Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn
pISSN: 2588-1191; eISSN: 2615-9708
Tập 132, Số 3D, 2023, Tr. 139–154, DOI: 10.26459/hueunijard.v132i3C.7276

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG VỚI NẤM *Phytophthora* sp. GÂY BỆNH CHẢY GÔM TRÊN CÂY BƯỞI THANH TRÀ (*Citrus grandis* (L.) *Osbeck*) Ở THỪA THIÊN HUẾ

Võ Thị Ngọc Trai [1], Trần Thị Thu Hà[2], Phạm Thị Diễm Thi[1, *], Nguyễn Bảo Hưng[1]

[1] Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Nguyễn Đình Tứ, Huế, Việt Nam
[2] Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Phạm Thị Diễm Thi <ptdiemthi@hueuni.edu.vn>
(*Ngày nhận bài: 8-8-2023; Ngày chấp nhận đăng: 27-9-2023*)

Tóm tắt. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm phân lập các chủng vi sinh vật có khả năng đối kháng với nấm *Phytophthora* sp. gây bệnh chảy gôm trên cây bưởi Thanh trà và khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến khả năng đối kháng của các chủng vi khuẩn trong điều kiện *in vitro*. Từ mười chủng vi khuẩn phân lập tại vườn trồng bưởi Thanh trà ở phường Thủy Biều, thành phố Huế, chúng tôi đã tuyển chọn được ba chủng, ký hiệu lần lượt là 6T3, CT3 và S22, có khả năng đối kháng mạnh với *Phytophthora* sp. Định danh phân tử trình tự đoạn gen 16S rRNA, chúng tôi xác định các chủng vi khuẩn 6T3, CT3, S22 lần lượt là *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia* sp. và *Paenibacillus peoriae*. Chúng có khả năng sinh trưởng và đối kháng tốt ở 30–40 °C và pH 5–7. Thời gian nuôi cấy là 48 giờ với khả năng đối kháng trên 60%. Nguồn carbon và nguồn nitơ thích hợp nhất là tinh bột đối với cả ba chủng, $(NH_4)_2SO_4$ đối với 6T3, NH_4NO_3 đối với CT3 và peptone đối với S22. Cả ba chủng vi khuẩn đều có khả năng đối kháng mạnh với *Phytophthora* sp. và có tiềm năng ứng dụng làm chế phẩm sinh học trong phòng trừ bệnh chảy gôm trên cây bưởi Thanh trà.

Từ khóa: bệnh chảy gôm, *Phytophthora* sp., cây bưởi Thanh trà, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia* sp., *Paenibacillus peoriae*

Isolation and screening of antagonist bacteria against *Phytophthora* sp. causing gummosis disease on Thanh Tra pomelo (*Citrus grandis* (L.) *Osbeck*) in Thua Thien Hue

Vo Thi Ngoc Trai [1], Tran Thi Thu Ha[2], Pham Thi Diem Thi[1]*, Nguyen Bao Hung[1]

[1] Institute of Biotechnology, Hue University, Nguyen Đinh Tu St., Hue, Vietnam
[2] University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Phan Thi Diem Thi <ptdiemthi@hueuni.edu.vn>
(*Submitted: August 8, 2023; Accepted: September 27, 2023*)

Abstract. This study was conducted to isolate strains of microorganisms capable of antagonizing *Phytophthora* sp. causing gummosis disease on Thanh Tra trees and investigate the influence of environmental factors on the antagonistic ability of bacterial strains under ***in vitro*** conditions. From ten bacterial strains isolated at a Thanh Tra garden in Thuy Bieu Ward, Hue City, we selected three bacterial strains, denoted as 6T3, CT3, and S22**,** with a strong antagonistic ability against *Phytophthora* sp. Molecular identification of the 16S rRNA gene fragment revealed that 6T3, CT3, and S22 are *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia* sp.**,** and *Paenibacillus peoriae*, respectively. They have good growth and resistance at 30–40 °C, pH 5–7, and culture time 48 h with over 60% resistance. The most suitable carbon and nitrogen sources were starch for all three strains, $(NH_4)_2SO_4$ for 6T3, NH_4NO_3 for CT3, and peptone for S22. All three strains have a strong antagonistic ability against *Phytophthora* sp. and can be applied as biological products in the prevention of gum disease on Thanh Tra trees.

Keywords: gummosis, *Phytophthora* sp., Thanh Tra pomelo, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia* sp., *Paenibacillus peoriae*

1 Đặt vấn đề

Bưởi Thanh trà (*Citrus grandis* L.) từ lâu đã được biết đến như là một trong những loại cây đặc sản được nhiều người yêu thích và có giá trị kinh tế cao ở Tỉnh Thừa Thiên Huế, và đã trở thành biểu trưng của văn hoá ẩm thực Cố Đô, nổi tiếng với hương vị thơm ngon đặc biệt. Tuy nhiên, không phải vùng đất nào ở Thừa Thiên Huế cũng có thể trồng được bưởi Thanh trà có chất lượng. Bưởi Thanh trà trồng ở một số vùng mới đem lại hương vị ngọt tao nhã và đặc trưng, trong đó bưởi Thanh trà trồng ở Thủy Biều được đánh giá là thơm ngon hơn cả [1]. Nguyễn Thị Kim Sơn và cs. báo cáo rằng bệnh chảy gôm do nấm *Phytophthora* sp. gây hại trên cây có múi ở một số tỉnh miền Bắc là một trong những bệnh hại nguy hiểm trên cây ăn quả có múi ở Việt Nam cũng như nhiều vùng trồng cây có múi trên thế giới [2, 3]. Hiện nay, cây bưởi Thanh trà trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế đã và đang bị thiệt hại nghiêm trọng bởi bệnh chảy gôm do nấm *Phytophthora* sp. gây ra, bệnh này đã ảnh hưởng lớn sản lượng cây có múi, giảm chất lượng quả và dẫn đến thiệt hại kinh tế [4].

Phytophthora sp. là vi sinh vật gây bệnh cây có nguồn gốc từ đất, xâm nhiễm vào cây chủ từ vùng rễ các cây như là cây có múi (cam, bưởi…) và một số loại cây trồng khác [5]. Khi *Phytophthora* sp. tấn công vùng phía trên bề mặt của cây gây ra các triệu chứng đặc trưng bởi sự xuất hiện các vùng chết trên vỏ cây, tiết nhựa cây và sau khi khô vỏ cây bị sẫm màu và tạo thành gôm [6].

Để phòng trừ bệnh do *Phytophthora* sp gây nên, người nông dân thường được khuyến cáo sử dụng các loại thuốc hóa học thành phần chứa các hoạt chất như Metalaxy, Mancozeb, Phosphorous Acid, Fosetyl Aluminium để phun, bôi hoặc tiêm cho cây bị bệnh. Mặc dù các loại thuốc trừ sâu và bệnh hại có hiệu quả trong việc kiểm soát bệnh này, tuy nhiên chúng có một số hạn chế nhất định như ảnh hưởng đến môi trường, vấn đề an toàn thực phẩm, đe dọa sức khỏe con người, và tạo cơ hội cho các chủng kháng thuốc xuất hiện [7–9].

Nhận thấy các mối đe dọa đối với môi trường, đã có nhiều nước trên thế giới đã ban hành các chỉ thị về việc hạn chế sử dụng các loại thuốc trừ sâu và thay thế bằng các chiến lược kiểm soát dịch bệnh bền vững [10]. Các cơ quan quản lý nông nghiệp ở Việt Nam đã ban hành các quy định cũng như thực hiện nhiều biện pháp tuyên truyền, giúp tăng cường hiểu biết của người dân về cách sử dụng thuốc bảo vệ thực vật, tác hại lâu dài của việc lạm dụng thuốc bảo vệ thực vật đối với con người vào môi trường [11, 12]. Bên cạnh đó, các nghiên cứu về sử dụng chế phẩm sinh học hay còn gọi là sử dụng các biện pháp kiểm soát sinh học để phòng trừ bệnh nói chung và bệnh *Phytophthora* sp. nói riêng đang được đẩy mạnh nghiên cứu tại các phòng thí nghiệm trên cả nước. Sử dụng đối kháng sinh học nghĩa là sử dụng vi sinh vật có lợi để hạn chế hay chống lại sự phát triển vi sinh vật gây bệnh một giải pháp có hiệu quả và thân thiện với môi trường và có thể là một lựa chọn thay thế cho thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc hóa học [10, 13].

Mặc dù trong nước ngày càng có nhiều sự quan tâm đến các loài *Phytophthora* sp. gây bệnh chảy gôm trên cây có múi, tuy nhiên các nghiên cứu ở Việt Nam về các chủng vi sinh vật có khả năng ức chế loài nấm này vẫn còn rất hạn chế [14, 15]. Do vậy, nghiên cứu này góp phần chọn lọc được các chủng vi khuẩn có khả năng ức chế nấm *Phytophthora* sp. và để ứng dụng các chủng vi khuẩn này trong việc sản xuất chế phẩm sinh học thì việc khảo sát các điều kiện nuôi cấy cho hiệu suất đối kháng cao là rất quan trọng.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Chủng nấm *Phytophthora* sp. gây bệnh chảy gôm trên cây bưởi Thanh trà được cung cấp bởi PTN Công nghệ Enzym & Protein. Các chủng vi khuẩn đối kháng nấm *Phytophthora* sp. được phân lập và tuyển chọn từ đất vùng rễ cây bưởi Thanh trà khỏe mạnh tại phường Thủy Biều, thành phố Huế.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Môi trường nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng các loại môi trường thông thường trong các nghiên cứu về vi sinh vật bao gồm: Môi trường LB với thành phần bao gồm (g/L): Peptone 10 g, cao nấm men 5 g, NaCl 10 g, Agar 20 g, nước cất 1 L, pH = 7 sử dụng trong nuôi cấy và tăng sinh vi khuẩn. Môi trường PDA với thành phần bao gồm (g/L): Potato extract 200g, dextrose 20 g, Agar 20 g, nước cất 1 L, pH = 5,6 sử dụng trong các nuôi cấy nấm. Ngoài ra, chúng tôi còn khảo sát các loại môi trường bao gồm: Môi trường khoáng cơ bản để khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbon: $(NH_4)_2SO_4$ 2 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0,2 g, $NaH_2PO_4.H_2O$ 0,5 g, $CaCl_2.2H_2O$ 0,1 g, KH_2PO_4 0,5 g và nước cất 1 L. Môi trường khoáng cơ bản để khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ: KH_2PO_4 1,36 g, $CaCl_2$ 0,03 g, NaH_2PO_4 2,13 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0,2 g, $FeSO_4.7H_2O$ 0,01 g, nguồn carbon thích hợp và nước cất 1L.

Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn đối kháng nấm *Phytophthora* sp.

Từ các mẫu đất thu thập tại các vườn trồng bưởi Thanh trà khỏe mạnh trên địa bàn phường Thủy Biều, thành phố Huế (16°26'41.9"N; 107°32'22.0"E). Phương pháp phân lập được tiến hành theo Idris và cộng sự (2007) [16]. Các mẫu đất vườn được pha loãng bằng nước cất vô trùng đến độ pha loãng thích hợp. Cấy trải 100 µL dịch huyền phù trên môi trường LBA và ủ ở điều kiện nhiệt độ 37^0C trong 24h. Các khuẩn lạc tuyển chọn được tinh sạch bằng cách cấy ria lặp đi lặp lại nhiều lần và sau đó thử nghiệm khả năng đối kháng bằng phương pháp đồng nuôi cấy chống lại nấm bệnh *Phytophthora* sp.

Đánh giá hoạt tính đối kháng của vi khuẩn đã tuyển chọn

Các chủng vi khuẩn tiềm năng được đánh giá khả năng đối kháng với nấm bệnh bằng phương pháp đồng nuôi cấy. Chủng vi khuẩn được đồng nuôi cấy với nấm bệnh *Phytophthora* sp. trên đĩa môi trường PDA theo kiểu cấy vạch đối xứng hai bên với khoảng cách 2 cm từ rìa của đĩa và chủng nấm bệnh được cấy vào vị trí trung tâm giữa hai vạch. Đĩa đối chứng chỉ cấy nấm bệnh *Phytophthora* sp. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 30^0C trong vòng 5 ngày và tiến hành thu thập số liệu kích thước vùng ức chế nấm bệnh [17].

Hiệu suất ức chế sự phát triển của sợi nấm bởi vi khuẩn được tính theo công thức:

$$\text{PIRG (\%)} = \frac{R - r}{R} \times 100 \quad (1)$$

trong đó: PIRG (percentage of inhibition of radial growth) là phần trăm ức chế xuyên tâm của vi khuẩn (%), R là bán kính của hệ sợi nấm *Phytophthora* sp. đối chứng (cm), r là bán kính của hệ sợi nấm trên đĩa có chủng vi khuẩn đối kháng.

Định danh các chủng vi khuẩn đối kháng đã tuyển chọn bằng sinh học phân tử

Để định danh các chủng vi khuẩn đối kháng, tiến hành phân tích trình tự gen 16S rRNA. DNA tổng số của các chủng vi khuẩn được tách chiết bằng TOPURE Genomic DNA Extraction Kit (ABT, Việt Nam). Trình tự 16S rRNA được khuếch đại bằng cặp mồi 27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3′) và 1492R (5'-GGTTACCTTGTTAC GACTT-3′). Chu trình phản ứng PCR bao gồm: biến tính 10 phút ở 95 °C, sau đó là 30 chu kì 95 °C 1 phút, gắn mồi ở 55 °C 1 phút, kéo dài 72 °C 1 phút, và cuối cùng là 10 phút ở 72 °C. Sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên gel agarose 1%, tinh sạch và tiến hành giải trình tự. Kết quả giải trình tự của chủng tuyển chọn được xử lý bằng phần mềm BioEdit và so sánh với các trình tự tương ứng của các chủng đã được đăng ký trên GenBank nhờ công cụ BLAST trên NCBI-National Center for Biotechnology Information.

Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến khả năng đối kháng

Ảnh hưởng của pH: Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng ở điều kiện nhiệt độ 30 °C, 180 rpm ở các giá trị pH 4, 5, 6, 7, 8. Sau 48 giờ nuôi cấy, tiến hành thu dịch nuôi cấy vi khuẩn và khảo sát khả năng đối kháng với nấm bệnh bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.

Ảnh hưởng của nhiệt độ: Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng có giá trị pH thích hợp nhất ở các điều kiện nhiệt độ 20, 25, 30, 35, 40 °C. Thời gian thu mẫu và phương pháp khảo sát tiến hành tương tự như phương pháp khảo sát ảnh hưởng của pH.

Ảnh hưởng của nguồn carbon: Tiến hành nuôi cấy các chủng vi khuẩn trong môi trường khoáng cơ bản được bổ sung thêm 1% các loại đường là tinh bột, saccharose, sucrose, glucose,

galactose. Các thí nghiệm được bố trí ở nhiệt độ và pH thích hợp. Thời gian thu mẫu và phương pháp khảo sát tiến hành tương tự như phương pháp khảo sát ảnh hưởng của pH.

Ảnh hưởng của nguồn nitơ: Tiến hành nuôi cấy các chủng vi khuẩn trong môi trường khoáng cơ bản được bổ sung thêm 0,1% các nguồn nitrơ vô cơ là $NaNO_3$, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ và nguồn nitơ hữu cơ là pepton, yeast extract. Các thí nghiệm được bổ trí ở nhiệt độ, pH và nguồn carbon thích hợp. Thời gian thu mẫu và phương pháp khảo sát tiến hành tương tự như phương pháp khảo sát ảnh hưởng của pH.

Phương pháp phân tích số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu được xử lý bằng excel và phân tích ANOVA (Duncan'test, $p \leq 0,05$) bằng phần mềm xử lý thống kê SPSS. Tính toán các giá trị trung bình, số liệu được trình bày bằng bảng biểu hoặc đồ thị, một nhân tố, ở mức ý nghĩa $p \leq 0,05$.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn đối kháng nấm bệnh *Phytophthora* sp.

Từ 10 mẫu đất trồng bưởi Thanh trà ở phường Thủy Biều đã phân lập được 10 chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng với chủng nấm bệnh *Phytophthora* sp. thông qua việc đánh giá sơ bộ khả năng đối kháng với nấm bệnh *Phytophthora* sp. bằng phương pháp đồng nuôi cấy. Ký hiệu và đặc tính hình thái khuẩn lạc của 10 chủng vi sinh vật được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Hình thái khuẩn lạc của 10 chủng vi sinh vật đối kháng tiền năng đã phân lập được

Kí hiệu chủng	Mô tả hình thái	Hình ảnh khuẩn lạc trên môi trường LB
6T3	Tròn, nhẵn bóng, màu vàng đậm, biên đều, tâm lồi.	
CT3	Khuẩn lạc tròn, ướt, nhẵn bóng, trắng đục, biên đều, màu vàng nhạt	

S22	Tròn, nhẵn bóng, trắng đục, biên không đều, tâm lồi,	
HT9	Tròn, nhẵn bóng, màu vàng nhạt, biên đều, tâm lồi.	
HT6	Tròn, nhẵn bóng, màu trắng sữa, biên đều, tâm lồi màu tắng đục	
DH1	Tròn, nhẵn bóng, màu trắng đục, biên đều, tâm lồi	
M7	Tròn, nhẵn bóng, màu trắng đục, biên đều, tâm lồi	
M8	Tròn, ướt, nhẵn bóng, màu trắng trong, biên đều, tâm lồi.	
T1	Tròn, nhẵn bóng, màu trắng trong, biên đều, tâm lồi màu trắng đục.	

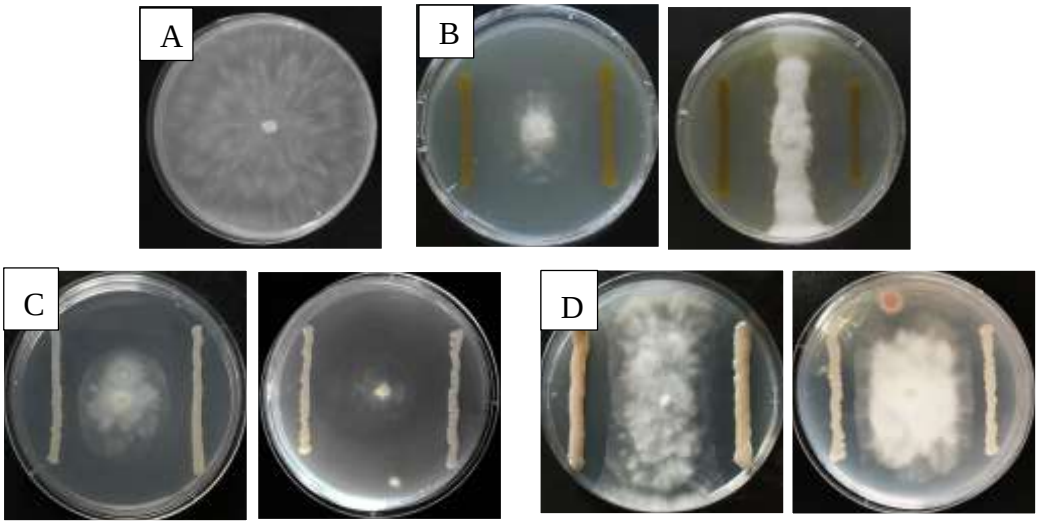
C2	Tròn, nhẵn bóng, màu trắng sữa, biên đều, tâm lồi màu trắng đục.	

3.2 Đánh giá hoạt tính đối kháng của các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn trong điều kiện *in-vitro*

Bảng 2 cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn đều có khả năng đối kháng với nấm bệnh *Phytophthora* sp. nhưng ở các mức độ khác nhau. Trong đó ba chủng (6T3, CT3, S22) thể hiện khả năng ức chế tăng trưởng mạnh (69,94-88,54%) đối với nấm bệnh sau sáu ngày đồng nuôi cấy trên môi trường PDA (Bảng 2) (Hình 1). Cụ thể là chủng 6T3 biểu hiện khả năng đối kháng rất mạnh với 88,54%, tiếp đến lần lượt là hai chủng CT3 và S22 với 72,67% và 69,94% (Bảng 2) (Hình 1). Các chủng T1, DH1, HT9, M7 có khả năng đối kháng trung bình (26, 28-48, 93 %) và hai chủng C2, M8 còn lại biểu hiện khả năng đối kháng yếu (18, 14-23, 27%). Trong các nghiên cứu trước đây, hiệu suất đối kháng của chủng *Burkholderia cepacia* JBK9 đối với các chủng nấm bệnh *Phytophthora capsici, Fusarium oxysporum*, và *Rhizoctonia solani* dao động từ 34, 22-59, 56% và được ứng dụng làm chế phẩm sinh học trong phòng trừ bệnh hại trên cây hồ tiêu [18]. Theo một nghiên cứu khác cũng đã phân lập được chủng *Stenotrophomonas maltophilia* UPMKH2 từ rễ và rễ lúa nằm trong 4 vựa lúa lớn ở bán đảo Malaysia cho thấy phần trăm ức chế tăng trưởng xuyên tâm (PIRG) cao nhất, lần lượt là 64,2% và 95,8% đối với các thử nghiệm bằng phương pháp dịch lọc nuôi cấy và

Bảng 2. Khả năng đối kháng của một số chủng vi khuẩn tuyển chọn có khả năng kháng nấm *Phytophthora* sp. gây bệnh chảy gôm trên cây bưởi Thanh trà

Hiệu quả ức chế bằng phương pháp nuôi đồng nuôi cấy		
Tên chủng	**Hiệu quả ức chế sau 3 ngày (%)**	**Hiệu quả ức chế sau 6 ngày (%)**
6T3	51,6 ± 1,30	88,54 ± 0,60
CT3	50,27 ± 0,83	72,67 ± 1,56
S22	40,97 ± 0,56	69,94 ± 0,43
HT9	32,07 ± 1,63	47,59 ± 0,55
HT6	39,6 ± 0,61	50,97 ± 0,33
DH1	37,24 ± 0,58	48,93 ± 0,56
M7	23,68 ± 1,98	37,09 ± 0,27
M8	13,08 ± 0,62	23,37 ± 0,47
T1	14,27 ± 0,32	26,28 ± 0,33
C2	10,08 ± 0,37	18,24 ± 0,26



Hình 1. Khả năng đối kháng giữa các chủng 6T3, CT3 và S22 với nấm bệnh *Phytophthora sp.* trên môi trường PDA sau 3 ngày và 6 ngày

Chú thích: A. Nấm *Phytophthora* sp. đối chứng; B. Khả năng đối kháng giữa chủng 6T3 và *Phytophthora* sp., *C.* Khả năng đối kháng giữa chủng CT3 và *Phytophthora* sp., D. Khả năng đối kháng giữa chủng S22 và *Phytophthora* sp.

nuôi cấy kép [19]. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Shengjun Xu và cs. đã phân lập được chủng *Paenibacillus polymyxa* SC09-21 trong việc giảm bệnh cháy lá *Phytophthora* sp. (do *Phytophthora capsici* gây ra) trên cây hồ tiêu và khả năng thúc đẩy tăng trưởng của cây. Nghiên cứu chỉ ra rằng SC09-2 có khả năng làm giảm hiệu quả sự phát triển xuyên tâm của tám tác nhân gây bệnh thực vật trong môi trường nuôi cấy kép và phát huy tác dụng kháng nấm tối đa đối với *P. capsici* [20].

So sánh với hiệu quả đối kháng trên cho thấy kết quả đối kháng sau sáu ngày ở chủng mà nghiên cứu này phân lập được có tính vượt trội hơn (Bảng 2).

Từ kết quả ở Bảng 2 về hiệu quả đối kháng chúng tôi đã chọn ra ba chủng là 6T3, CT3 và S22, là những chủng vi sinh vật cho thấy hiệu quả đối kháng mạnh, rõ rệt và ổn định nhất để tiến hành các phương pháp định danh để xác định được tên loài của các chủng này.

3.3 Định danh các chủng vi khuẩn

Chúng tôi đã chọn ra được ba chủng có ký hiệu lần lượt là 6T3, CT3, S22 là các chủng có khả năng đối kháng cao nhất (Hình 1) để tiến hành định danh bằng phương pháp giải trình tự gene. Kết quả phân tích trình tự 16S rRNA và so sánh trình tự trên NCBI bằng công cụ Blast N cho thấy trình tự 16S rRNA của chủng 6T3 có độ dài 1399 nucleotides có độ tương đồng 100% với chủng *Stenotrophomonas maltophilia* strain BBL-M2-2 (accession number: MT790729.1), do đó chủng này được phân loại thuộc loài Stenotrophomonas maltophilia. Trình tự 16S rRNA của

chủng CT3 có độ dài 1388 nucleotides có tương đồng 100% với loài Burkholderia sp Strian: Isyb41 (accession number: KY678896.1) thuộc chi *Burkholderia*, do đó chủng này được phân loại thuộc *Burkholderia* sp. Tiếp theo, Trình tự 16 rRNA của chủng S22 có độ dài 1369 nucleotides có tương đồng 100% với loài *Paenibacillus peoriae* strain AIPE2 (accession number: MW241598.1), thuộc chi *Paenibacillus* do đó chủng này được phân loại thuộc loài *Paenibacillus peoriae* (Hình 2).

3.4 Ảnh hưởng của pH môi trường

Thu dịch nổi sau ly tâm của các chủng vi khuẩn ở các giá trị pH 4, 5, 6, 7, 8 ở nhiệt độ 30 °C trong 48h. Kết quả thể hiện trong (Hình 3) đã chỉ ra rằng trong điều kiện nuôi cấy axit và kiềm yếu các chủng vi khuẩn giảm khả năng đối kháng rõ rệt đối với nấm bệnh so với môi trường trung tính. Tại giá trị pH = 4 hai chủng CT3 và S22 không có hoạt lực đối kháng (0%), riêng chủng 6T3 có hoạt tính đối kháng 49,46%. Bên cạnh đó, khi tăng giá trị pH lên 8 thì hoạt tính đối kháng giảm còn 45,56%, 52,68%, và 48,89% lần lượt đối với 6T3, CT3, và S22. Hoạt động ức chế mạnh nhất là ở các giá trị pH 5, 6 và 7 lần lượt đối với chủng 6T3 (65, 56%), S22 (57, 78 %), CT3 (54, 44%). Điều này phù hợp với nghiên cứu của Radtke, C. và cs. [21] khi sử dụng môi trường PDA với dải pH khác nhau để nghiên cứu tính đối kháng của các loài đối kháng thuộc chi Pseudomonas được phân lập từ đất, kết quả cho thấy 1 hiệu quả đối kháng cao nhất ở pH 5, 6 và 7. Và không phát hiện tính đối kháng ở pH 4 [21].

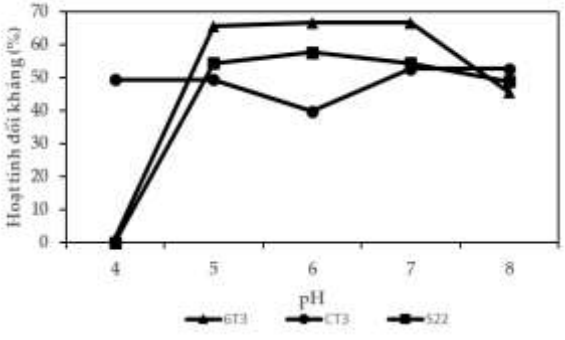
3.5 Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ nuôi cấy ảnh hưởng trực tiếp đến sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật, các loài vi sinh vật cho hiệu quả đối kháng tối đa khi ở điều kiện nuôi cấy tối ưu, do đó chúng tôi nghiên cứu các khoảng nhiệt độ từ 25–40 °C để tìm ra niệt độ tối ưu cho các chủng vi sinh vật đối kháng đã chọn. Thu dịch nổi sau ly tâm của các chủng vi khuẩn ở các giá trị pH thích hợp cho từng chủng (6T3: pH = 6; CT3: pH = 7; S22: pH = 7) và ở các khoảng nhiệt độ 25, 30, 37, 40 °C trong 48h. Hình 4 cho thấy hoạt lực đối kháng các chủng vi khuẩn tăng từ 29,52–58,09% đối với chủng 6T3; 27,61%–55,24% đối với chủng CT3, và 28,57%–43,80% đối với chủng S22 khi tăng nhiệt độ từ 25 đến 37 °C. Tiếp tục tăng nhiệt độ lên 40 °C đã làm giảm hoạt lực đối kháng đối với các chủng 6T3 (42%), CT3 (45%), và S22 (40%). Kết quả cho thấy hiệu quả đối kháng mạnh cũng tương đông và tỉ lệ thuận với mật độ tăng sinh của vi sinh vật đó. Kết quả của nghiên cứu này tương đồng với các nghiên cứu khác ví dụ như khi nghiên cứu sự đối kháng của *E. coli* so với *L. monocytogenes* của Aguilar, C., và Klotz, B., với khả năng đối kháng cao nhất đạt ở 37 °C [22].

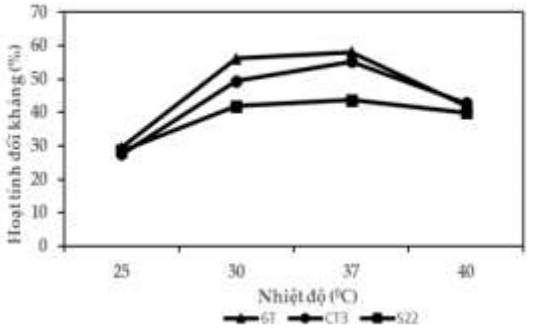
```
822    1    CCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCCACAAGACAGGGATAACTAC  60
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2  29   CCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCCACAAGACAGGGATAACTAC  88

822    61   CGGAAACGGTAGCTAATACCCGATACATCCTTTTCCTGCATGGGAGAAGGAGGAAAGACG  120
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2  89   CGGAAACGGTAGCTAATACCCGATACATCCTTTTCCTGCATGGGAGAAGGAGGAAAGACG  148

822    121  GAGCAATCTGTCACTTGTGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGC  180
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2  149  GAGCAATCTGTCACTTGTGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGC  208

822    181  CTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA  240
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2  209  CTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA  268

822    241  CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCT  300
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2  269  CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCT  328

822    301  GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGG  360
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2  329  GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGG  388

822    361  AAGAACGTCTTGTAGAGTAACTGCTACAAGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGC  420
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2  389  AAGAACGTCTTGTAGAGTAACTGCTACAAGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGC  448

822    421  TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG  480
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2  449  TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG  508

822    481  GCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTCTTTAAGTCTGGTGTTTAATCCCGAGGCTCAACTTCG  540
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2  509  GCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTCTTTAAGTCTGGTGTTTAATCCCGAGGCTCAACTTCG  568

822    541  GGTCGCACTGGAAACTGGGGAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAG  600
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2  569  GGTCGCACTGGAAACTGGGGAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAG  628

822    601  CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGGCTGTA  660
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2  629  CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGGCTGTA  688

822    661  ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC  720
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2  689  ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC  748

822    721  GCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACA  780
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2  749  GCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACA  808

822    781  CATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG  840
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2  809  CATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG  868
```

```
S22     841   GACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG  900
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2   869   GACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG  928

S22     901   GTCTTGACATCCCTYTGATCGGTCTAGAGATAGATCTTTCCTTCGGGACAGAGGAGACAG  960
              ||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2   929   GTCTTGACATCCCTCTGATCGGTCTAGAGATAGATCTTTCCTTCGGGACAGAGGAGACAG  988

S22     961   GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC  1020
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2   989   GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC  1048

S22     1021  GCAACCCTTATGCTTAGTTGCCAGCAGGTCAAGCTGGGCACTCTAAGCAGACTGCCGGTG  1080
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2   1049  GCAACCCTTATGCTTAGTTGCCAGCAGGTCAAGCTGGGCACTCTAAGCAGACTGCCGGTG  1108

S22     1081  ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTAC  1140
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2   1109  ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTAC  1168

S22     1141  ACACGTACTACAATGGCCGGTACAACGGGAAGCGAAATCGCGAGGTGGAGCCAATCCTAG  1200
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2   1169  ACACGTACTACAATGGCCGGTACAACGGGAAGCGAAATCGCGAGGTGGAGCCAATCCTAG  1228

S22     1201  AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATTGCT  1260
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2   1229  AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATTGCT  1288

S22     1261  AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCG  1320
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2   1289  AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCG  1348

S22     1321  TCACACCACGAGAGTTTACAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCCGCAA  1369
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
AIPE2   1349  TCACACCACGAGAGTTTACAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCCGCAA  1397
```

Hình 2. Kết quả so sánh trình tự đoạn gene 16S rRNA của chủng S22 phân lập được với chủng *Paenibacillus peoriae* strain AIPE2 (accession number: MW241598.1) bằng công cụ BLAST trên NCBI-National Center for Biotechnology Information.



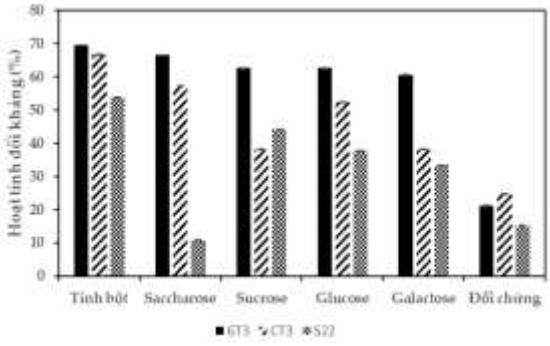
Hình 3. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi đến hoạt tính đối kháng nấm *Phytophthora* sp. của các chủng 6T3, CT3, S22.



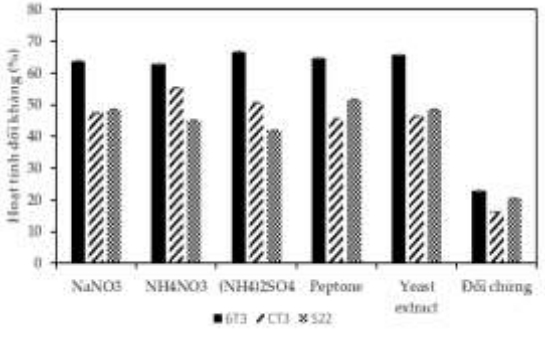
Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến hoạt tính đối kháng nấm *Phytophthora* sp. của các chủng 6T3, CT3, S22.

3.6 Ảnh hưởng của nguồn carbon

Nguồn carbon là khác đặc trưng cho từng loại vi sinh vật khác nhau, mỗi loài phù hợp với một loại nguồn carbon nhất định [23]. Các nguồn carbon sử dụng trong nghiên cứu đều tác động tốt đến hoạt lực đối kháng của các vi khuẩn được lựa chọn (hoạt lực đối kháng trên 30%). Trong đó, nguồn carbon thích hợp nhất cho cả 3 chủng vi khuẩn là tinh bột, với khả năng đối kháng của các chủng lần lượt là 6T3 (69,69%), CT3 (62,85%) và S22 (51,61%) (Hình 5). Chang và cs. báo cáo



Hình 5. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến hoạt tính đối kháng nấm *Phytophthora* sp. của các chủng 6T3, CT3, S22



Hình 6. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến hoạt tính đối kháng nấm *Phytophthora* sp. của các chủng 6T3, CT3, S22

rằng trong nghiên cứu về tính đối kháng của vi sinh vật vùng rễ của mình là Glucose [23]. Trong khi đó Berg và cs. cũng nghiên cứu về tính đối kháng của vi sinh vật vùng rễ báo cáo rằng nguồn carbon từ đó tỷ lệ đối kháng cao nhất vi khuẩn thu được là casein (14,2%), tiếp theo là xylan (10,4%) và chitin (8%) [24].

3.7 Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Kết quả về ảnh hưởng của nguồn nitơ chỉ ra rằng các chủng vi khuẩn khác nhau sẽ phù hợp với các nguồn nitơ khác nhau (Hình 5). Hầu hết các chủng vi khuẩn đều sử dụng tốt các nguồn nitơ này với hoạt lực đối kháng đều trên 40%. Nguồn nitơ thích hợp nhất lần lượt là $(NH_4)_2SO_4$ đối với chủng 6T3 (68,57%), NH_4NO_3 đối với chủng CT3 và 51,61% đối với chủng S22 (Hình 6). Đây là các nguồn Nitơ thông dụng và thường được trình bày trong các nghiên cứu hàn lâm [21,22]. Một số nghiên cứu chỉ ra việc sử dụng vật liệu hữu cơ giải phóng amoniac và axit nitơ hay sử dụng phân bón gốc lưu huỳnh có khả năng kiểm soát được nấm bệnh *Phytophthora* spp. Cocozza và cộng sự (2021) chỉ ra rằng, *Pseudomonads* sp, vi khuẩn có bào tử và nấm *Trichoderma* sp. cho thấy tỷ lệ đối kháng cao nhất đạt lần lượt là 73,6% và 56% với *Phytophthora* spp. [25].

4 Kết luận

Nghiên cứu này đã phân lập được 10 chủng vi sinh vật có khả năng đối kháng với chủng nấm bệnh *Phytophthora* sp. gây bệnh chảy gôm trên cây bưởi Thanh trà ở Thừa Thiên Huế. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia, Burkholderia* sp, *Paenibacillus peoriae* đều có khả năng đối kháng với chủng nấm *Phytophthora* sp. gây bệnh chảy gôm trên cây bưởi Thanh trà với hiệu suất đối kháng dao động từ 69,94–88,54%. Điều kiện sinh trưởng và đối kháng tốt của chúng trong khoảng giá trị nhiệt độ từ 30–40 °C và pH = 5–7, thời gian nuôi

cấy là 48 giờ với khả năng đối kháng trên 60%. Nguồn carbon thích hợp nhất đối với cả 3 chủng vi khuẩn là tinh bột và nguồn nitơ thích hợp lần lượt là $(NH_4)_2SO_4$ đối với 6T3, NH_4NO_3 đối với CT3 và peptone đối với S22. Qua đó, ta thấy cả 3 chủng đều có tiềm năng ứng dụng làm chế phẩm sinh học trong phòng trừ bệnh chảy gôm trên cây bưởi Thanh trà ở Thừa Thiên Huế.

Thông tin tài trợ

Kinh phí thực hiện nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Huế thông qua đề tài với mã số DHH2021-15-18.

Tài liệu tham khảo

1. Hoàng Tấn Quảng, Phạm Thị Diễm Thi, Trương Thị Bích Phượng, Nguyễn Hoàng Lộc. (2013), *Nghiên cứu đa dạng di truyền của bưởi Thanh Trà (Citrus grandis (L.) Osbeck) bằng chỉ thị SSR*, Báo cáo toàn văn Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc năm 2013, 2, 1012–1016.
2. Vũ Khắc Nhượng (2003), Nấm Phytopthora gây hại bưởi Phúc Trạch, *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 4, 41.
3. Nguyễn Thị Kim Sơn và Nguyễn Duy Hưng (2005), Nghiên cứu bệnh chảy gôm do nấm *Phytophthora* spp., Hại trên cây ăn quả có múi ở một số tỉnh Miền Bắc và biện pháp phòng trừ, *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 2, 10.
4. Sở Nông nghiệp và PTNT Thừa Thiên Huế (2023), *Thông báo tình hình sinh vật gây hại cây trồng*. https://snnptnt.thuathienhue.gov.vn/?gd=1&cn=248&tc=23471. Ngày truy cập: 11 tháng 9 năm 2023.
5. Graham, J. & Feichtenberger, E. (2015), Citrus Phytophthora diseases: management challenges and successes, *Journal of Citrus Pathology*, 2, 1–11.
6. Savita, G. S. V., Avinash, N. (2012), Citrus diseases caused by Phytophthora species, GERF *Bulletin of Biosciences*, 3(1), 18–27.
7. Ivanov, A. A., Egor, O. U., Tatiana S. G. (2021), *Phytophthora infestans*: an overview of methods and attempts to combat late blight, *Journal of Fungi*, 7(12), 1071.
8. Axel, C., Zannini, E., Coffey, A., Guo, J., Waters, D. M., Arendt, E. K. (2012), Ecofriendly control of potato late blight causative agent and the potential role of lactic acid bacteria: a review, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(1), 37–48. doi:10.1007/s00253-012-4282-.
9. Deahl, K. L., Cooke, L. R., Black, L. L., Wang, T. C., Perez, F. M., Moravec, B. C., Quinn, M., Jones, R. W. (2002), Population changes in *Phytophthora infestans* in Taiwan associated with the appearance of resistance to metalaxyl, *Pest management science*, 58(9), 951–958. https://doi.org/10.1002/ps.559.

10. Hashemi, M., Tabet, D., Sandroni, M., Benavent-Celma, C., Seematti, J., Andersen, C. B., Grenville-Briggs L. J. (2022), The hunt for sustainable biocontrol of oomycete plant pathogens, a case study of *Phytophthora infestans*, *Fungal Biology Reviews*, 40, 53–69.

11. Cục Bảo vệ thực vật (1996), Quy về việc sử dụng các loại thuốc bảo vệ thực vật hạn chế sử dụng ở Việt Nam. Số: 367-BVTV/QĐ. https://thuvienphapluat.vn/van-ban/Tai-nguyen-Moi-truong/Quy-dinh-367-BVTV-QD-su-dung-thuoc-bao-ve-thuc-vat-42552.aspx. Ngày truy cập: 11 tháng 9 năm 2023.

12. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2010), Quy định về Quản lý thuốc bảo vệ thực vật. Số: 38/2010/TT-BNNPTNT. https://thuvienphapluat.vn/van-ban/The-thao-Y-te/Thong-tu-21-2015-TT-BNNPTNT-quan-ly-thuoc-bao-ve-thuc-vat-277987.aspx . Ngày truy cập: 11 tháng 9 năm 2023.

13. Johan, A., Stenberg, I. S., Paul, G. B., Christer, B., Mukesh, D., Paul, A. E., Hanna, F., Jose, F. G., Dan F. J., Mattias J. (2021), When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications, *Journal of Pest Science*, 94(3), 665–76.

14. Phạm Thị Dung, Nguyễn Thị Bích Ngọc, Cái Văn Thám, Nguyễn Lợi, Nguyễn Nam Dương, Đỗ Duy Hưng, Ngô Thanh Hường, Nguyễn Tiến Bình (2015), Hiệu quả của một số loại thuốc hóa học phòng trừ bệnh chảy gôm do nấm *Phytophthora citrophthora* trên bưởi thanh trà tại Thừa Thiên Huế, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 01(55), 53–59.

15. Phạm Hồng Hiển, Nguyễn Thịị Chúc Quỳnh, Phùng Quang Tùng, Bạch Thị Điệp, Nguyễn Xuân Cảnh (2021), Nấm *Phytophthora* gây bệnh trên cây cam ại một số vùng trồng chính của việt nam, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam,* 08(129), 61–68.

16. Idris, H. A., Labuschagne, N., & Korsten, L. (2007), Screening rhizobacteria for biological control of Fusarium root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological Control*, 40(1), 97–106. doi:10.1016/j.biocontrol.2006.07.017.

17. Dutta, J., & Thakur, D. (2017), Evaluation of multifarious plant growth promoting traits, antagonistic potential and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with commercial tea plants grown in Darjeeling, I*ndia. PloS one*, 12(8), e0182302. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182302.

18. Jung, B. K., Hong, S.-J., Park, G.-S., Kim, M.-C., & Shin, J.-H. (2018), Isolation of *Burkholderia cepacia* JBK9 with plant growth-promoting activity while producing pyrrolnitrin antagonistic to plant fungal diseases. *Applied Biological Chemistry*, 61(2), 173–180. doi:10.1007/s13765-018-0345-9.

19. Fariman, A. B., Abbasiliasi, S., Abdullah, S. N. A., Saud, H. M., and Wong, M. -Y. (2022), Stenotrophomonas maltophilia isolate UPMKH2 with the abilities to suppress rice blast disease and increase yield a promising biocontrol agent. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 121, 101872. doi: 10.1016/j.pmpp.2022.101872.

20. Xu, S., & Kim, B.-S. (2016), Evaluation of *Paenibacillus polymyxa* strain SC09-21 for

biocontrol of Phytophthora blight and growth stimulation in pepper plants. *Tropical Plant Pathology*, 41(3), 162–168. doi:10.1007/s40858-016-0077-5.

21. Radtke, C., Cook, W. S., & Anderson, A. (1994), Factors affecting antagonism of the growth of *Phanerochaete chrysosporium* by bacteria isolated from soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(2), 274–280. doi:10.1007/bf00186972.
22. Aguilar, C., & Klotz, B. (2010), Effect of the temperature on the antagonistic activity of lactic acid bacteria against Escherichia coli and *Listeria monocytogenes*, *Journal of Food Safety*, 30(4), 996–1015. doi:10.1111/j.1745-4565.2010.00257.x.
23. Chang, H., Yang, H., Han, T., Wang, F., & Liu, Y. (2020), Study on the optimal antagonistic effect of a bacterial complex against Monilinia fructicola in peach, *Open Life Sciences*, 15(1), 890–901. doi:10.1515/biol-2020-0080.
24. Berg, G., Opelt, K., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R., & Smalla, K. (2006), The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus Verticillium differs depending on plant species and site, *FEMS Microbiology Ecology*, 56(2), 250-61.
25. Cocozza, C., Abdeldaym, E. A., Brunetti, G., Nigro, F., Traversa, A. (2021), Synergistic effect of organic and inorganic fertilization on the soil inoculum density of the soilborne pathogens Verticillium dahliae and Phytophthora spp. under open-field conditions, *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 8(1),24. doi: 10.1186/s40538-021-00223-w.