

Phân lập, tuyển chọn và xác định các chủng vi khuẩn bản địa có khả năng kích thích sinh trưởng và đối kháng chống lại nấm bệnh *Fusarium oxysporum* và tuyến trùng nốt sừng *Meloidogyne* sp. ở Việt Nam

Lê Thị Thanh Tâm^{1*}, Phạm Thị Lương¹, Lê Thị Phương Thảo¹, Jennifer Jähne², Peter Lasch², Rainer Borriss³

¹Viện Bảo vệ Thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Việt Nam· Phố Viên, phường Đức Thắng, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

²Trung tâm ZBS6, Viện Nghiên cứu Robert Koch, CHLB Đức, Nordufer 20, 13353 Berlin, Germany

³Viện Công nghệ Sinh học Biển, CHLB Đức, Nordufer 20, 13353 Berlin, Germany

Ngày nhận bài 21/11/2022; ngày chuyển phản biện 24/11/2022; ngày nhận phản biện 16/12/2022; ngày chấp nhận đăng 20/12/2022

Tóm tắt:

Cà chua và cà phê là những cây trồng và cây công nghiệp rất quan trọng ở Việt Nam. Tuy nhiên, cả hai loại cây này đều bị gây hại nặng bởi nấm bệnh *Fusarium oxysporum* và tuyến trùng nốt sừng *Meloidogyne* sp. Cho đến nay, chưa có nhiều chế phẩm sinh học vừa phòng bệnh hiệu quả vừa an toàn với sức khỏe con người và môi trường. Với mục tiêu tìm ra các tác nhân hữu ích để sản xuất thử nghiệm các chế phẩm sinh học trong phòng trừ bệnh nấm và tuyến trùng gây hại, nghiên cứu này đã phân lập, tuyển chọn và xác định được 3 chủng vi khuẩn bản địa có triển vọng trong phòng trừ nấm bệnh và tuyến trùng gây hại vùng rễ cây cà chua, cà phê và kích thích sinh trưởng (KTST) cây trồng, gồm các chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* được ký hiệu là S1, S2 và TL7 bằng giải trình tự toàn bộ bộ gen vi khuẩn với các mã GenBank lần lượt là VEW000000000, VEWX000000000 và VEZW000000000.

Từ khóa: *Bacillus velezensis*, cà chua, cà phê, chỉ số bệnh, *Fusarium oxysporum*, *Meloidogyne* sp., tuyến trùng nốt sừng rễ.

Chỉ số phân loại: 4.1

Isolation, selection and identification of indigenous bacterial strains having the ability to promote plant growth and antagonise the fungal disease *Fusarium oxysporum* and root-knot nematode *Meloidogyne* sp. in Vietnam

Thi Thanh Tam Le^{1*}, Thi Luong Pham¹, Thi Phuong Thao Le¹, Jennifer Jähne², Peter Lasch², Rainer Borriss³

¹Plant Protection Research Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences, Vietnam, Vien Street, Duc Thang Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

²Proteomics and Spectroscopy Unit (ZBS6), Centre for Biological Threats and Special Pathogens, Robert Koch Institute, Germany, Nordufer 20, 13353 Berlin, Germany

³Institute of Marine Biotechnology e.V., Germany, Nordufer 20, 13353 Berlin, Germany

Received 21 November 2022; revised 16 December 2022; accepted 20 December 2022

Abstract:

Tomato and coffee are very important crops and industrial plants in Vietnam. However, both are severely damaged by the fungus *F. oxysporum* and the knot root nematode *Meloidogyne* sp. To date, there are not many biological products that are both effective for prevention and safe for human health and the environment. With the goal of finding beneficial agents for experimental bioproduction in the prevention and suppression of harmful fungal and nematode diseases, this study isolated, selected and identified three indigenous bacterial strains with potential in both plant growth promotion plant and the control of fungal diseases and nematodes harmful to the roots of tomato plants, and ability in plant growth promotion, including strains of *Bacillus velezensis* TL7, S1 and S2 by sequencing the whole bacterial genome with GenBank codes VEW000000000, VEWX000000000 and VEZW000000000, respectively.

Keywords: *Bacillus velezensis*, coffee, disease index, *Fusarium oxysporum*, *Meloidogyne* sp., root-knot nematode, tomato.

Classification number: 4.1

1. Đặt vấn đề

Cà chua là loại rau ăn quả có giá trị dinh dưỡng cao được trồng phổ biến quanh năm ở khắp các vùng khí hậu khác nhau của Việt Nam. Theo số liệu của tổ chức GAP (Quy trình thực hành sản xuất nông nghiệp tốt - Good Agricultural Practices),

năm 2011 Việt Nam đứng thứ 27 trên toàn cầu về sản lượng cà chua xuất khẩu, với tổng giá trị 2.417.000 USD. Tuy nhiên, xuất khẩu cà chua của Việt Nam đã giảm 30,7% trong năm 2011-2014 chủ yếu do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh, nấm *F. oxysporum* gây bệnh héo vàng và tuyến trùng *Meloidogyne* sp. gây bệnh nốt sừng rễ cũng như là tác

*Tác giả liên hệ: Email: lethithanhtam.bvtv@gmail.com

nhân tấn công mở đường cho bệnh nấm và vi khuẩn gây hại thêm nghiêm trọng. Tiềm năng thị trường xuất khẩu của cà chua Việt Nam rất lớn, tuy nhiên cũng như nhiều cây trồng khác, việc sản xuất bị hạn chế đáng kể bởi bệnh hại nông nghiệp và ảnh hưởng của biến đổi khí hậu. Cà phê là cây công nghiệp quan trọng ở Việt Nam đã từng được xuất khẩu đứng thứ 2 trên thế giới chỉ sau Brazil. Tuy nhiên, theo số liệu của Tổng cục Thống kê, năm 2015 sản xuất cà phê đã bị sụt giảm 20% sản lượng, tương đương giá trị kim ngạch xuất khẩu giảm 13% so với 2014. Thiệt hại gây ra chủ yếu bởi nấm bệnh *F. oxysporum* và tuyến trùng *Meloidogyne* sp. khiến cây bị vàng lá, thối rễ, mất năng suất. Trước đây, các loại thuốc hóa học bảo vệ thực vật được sử dụng để phòng trừ bệnh trên cây cà phê nhưng đã bị hạn chế hoặc cấm do để lại dư lượng độc tố không đảm bảo sức khỏe con người và môi trường tự nhiên, cũng như các sản phẩm cà phê tạo ra không đủ điều kiện xuất khẩu sang các quốc gia phát triển.

Trên thế giới, việc sử dụng các chế phẩm sinh học làm từ các chủng vi khuẩn *Bacillus* nội sinh hoặc vùng rễ có khả năng KTST cây trồng và diệt trừ nguồn nấm bệnh và tuyến trùng gây hại thay thế cho các hóa chất nông nghiệp như phân bón, thuốc hóa học bảo vệ thực vật đang là xu hướng phát triển [1-3]. Các vi khuẩn này thường tác động thông qua việc tiết ra các hợp chất có khả năng KTST như indole-3-acetic acid (IAA), phytase, các hợp chất bay hơi [4-6] cùng các hoạt chất sinh học tự nhiên có tác dụng kháng vi khuẩn nấm bệnh như bacillomycinD và fengycin [7] hay plantazolicin trừ tuyến trùng [8-10]. Ở Việt Nam bước đầu có một số nghiên cứu sử dụng các chế phẩm sinh học từ vi khuẩn, giúp giảm việc sử dụng phân hóa học, an toàn với môi trường và giảm chi phí sản xuất [11]. Tuy nhiên, việc sử dụng các chế phẩm sinh học để phòng trừ các tác nhân nấm và tuyến trùng gây bệnh trên các cây trồng nói chung và cây cà chua, cây cà phê nói riêng với hiệu quả cao, ổn định chưa có nhiều vì chưa tìm được nhiều chủng vi khuẩn bản địa có đồng thời cả khả năng KTST và hoạt tính đối kháng cao với nấm bệnh và tuyến trùng.

Do vậy nghiên cứu này được thực hiện nhằm sàng lọc, tuyển chọn và xác định các chủng vi khuẩn bản địa có cả khả năng KTST và đối kháng với nấm và tuyến trùng gây bệnh nốt sần trên cây cà chua, bệnh vàng lá thối rễ trên cây cà phê.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Địa điểm thu thập nguồn mẫu

Chủng nấm *F. oxysporum* gây bệnh vàng lá cà phê cùng các chủng vi khuẩn bản địa đã được phân lập từ các mẫu đất vùng rễ cây cà phê, thân lá cây cà phê thu thập tại Đà Lạt, Lâm Đồng và Buôn Ma Thuột, Đắk Lắk, các mẫu đất, thân, lá cây ký chủ khác thu thập được ở các vùng khác (bảng 1) sau đó được làm thuần, lưu giữ tại Bộ môn Bệnh cây và Miễn dịch thực vật, Viện Bảo vệ Thực vật.

Bảng 1. Đặc điểm khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn bản địa có tiềm năng đối kháng với nấm bệnh và tuyến trùng gây hại trên cây cà phê.

STT	Chủng vi khuẩn	Hình thái khuẩn lạc	Vị trí lấy mẫu	Địa điểm thu thập mẫu
1	TL7	Tròn, nhúm và lõm ở giữa, màu trắng đục, nhầy nhớt	Thân lá non cây cà phê khỏe	Cầu Đất, Đà Lạt, Lâm Đồng
2	S1	Tròn, có hình tròn nhỏ lõm ở giữa, có viền rìa xung quanh, có tia ít, màu trắng kem	Đất vùng rễ cây cà phê	Hoài Đông, Krông Pak, Đắk Lắk
3	S2	Tròn, có hình tròn nhỏ lõm ở giữa, có viền rìa xung quanh, có tia nhiều, màu trắng kem	Đất vùng rễ cây cà phê	Ea Tiếu, Cu Kuin, Đắk Lắk
4	A22	Hình thủy lá, trắng kem, có bụi bào tử trên bề mặt, có tia quanh rìa khuẩn lạc	Rễ cây hồ tiêu khỏe	Ea Tiếu, Cu Kuin, Đắk Lắk
5	CD3-6	Tròn, màu trắng kem	Mẫu đất xung quanh rễ cây cà phê ở vườn rau hữu cơ	Xuân Thượng, Bái Thượng, Sóc Sơn, Hà Nội
6	CD3-1	Tròn, màu trắng kem	Mẫu đất xung quanh rễ cây cà phê ở vườn rau hữu cơ	Xuân Thượng, Bái Thượng, Sóc Sơn, Hà Nội
7	A35	Tròn, có viền gờ xung quanh rìa, màu trắng vàng	Rễ cây hồ tiêu khỏe	Vĩnh Thành, Vĩnh Linh, Quảng Trị
8	A25	Tròn, lõm, nhúm, có vòng viền rìa bao quanh, màu trắng đục, nhớt	Rễ cây hồ tiêu khỏe	Vĩnh Thành, Vĩnh Linh, Quảng Trị
9	A24	Tròn, bề mặt phủ bột mịn bào tử, có nhiều tia xung quanh, trắng kem	Rễ cây hồ tiêu khỏe	Vĩnh Thành, Vĩnh Linh, Quảng Trị
10	A31	Tròn, bề mặt lõm có bột bào tử, ở giữa có thể có giọt nhớt lỏng, có rìa viền tròn bao quanh, màu trắng đục, nhớt	Rễ cây hồ tiêu khỏe	Vĩnh Thành, Vĩnh Linh, Quảng Trị
11	A8	Tròn khi nhỏ, khi to, phát triển có hình thủy lá, trắng kem, có bụi bào tử trên bề mặt, có tia quanh rìa khuẩn lạc	Rễ cây hồ tiêu khỏe	Ea Tiếu, Cu Kuin, Đắk Lắk
12	KT1	Tròn, nhúm nhúm ở giữa, trắng đục, trong suốt, lỏng nhớt	Đất vùng rễ cây hồ tiêu khỏe	Chư Sê, Gia Lai
13	CD3-5	Tròn, màu trắng kem	Mẫu đất xung quanh rễ cây cà phê ở vườn rau hữu cơ	Xuân Thượng, Bái Thượng, Sóc Sơn, Hà Nội
14	SN4-3	Tròn, màu trắng kem	Sâu yếu trên cây ngô ở vườn nhà không dùng thuốc và phân bón hóa học	Xuân Thượng, Bái Thượng, Sóc Sơn, Hà Nội

Tuyến trùng *Meloidogyne* sp. gây nốt sần trên cây cà phê cũng được thu thập tại Đà Lạt, Lâm Đồng và Buôn Ma Thuột, Đắk Lắk, lưu giữ và nhân nguồn tại nhà lưới Bộ môn Bệnh cây và Miễn dịch thực vật, Viện Bảo vệ Thực vật.

2.2. Vật liệu, hóa chất nghiên cứu

Hạt giống *Arabidopsis thaliana* dòng Col-0 được nhập khẩu từ Mỹ vào Việt Nam.

Tuyến trùng *Caenorhabditis elegans* N2 (Carolina - USA, code 173500) ăn *Escherichia coli* OP50 (In stock Freezedried OP50 Vials 40 Units (LabTIE), code 1.17.040).

Hạt giống cây cà chua hè chịu nhiệt được mua ở Công ty Giống cây trồng Hà Nội.

Các hóa chất, dụng cụ dùng để tách chiết gDNA, giải trình tự gen, khử trùng, môi trường nuôi cấy mua từ các công ty hóa chất của Đức, Mỹ, Anh và Trung Quốc.

Địa điểm thực hiện thí nghiệm: Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn cho các thử nghiệm trong phòng và nhà lưới được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm của Bộ môn Bệnh cây và Miễn dịch thực vật, Viện Bảo vệ Thực vật. Các thí nghiệm giải trình tự toàn bộ bộ gen vi khuẩn (Whole genome sequencing - WGS) được thực hiện tại Viện Bảo vệ Thực vật và Viện Nghiên cứu Robert Koch (Robert Koch Institute - RKI) cùng Viện Công nghệ Sinh học biển (IMab) tại Đức.

2.3. Thu thập, phân lập mẫu

Thu thập, phân lập mẫu vi khuẩn nội sinh theo theo phương pháp nghiên cứu của X. Wang và cs (2014) [12], trong đó mẫu lá, thân và rễ được lấy từ các cây không bị nhiễm bệnh và biểu hiện sức sống khỏe mạnh trong vườn cà phê bị bệnh. Các vi khuẩn vùng rễ được phân lập từ các mẫu đất theo phương pháp của L.W. Burgess và cs (2009) [13].

2.4. Tuyển chọn và xác định các chủng vi khuẩn có tiềm năng đối kháng với nấm bệnh *F. oxysporum*

Sàng lọc nhanh các chủng vi khuẩn có tiềm năng đối kháng với nấm bệnh như phương pháp của S.H. Ji và cs (2013) [14] với một số điều chỉnh nhỏ như sau:

Đánh giá nhanh hoạt tính đối kháng với nấm bệnh *F. oxysporum* của các chủng vi khuẩn bản địa phân lập. Một mẫu thạch agar (đường kính 5 mm) chứa nấm bệnh *F. oxysporum* được đặt ở trung tâm của đĩa thạch PDA. Các chủng vi khuẩn cần kiểm tra được nuôi cấy trong môi trường LB (Luria - Bertani) lỏng sau 2 ngày nuôi cấy ở 28°C. Đặt các đĩa giấy hình tròn (đường kính 5 mm) đã được khử trùng vào trong các đĩa PDA này và nhỏ 100 µl dung dịch của mỗi chủng vi khuẩn được kiểm tra vào mỗi đĩa giấy, trong khi đối chứng chỉ nhỏ môi trường LB. Sau đó, các đĩa được ủ ở 28°C trong 7 ngày. Hoạt tính kháng nấm được chỉ ra khi vòng vô khuẩn xuất hiện xung quanh đĩa giấy được nhỏ dung dịch vi khuẩn bản địa được kiểm tra. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần cho mỗi chủng vi khuẩn được sàng lọc.

Sử dụng phương pháp đối kháng trực tiếp để khảo sát đặc tính đối kháng với nấm *F. oxysporum*. Trước thử nghiệm, chủng nấm *F. oxysporum* được nhân nuôi 5 ngày trên môi trường PDA và các chủng vi khuẩn cũng được nhân nuôi 2 ngày trong môi trường LB lỏng trước thử nghiệm. Thí nghiệm được thực hiện trên đĩa thạch PDA. Tiến hành cấy 1 chủng vi khuẩn ở tâm đĩa và đặt khoanh khuẩn ty nấm với đường kính 5 mm ở 2 bên của chủng vi khuẩn, cách mép đĩa 1/3 bán kính đĩa, công thức đối chứng không được cấy vi khuẩn. Sau 7 ngày đánh giá khả năng đối kháng thông qua hiệu quả ức chế (%) theo công thức sau:

$$H = [(Ddc - D)/Ddc] \times 100$$

trong đó H: hiệu quả ức chế (%); D: kích thước tán nấm bệnh trung bình trên đĩa đối kháng; Ddc: đường kính tán nấm bệnh trung bình trên đĩa đối chứng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần đối với mỗi chủng vi khuẩn cần chọn lọc, kết quả là giá trị trung bình cộng của các lần lặp lại.

2.5. Tuyển chọn và xác định các chủng vi khuẩn có khả năng KTST thông qua cây mô hình *A. thaliana*

Thử nghiệm đánh giá khả năng tăng cường KTST cây trồng với hạt giống cây *A. thaliana* theo phương pháp của A. Budiharjo và cs (2014) [15]. Các hạt *A. thaliana* được cho vào trong ống eppendorf có chứa 1 ml dung dịch 10% sodium hypochlorite lắc trong 3 phút. Sau đó dùng pipet hút loại bỏ dung dịch sodium hypochlorite, rửa lại bằng nước cất vô trùng và lặp lại các bước khử trùng 4 lần. Các hạt đã khử trùng được đặt trên các đĩa petri chứa môi trường Murashige và Skoog (MS) với nồng độ các chất giảm 50% so với ban đầu cùng 0,6% agar, 3% sucrose và để nảy mầm trong 7 ngày ở 22°C. Sau 7 ngày nhổ các cây con *A. thaliana* và nhúng rễ vào trong huyền phù vi khuẩn (1×10^5 CFU/ml) trong 5 phút và 5 cây con được chuyển vào trong các đĩa petri chứa môi trường MS đã được chuẩn bị ở trên với 1% agar. Sau đó, các đĩa này được đặt trong buồng sinh trưởng ở 22°C với quang chu kỳ 14 giờ. Sau 21 ngày tiến hành cân trọng lượng của các cây *A. thaliana* để đánh giá khả năng KTST của các chủng vi khuẩn thí nghiệm.

2.6. Thử nghiệm hoạt tính đối kháng chống lại tuyến trùng

Thử nghiệm hoạt tính đối kháng chống lại tuyến trùng thông qua mô hình tuyến trùng sinh học *Caenorhabditis elegans* N2 sử dụng thức ăn là vi khuẩn *E. coli* OP50 theo phương pháp của Z. Liu và cs (2013) [16] với một số thay đổi nhỏ được chi tiết như sau: Sau khi nuôi cấy qua đêm, 50 µl *E. coli* OP50 được cung cấp làm thức ăn cho *C. elegans* trên các đĩa thạch chứa môi trường sinh trưởng tuyến trùng (NGM) [50 mM NaCl, 0,25% (w/v) peptone, 1 mM CaCl₂, 5 µg/ml cholesterol, 25 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄ và 1,7% (w/v) agar]. Chủng Bristol N2 của *C. elegans* được nuôi cấy trong 2-3 ngày ở 20°C trên nền vi khuẩn. Khi đủ trứng tuyến trùng (20-50 trứng/cm²) đem rửa bằng 4 ml môi trường M9 đã khử trùng (5,8 g Na₂HPO₄·7H₂O, 3 g KH₂PO₄, 5 g NaCl, 0,25 g MgSO₄·7H₂O) từ một đĩa thạch NGM và tiếp tục rửa thường xuyên trong môi trường M9 để giảm bớt nồng độ vi khuẩn. Sau khi loại bỏ dung dịch lỏng phía trên, xử lý bằng alkaline hypochlorite được thực hiện để tách các trứng với 1-1,5 ml dung dịch tẩy rửa có khả năng dung giải (5 M NaOH 0,3 ml, 8% NaClO 1,2 ml, dung dịch H₂O 3,5 ml). Các trứng được rửa lại lần nữa bằng môi trường M9, sau đó được ủ trong 4-5 ml môi trường M9 medium ở 25°C trong 18 giờ để nhận được tuyến trùng giai đoạn ấu trùng tuổi 1 (L1). Các L1 này sau đó được chuyển lại tới các đĩa thạch NGM chứa *E. coli* OP50 và được ủ ở 25°C trong 2-3 ngày tới giai đoạn tuổi 4 (L4). Các L4 được sử dụng cho các thử nghiệm sinh học đối kháng tuyến trùng.

Tất cả thử nghiệm chết nhanh và chết chậm đều được thực hiện [17-19] như sau: Trong thử nghiệm diệt chậm, sấp xỉ 60 tuyến trùng L4 *C. elegans* được thêm vào các đĩa NGM chứa nền vi khuẩn cần được kiểm tra khả năng đối kháng với tuyến trùng. Các tuyến trùng sau đó được ủ ở 25°C và kiểm tra kết quả sau 24, 48 và 72 giờ. Trong thử nghiệm diệt nhanh, các chủng vi khuẩn kiểm tra được nuôi cấy qua đêm ở 37°C và lắc ở 200

rpm trong 3 ml môi trường lỏng thí nghiệm (4,0 g NaCl, 2,5 g peptone, 5,0 g tryptone, 2,5 g yeast extract, 5 mg cholesterol, 7,5 ml glycerol, thêm nước tới 1 lít). Sau đó, mỗi 100 µl dung dịch nuôi cấy vi khuẩn được pha loãng bằng môi trường M9 tới 600 µl và chuyển vào mỗi giếng bên trong bản nhựa chứa 12 giếng. Mỗi giếng được cho khoảng 60 tuyến trùng L4 ủ trong 24 giờ ở 25°C. Trong các thí nghiệm sinh học này, các tuyến trùng được xem là chết khi không di chuyển hoặc phản ứng khi bị chạm nhẹ bởi kim. Tỷ lệ chết của tuyến trùng được xác định như tỷ số của các tuyến trùng chết trên tổng số tuyến trùng thả trong 1 giếng thí nghiệm. Tất cả các thử nghiệm sinh học được thực hiện trong 3 lần lặp riêng biệt.

2.7. Thử nghiệm hoạt tính đối kháng của các chủng vi khuẩn bản địa chống lại tuyến trùng *Meloidogyne* sp. gây bệnh nốt sừng trên rễ cây cà chua trong nhà lưới

Tuyến trùng *Meloidogyne* sp. gây bệnh hại cà phê được chuẩn bị theo phương pháp của D.J. Hooper và cs (2005) [20], sau đó nhân lên bằng các cây cà chua sạch bệnh theo phương pháp của J.A.L. Pérez và cs (2011) [21] với những biến đổi như sau: Hạt giống cây cà chua được khử trùng bề mặt bằng 70% ethanol trong 5 phút, sau đó bằng NaOCl 1% trong 15 phút và được rửa lại 4 lần bằng nước cất khử trùng để loại bỏ dư lượng NaOCl 1%. Sau đó, hạt giống cây cà chua được gieo trong các chậu đất đã được khử trùng và được thêm 200 con tuyến trùng tuổi 2 (J2) vào trong mỗi chậu đất. Chăm sóc cây tới 1 tháng tuổi, nhổ rễ cây và thu thập các rễ có nốt sừng. Các rễ này được rửa dưới vòi nước chảy sau đó khử trùng bằng NaOCl 4% trong 5 phút, sau đó rửa lại 3 lần bằng nước cất đã khử trùng. Sử dụng kim để nhấc túi trứng bên trong nốt sừng ở rễ cà chua ra, ủ trong nước cất được khử trùng và cung cấp với oxy ở nhiệt độ phòng tới khi trứng nở (6-10 ngày). Thu thập tuyến trùng J2 từ các trứng được thu lại trong các rây lưới lọc 500 µm và rửa nhẹ bằng nước vòi trong 5 phút [22].

Do yêu cầu nhiệt độ của các cây cà chua, thử nghiệm được thiết lập trong nhà lưới có nhiệt độ trung bình khoảng 28°C, giống cà chua được sử dụng là giống xuân hè chịu nhiệt, được trồng trong các chậu đất có pH 7,5 (kiềm nhẹ), lượng phân bón MO: 0,5% (thấp), NH₄ 15,0 (thấp), P 32,0 (cao) và K 0,80 (cao).

Chủng nấm vi khuẩn và tuyến trùng theo thứ tự trong quy trình như sau: Các hạt cà chua được khử trùng tương tự như trong bước nhân nguồn cho tuyến trùng, sau đó được gieo vào các khay chứa đất khử trùng tới khi mọc lên được 2 lá thật hay khoảng 2 tuần sau gieo, các cây con được chuyển vào trong các chậu đất đường kính 20 cm chứa 1 kg đất đã được hấp khử trùng. Sau 2 tuần chuyển cây vào chậu, xử lý các chủng vi khuẩn bản địa cần kiểm tra về khả năng đối kháng với tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trên cây cà chua ở mật độ 3,65x10⁸ CFU/ml; công thức đối chứng: không xử lý vi khuẩn. Sau 2 tuần xử lý chủng vi khuẩn tiềm năng, chủng nấm 1000 con tuyến trùng J2 *Meloidogyne* sp. được chuyển vào trong mỗi chậu trồng cà chua của cả công thức xử lý và công thức đối chứng [23].

Sau 2,5 tháng, thu rễ cây cà chua và đánh giá cấp bệnh tuyến trùng *Meloidogyne* sp. theo thang phân cấp của J. Bridge và S.L.J. Page (1980) [24], trong đó chỉ số bệnh (CSB, %) được tính bằng tổng của các tích số cây bị bệnh nhân với cấp bệnh tương ứng chia cho tổng số cây điều tra nhân với cấp bệnh cao nhất trong thang phân cấp, sau đó nhân với 100. Tính hiệu quả (%) trong công thức so sánh với đối chứng như sau:

$$\text{Hiệu quả (\%)} = [(\text{Đối chứng} - \text{Công thức}) / \text{Đối chứng}] \times 100$$

trong đó hiệu quả (%): hiệu quả của việc phòng chống bệnh tuyến trùng *Meloidogyne* sp. của các chủng vi khuẩn trong so sánh với đối chứng không xử lý chủng vi khuẩn; đối chứng: số tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong 100 g đất vùng rễ hoặc trong 5 g rễ cây cà chua hoặc CSB nốt sừng cà chua ở công thức đối chứng không xử lý chủng vi khuẩn nào; công thức: số tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong 100 g đất vùng rễ hoặc trong 5 g rễ cây cà chua hoặc CSB nốt sừng cà chua ở các công thức xử lý các chủng vi khuẩn.

2.8. Định danh các chủng vi khuẩn bằng WGS

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên các đĩa chứa môi trường LB agar, các khuẩn lạc đơn được lựa chọn sau 24 giờ ở 37°C. DNA bộ gen vi khuẩn được tách chiết sử dụng kit The DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). Giải trình tự được tiến hành ở LGC Genomics (Berlin, Germany) với hệ thống Illumina HiSeq sử dụng việc đọc các đoạn 150 bp được bắt cặp cuối. Các tham số được mặc định đặt trước được sử dụng cho tất cả các phần mềm trừ khi được chỉ ra cụ thể. Phần mềm tính toán khoảng cách từ bộ gen tới bộ gen (Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) v2.1 cung cấp bởi DSMZ (<http://ggdc.dsmz.de>) được sử dụng cho việc phân biệt loài dựa trên bộ gen được đánh giá thông qua các giá trị lai DNA-DNA (dDDH) đối với một bộ gen tham khảo đối chứng [25, 26].

2.9. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được xử lý bằng Excel, phần mềm phân tích thống kê Statistical Analysis Systems (SAS) và phân tích phương sai (ANOVA).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Điều tra, thu thập và phân lập mẫu

Các chủng vi sinh có khả năng đối kháng với nấm *F. oxysporum* và tuyến trùng *Meloidogyne* sp. gây bệnh vàng lá thối rễ trên cây cà phê thuộc tỉnh Lâm Đồng, Đắk Lắk được thu thập. Từ 50 mẫu rễ và đất đã thu thập phân lập được 14 chủng vi khuẩn với các đặc điểm nhận dạng *Bacillus* như: trực khuẩn hình que, gram dương, sinh nội bào tử, di động, khuẩn lạc tròn hoặc tròn méo, có màu trắng trong đến trắng đục, rìa tròn đều, lượn sóng hoặc răng cưa (bảng 1).

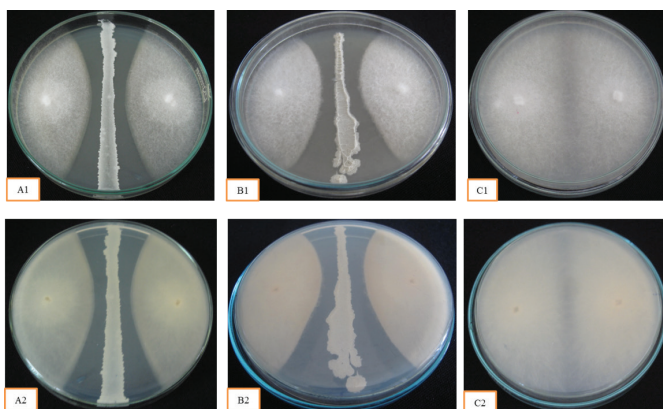
3.2. Tuyển chọn và xác định các chủng vi khuẩn có tiềm năng đối kháng với nấm *F. oxysporum*

Kết quả thử nghiệm đánh giá khả năng đối kháng nấm bệnh *F. oxysporum* của các chủng *Bacillus* xác định thông qua hiệu quả ức chế cho thấy, 100% các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm bệnh *F. oxysporum*, hiệu quả ức chế đạt 4,73-88,83%. Trong đó, 4 chủng vi khuẩn ký hiệu là KT1, TL7, S1 và S2 có hoạt tính đối kháng nấm bệnh *F. oxysporum* mạnh nhất với hiệu quả ức chế lần lượt là 88,83, 79,11, 69,76 và 60,42% (bảng 2, hình 1).

Bảng 2. Khả năng đối kháng nấm bệnh *F. oxysporum* gây bệnh văng lá cà phê của các chủng vi khuẩn bản địa phân lập được.

STT	Chủng vi khuẩn	Bán kính tán nấm (mm)	Hiệu quả ức chế (%)
1	TL7	4,49 ^k	79,11 ^b
2	S1	6,5 ^j	69,76 ^c
3	S2	8,53 ⁱ	60,42 ^d
4	A22	11,53 ^e	46,41 ^f
5	CD3-6	19,53 ^c	9,36 ^g
6	CD3-1	18,75 ^{cd}	13,04 ^g
7	A35	12,57 ^f	41,58 ^e
8	A25	10,57 ^h	50,88 ^e
9	A24	20,54 ^b	4,73 ^k
10	A31	17,57 ^e	18,47 ^h
11	A8	19,54 ^c	9,37 ^g
12	KT1	2,41 ^l	88,83 ^a
13	CD3-5	18,49 ^{de}	14,20 ^g
14	SN4-3	19,53 ^c	9,40 ^g
15	Đối chứng	21,56 ^d	0 ^l
	LSD 5%	0,93	1,78
	CV %	3,93	3,09

Nhóm Duncan được thực hiện trong quy trình ANOVA với t Tests (LSD=5%), trong đó các giá trị trung bình trong cùng một cột được phân lớp có chữ giống nhau thì không khác nhau về mặt ý nghĩa thống kê.



Hình 1. Hình ảnh về thử nghiệm khả năng đối kháng của một số chủng vi khuẩn bản địa với nấm *F. oxysporum*. (A1-A2) Ảnh chụp đối kháng nấm của chủng vi khuẩn S1 từ mặt trước và mặt sau của đĩa thử nghiệm; (B1-B2) Ảnh chụp đối kháng nấm của chủng vi khuẩn TL7 từ mặt trước và mặt sau của đĩa thử nghiệm; (C1, C2) Ảnh chụp mặt trước và mặt sau của đĩa đối chứng chỉ có nấm *F. oxysporum* cấy đối xứng.

Nhằm xác định nhanh tiềm năng đối kháng với tuyến trùng gây bệnh của các chủng vi khuẩn bản địa phân lập được trong điều kiện phòng thí nghiệm, các thử nghiệm giết chết nhanh và giết chết chậm tuyến trùng được thực hiện thông qua mô hình tuyến trùng sinh học *C. elegans*. Kết quả được thể hiện ở bảng 3 và hình 2 cho thấy 100% các chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng thông qua tỷ lệ chết nhanh tuyến trùng đạt 15,37-100%, trong đó 3 chủng vi khuẩn ký hiệu là TL7, S2 và S1 có hoạt tính đối kháng tuyến trùng *C. elegans* mạnh nhất với tỷ lệ chết nhanh lần lượt là 100, 98,52 và 97,59%, trong khi chủng KT1 chỉ đạt tỷ lệ chết nhanh là 55,74%. Tỷ lệ chết chậm ở 4 chủng vi khuẩn này có chiều hướng tương tự và giá trị thấp hơn tỷ lệ chết nhanh.

Bảng 3. Tiềm năng đối kháng với tuyến trùng của các chủng vi khuẩn bản địa thông qua mô hình tuyến trùng *C. elegans*.

STT	Chủng vi khuẩn	Tỷ lệ chết nhanh (sau 24 giờ) (%)	Tỷ lệ chết chậm (sau 72 giờ) (%)
1	TL7	100,00 ^a	76,41 ^a
2	S1	97,59 ^a	69,15 ^c
3	S2	98,52 ^a	72,96 ^b
4	A22	28,7 ^e	23,71 ^e
5	CD3-6	30,74 ^e	22,82 ^b
6	CD 3-1	21,85 ^f	14,44 ⁱ
7	A35	58,52 ^c	51,33 ^e
8	A25	56,85 ^c	50,29 ^{ef}
9	A24	57,41 ^c	48,67 ^f
10	A31	51,85 ^d	26,52 ^g
11	A8	23,15 ^f	21,86 ^b
12	KT1	55,74 ^c	48,93 ^f
13	CD3-5	15,37 ^g	10,89 ^j
14	SN4-3	74,07 ^b	58,26 ^d
15	Đối chứng	0,00 ^h	0,00 ^k
	CV	4,01	3,9
	LSD	3,44	2,81

Nhóm Duncan được thực hiện trong quy trình ANOVA với t Tests (LSD=5%), trong đó các giá trị trung bình trong cùng một cột được phân lớp có chữ giống nhau thì không khác nhau về mặt ý nghĩa thống kê.

3.3. Tuyển chọn và xác định các chủng vi khuẩn bản địa có khả năng KTST cây trồng thông qua cây mô hình *A. thaliana*

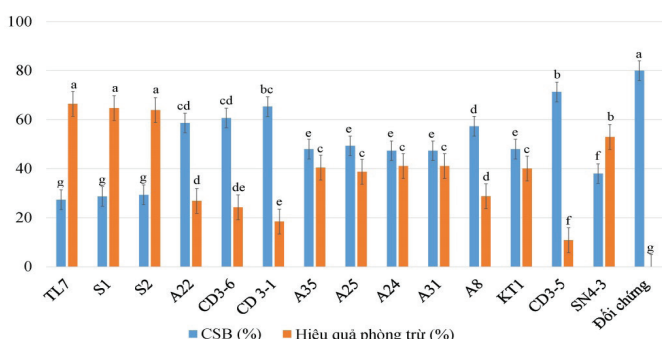
Đã có nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước sử dụng cây *A. thaliana* để đánh giá khả năng thúc đẩy tăng trưởng cây trồng của các PGPR. Ở Việt Nam, kết quả nghiên cứu của C.N. Thanh và cs (2018) [11] cho thấy, 2 chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. P112 và P113 có khả năng KTST rễ và chồi của cây *A. thaliana* gấp 4,1-4,9 và 2,3-2,5 lần so với đối chứng. Ở thí nghiệm này, cây mô hình *A. thaliana* được sử dụng để đánh giá khả năng KTST cây trồng của 14 chủng vi khuẩn *Bacillus* đã được tuyển chọn, kết quả ghi nhận được 4/14 chủng có khả năng KTST của cây *A. thaliana* vượt trội so với đối chứng gồm S1, S2, A35 và TL7 thể hiện qua phần trăm tăng trọng lượng so với cây ở công thức đối chứng không xử lý lần lượt là 34,16, 32,68, 27,09 và 25,21% (bảng 4).

Bảng 4. Thử nghiệm khả năng kích thích sinh trưởng của vi khuẩn bản địa thông qua mô hình cây *A. thaliana*.

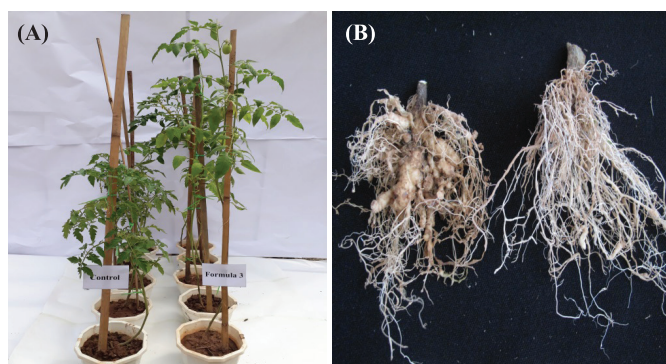
STT	Chủng vi khuẩn	Trọng lượng cây (mg)	% tăng so với đối chứng
1	TL7	158,20 ^b	25,21 ^d
2	S1	169,70 ^a	34,16 ^a
3	S2	167,90 ^a	32,68 ^b
4	A22	133,5 ^c	5,56 ^e
5	CD3-6	128,02 ^{cd}	1,22 ⁱ
6	CD 3-1	128,65 ^{cd}	1,71 ^{hi}
7	A35	160,63 ^b	27,09 ^c
8	A25	130,61 ^{cd}	3,22 ^e
9	A24	132,25 ^{cd}	4,58 ^f
10	A31	129,37 ^{cd}	2,24 ^h
11	A8	129,52 ^{cd}	2,37 ^h
12	KT1	129,47 ^{cd}	2,32 ^h
13	CD3-5	130,86 ^{cd}	3,43 ^e
14	SN4-3	131,25 ^{cd}	3,73 ^e
15	Đối chứng	126,52 ^c	0,00 ^j
	LSD 5%	6,01	0,67
	CV %	2,59	4,04

Nhóm Duncan được thực hiện trong quy trình ANOVA với t Tests (LSD=5%), trong đó các giá trị trung bình trong cùng một cột được phân lớp có chữ giống nhau thì không khác nhau về mặt ý nghĩa thống kê.

Tuyến trùng nốt rỗ như *Meloidogyne* sp. là một trong các tác nhân gây thiệt hại nhất trên cây trồng nông nghiệp nhiệt đới ở Việt Nam, trong đó có cà chua và cà phê. Bản thân cây cà chua được sử dụng như cây chỉ thị và nhân nguồn cho tuyến trùng nốt sừng vì cây cà chua rất dễ nhiễm tuyến trùng và biểu hiện bệnh rõ ràng trong một thời gian ngắn. Kết quả thí nghiệm cho thấy, ở các công thức thí nghiệm xử lý các chủng vi khuẩn TL7, S1, S2, cây cà chua có CSB thấp lần lượt là 27,33, 28,67 và 29,33%, thấp hơn nhiều so với CSB ở công thức đối chứng là 80%. Nói cách khác, hiệu quả phòng trừ bệnh tuyến trùng nốt sừng trên cây cà chua của 3 chủng vi khuẩn TL7, S1, S2 này so với đối chứng không xử lý lần lượt là 66,46, 64,77 và 63,94% (hình 2 và 3).



Hình 2. Đồ thị biểu diễn hiệu quả giảm bệnh tuyến trùng nốt sừng *Meloidogyne* sp. trên cây cà chua của các chủng vi khuẩn bản địa phân lập được.



Hình 3. Hiệu quả giảm bệnh tuyến trùng nốt sừng *Meloidogyne* sp. trên cây cà chua của chủng vi khuẩn TL7. (A) Phần cây cà chua trên mặt đất ở đối chứng (bên trái), CT xử lý TL7 (bên phải); (B) Phần rễ cây cà chua ở đối chứng (bên trái), CT xử lý TL7 (bên phải).

3.4. Kết quả định danh các chủng vi khuẩn bản địa có khả năng KTST và hoạt tính đối kháng cao bằng phương pháp WGS

Từ các thử nghiệm khả năng KTST và đối kháng với nấm bệnh cùng tuyến trùng trong phòng thí nghiệm cũng như thử nghiệm giảm bệnh tuyến trùng nốt sừng trên cà chua trong nhà lưới của Viện Bảo vệ Thực vật, 3 chủng vi khuẩn phân lập từ đất được lựa chọn gồm S1, S2 và TL7 để định danh bằng phương pháp WGS nhằm xác định đến loài. Kết quả lắp ráp trình tự bộ gen được gửi lưu giữ trong ngân hàng gen với các mã và thông số được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả giải trình tự toàn bộ bộ gen của các chủng vi khuẩn được tuyển chọn

Ký hiệu chủng vi khuẩn	Mã GenBank	Kích cỡ bộ gen (bp)	G+C (%)	Contig N ₅₀ (bp)	Tổng số các gen	dDDH (%)	AnIb (%)
S1	VEWW000000000	3.866.305	46,1	486.485	3.893	85,80	97,01
S2	VEWX000000000	3.864.301	46,1	397.838	3.893	85,70	97,12
TL7	VEWZ000000000	3.865.047	46,4	428.384	3.879	85,70	97,94

Căn cứ vào giá trị phân biệt loài của AnIb từ 96% trở lên [25] và giá trị phân biệt loài của dDDH từ 70% trở lên [26], trình tự bộ gen của 3 chủng vi khuẩn S1, S2, TL7 đều là chủng *Bacillus velezensis* và chủng tương tự trong ngân hàng gen là *B. velezensis* KCTC13012. Bộ gen của cả 3 chủng vi khuẩn *B. velezensis* này đều chứa đồng thời gen *fen* mã hóa hoạt chất fengycin có tác dụng diệt trừ nấm bệnh và gen *pnz* mã hóa hoạt chất plantazolicin có tác dụng diệt trừ tuyến trùng [11].

4. Kết luận

1. Đã phân lập và tuyển chọn được 5 chủng vi khuẩn *Bacillus* gồm TL7, S1, S2, A35, KT1 từ đất vùng rễ và thân lá cây cà phê có khả năng đối kháng cao với nấm bệnh *F. oxysporum* và tuyến trùng *Meloidogyne* sp. cũng như có khả năng KTST cây trồng.

2. Ba chủng vi khuẩn gồm S2, S1 và TL7 được tuyển chọn có khả năng phòng trừ tuyến trùng nốt sần trên cây cà chua với hiệu quả phòng trừ cùng mức phân lớp là 63,94-66,46%.

3. Ba chủng vi khuẩn được định danh đến loài từ việc giải WGS và căn cứ vào các giá trị dDDH và ANI xác định loài đã được tính toán là *B. velezensis* S1, *B. velezensis* S2 và *B. velezensis* TL7 với các mã số đăng ký trên GenBank lần lượt là VEW000000000, VEWX000000000 và VEZW000000000. Cả 3 chủng vi khuẩn đều chứa gen *fen* và *pzn* mã hóa các hoạt chất fengycin và plantazolin có tác dụng diệt trừ nấm bệnh và tuyến trùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. Lugtenberg, F. Kamilova (2009), "Plant-growth-promoting rhizobacteria", *Ann. Rev. Microbiol.*, **63**, pp.541-556, DOI: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918.
- [2] R. Borriss (2011), "Use of plant-associated bacillus strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture", *Bacteria in Agrobiol.: Plant Growth Responses*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.41-76.
- [3] D.M. Weller (1988), "Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria", *Ann. Rev. of Phytopathol.*, **26**, pp.379-407, DOI: 10.1146/annurev.py.26.090188.002115.
- [4] T. Beric, M. MilanKojic, S. Stankovic, et al. (2012), "Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria", *Food Technol. Biotechnol.*, **50(1)**, pp.25-31.
- [5] E.E. Idris, O. Makarewicz, A. Farouk, et al. (2002), "Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plantgrowth-promoting effect", *Microbiology*, **148(Pt7)**, pp.2097-2109, DOI: 10.1099/00221287-148-7-2097.
- [6] E.E. Idris, D.J. Iglesias, M. Talon, et al. (2007), "Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plantgrowth-promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42", *Mol. Plant Microbe Interact.*, **20**, pp.619-626, DOI: 10.1094/MPMI-20-6-0619.
- [7] C.M. Ryu, M.A. Farag, C.H. Hu, et al. (2003), "Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100(8)**, pp.49274932, DOI: 10.1073/pnas.073084510.
- [8] A. Koumoutsis, X.H. Chen, A. Henne, et al. (2004), "Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42", *J. Bacteriol.*, **186(4)**, pp.1084-1096, DOI: 10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004.
- [9] M.F. Rabbee, M.S. Ali, J. Choi, et al. (2019), "*Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes", *Molecules*, **24(6)**, DOI: 10.3390/molecules24061046.
- [10] B. Fan, C. Wang, X. Song, et al. (2018), "*Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol", *Front. Microbiol.*, **9**, DOI: 10.2289/fmicb.2018.02491.
- [11] C.N. Thanh, N.Y. Nhi, D.N. Diep, et al. (2018), "Evaluating the ability to stimulate plant growth of two *Pseudomonas* strains isolated from the root zone of corn plants", *Journal of Scientific Development and Technology: Journal of Natural Sciences*, **2(2)**, pp.38-46 (in Vietnamese).
- [12] X. Wang, G. Liang (2014), "Control efficacy of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* Strain BZ6-1 against peanut bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum*", *BioMed Research International*, **2014**, DOI: 10.1155/2014/465435.
- [13] L.W. Burgess, T.E. Knight, L. Tesoriero, et al. (2009), *Diagnostic Manual for Plant Diseases in Vietnam*, Australian Center for International Agricultural Research (ACIAR), 212p (in Vietnamese).
- [14] S.H. Ji, N.C. Paul, J.X. Deng, et al. (2013), "Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases", *Mycobiology*, **41(4)**, pp.234-242, DOI: 10.5941/MYCO.2013.41.4.234.
- [15] A. Budiharjo, S.P. Chowdhury, K. Dietel, et al. (2014), "Transposon mutagenesis of the plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* FZB42 revealed that the *nfrA* and *RBAM17410* genes are involved in plantmicrobe-interactions", *PLOS ONE*, **9(5)**, e98267, DOI: 10.1371/journal.pone.0098267.
- [16] Z. Liu, A. Budiharjo, P. Wang, et al. (2013), "The highly modified peptide plantazolin is associated with nematocidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, pp.1081-1090, DOI: 10.1007/s00253-013-5247-5.
- [17] S. Brenner (1974), "The genetics of *Caenorhabditis elegans*", *Genetics*, **77(1)**, pp.71-94, DOI: 10.1093/genetics/77.1.71.
- [18] C.L. Kurz, S. Chauvet, E. Andres, et al. (2003), "Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivo screening", *EMBO J.*, **22(7)**, pp.1451-1460, DOI: 10.1093/emboj/cdg159.
- [19] S. Garvis, A. Munder, G. Ball, et al. (2009), "Caenorhabditis elegans semi-automated liquid screen reveals a specialized role for the chemotaxis gene *cheB2* in *Pseudomonas aeruginosa* virulence", *PLOS Pathog.*, **5(8)**, DOI: 10.1371/journal.ppat.1000540.
- [20] D.J. Hooper, J. Hallmann, S.A. Subbotin (2005), "Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes", *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*, DOI: 10.1079/9780851997278.00.
- [21] J.A.L. Pérez, M. Escuer, M.A.D. Rojo, et al. (2011), "Host range of *Meloidogyne arenaria* (neal, 1889) chitwood, 1949 (nematoda: Meloidogynidae) in Spain", *Nematropica*, **41**, pp.130-140.
- [22] N.S.E. Sandoval, M.M.E. Guadalupe, J.L.J. Nakayo, et al. (2020), "Effect of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) and *Trichoderma harzianum* (Rifai) on *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.)", *Acta Scientiarum Biological Sciences*, **42**, pp.1-8, DOI: 10.4025/actasciobiolsci.v42i1.47522.
- [23] F. Gharabadiyan, S. Jamali, A.A. Yazdi, et al. (2012), "Source of resistance to root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in tomato cultivars", *Journal of Agricultural Technology*, **8(6)**, pp.2011-2021.
- [24] J. Bridge, S.L.J. Page (1980), "Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart", *Tropical Pest Management*, **26(3)**, pp.296-298, DOI: 10.1080/09670878009414416.
- [25] J.P.M. Kolthoff, A.F. Auch, H.P. Klenk, et al. (2013), "Genome sequencebased species delimitation with confidence intervals and improved distance functions", *BMC Bioinformatics*, **14**, DOI: 10.1186/1471-2105-14-60.
- [26] M. Richter, R.R. Móra, F.O. Glöckner, et al. (2016), "JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison", *Bioinformatics*, **32**, pp.929-931, DOI: 10.1093/bioinformatics/btv681