



KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG CỦA VI KHUẨN *BACILLUS* SP. VỚI VI NẤM *NEOSCYTALIDIUM DIMIDIATUM* GÂY BỆNH Đốm TRẮNG TRÊN THANH LONG

Đỗ Thị Thanh Dung^{1*}, Lê Thanh Bình¹, Viên Thị Thanh Trúc², Võ Đình Quang¹

¹ Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại Thành phố Hồ Chí Minh

² Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG TP HCM

Ngày nhận bài: 17-8-2018, ngày nhận bài sửa: 05-9-2018, ngày duyệt đăng: 21-12-2018

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm tuyển chọn các dòng *Bacillus* có khả năng đối kháng với vi nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm trắng trên thanh long. Trong nghiên cứu này, đã chọn được 2 chủng vi nấm gây nhiễm bệnh đốm trắng trên thanh long, dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS cho thấy 100% tương đồng với *N. dimidiatum*. Với dòng *Bacillus* đối kháng, tổng số đã phân lập và sàng lọc được 136 chủng từ 20 mẫu đất tại Bình Thuận. Trong đó, có 104 chủng đối kháng với *N. dimidiatum* gây bệnh đốm trắng thanh long trên cả 2 phương pháp thử nghiệm. Chủng ĐV5B6 cho kết quả đối kháng tốt nhất với hiệu suất đối kháng là 36,67% và đường kính vòng vô khuẩn là 21,33 mm. Kết quả định danh MALDI – TOF cho thấy ĐV5B6 là *Bacillus atrophaeus*, chủng này được đánh giá là an toàn và có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh đốm trắng trên thanh long.

Từ khóa: bệnh đốm trắng thanh long, *Bacillus atrophaeus*, *Neoscytalidium dimidiatum*.

ABSTRACT

Antagonistic activity of *Bacillus* sp. isolates against fungus *Neoscytalidium dimidiatum* causing the white spot disease in pitahaya

The aim of this study is to select some *Bacillus* isolates which are capable of antagonism to *Neoscytalidium dimidiatum* causing the white spot disease in pitahaya. In this study, 2 isolates of fungal were pathogenic causing the white spot disease on pitahaya, based on morphological characteristics and ITS region sequences, which showed 100% similarity to *N. dimidiatum*. With *Bacillus* strains, we isolated and screened total of 136 isolates from 20 soil samples in Binh Thuan province. Among these, 104 isolates were resistant against *Neoscytalidium dimidiatum* causing the white spot disease in pitahaya via two testing methods. ĐV5B6 isolates showed strong resistance with antagonistic effect was 36.67% and the sterile ring diameter was 21,33 mm. Result of MALDI-TOF showed that ĐV5B6 was *Bacillus atrophaeus*. *Bacillus atrophaeus* was regarded as safe and having potential applications in the production of biological products to prevent white spot disease in pitahaya.

Keywords: white spot disease in pitahaya, *Bacillus atrophaeus*, *Neoscytalidium dimidiatum*.

1. Mở đầu

Với ưu thế về điều kiện đất đai khí hậu và kinh nghiệm canh tác, thanh long đang là một cây trồng chiếm một vị trí quan trọng trong ngành trồng cây ăn quả theo hướng xuất

* Email: dothithanhdung1990@gmail.com

khẩu của Việt Nam. Tuy nhiên hiện nay, tình hình dịch bệnh trên thanh long diễn ra nghiêm trọng, trong đó đáng chú ý là bệnh đốm trắng. Theo ghi nhận của Viện Cây ăn quả miền Nam thì bệnh đốm trắng xuất hiện rải rác vào năm 2008 ở Bình Thuận và Tiền Giang, và từ năm 2011 đến nay bệnh tấn công mạnh và lây lan nhanh hơn. Mức độ bệnh ở các vườn, địa phương khác nhau, có những vườn bị nhiễm quả không thể thu hoạch được, thiệt hại rất lớn cho nhà vườn.

Bệnh đốm trắng hay còn được gọi dưới các tên “đốm nâu”, “đốm tắc kè”, “bệnh ma”, “bệnh loét” hay “thối mục”, là một trong những bệnh gây thiệt hại lớn về năng suất và chất lượng thanh long. Nguyên nhân của bệnh được xác định là do vi nấm *Neoscytalydium dimidiatum* [1] - [4]... Cho đến nay, vẫn chưa có thuốc đặc trị bệnh này. Việc sử dụng các hóa chất để hạn chế bệnh hiện nay chỉ là giải pháp tình thế và là một trong những nguồn góp phần gây ô nhiễm, giảm chất lượng thanh long, hạn chế khả năng xuất khẩu thanh long ra các thị trường khó tính.

Nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước cho thấy, việc sử dụng vi khuẩn như *Bacillus* sp. để ức chế một số loài nấm bệnh trên cây trồng đã cho thấy tính hiệu quả của nó [5] - [8]..., điều này cũng cho thấy dòng *Bacillus* sp. có tiềm năng trong việc ức chế nấm bệnh *N. dimidiatum* trên thanh long. Ở nước ta hiện nay, vẫn chưa có nghiên cứu tạo được chế phẩm vi sinh kháng bệnh đốm trắng trên thanh long, do đó việc nghiên cứu chọn lựa những chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng vi nấm *N. dimidiatum* gây bệnh đốm trắng trên thanh long giúp sản xuất chế phẩm vi sinh phòng và trị bệnh đốm trắng là một vấn đề cần thiết trong giai đoạn hiện tại.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng *Bacillus* phân lập từ các mẫu đất của vườn thanh long khỏe mạnh không có dấu hiệu của bệnh đốm trắng trong vùng dịch bệnh và từ đất rừng Tà Cú thuộc tỉnh Bình Thuận.

Chủng vi nấm *N. dimidiatum* gây bệnh đốm trắng thanh long được phân lập từ mẫu thanh long bệnh tại tỉnh Bình Thuận.

2.1.2. Môi trường sử dụng nghiên cứu

Môi trường phân lập, nuôi cấy *N. dimidiatum* và thử nghiệm đối kháng: PGA (Potato Glucose Agar): Potato 200 g/l, D – glucose 20 g/l, Agar: 20 g/l, nước cất vừa đủ 1l.

Môi trường phân lập và nuôi cấy *Bacillus*: LB (Luria – Bertani) Tryptone: 10 g, Cao nấm men: 5 g, NaCl: 5 g, nước cất vừa đủ: 1l, môi trường thạch bổ sung Agar: 20 g/l.

Các môi trường trên được hấp khử trùng ở 121°C, 15 phút trước khi sử dụng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập, làm thuần *N. dimidiatum*, *Bacillus*.

Phân lập, làm thuần *N. dimidiatum* [1].

Chọn mô thực vật mới bị bệnh để phân lập, rửa mẫu trong nước để loại bỏ bụi và các tạp chất khác. Khử trùng bề mặt bằng sodium hypochloride 1% trong 1 phút sau đó rửa lại 3 lần với nước cất vô trùng. Dùng dụng cụ được khử trùng cắt những miếng nhỏ (khoảng 2x2 mm) từ phần ranh giới giữa mô khỏe và mô bệnh, sau đó cấy lên môi trường PGA, ủ ở 25°C-28°C trong tối. Kiểm tra đĩa cấy hằng ngày, khi các tản nấm phát triển từ những mẫu nhiễm bệnh, cấy truyền chúng sang môi trường PGA.

Phân lập, làm thuần Bacillus

Trước khi phân lập, mẫu được đun ở nhiệt độ cao (80°C) trong 10 phút để loại bỏ tế bào sinh dưỡng chỉ giữ lại những chủng có sinh bào tử để chọn lọc và làm thuần *Bacillus*. Pha loãng mẫu đất đến nồng độ thích hợp bằng nước muối sinh lý 0,85-0,9%, cấy trải trên đĩa petri có chứa môi trường LB – agar nuôi cấy 37°C trong 24 giờ. Chọn khuẩn lạc đặc trưng cho *Bacillus* và tiến hành làm thuần bằng cách cấy ria trên môi trường LB – agar. Các chủng thuần được bảo quản -80°C.

2.2.2. Phương pháp định danh N. dimidiatum, Bacillus

Đối với dòng vi nấm *N. dimidiatum* định danh sơ bộ theo khóa phân loại Ellis, 1976 và theo mô tả của Võ Thị Thu Oanh và cs, 2014 [9].

Đối với chủng vi khuẩn *Bacillus* xác nhận thông qua đặc tính sinh trưởng tốt và chiếm ưu thế trên môi trường LB, tế bào hình que, Gram (+), catalase (+) và Oxydase (+), có khả năng hình thành bào tử, di động.

Chủng vi sinh sau khi định danh hình thái và sinh hóa và thử nghiệm đối kháng được tuyển chọn tiến hành định danh đến loài bằng phương pháp giải trình tự vùng ITS - rDNA đối với vi nấm *N. dimidiatum*: Tách chiết bộ gen vi khuẩn bằng bộ kit của QIAgen, khuếch đại trình tự bằng phản ứng PCR với cặp mồi có trình tự như sau ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) và ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). Phản ứng PCR được thực hiện trong 25 µl master mix (Công ti Promega) bao gồm: 12,5 µl 2X Gotaq® Colorless Master Mix; mỗi loại nồng độ 10 µM; 1,2 µL; 9,1 µL của dH₂O và 1 µL của DNA nấm. Phản ứng PCR gồm 35 chu kỳ bao gồm 2 giai đoạn tiền biến tính: 95°C trong 2 phút; giai đoạn biến tính 95°C trong 40 giây; giai đoạn bắt cặp của các mồi: 58°C trong 60 giây; giai đoạn kéo dài đoạn khuếch đại: 72°C trong 1 phút và giai đoạn kéo dài cuối: 72°C trong 5 phút. Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong dung dịch TBE 0,5X. Sử dụng 5 µL sản phẩm trộn chung với 1 µL loading dye cho vào từng giếng. Chạy điện di với hiệu điện thế 100 V trong 25 phút. Kết quả điện di được quan sát bằng máy chụp ảnh gel (Bioroad, Hoa Kỳ). Đoạn khuếch đại PCR của vùng ITS của từng mẫu nấm được gửi giải trình tự tại hãng Macrogen (Seoul, Hàn Quốc). Các trình tự nucleotide hoàn chỉnh được so sánh với ngân hàng dữ liệu gen của NCBI bằng cách sử dụng công cụ BLAST.

Đối với chủng vi khuẩn *Bacillus* được gửi mẫu định danh bằng phương pháp sử dụng công nghệ khối phổ protein (MALDI- TOF) tại Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2.3 Phương pháp thử nghiệm khả năng gây bệnh của chủng *N. dimidiatum* phân lập được

Nuôi cấy nấm bệnh *N. dimidiatum* trên môi trường PDA (ủ trong tối ở 25°C-28°C) khoảng 4-7 ngày, sau đó hòa tan bào tử và đưa về mật độ 10^4 CFU/ml. Sử dụng kim tiêm vô trùng tiêm 100 μ l dịch treo bào tử (10^5 CFU/ml) vào thân và quả thanh long (*H. undatus*) khỏe. Nghiệm thức đối chứng tiêm nước cất vô trùng. Tất cả các mẫu đoạn thân và quả thanh long sau khi tiêm được đặt trong các hộp nhựa kín ở 25°C-28°C, ủ trong điều kiện tối [1]. Mỗi thí nghiệm sử dụng 10 quả và đoạn thân cây thanh long cho mỗi lần lặp. Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

- *Ghi nhận kết quả:* Quan sát hàng ngày và đánh giá biểu hiện bệnh trên đoạn thân cây và quả được gây bệnh và so sánh các đặc điểm của bệnh trong tự nhiên. Chọn mẫu nấm có khả năng gây bệnh tương tự mô tả ngoài tự nhiên để tiếp tục nghiên cứu. Tính tỉ lệ gây bệnh: TLB (%) = Số quả hoặc đoạn thân cây bệnh/tổng số quả hoặc đoạn thân x 100.

2.2.3. Phương pháp khảo sát khả năng đối kháng với nấm bệnh *N. dimidiatum*

Sử dụng phương pháp đối kháng trực tiếp [10] và sử dụng phương pháp khuếch tán qua lỗ thạch [11], [12] để khảo sát đặc tính đối kháng với vi nấm *N. dimidiatum*.

Với phương pháp đối kháng trực tiếp đánh giá khả năng đối kháng thông qua hiệu quả ức chế (%) sau $H = (D_{dc} - D) / D_{dc} \times 100$, theo dõi sau 4 ngày thử nghiệm. Trong đó: H: Hiệu quả ức chế (%); D: Đường kính khuẩn lạc nấm bệnh trung bình trên đĩa đối kháng; D_{dc} : Đường kính khuẩn lạc nấm bệnh trung bình trên đĩa đối chứng. Với phương pháp khuếch tán qua lỗ thạch đánh giá khả năng đối kháng sau 4 ngày thử nghiệm được đánh giá thông qua kích thước vòng đối kháng (vòng tròn trong suốt bao quanh khuẩn lạc), tính bằng mm theo công thức: Kích thước vòng đối kháng = $D - d$. Trong đó: D (mm) là đường kính vòng đối kháng; d (mm) là đường kính khuẩn lạc.

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.

2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu

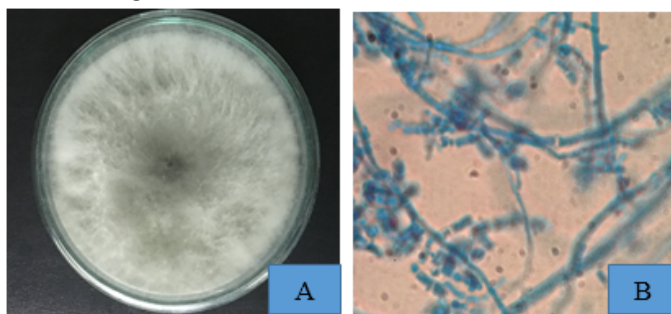
Các số liệu thí nghiệm được đánh giá bằng các phương pháp thống kê phân tích biến lượng (Analysis of Variance, ANOVA), so sánh trung bình theo phương pháp trắc nghiệm Duncan. Các số liệu ghi nhận được xử lý bằng Excel và phần mềm Statistical Program Scientific System (SPSS) phiên bản 19.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập và sàng lọc chủng vi nấm *N. dimidiatum*

Từ các mẫu thanh long bệnh thu được tiến hành phân lập *N. dimidiatum* trên môi trường PGA và lựa chọn các dòng có đặc tính của vi nấm *N. dimidiatum* theo mô tả của

Võ Thị Thu Oanh và cs (2015) như: Tán nấm có màu xám đen đến nâu đen, mặt sau tán nấm có màu đen, không có vòng đồng tâm. Sợi nấm phân nhánh có màu nâu đến nâu đậm, vươn cao như bông gòn trên bề mặt môi trường (Hình 1A). Quan sát dưới kính hiển vi quang học cho thấy sợi nấm phân nhánh có vách ngăn. Bào tử hình chữ nhật, hình vuông, hình bầu dục, hình tròn hoặc hình que (Hình 1B). Kết quả thí nghiệm đã chọn được 2 chủng là MB1 và MB3 mang các đặc điểm của *N. dimidiatum*.



Hình 1. Đặc điểm hình thái vi nấm *N. dimidiatum* trên môi trường PGA (A): Khuẩn lạc vi nấm; (B): Tiêu bản vi thể được quan sát ở vật kính x100.

Hai chủng sau khi định danh hình thái được lựa chọn tiếp tục được định danh đến loài bằng phương pháp giải trình tự vùng ITS – rDNA, vùng trình tự sau khi khuếch đại được gửi giải trình tự tại Công ty Macrogen và so sánh độ tương đồng di truyền với các loài trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST. Dựa trên kết quả phân tích trình tự của 2 chủng tuyển chọn xác định được 2 chủng phân lập được có độ tương đồng 100% với chủng nấm *N. dimidiatum* (Bảng 1).

Bảng 1. Tóm tắt kết quả định danh chủng vi nấm MB1 và MB3

MB1	Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
	Neoscytalidium dimidiatum voucher Nd internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and	1581	1581	100%	0.0	100%	MG865987
MB3	Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
	Neoscytalidium dimidiatum voucher Nd internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and	1544	1544	100%	0.0	100%	MG865987

3.2. Kết quả thử nghiệm khả năng gây bệnh của chủng *N. dimidiatum* phân lập được

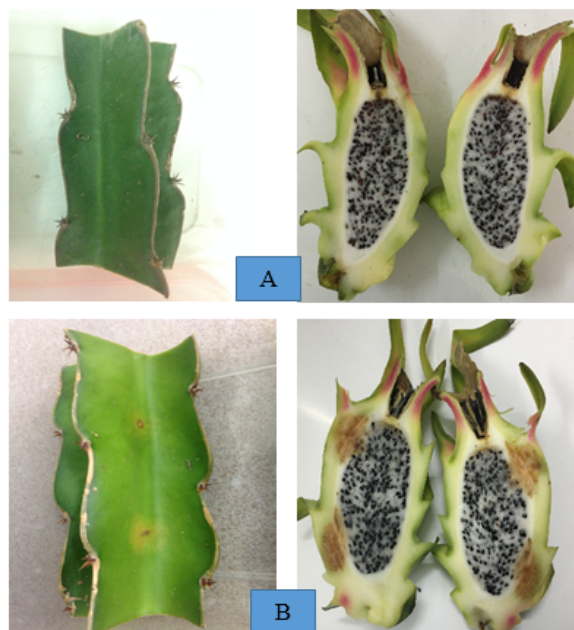
Hai chủng nấm bệnh sau khi định danh được tiến hành thử nghiệm khả năng gây bệnh trên thân và quả thanh long. Tiến hành thí nghiệm và quan sát ở các thời điểm cho thấy: Với các nghiệm thức tiêm nấm bệnh, tại 3-4 ngày sau khi tiêm ở một số vị trí tiêm

nấm bệnh trên thân và mô quả đã bắt đầu xuất hiện đốm bệnh màu vàng và ngả dần sang nâu với các trũng tròn nhỏ tương tự với mô tả bệnh [9] (Hình 2B). Đến thời điểm sau 2 tuần gần như các mẫu thân và mô quả tiêm nấm bệnh đều có biểu hiện bệnh, một số đoạn thân thanh long tại thời điểm này bị thối hoàn toàn do tác động của nấm bệnh. Trong khi đó, ở nghiệm thức đối chứng vẫn không quan sát thấy hiện tượng nhiễm bệnh sau 2 tuần tiêm (Hình 2A). Tiến hành xác định tỉ lệ bệnh đối với từng nghiệm thức sau 1 tuần và 2 tuần theo dõi thu được kết quả Bảng 2.

Bảng 2. Tỉ lệ bệnh trên thân và quả thanh long theo thời gian sau khi lây nhiễm *N. dimidiatum*

Nghiệm thức	Tỉ lệ bệnh trên đoạn thân thanh long (%)		Tỉ lệ bệnh trên quả thanh long (%)	
	Sau 1 tuần	Sau 2 tuần	Sau 1 tuần	Sau 2 tuần
Đối chứng	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
MB1	96,67 ± 3,33 ^b	100,00 ± 0,00 ^b	80,00 ± 11,54 ^b	100,00 ± 0,00 ^b
MB3	90,00 ± 5,77 ^b	96,67 ± 3,33 ^b	66,67 ± 8,82 ^b	96,67 ± 3,33 ^b

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau khác nhau có sự khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$).



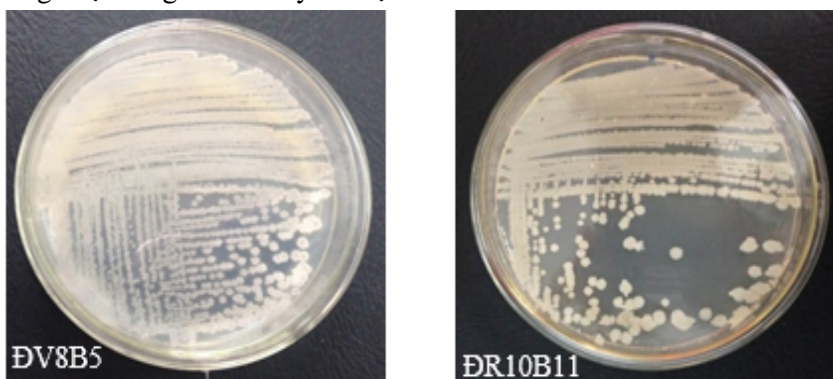
Hình 2. Thân và quả thanh long sau 1 tuần tiêm vi nấm. A: Thân và quả thanh long bổ đôi ở nghiệm thức tiêm nước cất vô trùng; B: Thân và quả thanh long sau khi tiêm MB12

Kết quả Bảng 2 cho thấy, tỉ lệ bệnh đốm trắng trên đoạn thân và quả thanh long tăng dần theo thời gian theo dõi sau khi tiêm chủng vi nấm *N. dimidiatum*. Tại thời điểm sau 1 tuần tiêm nấm bệnh, đoạn thân và quả đã có tỉ lệ bệnh khá cao dao động từ 80%-90%. Ở nghiệm thức đối chứng chỉ tiêm nước cất vô trùng thì không cho hiện tượng bệnh trong

suốt thời gian theo dõi. Tại thời điểm sau 2 tuần thí nghiệm hai chủng thử nghiệm cho tỉ lệ bệnh trên thân và quả đạt 96,67-100% và khác biệt thống kê so với đối chứng. Từ kết quả đánh giá khả năng gây bệnh của các chủng vi nấm *N. dimidiatum* phân lập được có thể lựa chọn 1 trong 2 dòng nấm MB1 và MB3 đều là dòng có độc lực cao gây bệnh đốm trắng trên thanh long để tiến hành nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Phân lập và sàng lọc sơ bộ chủng *Bacillus*

Theo nguyên lí vi sinh, để tìm được những chủng đối kháng mạnh thì phải phân lập từ những vùng đất tự nhiên (chưa có sự tác động của con người) và vùng đất có những cây khỏe mạnh ngay trong vùng dịch bệnh. Ngoài ra, Bình Thuận là địa phương với điều kiện khí hậu đặc thù, đặc biệt trong những năm gần đây có nhiều biến đổi khí hậu gây khó khăn trong việc sử dụng các chế phẩm vi sinh. Do đó, để có thể phân lập các chủng vi sinh có khả năng đối kháng với nấm *N. dimidiatum* và thích nghi tốt với điều kiện khí hậu Bình Thuận và các vùng có điều kiện sinh thái tương đương thì đất vườn thanh long và đất rừng tự nhiên Tà Cú thuộc tỉnh Bình Thuận đã được lựa chọn. Từ các mẫu đất vườn trồng thanh long và đất rừng kí hiệu ĐV, ĐR phân lập được 159 chủng với các đặc điểm nhận dạng *Bacillus* như: khuẩn lạc tròn, có màu trắng trong, trắng đục, vàng đậm, vàng nhạt, rìa tròn đều, lượn sóng hoặc răng cưa để tuyển chọn Hình 3.



Hình 3. Hình dạng khuẩn lạc của một số chủng vi khuẩn phân lập được trên môi trường LB sau 48 giờ nuôi cấy

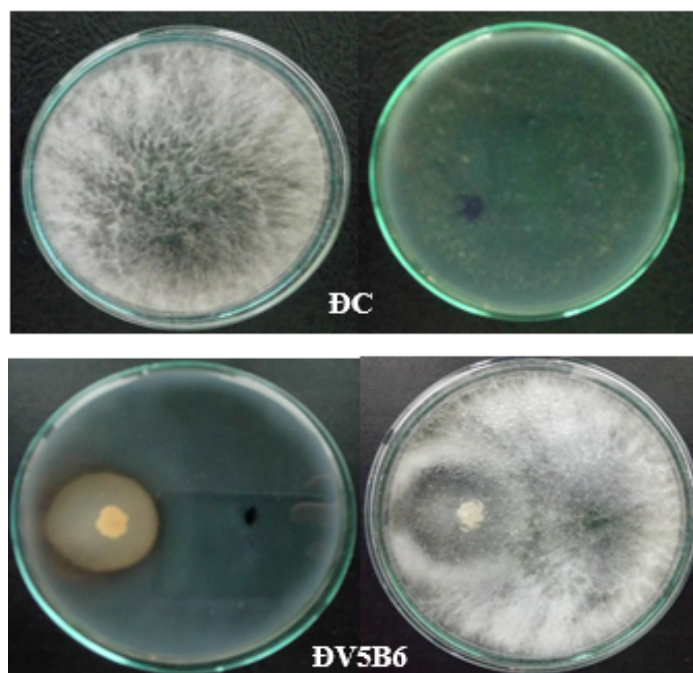
Với 159 chủng vi khuẩn phân lập được, tiến hành sàng lọc sơ bộ đã chọn được 136 chủng có đặc tính tương ứng với *Bacillus*: Trục khuẩn hình que, Gram dương, catalase và oxidase dương tính, sinh nội bào tử, di động. Trong đó số chủng phân lập được tại mẫu đất vườn phân lập là 73/136 chủng chiếm tỉ lệ 53,68 %, mẫu đất rừng phân lập được 63/136 chủng chiếm tỉ lệ 46,32%.

3.4. Khả năng kháng *N. dimidiatum* gây bệnh đốm trắng của các chủng *Bacillus* phân lập

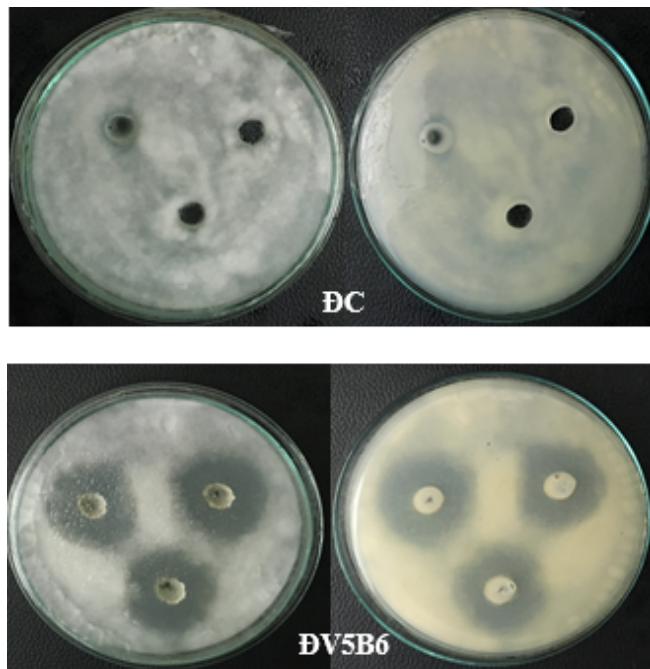
Việc đánh giá khả năng kháng *N. dimidiatum* gây bệnh đốm trắng của các chủng *Bacillus* đã phân lập được xác định thông qua hiệu quả ức chế (phương pháp đối kháng trực tiếp) và xác định đường kính vòng kháng khuẩn (phương pháp khuếch tán trên lỗ thạch).

Kết quả thí nghiệm cho thấy cho thấy với phương pháp đối kháng trực tiếp 116/136 chủng khảo sát có hiệu quả ức chế nấm bệnh *N. dimidiatum* giao động từ 0 đến 36,67 % sau 6 ngày theo dõi. Trong đó, số chủng đối kháng phân lập từ các mẫu đất vườn là 68/116 chủng, số chủng đối kháng phân lập từ các mẫu đất rừng là 48/116 chủng. Chủng đối kháng mạnh nhất là ĐV5B6 với hiệu suất đối kháng sau 6 ngày là 36,67 %.

Phương pháp đối kháng trực tiếp chỉ cho biết chủng khảo sát có đối kháng hay không mà không biết rõ các chủng thử nghiệm đối kháng có phải do sinh các hợp chất kháng khuẩn hay do cạnh tranh dinh dưỡng. Trong khi đó phương pháp khuếch tán trên lỗ thạch cho biết được các chủng có khả năng sinh chất kháng khuẩn hay không. Vòng vô khuẩn xung quanh lỗ thạch chứng tỏ chủng có tiết chất kháng khuẩn ức chế khả năng sinh trưởng của *N. dimidiatum* Hình 5. Từ kết quả thí nghiệm đã chọn được 107/136 chủng có khả năng đối kháng với *N. dimidiatum* chiếm tỉ lệ 78,67%. Trong đó, số chủng đối kháng phân lập từ các mẫu đất vườn là 58/107 chủng, số chủng đối kháng phân lập từ các mẫu đất rừng là 49/107 chủng. Chủng ĐV5B6 và ĐV2B4 có khả năng đối kháng mạnh nhất với $(D - d) = 21,33\text{mm} > 20$.



Hình 4. Khả năng kháng *N. dimidiatum* của chủng ĐV5B6 bằng phương pháp đối kháng trực tiếp



Hình 5. Khả năng kháng *N. dimidiatum* của chủng ĐV5B6 bằng phương pháp khuếch tán trên lỗ thạch. A: Mặt trước; B: Mặt sau

Qua thí nghiệm khảo sát khả năng đối kháng với *N. dimidiatum* gây bệnh đốm trắng thanh long bằng hai phương pháp đối kháng trực tiếp và khuếch tán trên lỗ thạch cho thấy 104 chủng *Bacillus* có khả năng đối kháng với *N. dimidiatum* trên cả 2 phương pháp. Trong đó, chủng cho kết quả đối kháng mạnh nhất với *N. dimidiatum* trên cả hai phương pháp là ĐV5B6 được phân lập từ đất vườn thanh long tại Bình Thuận. Chủng ĐV5B6 được sử dụng để định danh MALDI – TOF làm cơ sở tiếp tục nghiên cứu hình thành chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh đốm trắng trên thanh long.

3.5. Kết quả định danh bằng phương pháp MALDI – TOF chủng *Bacillus* tuyển chọn

Chủng ĐV5B6 tuyển chọn được định danh bằng phương pháp MALDI – TOF. Kết quả định danh cho thấy đây là *Bacillus atrophaeus* (Bảng 4). Kết quả phù hợp với các nghiên cứu trước đây, chủng *Bacillus atrophaeus* đã được đánh giá là vi khuẩn an toàn cho con người, cây trồng và được ứng dụng nhiều trong phòng trừ sinh học, chống lại nhiều nấm bệnh cây trồng [13] - [15]. Ngoài khả năng sản xuất Bacteriocin [16], sản xuất các hợp chất hoạt tính sinh học [17] và các protein hoạt động bề mặt sinh học [18], khả năng đối kháng với vi khuẩn và vi nấm thì chủng *Bacillus atrophaeus* còn giúp cây trồng tăng trưởng tốt [19]. Như vậy, chủng *Bacillus atrophaeus* ĐV5B6 thích hợp được sử dụng nghiên cứu hướng đến việc hình thành chế phẩm vi sinh phòng trừ bệnh đốm trắng trên thanh long.

Bảng 4. Tóm tắt kết quả định danh bằng MALDI – TOF của chủng ĐV5B6

Chủng	Analyte Name	Matched Pattern	Score Value
ĐV5B6	(–)	<i>Bacillus atrophaeus</i>	1.731

4. Kết luận

Từ các mẫu thanh long bệnh được lấy tại Bình Thuận đã phân lập, làm thuần và sàng lọc được 2 chủng *N. dimidiatum* là MB1 và MB3 cả hai chủng cho tỉ lệ bệnh đạt 96,67%-100% sau 2 tuần thử nghiệm trên thân và quả thanh long.

Đã phân lập và sàng lọc được 136 chủng vi khuẩn *Bacillus* từ các mẫu đất lấy tại Bình Thuận. Trong đó 104 chủng có khả năng đối kháng với *N. dimidiatum* trên 2 phương pháp thử nghiệm. Chủng ĐV5B6 cho kết quả đối kháng tốt nhất với hiệu suất đối kháng là 36,67% và đường kính vòng vô khuẩn là 21,33 mm. Kết quả định danh bằng phương pháp MALDI – TOF cho thấy chủng ĐV5B6 là *Bacillus atrophaeus*, có tiềm năng sử dụng trong chế phẩm phòng trừ bệnh đốm trắng trên thanh long.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] G. B. Lan, Z. F. He, P. G. Xi, Z. D. Jiang and C. Mainland, “First Report of Brown Spot Disease Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on *Hylocereus undatus* in Guangdong,” *Plant Disease*, 96(11), p. 1702, November 2012.
- [2] M. H. Mohd, B. Salleh and L. Zakaria, “Identification and Molecular Characterizations of *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Stem Canker of Red-fleshed Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia,” *Journal of Phytopathology*, 161(11-12), 2013
- [3] D. Ezra, O. Liarzi, T. Gat, M. Hershcovich and M. Dudai, “First Report of Internal Black Rot Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on *Hylocereus undatus* (Pitahaya) Fruit in Israel,” *Plant disease*, 97(11), p. 1513, 2013.
- [4] G. Sanahuja, P. Lopez and A. J. Palmateer, “First Report of *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Stem and Fruit Canker of *Hylocereus undatus* in Florida,” *Plant disease*, 100(7), p. 1499, 2016.
- [5] P. Kumar, R. C. Dubey and D. K. Maheshwari, “*Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens,” *Microbiological Research*, 167(8), pp. 493-499, 2012.
- [6] B. B. Wang, J. Yuan, J. Zhang, Z. Z. Shen, M. X. Zhang, R. Li, Y. Z. Ruan and Q. R. Shen, “Effects of novel bioorganic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of *Fusarium* wilt of banana,” *Biol Fert Soils*, 4, pp. 435-446, 2013.

- [7] I. S. Sawant, P. N. Wadkar, Y. R. Rajguru, N. H. Mhaske, V. P. Salunkhe, S. D. Sawant and A. Upadhyay, "Biocontrol potential of two novel grapevine associated *Bacillus* strains for management of anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*," *Biocontrol Science and Technology*, 2016.
- [8] T. Kejela, V. R. Thakkar and P. Thakor, "*Bacillus* species (BT42) isolated from *Coffea arabica* L. rhizosphere antagonizes *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* and also exhibits multiple plant growth promoting activity," *BMC Microbiology*, 2016.
- [9] Võ Thị Thu Oanh, "Nghiên cứu xác định tác nhân gây bệnh và biện pháp phòng trừ bệnh đốm trắng hại thanh long," Báo cáo tổng kết đề tài *Nghiên cứu khoa học và Phát triển công nghệ*, Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Bình Thuận, Trường Đại học Nông Lâm, TP Hồ Chí Minh, 2015.
- [10] Trương Minh Tường, Trần Ngọc Hùng, "Nghiên cứu khả năng phòng, trị một số nấm bệnh ở thanh long bằng *Trichoderma*," *Tạp chí Đại học Thủ Dầu Một*, 4(6), 2012.
- [11] J. L. Balcázar, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell and J. L. Múzquiz, "The role of probiotics in aquaculture," *Veterinary microbiology*, 114(3-4). pp. 173-186, 2006.
- [12] H. A. Hong, J. M. Huang, R. Khaneja, L. V. Hiep, M. C. Urdaci and S. M. Cutting, "The safety of and *Bacillus indicus* as food probiotics," *J Appl Microbiol*, 105, pp. 510-520, 2008.
- [13] S. R. B. R. Sella and P. S. L. Vandenberghe, "Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*," *Microbiological research*, 169(12), pp. 931-939, 2014.
- [14] H. Huang, Z. Wu, C. Tian, Y. Liang, C. You and L. Chen, "Identification and characterization of the endophytic bacterium *Bacillus atrophaeus* XW2, antagonistic towards *Colletotrichum gloeosporioides*," *Annals of Microbiology*, 65(3), pp. 1361-1371, 2015.
- [15] X. Zhang, B. Li, Y. Wang et al., "Lipopeptides, a novel protein, and volatile compounds contribute to the antifungal activity of the biocontrol agent *Bacillus atrophaeus* CAB-1," *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(21), pp. 9525-9534, 2013.
- [16] T. Stein, S. Düsterhus, A. Stroh and K. D. Entian, "Subtilisin Production by Two *Bacillus subtilis* Subspecies and Variance of the sbo-alb Cluster," *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), pp. 2349-2353, 2004.
- [17] F. Liu, W. Sun, F. Su, K. Zhou and Z. Li, "Draft genome sequence of the sponge-associated strain *Bacillus atrophaeus* C89, a potential producer of marine drugs," *Journal of Bacteriology*, 194(16), pp. 4454-4454, 2012.
- [18] L. C. M. Das Neves, K. S. De Oliveira, M. J. Kobayashi, T. C. V. Penna and A. Converti, "Biosurfactant production by cultivation of *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 in semidefined glucose/casein-based media," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137-140(1-12), pp. 539-554, 2007.
- [19] J. Ma, C. Wang, H. Wang, K. Liu, T. Zhang, L. Yao, Z. Zhao, B. Du and Y. Ding, "Analysis of the Complete Genome Sequence of *Bacillus atrophaeus* GQJK17 Reveals Its Biocontrol Characteristics as a Plant Growth-Promoting *Rhizobacterium*," *BioMed Research International*, Article ID 9473542, 9 p, 2018.