh đối kháng với nấm gây bệnh *Exobasidium vexans* như một tác nhân phòng trừ sinh học. Từ 14 chủng vi khuẩn nội sinh trong mẫu rễ, thân và lá cây chè, đã tuyển chọn được 3 chủng vi khuẩn nội sinh Y2.2, Y2.5 và Y2.7 có hoạt tính đối kháng cao với nấm gây bệnh *Exobasidium vexans* (kính thước vòng đối kháng từ 0,7- 1,9 cm) trong điều kiện *in vitro*. Sau 3 ngày đồng nuôi cấy các chủng vi khuẩn này với nấm *Exobasidium* cho thấy sợi nấm bị gãy vụn và dần không phát triển được. Kết quả giải trình tự đoạn 16S rDNA của 2 chủng vi khuẩn Y2.2 và Y2.5 cho thấy chủng Y2.2 có tỉ lệ tương đồng với vi khuẩn *Bacillus subtilis* SMY, NCIB 3610 là 100% và chủng Y2.5 có mức tương đồng với vi khuẩn *Burkholderia cepacia* là 100%

Từ khóa: Vi khuẩn nội sinh, nấm *Exobasidium vexans*, lá chè.

Abstract: Tea leaf blister disease caused by the fungus *Exobasidium vexans* damages young leaves and young buds on tea plants. The disease has a rapid spread, seriously affecting the yield and quality of tea buds. The objective of the study was to selectively isolate endogenous bacteria that are antagonistic to the pathogenic fungus *Exobasidium vexans* as a biological control agent. From 14 isolates of endophytic bacteria in samples of shoots, stems and roots of tea plants, 3 strains of endophytic bacteria Y2.2, Y2.5 and Y2.7 were selected with high antagonistic activity against the pathogenic fungus *Exobasidium vexans*. (optimal ring diameter from 0.7 to 1.9 cm) under *in vitro* conditions. After 3 days of co-culture of these strains with *Exobasidium*, the mycelium was broken and gradually failed to grow. The results of sequencing 16S rDNA fragments of two strains of bacteria Y2.2 and Y2.5 showed that

* Viện Di truyền Nông nghiệp

† Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm – Trường Đại học Mở Hà Nội

strain Y2.2 had 100% similarity with *Bacillus subtilis* SMY, NCIB 3610 was 100% and strain Y2.5 had a similarity rate. 100% similarity to *Burkholderia cepacia*

Keywords: Endogenous bacteria, fungus *Exobasidium vexans*, tea leaves

I. Đặt vấn đề

Chè (*Camellia sinensis* (L.) không chỉ là thức uống giải khát hàng ngày mà còn là một nét văn hóa đặc trưng của người dân châu Á. Chè được coi là chất kháng sinh tự nhiên giúp cơ thể khỏe mạnh phòng chống được nhiều bệnh tật, đây là thức uống bổ dưỡng cho sức khỏe có nguồn gốc tự nhiên được nhiều nơi trên thế giới ưa chuộng. Hơn nữa, chè còn là cây công nghiệp có giá trị kinh tế cao. Tuy nhiên nghề trồng chè phải đối mặt với không ít khó khăn do sâu bệnh hại. Đây là những yếu tố chính làm giảm năng suất và chất lượng chè nguyên liệu. Các loại sâu bệnh gây hại chè bao gồm: rầy xanh, bọ cánh tơ, nhện đỏ nâu, bọ xít muỗi, sâu cuốn lá non, sâu cuốn búp, rệp muội, sâu róm, sâu chùm, bọ net, bọ net tơ không gai, ruồi đục lá, sâu xé lá, bọ xít bông, nhóm sâu kèn, sâu đục thân đỏ, mối hại chè, bọ xít hoa hại quả chè, rệp sáp,... Ngoài côn trùng, một phần lớn các bệnh hại chè có nguồn gốc từ nấm. Đã có hơn 300 loài nấm được báo cáo là gây hại đến các phần khác nhau của cây chè [1], [6]. Là loại cây lấy lá nên bệnh trên lá được quan tâm nhất vì nó dẫn đến mất mùa vụ trực tiếp và suy giảm chất lượng của sản phẩm cuối cùng [3]. Các loại bệnh gây hại trên lá chủ yếu gồm: bệnh phòng lá chè, bệnh phòng lá chè mất lưới, bệnh đốm nâu, bệnh đốm xám, loét cành, đốm mắt cua, bệnh táo, tóc đen, sùi cành chè,... Các loại nấm khác nhau sẽ có những triệu chứng gây bệnh và mức độ thiệt hại khác nhau cho cây chè. Trong số những bệnh ở trên thì bệnh phòng lá chè do nấm *Exobasidium vexans* Masee là loại bệnh gây hại rất nghiêm trọng và phổ biến rộng rãi ở nhiều vùng trồng chè trên thế giới như Ấn Độ, Pakistan, Trung Quốc, Xaylan, Srilanca, Nhật Bản,...[4] và nhiều vùng trồng chè

của Việt Nam (bệnh gây hại trên 150 ha chè ở Thái Nguyên (công thông tin điện tử huyện Đông Hỷ, Thái Nguyên, 2020)). Bệnh này đã gây thiệt hại 50% năng suất chè tại phía Nam Ấn Độ vào những năm 1998. Bệnh gây hại chủ yếu trên búp non làm búp khô cháy, cây sinh trưởng kém, thời gian ra búp chậm, khi chế biến dễ bị vụn nát, chất lượng kém, mất hương vị [4]. Việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật trong kiểm soát bệnh phòng lá chè đã có những kết quả khả quan. Tuy nhiên, lạm dụng thuốc hóa học sẽ gây ra độc tính thực vật, gây ô nhiễm môi trường và lượng thuốc tồn dư trên lá khi pha trà sẽ ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Do đó, việc sử dụng các tác nhân kiểm soát sinh học đang được sự tâm và sử dụng trong kiểm soát bệnh phòng lá chè.

Vi khuẩn nội sinh tạo một ổ sinh thái tương tự như ổ sinh thái của các vi khuẩn gây bệnh thực vật, đặc biệt là các mầm bệnh xâm nhiễm mạch gây héo. Điều này tạo cho vi khuẩn nội sinh trở nên ưu thế khi sử dụng như các tác nhân phòng trừ sinh học [7]. YuJing và cộng sự đã phân lập được 11 chủng vi khuẩn nội sinh thuộc các chi *Rhodobacter*, *Microbacterium*, *Rhizobium*, *Variovorax*, *Rhizobium* và *Variovorax* từ các mẫu chồi, rễ cây chè được trồng ở các nông trường chè thuộc Phúc Kiến Trung Quốc. Các chủng vi khuẩn nội sinh này có hoạt tính đối kháng cao với các tác nhân gây bệnh như: *Escherichia coli*, *Verticillium dahliae*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Ralstonia solanacearum*, *Verticillium longisporum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*, *Exobasidium vexans* and *Colletotrichum orbiculare* [18]. Sử dụng hỗn hợp các chủng *Trichoderma harzianum*, *Gliocladium virens*, *Serratia*

marcescens, *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* đã hạn chế được bệnh phòng lá do nấm *Exobasidium vexans* gây ra trên chè [14], [15], [17]. Các chủng *Pseudomonas fluorescens* và *Bacillus subtilis* có bổ sung các chất dinh dưỡng như $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và acid salicylic như một chế phẩm dạng lỏng đã làm giảm đáng kể tỷ lệ mắc bệnh phòng lá trên cây chè [16]. Tại Việt Nam, các biện pháp thường dùng trong phòng trừ bệnh phòng lá chè gồm: vệ sinh nương chè, sử dụng các chất hóa học có nguồn gốc tự nhiên, các hợp chất có nguồn gốc hóa học, phòng trừ sinh học, phòng trừ tổng hợp và sử dụng các công nghệ sinh học hiện đại để chọn tạo giống kháng mà chưa có nghiên cứu nào về sử dụng vi khuẩn nội sinh trong phòng trừ bệnh phòng lá gây hại cây chè xanh. Mục đích của nghiên cứu này nhằm thu thập, phân lập, tuyển chọn vi khuẩn nội sinh trên cây chè ở 2 tỉnh của miền Bắc Việt Nam và đánh giá hoạt tính đối kháng của vi khuẩn nội sinh phân lập được với nấm *Exobasidium vexans* gây bệnh phòng lá chè.

II. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Chủng nấm gây bệnh phòng lá chè *Exobasidium vexans* NB1 được cung cấp bởi phòng Công nghệ Vi sinh, Viện Di truyền Nông nghiệp

- Mẫu rễ, thân và lá cây chè khỏe giống Shan, PH1, Bát tiên được thu thập tại Yên Bái, Phú Thọ

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn nội sinh (Pillay và Nowak, 1997)

Các mẫu rễ, thân, lá cây chè được thu thập để phân lập vi khuẩn nội sinh là những mẫu thuộc cây chè khỏe, lâu năm ở phía dọc đường đi và bên trong nương chè của Yên Bái và Phú Thọ. Các mẫu đất được đựng trong túi nilon, dán nhãn,

mang về phòng thí nghiệm và bảo quản ở 4°C cho tới khi sử dụng.

Lấy 3 cm phần rễ, thân, lá của cây chè... rửa sạch bằng nước, sau đó khử trùng bề mặt bằng cồn (ethanol) và dung dịch hypochlorit. Rửa lại nhiều lần bằng nước cất khử trùng. Mẫu được nghiền nát trong nước cất khử trùng. Thu phần dịch huyền phù, pha loãng và trải đều trên môi trường KB và YPDA (mật độ tế bào trong dung dịch sao cho sau khi ủ ở 28°C ÷ 30°C trong 24 ÷ 48 giờ có thể nhìn rõ các khuẩn lạc riêng biệt). Chọn những khuẩn lạc có hình thái điển hình theo những đặc điểm như: hình thái, kích cỡ, màu sắc ..., làm sạch và được bảo quản trên môi trường thạch nghiêng KB, YPDA ở 4°C hoặc glycerol 30% ở -80°C.

2.2.2. Xác định vị trí dòng của vi khuẩn nội sinh trong mô rễ cây chè (Patriquin và cs, 1978)

Bổ sung vi khuẩn phân lập được vào phần rễ cây chè (cây chè có 8-9 lá thật) với mật độ 10⁷tb/gam đất. Sau 10 ngày bổ sung vi khuẩn, thu mẫu rễ cây chè, rửa sạch và ủ qua đêm trong dung dịch PBMT, rồi cắt lát mỏng và quan sát sự chuyển động và vị trí tạo dòng của vi khuẩn dưới kính hiển vi.

2.2.3. Đánh giá hoạt lực của các chủng vi khuẩn nội sinh đối kháng với nấm gây bệnh *Exobasidium vexans* (in vitro) (Barka và cs, 2001)

* Phương pháp khuếch tán lỗ thạch:

- Lấy một khoan có các sợi nấm bệnh *Exobasidium vexans* đặt vào giữa đĩa petri có chứa môi trường YPDA.

- Các chủng vi khuẩn nội sinh được nuôi lắc trong môi trường KB (pH 7) ở 28°C ÷ 30°C, 150 rpm trong 36 giờ (cuối pha log). Điều chỉnh để nồng độ vi khuẩn đạt 10⁶ tế bào/ml.

- Đục lỗ thạch đường kính 1cm trên đĩa môi trường YPDA (1,5% agar) sau đó

nhỏ 1 giọt thạch vào đáy lỗ để tránh rò rỉ. Tất cả các lỗ thạch phải cách xa hệ sợi nấm bệnh 1cm (nấm bệnh đã được 2 ngày nuôi cấy). Nhỏ 100µl dịch vi khuẩn vào lỗ thạch. Đối chứng âm là lỗ thạch được nhỏ môi trường KB không có vi khuẩn.

- Mỗi chủng được lặp lại với 5 lỗ thạch và chỉ có các chủng có triển vọng mới được lựa chọn để thử nghiệm đối kháng theo phương pháp đồng nuôi cấy.

** Phương pháp đồng nuôi cấy:*

- Lấy một khoanh có các sợi nấm bệnh *Exobasidium vexans* đường kính 5mm sau khi đã được cấy trên đĩa thạch YPDA cho vào ống nghiệm có chứa 1ml môi trường YPDA lỏng và 1ml dịch vi khuẩn (được chuẩn bị như trên).

- Nuôi lắc hỗn hợp này ở 120rpm, 30°C trong 48 giờ. Đối chứng âm được chuẩn bị tương tự nhưng không có vi khuẩn.

- Hiệu quả ức chế nấm bệnh *Exobasidium vexans* phát triển của các chủng vi khuẩn đối kháng được tính theo công thức của Nawa như sau: (% ức chế = $\{[A - B]/A\} \times 100$, trong đó A là trọng lượng khô của khuẩn ty nấm đối chứng âm, B là trọng lượng khô của khuẩn ty nấm có xử lý vi khuẩn đối kháng).

2.2.4. Phương pháp nhận dạng vi khuẩn nội sinh đối kháng

2.2.4.1. Nhận dạng dựa vào các đặc điểm nuôi cấy

Xác định một số đặc điểm sinh lý, sinh hoá cơ bản của các chủng vi khuẩn nội sinh đối kháng gồm các phản ứng: Gram, hiếu khí, kỵ khí, phát triển trên môi trường YDC, phát quang trên môi trường KB, khuếch tán trên môi trường KB, Oxidase, phát triển trên môi trường thạch DIM...

- Phản ứng Gram: Lấy một đầu que cấy chủng vi khuẩn cần xác định cho vào 2 giọt KOH 3% và trộn đều. Nếu thấy hỗn

hợp này nhớt tức là phản ứng Gram âm, nếu không nhớt là phản ứng Gram dương.

- Khả năng phát quang trên môi trường KB: Cấy vi khuẩn cần xác định thành các vệt trên môi trường KB và nuôi ở 25°C. Sau 48h quan sát khả năng phát quang dưới đèn tử ngoại với bước sóng 366nm.

- Phát triển hiếu khí và kỵ khí: Môi trường Basal: 2,0 g pepton, 5,0 g NaCl, 0,3 g KH_2PO_4 , 3 g agar, 3ml bromothymol blue (1% dung dịch nước), 1 lít nước cất, pH 7,1. Lấy 5 ml môi trường Basal cho vào các ống tuýp dài 13 cm và khử trùng ở 121°C trong 20 phút, sau đó bổ sung vào mỗi ống tuýp đó 0,5 ml dung dịch glucoza 10% đã khử trùng. Cấy các chủng cần xác định vào các ống tuýp đó, mỗi chủng cấy hai ống, một ống để bình thường (xác định hiếu khí), ống còn lại phủ lên trên bề mặt một lớp parafin dày khoảng 5mm (xác định kỵ khí), nuôi ở 30°C và quan sát sự biến đổi màu. Các chủng có khả năng phát triển là các chủng làm biến đổi màu của môi trường từ màu xanh sang màu vàng.

- Phát triển trên môi trường YDC: Môi trường YDC: 10,0 g cao nấm men, 20,0 g glucoza, 20,0 g canxi cacbonat, 15,0 g agar, 1 lít nước cất. Cấy các chủng cần xác định trên môi trường YDC, nuôi ở nhiệt độ 30°C và quan sát sự phát triển.

- Phát triển trên môi trường DIM: Môi trường DIM: 5 g Cellobioza; 1 g NH_4CL ; 1 g NaH_2PO_4 ; 1 g K_2HPO_4 ; 3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 10 mg Malachine green; 15 g thạch; 1 lít nước cất; pH: 7,0

- Sắc tố không phát quang trên môi trường KB: Cấy vi khuẩn cần xác định thành các vệt trên môi trường KB và nuôi ở 25°C. Sau 48h quan sát khả năng không phát quang dưới đèn tử ngoại với bước sóng 366nm.

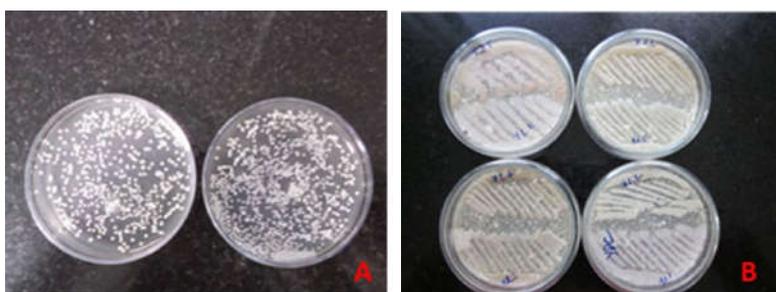
2.2.4.2. Nhận dạng vi khuẩn nội sinh đối kháng bằng giải trình tự gen 16SrRNA

Tách DNA của các chủng vi khuẩn được tuyển chọn và khuếch đại DNA bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi: 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3', 1492r: 5'-GGCTACCTTGTACGACTT-3' (Akasaka và cs, 2002). Sản phẩm sau khi được khuếch đại được điện di trên agarose gel 1,2% bằng bộ điện di một chiều có bổ sung thêm ethidium bromide để kiểm tra sản phẩm. Cuối cùng giải trình tự đoạn DNA được khuếch đại. Được kết quả, dùng chương trình BLAST để so sánh trình tự đoạn DNA của dòng vi khuẩn với trình tự DNA của các loài vi khuẩn có trong ngân hàng dữ liệu NCBI. Trình tự các mẫu vi khuẩn thu được và các mẫu tương đồng trên ngân hàng gen được sử dụng để phân tích trình tự và phá hệ bằng phần mềm MEGA 7.0.

III. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập vi khuẩn nội sinh trên cây chè

Từ các mẫu rễ, thân, lá và búp chè được thu thập tại Yên Bái và Phú Thọ, đã phân lập được 14 chủng vi khuẩn với các đặc điểm hình thái khác nhau. Trong đó có 9 chủng là từ mẫu rễ, 3 chủng là từ thân và 2 chủng là ở lá của cây chè khỏe. Các mẫu rễ của cây được trồng ở cạnh đường đi cho mật độ vi khuẩn nhiều hơn các cây được trồng ở phía trong. Các chủng vi khuẩn này được làm thuần và bảo quản trong môi trường thạch nghiêng KB, YPDA ở 4°C để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.1. Hình thái khuẩn lạc điển hình của vi khuẩn nội sinh cây chè
 Chú thích: A. Hình thái khuẩn lạc vi khuẩn khi phân lập trên môi trường KB; B. Sự phát triển của một số chủng vi khuẩn phân lập được trên môi trường YDC và NBY

Bảng 3.1. Một số đặc điểm cơ bản của vi khuẩn phân lập được

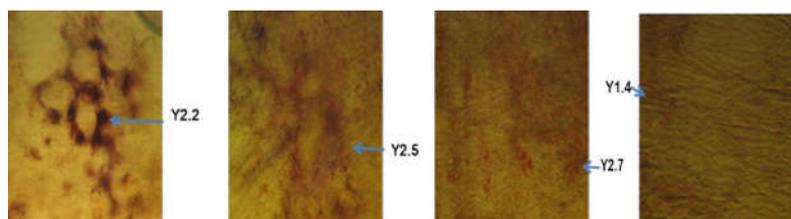
Ký hiệu chủng	Đặc điểm/ Tính chất						
	Gram	Hiếu khí	Kỵ khí	Phát quang trên KB	Phát triển trên D ₁ M	NBY ở 33°C	Nhảy trên YDC
Y1.1	+	+	+	-	-	+	+
Y1.2	+	+	-	-	-	+	+
Y1.3	-	+	+	-	-	+	+
Y1.4	-	+	-	+	-	+	+
Y1.5	+	-	+	+	-	+	+
Y2.1	-	+	-	+	-	+	+
Y2.2	+	-	+	-	-	+	+
Y2.3	-	+	+	-	-	+	+
Y2.4	+	-	+	-	-	+	+
Y2.5	-	+	-	-	-	+	-
Y2.6	-	-	+	-	+	+	+
Y2.7	+	-	+	-	-	+	+
Y5.1	-	+	-	+	-	+	+
Y5.2	-	+	-	-	-	+	+

Chú thích: +: dương tính; -: âm tính

Sau khi phân lập và làm thuần các chủng vi khuẩn nội sinh trên cây chè, đã tiến hành nhận dạng sơ bộ các chủng bằng các đặc điểm nuôi cấy theo như mô tả của N.W.Schaad-2002. Kết quả thu được ở bảng 3.1.

Kết quả thu được trên bảng 3.1 cho thấy có sáu chủng Y1.1, Y1.2, Y1.5, Y2.2, Y2.4, Y2.7 đều là vi khuẩn gram dương, sinh bào tử. Tuy nhiên 3 chủng Y1.5, Y2.2, Y2.7 phát triển trong điều kiện kỵ khí nên các chủng này thuộc chi *Bacillus*, 2 chủng còn lại Y1.2, Y2.4, phát triển trong điều kiện hiếu khí nên các chủng này thuộc chi *Clostridium*. Chủng Y1.1 là chủng hô hấp tùy tiện (vừa phát triển hiếu khí, vừa phát triển kỵ khí) nên chưa có được kết quả.

3.2. Xác định vị trí dòng của vi khuẩn nội sinh trong mô rễ cây chè



Hình 3.2. Sự tồn tại của một số chủng vi khuẩn nội sinh trong gian bào mô rễ cây chè (quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 100x)

Vi khuẩn nội sinh được định nghĩa là vi khuẩn cư trú trong các mô thực vật không gây hại cho thực vật. Vi khuẩn nội sinh tạo một ổ sinh thái tương tự như ổ sinh thái của các vi khuẩn gây bệnh thực vật. Điều này tạo cho vi khuẩn nội sinh trở nên ưu thế khi sử dụng như các tác nhân phòng trừ sinh học. Mục đích của nghiên cứu này nhằm khẳng định có vi khuẩn tồn tại trong mô rễ cây chè hay không. Thí nghiệm được thực hiện như đã mô tả trong phương pháp nghiên cứu (mục 2.2.2).

Sau khi ủ qua đêm trong đệm PBMT khử tetrazolium, mô thực vật có thể quan sát thấy bằng mắt thường và vi khuẩn khử tetrazolium có thể quan sát dưới kính hiển vi. Vi khuẩn tạo dòng trong rễ có thể dễ dàng phân biệt với các hạt có cỡ tương tự của tế bào thực

Tám chủng Y1.3, Y1.4, Y2.1, Y2.3, Y2.5, Y2.6, Y5.1, Y5.2 là các chủng gram âm. Trong đó 3 chủng Y1.3, Y2.3, Y5.2 là các vi khuẩn vừa hiếu khí, kỵ khí và phát triển trên môi trường YDC nên đây là các chủng thuộc chi *Pantoea*. Ba chủng Y1.4, Y2.1, Y5.1 là các chủng vi khuẩn kỵ khí và có khả năng phát quang trên môi trường nên chúng thuộc chi *Pseudomonas*. Chủng Y2.5 là vi khuẩn hiếu khí, phát triển trên môi trường NBY ở 33°C nhưng lại không tạo nhày trên môi trường YDC nên chủng này thuộc chi *Burkholderia*. Chủng Y2.6 là vi khuẩn kỵ khí, nhày trên YDC và phát triển trên D₁M nên chủng này thuộc chi *Agrobacterium*.

vật ví dụ như hạt tinh bột thường bắt màu đỏ ngũ sắc sau khi ủ trong PBMT. Trong khi đó vi khuẩn có thể được phân biệt bằng các đặc điểm hình thái điển hình, khả năng di động và nhóm khuẩn lạc giống nhau cũng như độ tương phản đáng kể sau khi nuôi qua đêm.

Sử dụng chất chỉ thị ôxi hoá khử 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chloride kết hợp với thuốc nhuộm alinine blue và quan sát dưới kính hiển vi vật kính dầu x100. Kết quả cho thấy, cả 14 chủng phân lập được đều có khả năng tạo dòng cả bên trong tế bào và gian bào của tế bào rễ cây chè. Trong đó chủng Y2.3, Y2.5, Y2.7 tạo dòng rõ nhất, chúng được thể hiện qua sự bắt màu đỏ của thuốc nhuộm và khả năng di động trong tế bào (hình 3.2). Điều này cho thấy, đây là các chủng vi khuẩn nội sinh trong mô rễ cây chè.

3.3. Đánh giá hoạt lực đối kháng của các chủng vi khuẩn nội sinh với nấm gây bệnh *Exobasidium vexans* (in vitro)

3.3.1. Đánh giá hoạt tính đối kháng theo phương pháp trực tiếp

Sau khi phân lập và làm thuần, 14 chủng vi khuẩn nội sinh được thử tương tác với nấm gây bệnh *Exobasidium vexans*. Kết quả được trình bày trên bảng 3.2.

*Bảng 3.2. Hoạt lực đối kháng với nấm gây bệnh phòng lá chè *Exobasidium vexans* của các chủng vi khuẩn nội sinh*

STT	Chủng vi khuẩn	Kích thước vòng đối kháng (cm)
1	Y1.1	-
2	Y1.2	0,3
3	Y1.3	-
4	Y1.4	0,4
5	Y1.5	-
6	Y2.1	0,2
7	Y2.2	1,7
8	Y2.3	0,5
9	Y2.4	-
10	Y2.5	1,2
11	Y2.6	-
12	Y2.7	0,8
13	Y5.1	-
14	Y5.2	-

Chú thích: “-”: không có vòng đối kháng

Kết quả bảng 3.2 cho thấy, có 7 chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng với nấm gây bệnh phòng lá chè, trong đó có 3 chủng Y2.2, Y2.5 và Y2.7 có hoạt tính đối kháng cao với kích thước vòng ức chế từ 0,8-1,7cm. Quan sát vòng ức chế trên hình 3.3 không thấy xuất hiện một khuẩn lạc hay sợi khuẩn ty nào của nấm gây bệnh. Điều này cho thấy, các chủng vi khuẩn đối kháng có thể đã tiết vào môi trường một hợp chất có khả năng ức chế sự phát triển của nấm gây bệnh. Có nhiều nghiên cứu cho rằng, hợp chất này có thể là một protein, kháng sinh, enzyme nào đó, hoặc bacteriocin hoặc chúng cùng cạnh tranh dinh dưỡng,....Để

hiểu phần nào về cơ chế đối kháng này, 3 chủng Y2.2, Y2.5 và Y2.7 được chọn để nuôi cấy trên môi trường KB sau 36, 48 và 72 giờ, ly tâm, thu dịch trong. Phần dịch trong này được chia làm 2 phần, một phần được giữ nguyên ở nhiệt độ thường, một phần được xử lý nhiệt ở 100°C trong 15 phút (nhằm bất hoạt enzyme, biến tính protein, ...) và đem thử tương tác với nấm gây bệnh *Exobasidium vexans* NBI như mô tả ở mục 2.2.3

Theo kết quả bảng 3.3 cho thấy, khi xử lý nhiệt, dịch lọc của ba chủng Y2.2, Y2.5, Y2.7 đều không có hoạt tính đối kháng với nấm gây bệnh ở các thời gian nuôi cấy là 60h, 48h và 72h. Trong khi dịch lọc của các chủng đối kháng ở nhiệt độ thường ở các thời gian nuôi cấy đều có hoạt tính đối kháng với nấm gây bệnh với vòng đối kháng có kích thước từ 0,5-1,9cm. Từ đó cho thấy các chủng vi khuẩn này trong quá trình sinh trưởng đã sản sinh ra tác nhân ức chế nấm bệnh có bản chất là protein (enzyme, bacterioxin,...) vì ở nhiệt độ cao protein bị biến tính và enzyme bị bất hoạt.

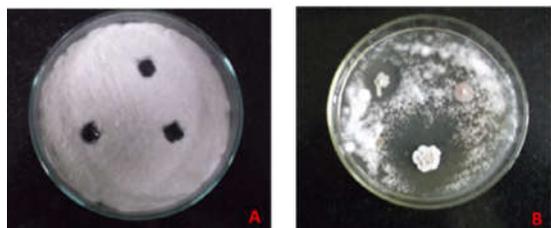


Hình 3.3. Hoạt tính đối kháng với nấm gây bệnh phòng lá chè của đại diện một số chủng vi khuẩn nội sinh đối kháng (Y1.4, Y2.2 và Y2.7)

Bảng 3.3. Hoạt tính đối kháng với nấm gây bệnh phòng lá chè *Exobasidium vexans* của các loại dịch lọc tế bào canh khuẩn đối kháng

STT	Chủng vi khuẩn	Kích thước vòng đối kháng (cm)					
		Không xử lý nhiệt			Xử lý nhiệt		
		36h	48h	72h	36h	48h	72h
1	Y2.2	1,2	1,9	1,7	-	-	-
2	Y2.5	0,8	1,2	1,3	-	-	-
3	Y2.7	0,5	0,7	0,7	-	-	-

Chú thích: “-”: không có vòng đối kháng nấm gây bệnh *Exobasidium vexans*



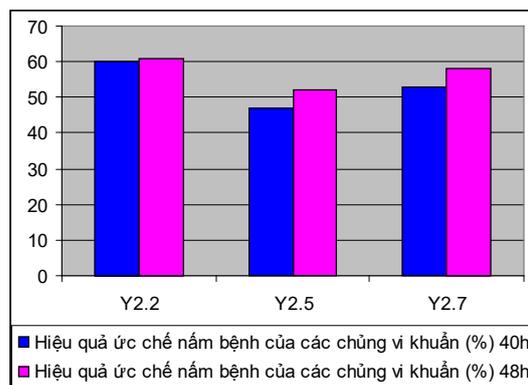
Hình 3.4. Hoạt tính đối kháng của dịch lọc sau nuôi cấy các chủng vi khuẩn với nấm gây bệnh phòng lá chè *Exobasidium vexans*

Chú thích: A. Hoạt tính đối kháng với nấm *Exobasidium vexans* NBI của dịch lọc 3 chủng vi khuẩn Y2.2, Y2.5, Y2.7 sau khi đã xử lý nhiệt; B. Hoạt tính đối kháng với nấm *Exobasidium vexans* NBI của dịch lọc 3 chủng Y2.2, Y2.5, Y2.7 không xử lý nhiệt

Ngày nay, có nhiều chế phẩm sinh học chứa vi khuẩn *Bacillus* được sử dụng trong kiểm soát bệnh thực vật do các loại nấm gây ra [8]. Các loài *Bacillus* spp. như: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* và *B. cereus* đã được báo cáo có hiệu quả trong phòng chống một số loại nấm gây bệnh trên lá và nấm gây bệnh trong đất [9], [5]. Điều này có thể do chúng có thể đối kháng trực tiếp hoặc gián tiếp tạo ra tinh kháng cho cây chủ. Ngoài ra, *B. subtilis* còn có khả năng sinh ra tiết ra các loại kháng sinh như iturin, surfactin gây ức chế hoặc tiêu diệt nấm gây bệnh [10], [13]. *B. subtilis* cũng tiết ra nhiều enzyme protease có khả năng làm teo hoặc tan khuẩn ty nấm gây bệnh và làm cho chúng không phát triển được [11].

3.3.2. Xác định sự ảnh hưởng của vi khuẩn đối kháng đến hình thái khuẩn ty

Ba chủng Y2.2, Y2.5 và Y2.7 là những chủng có hoạt tính đối kháng cao nhất với nấm *Exobasidium vexans* nên được chọn để xác định sự ảnh hưởng của vi khuẩn đối kháng đến hình thái khuẩn ty nấm gây bệnh bằng phương pháp đồng nuôi cấy như mô tả trong mục 2.2.3. Kết quả cho thấy sau 40h, 48h và 72h nuôi cấy, gần như không thu được sinh khối nấm gây bệnh *Exobasidium vexans*. Khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử thì thấy vẫn còn một số sợi nấm với kích thước rất ngắn trong dịch nuôi cấy. Tuy nhiên không thấy sự phân nhánh ở các sợi nấm. Không thấy các đầu phình của sợi nấm, nơi để sinh bào tử.



Hình 3.5. Hiệu quả ức chế nấm bệnh của các chủng vi khuẩn nội sinh đối kháng ở các thời gian nuôi cấy khác nhau

Để làm rõ hơn về sự ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn đối kháng và hiệu quả ức chế nấm gây bệnh phòng lá, nấm *Exobasidium vexans* được nuôi lắc trong môi trường PDA lỏng ở 120rpm, 25°C trong 32 giờ, khi đó đã

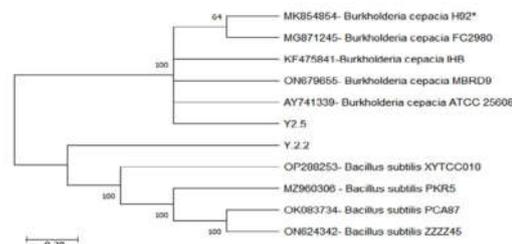
có một lượng sinh khối nấm nhất định, bổ sung vi khuẩn nội sinh đối kháng với mật độ 10^6 tb/ml. Tiếp tục nuôi lác hỗn hợp này sau 40h và 48h, thu sinh khối nấm và đánh giá hiệu quả ức chế nấm bệnh như mô tả trong mục 2.2.3. Công thức đối chứng là dịch nuôi cấy chỉ có nấm gây bệnh. Kết quả được trình bày trên hình 3.5.

Qua kết quả hình 3.5 cho thấy, hiệu quả ức chế phát triển nấm bệnh của chủng vi khuẩn Y2.2 là cao nhất, đạt từ 60%, 61% so với đối chứng, chủng Y2.5 đạt từ 47%, 52% và chủng Y2.7 là 53% và 58% so với đối chứng. Khi quan sát dưới kính hiển vi thì thấy sợi nấm gây bệnh *Exobasidium vexans* bị gãy vụn, cơ quan sinh bào tử bị teo lại. Các sợi nấm mới không có vách ngăn. Điều này cho thấy, các chủng vi khuẩn đối kháng đã tác động đến các khuẩn ty nấm làm cho sợi của chúng dần teo lại và một số sợi đã bị tan dần nên trọng lượng khô của sợi nấm ở các công thức thí nghiệm đã giảm từ 47%-61% so với đối chứng. Khi tiếp tục nuôi lác hỗn hợp này ở 72h và 96h vẫn không thấy xuất hiện bào tử nấm bệnh.

3.4. Nhận dạng vi khuẩn nội sinh trên cây chè bằng giải trình tự gen 16SrRNA

Chọn 2 chủng vi khuẩn (Y2.2 và Y2.5) có khả năng đối kháng cao nhất với nấm *Exobasidium vexans* để nhân mật độ trên môi trường LB, tách DNA của vi khuẩn và phản ứng PCR được thực hiện để nhân đoạn DNA 16SrRNA với cặp mồi tổng là 27F và 1492R. Sau khi giải trình tự đoạn DNA của 2 chủng Y2.2 và Y2.5, tiến hành so sánh các trình tự này trên ngân hàng dữ liệu NCBI bằng chương trình BLAST để xác định mức độ tương đồng của các chủng vi khuẩn. Kết quả cho thấy, chủng vi khuẩn Y2.2 có độ tương đồng với vi khuẩn *Bacillus subtilis* tới 100%, còn chủng Y2.5 cũng có độ tương đồng là 100% với vi khuẩn *Burkholderia cepacia*

(Bảng 4). Khi phân tích phả hệ, kết quả cũng cho thấy chủng vi khuẩn Y2.2 thuộc loài *Bacillus subtilis* và chủng Y2.5 thuộc loài *Burkholderia cepacia* (Hình 3.6).



Hình 6. Phân tích phả hệ dựa trên trình tự vùng 16S hai chủng vi khuẩn *Bacillus* tiềm năng

Hai chủng vi khuẩn Y2.2 và Y2.5 có hoạt tính đối kháng cao nhất với nấm gây bệnh phòng lá chè *Exobasidium vexans*. Hơn nữa chủng Y2.2 thuộc loài *Bacillus subtilis*, được biết như một loại vi khuẩn an toàn. Vì vậy, các chủng này rất có tiềm năng ứng dụng vào sản xuất thực tế như một biện pháp phòng trừ sinh học. Theo Premkumar sử dụng *Bacillus subtilis* có bổ sung thêm các chất dinh dưỡng như $(NH_4)_2SO_4$ và acid salicylic như một chế phẩm dạng lỏng đã làm giảm đáng kể tỷ lệ mắc bệnh phòng lá trên cây chè [16].

IV. Kết luận

- Đã phân lập được 14 chủng vi khuẩn nội sinh trong mẫu rễ, thân và lá cây chè. Bước đầu phân loại chúng thuộc các chi như: *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*.

- Ba chủng vi khuẩn nội sinh Y2.2, Y2.5 và Y2.7 có hoạt tính đối kháng cao với nấm gây bệnh phòng lá chè *Exobasidium vexans* trong điều kiện *in vitro*. Sau 3 ngày đồng nuôi cấy các chủng vi khuẩn này với nấm *Exobasidium* cho thấy sợi nấm bị gãy vụn và dần không phát triển được. Kết quả giải trình tự đoạn 16S rDNA của 2 chủng vi khuẩn Y2.2 và Y2.5 cho thấy chủng

Y2.2 có tỉ lệ tương đồng với vi khuẩn *Bacillus subtilis* SMY, NCIB 3610 là 100% và chủng Y2.5 có mức tương đồng với vi khuẩn *Burkholderia cepacia*

Tài liệu tham khảo:

- [1]. Agnihothrudu, V. A world list of fungi reported on tea (*Camellia* spp.) *Journal of Madras University* 34 (1964) 155-217.
- [2]. Baby, U.I, Ravichandran, R., Ganesan, V., Parthiban, R. and Sukumar, S. *Effect of blister blight disease on the biochemical and quality constituents of green leaf and CTC tea. Tropical Agriculture (Trinidad)* 75(4) (1998) 452-456.
- [3]. Baby, U.I., Premkumar, R., Ajay, D., Sanjay, R., and Sasidhar, R. Chemical and biological control of red root disease. *Newsletter of UPASI Tea Res. Foundation* 14(2) (2004) 1-2.
- [4]. Barthakur, B.K., Dutta, P., Sarmah, S.R., Begum, R., Kalita J.N., Singh K. *Effect of certain native microbials in controlling diseases of tea. Two and a Bud* 49 (2002) 54-54.
- [5]. Carneiro RM, Desouza DG, Belarmino LC. *Nematicidal activity of Bacillus spp. strains on juveniles of Meloidogyne javanica. Nematol. Brasileira.* 22 (1998) 12-21.
- [6]. Chen. Z.M. and Chen, X.F. A world list of pathogens reported on tea plant (In Chinese). *Journal of Tea Science* 9 (1989) 73-88.
- [7]. Clay. K., *Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. Ecology* 69 (1988) 10-16.
- [8]. Gardener BBM. *Ecology of Bacillus and Paenibacillus spp. in agricultural systems. Phytopathology* 94 (2004) 1252-1258
- [9]. Hassan MN, Osborn AM, Hafeez FY. *Molecular and biochemical characterization of surfactin producing Bacillus species antagonistic to Colletotrichum falcatum wend causing sugarcane red rot. African Journal of Microbiology Research* 4(20) (2010) 2137-2142.
- [10]. Joshi, R., and M.B. Gardener. *Identification of genes associated with pathogen inhibition in different strains B. subtilis. Phytopathology* 96 (2006) 145-154.
- [11]. Leclere, V., M. Bechet, A. Adam, J.S.

Guez, B. Wathlet, M. Ongena, P. Thonart, F. Gancel, I. Imbert, P. Jacques. *Mycosubtilin Overproduction by Bacillus subtilis BBG100 Enhances the Organism's Antagonistic and Biocontrol Activities. Appl. Environ. Microbiol* 71 (8) (2006) 4577-4584.

[12]. Patriquin, D. G., and J. Dobereiner. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. *Canadian Journal of Microbiology.* 24 (1978) 734-742

[13]. Peypoux, F., J.M. Bonmatin, and J. Wallach. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *App. Microbiol. Biotechnol* 51(5) (1999) 553-563.

[14]. Premkumar, R. Report of the plant pathology division. *Annual Report of UPASI Tea Res. Foundation.* (2001) 32-33 .

[15]. Premkumar, R. Report of the plant pathology division. *Annual Report of UPASI Tea Res. Foundation.* (2002) 35-36.

[16]. Premkumar, R. Report of the plant pathology division. *Annual Report of UPASI Tea Res. Foundation.* (2003) 38-39.

[17]. Premkumar, R. and Baby, U.I. Recommendations on the control of root and stem diseases of tea. *Handbook of Tea Culture Section* (2005) 15/16.

[18]. Zhu YuJing, Chen Lu, Lan JiangLin, Su MingXing, Liu Bo. Isolation, identification and the biocontrol potential of endophyte in *Camellia sinensis*. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)* 38 (2) (2009) 129-134.

Địa chỉ tác giả: Viện Di truyền Nông nghiệp

Email: honghaicnsh@gmail.com