

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



TRẦN KIM HẠNH

**PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN *Bacillus* sp. TỪ  
ĐẤT VÙNG RỄ XOÀI CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM  
*Colletotrichum* sp. GÂY BỆNH THÁN THU TRÊN XOÀI**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:  
TS. LÊ THỊ ÁNH HỒNG

TRẦN KIM HẠNH

SINH HỌC THỰC NGHIỆM

2024

*Thành phố Hồ Chí Minh – Năm 2024*

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



**TRẦN KIM HẠNH**

**PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN *Bacillus* sp. TỪ ĐẤT  
VÙNG RỄ XOÀI CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM *Colletotrichum* sp.  
GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN XOÀI**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Ngành: Sinh học thực nghiệm**

**Mã số: 8420114**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :  
TS. LÊ THỊ ÁNH HỒNG

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Lê Thị Ánh Hồng', is written over a faint rectangular stamp.

*Thành phố Hồ Chí Minh – Năm 2024*

## LỜI CAM ĐOAN

*Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.*

**Tác giả luận văn**



**Trần Kim Hạnh**

## LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin chân thành cảm ơn TS. Lê Thị Ánh Hồng, người đã tận tình hướng dẫn tôi trong suốt quá trình xây dựng đề cương và thực hiện luận văn. Cảm ơn cô luôn nhiệt tình giúp đỡ, hỗ trợ, chia sẻ kinh nghiệm nghiên cứu và tạo mọi điều kiện tốt nhất để tôi hoàn thành luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài: “Thu thập, bảo tồn vi sinh vật phục vụ sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng trong nông nghiệp tại Thành phố Hồ Chí Minh và vùng phụ cận”.

Tôi xin chân thành cảm ơn đến tất cả thầy cô ở Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã truyền đạt cho tôi những kiến thức giúp tôi hoàn thành tốt luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn Phòng Công nghệ Biến đổi Sinh học và Phòng Vi sinh Ứng Dụng của Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi bao gồm hóa chất, dụng cụ và thiết bị để tôi có thể hoàn thành luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, Quý Thầy, Cô và các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi để luận văn được hoàn thành.

Cuối cùng tôi xin cảm ơn gia đình, bạn bè, đồng nghiệp đã hỗ trợ, động viên tinh thần cho tôi trong suốt thời gian học tập và thực hiện luận văn.

**Tác giả luận văn**



**Trần Kim Hạnh**



## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC .....	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT .....	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG .....	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ .....	viii
MỞ ĐẦU .....	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU .....	3
1.1. TỔNG QUAN VỀ BỆNH THÁN THƯ XOÀI.....	3
1.1.1. Giới thiệu chung về bệnh thán thư xoài.....	3
1.1.2. Tình hình nghiên cứu bệnh thán thư xoài trên thế giới .....	4
1.1.3. Tình hình nghiên cứu bệnh thán thư xoài ở Việt Nam.....	5
1.1.4. Biện pháp kiểm soát bệnh.....	6
1.2. TỔNG QUAN VỀ NẤM <i>Colletotrichum</i> .....	8
1.2.1. Giới thiệu chung .....	8
1.2.2. Cơ chế gây bệnh .....	8
1.2.3. Biện pháp kiểm soát .....	9
1.3. TỔNG QUAN VỀ VI KHUẨN <i>Bacillus</i> .....	10
1.3.1. Giới thiệu chung .....	10
1.3.2. Ứng dụng của vi khuẩn <i>Bacillus</i> trong nông nghiệp .....	11
1.3.2.1. Ứng dụng trong kiểm soát sinh học.....	11
1.3.2.2. Ứng dụng trong thúc đẩy tăng trưởng thực vật .....	13
1.3.3. Tình hình nghiên cứu vi khuẩn <i>Bacillus</i> phòng trừ bệnh thán thư .....	15
1.3.3.1. Vai trò vi khuẩn <i>Bacillus</i> trong phòng trừ nấm bệnh .....	15
1.3.3.2. Tình hình nghiên cứu vi khuẩn <i>Bacillus</i> trên thế giới .....	16
1.3.3.3. Tình hình nghiên cứu vi khuẩn <i>Bacillus</i> ở Việt Nam.....	17
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	19
2.1. ĐỐI TƯỢNG VÀ NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU.....	19
2.1.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu .....	19
2.1.2. Đối tượng nghiên cứu .....	19
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	20
2.2.1. Phân lập và định danh nấm <i>Colletotrichum</i> sp. từ mẫu lá xoài nhiễm bệnh	20
2.2.1.1. Thu mẫu lá xoài .....	20

2.2.1.2.	Phân lập nấm <i>Colletotrichum</i> sp.....	20
2.2.1.3.	Sàng lọc nhanh các mẫu nấm gây bệnh bằng phương pháp MALDI-TOF..	21
2.2.1.4.	Định danh nấm <i>Colletotrichum</i> sp. dựa vào đặc điểm hình thái .....	21
2.2.1.5.	Định danh nấm <i>Colletotrichum</i> sp. bằng giải trình tự vùng gen ITS .....	22
2.2.2.	Phân lập và sàng lọc vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. từ đất vùng rễ xoài có khả năng ức chế nấm <i>Colletotrichum</i> sp. ....	22
2.2.2.1.	Thu thập và xác định giá trị pH mẫu đất .....	22
2.2.2.2.	Sàng lọc nhanh các mẫu đất có khả năng ức chế nấm <i>Colletotrichum</i> sp....	23
2.2.2.3.	Phân lập và quan sát đặc điểm hình thái vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. ....	23
2.2.3.	Tuyển chọn vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. có khả năng ức chế nấm <i>Colletotrichum</i> sp. mạnh nhất.....	24
2.2.4.	Khảo sát đặc tính sinh hóa và định danh vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. được tuyển chọn bằng phương pháp sinh học phân tử .....	24
2.2.4.1.	Khảo sát các đặc tính sinh hóa.....	24
2.2.4.2.	Định danh vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. bằng sinh học phân tử .....	26
2.2.5.	Phương pháp tính toán và xử lý số liệu.....	26
Chương 3.	KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	27
3.1.	KẾT QUẢ PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH NẤM <i>Colletotrichum</i> sp. TỪ MẪU LÁ XOÀI NHIỄM BỆNH .....	27
3.1.1.	Thu mẫu lá xoài .....	27
3.1.2.	Phân lập nấm <i>Colletotrichum</i> sp. từ mẫu xoài nhiễm bệnh.....	28
3.1.3.	Sàng lọc nhanh các mẫu nấm gây bệnh bằng phương pháp MALDI-TOF..	31
3.1.4.	Định danh nấm <i>Colletotrichum</i> sp. dựa vào đặc điểm hình thái .....	31
3.1.5.	Định danh nấm <i>Colletotrichum</i> sp. dựa trên giải trình tự vùng gen ITS.....	33
3.2.	KẾT QUẢ PHÂN LẬP VÀ SÀNG LỌC VI KHUẨN <i>Bacillus</i> sp. TỪ ĐẤT VÙNG RỄ XOÀI CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM <i>Colletotrichum</i> sp. ....	35
3.2.1.	Thu thập mẫu đất vùng rễ xoài .....	35
3.2.2.	Sàng lọc nhanh mẫu đất có khả năng ức chế nấm <i>Colletotrichum</i> sp. ....	36
3.2.3.	Phân lập và quan sát đặc điểm hình thái vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. ....	39
3.3.	KẾT QUẢ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN <i>Bacillus</i> sp. CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM <i>Colletotrichum</i> sp. MẠNH NHẤT .....	41
3.4.	KẾT QUẢ KHẢO SÁT ĐẶC TÍNH SINH HÓA VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN <i>Bacillus</i> sp. ĐƯỢC TUYỂN CHỌN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ .....	47

3.4.1. Khảo sát đặc tính sinh hóa .....	47
3.4.2. Định danh vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. bằng sinh học phân tử .....	50
Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....	53
4.1. KẾT LUẬN .....	53
4.2. KIẾN NGHỊ.....	53
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO .....	54
PHỤ LỤC .....	62

**DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT**

ABA	Axit abscisic
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylate
ACT	Actin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CK	Cytokinin
CMC	Carboxy methyl cellulose
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
GA	Gibberellin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase
GS	Glutamine synthetase
HIS4	Histone 4
HQUC	Hiệu quả ức chế
IAA	Axit indole-3-axetic
ISR	Induced Systemic Resistance
ITS	Internal Transcribed Spacer
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polemerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
TBE	Tris –Borate-EDTA
TUB2	$\beta$ -tubulin 2

**DANH MỤC CÁC BẢNG**

<b>Bảng 3. 1.</b> Thông tin các mẫu lá xoài thu thập tại các vườn.....	27
<b>Bảng 3. 2.</b> Kết quả phân lập và lây nhiễm nhân tạo các chủng nấm phân lập.....	29
<b>Bảng 3. 3.</b> Kết quả định danh các chủng nấm bằng phương pháp MALDI-TOF.....	31
<b>Bảng 3. 4.</b> Thông tin mẫu đất vùng rễ xoài thu thập tại các tỉnh.....	36
<b>Bảng 3. 5.</b> Kết quả đồng nuôi cây dịch đất và nấm <i>Colletotrichum</i> sp.....	37
<b>Bảng 3. 6.</b> Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn phân lập từ đất vùng rễ xoài.....	40
<b>Bảng 3. 7.</b> Hiệu quả ức chế của các chủng vi khuẩn nghi ngờ <i>Bacillus</i> với nấm <i>Colletotrichum</i> sp. ....	42

## DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

<b>Hình 1. 1.</b> Triệu chứng bệnh thán thư trên các bộ phận của xoài .....	3
<b>Hình 1. 2.</b> Tế bào vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. dưới kính hiển vi.....	10
<b>Hình 3. 1.</b> Thu thập mẫu lá xoài .....	27
<b>Hình 3. 2.</b> Triệu chứng bệnh thán thư trên mẫu lá xoài nhiễm bệnh .....	28
<b>Hình 3. 3.</b> Phân lập nấm từ mẫu lá xoài nhiễm bệnh trên môi trường PDA.....	28
<b>Hình 3. 4.</b> Đặc điểm hình thái chủng nấm M1C1 trên môi trường PDA.....	32
<b>Hình 3. 5.</b> Đặc điểm sợi nấm, bào tử và đĩa áp chủng nấm M1C1 dưới kính hiển vi .....	33
<b>Hình 3. 6.</b> Kết quả điện di sản phẩm PCR vùng gen ITS trên gel agarose 1% .....	34
<b>Hình 3. 7.</b> Kết quả so sánh mức độ tương đồng của chủng nấm M1C1 bằng công cụ BLAST trong NCBI .....	34
<b>Hình 3. 8.</b> Một số vườn xoài thu thập mẫu đất .....	35
<b>Hình 3. 9.</b> Khả năng ức chế nấm <i>Colletotrichum</i> sp. của các chủng vi khuẩn có hiệu quả ức chế cao sau 15 ngày khảo sát.....	44
<b>Hình 3. 10.</b> Khả năng ức chế nấm <i>Colletotrichum</i> sp. của chủng vi khuẩn ĐT5.2 sau 3, 7, 11, 15 ngày khảo sát .....	44
<b>Hình 3. 11.</b> Sợi nấm <i>Colletotrichum</i> sp. khi đồng nuôi cấy với chủng vi khuẩn ĐT5.2 ...	45
<b>Hình 3. 12.</b> Đặc điểm hình thái và tế bào chủng vi khuẩn ĐT5.2 .....	46
<b>Hình 3. 13.</b> Khả năng sinh enzyme chitinase của chủng vi khuẩn ĐT5.2 .....	47
<b>Hình 3. 14.</b> Khả năng sinh enzyme protease của chủng vi khuẩn ĐT5.2.....	48
<b>Hình 3. 15.</b> Khả năng sinh enzyme cellulase của chủng vi khuẩn ĐT5.2 .....	48
<b>Hình 3. 16.</b> Khả năng hòa tan phosphate của chủng vi khuẩn ĐT5.2 .....	49
<b>Hình 3. 17.</b> Khả năng sinh siderophore của chủng vi khuẩn ĐT5.2.....	49
<b>Hình 3. 18.</b> Kết quả điện di sản phẩm PCR vùng gen 16S rRNA trên gel agarose 1% .....	50
<b>Hình 3. 19.</b> Kết quả so sánh mức độ tương đồng của chủng vi khuẩn ĐT5.2 bằng công cụ BLAST trong NCBI .....	51
<b>Hình 3. 20.</b> Cây phát sinh chủng loại dựa vào trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn ĐT5.2 .....	52

## MỞ ĐẦU

Xoài là một trong những loại cây ăn quả được trồng chủ yếu ở vùng nhiệt đới, mang lại giá trị kinh tế cao ở thị trường trong nước và xuất khẩu, góp phần phát triển ngành nông sản của Việt Nam. Theo thống kê của Cục trồng trọt năm 2019, sản lượng xoài đạt 31.276 tấn, giúp Việt Nam đứng thứ 13 về sản xuất xoài trên thế giới [1]. Tuy nhiên, xoài bị ảnh hưởng rất lớn bởi dịch bệnh, đặc biệt bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* spp. gây ra.

Bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* là bệnh phổ biến nhất ở xoài, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng xoài ở giai đoạn trước và sau thu hoạch. Bệnh thán thư trên xoài có thể gây tổn thất năng suất lên đến 60%.

Công tác phòng trừ dịch bệnh chưa thật sự hiệu quả do hiểu biết của người trồng còn hạn chế. Hiện nay, người nông dân thường sử dụng thuốc hóa học để phòng trừ mỗi khi dịch bệnh xảy ra. Việc này góp phần gây ô nhiễm môi trường do một lượng lớn thuốc bảo vệ thực vật tồn dư trong đất và đi vào mạch nước ngầm và trên sản phẩm, ảnh hưởng lớn đến sức khỏe của con người và các loài sinh vật khác. Vấn đề đặt ra hiện nay là tìm kiếm một biện pháp an toàn và hiệu quả để phòng trừ bệnh thán thư trên xoài. Xu hướng hiện nay để phát triển nền nông nghiệp bền vững và thân thiện với môi trường là biện pháp sử dụng vi sinh vật đối kháng để phòng trừ bệnh hại. Trong số các vi sinh vật đối kháng, các chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus* spp. đã được nghiên cứu rất nhiều về khả năng đối kháng với nấm gây bệnh. Ở Việt Nam, có một số nghiên cứu vi khuẩn *Bacillus* có hoạt tính đối kháng với nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh trên một số loại cây trồng như đu đủ, ớt và cà phê. Tuy nhiên, hiện nay ở Việt Nam vẫn chưa có nghiên cứu nào về khả năng đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* với nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên cây xoài.

Chính vì những thực tế trên, đề tài “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* sp. từ đất vùng rễ xoài có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên xoài” được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn được vi khuẩn *Bacillus* sp. từ đất vùng rễ xoài có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên xoài. Đồng thời, nghiên cứu góp phần tạo bộ chủng giống *Bacillus* có tiềm năng tạo chế phẩm sinh học phục vụ cho việc quản lý phòng kháng bệnh thán thư cho cây xoài.

## **Mục đích nghiên cứu**

Tuyển chọn được vi khuẩn *Bacillus* sp. phân lập từ đất vùng rễ xoài có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên xoài.

## **Nội dung nghiên cứu**

Nội dung 1: Phân lập và định danh nấm *Colletotrichum* sp. từ mẫu lá xoài nhiễm bệnh

Nội dung 2: Phân lập và sàng lọc vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp.

Nội dung 3: Tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. mạnh nhất

Nội dung 4: Khảo sát đặc tính sinh hóa và định danh vi khuẩn *Bacillus* sp. được tuyển chọn bằng phương pháp sinh học phân tử

## **Cơ sở khoa học và thực tiễn của đề tài**

### *Cơ sở khoa học đề tài*

Kết quả nghiên cứu tuyển chọn được vi khuẩn *Bacillus subtilis* (PQ517027) phân lập từ đất vùng rễ xoài xoài thu thập tại vườn xoài Đồng Tháp (tọa độ 10.2308188, 105.7259846) có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên xoài.

### *Tính thực tiễn của đề tài*

Kết quả nghiên cứu góp phần tạo bộ chủng giống *Bacillus* có tiềm năng tạo chế phẩm sinh học phục vụ cho việc quản lý phòng kháng bệnh thán thư cho cây xoài.

## **Những đóng góp của luận văn**

Đề tài phân lập được chủng *Bacillus subtilis* có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên xoài, góp phần tạo bộ chủng giống *Bacillus* có tiềm năng tạo chế phẩm sinh học phục vụ cho việc quản lý phòng kháng bệnh thán thư cho cây xoài.

Phân lập được 8 chủng nấm gây bệnh trên xoài. Trong đó, xác định được loài *Colletotrichum asianum* gây bệnh thán thư trên lá xoài.



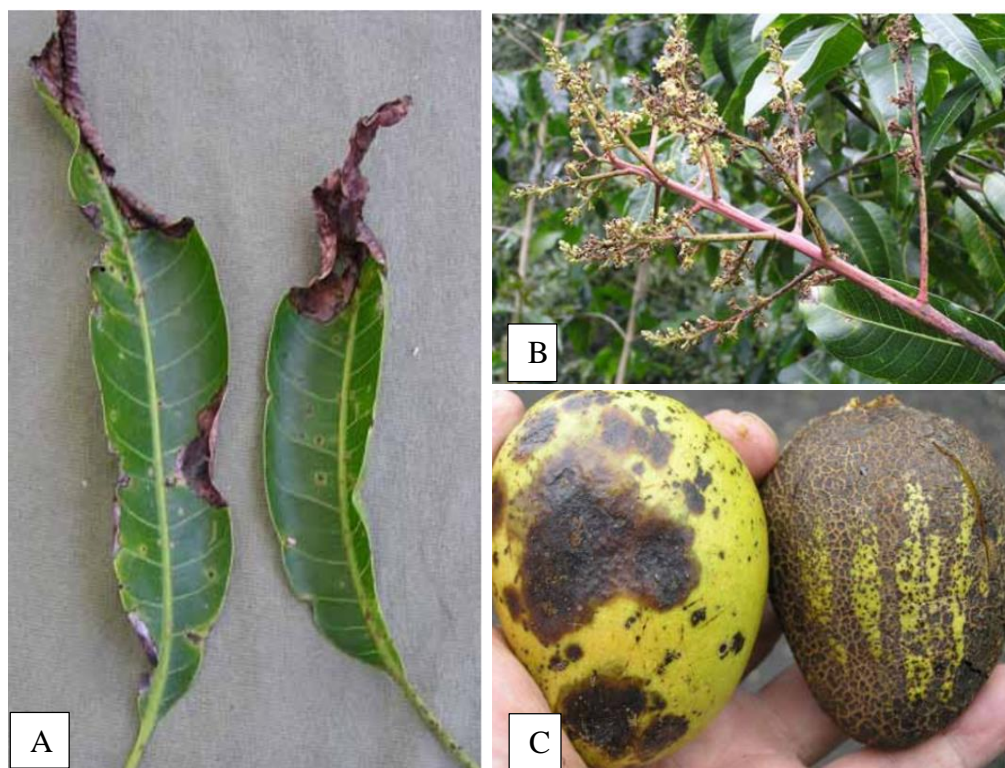
## Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

### 1.1. TỔNG QUAN VỀ BỆNH THÁN THƯ XOÀI

#### 1.1.1. Giới thiệu chung về bệnh thán thư xoài

Xoài được trồng chủ yếu ở Châu Á, đặc biệt là ở Ấn Độ, chiếm khoảng 50% sản lượng xoài của thế giới, tiếp theo là Trung Quốc, Thái Lan, Pakistan và Indonesia. Brazil và Mexico là những nước sản xuất xoài lớn nhất ở Mỹ, trong khi Nigeria và Ai Cập là những nước sản xuất lớn ở châu Phi [2]. Ở Việt Nam, xoài là cây ăn quả mang lại giá trị kinh tế cao, giúp Việt Nam đứng thứ 13 về sản xuất xoài trên thế giới với sản lượng đạt 31.276 tấn [1].

Các giống xoài được trồng ở các nước đều dễ bị bệnh thán thư do nhiệt độ và độ ẩm cao đặc trưng của các vùng khí hậu nhiệt đới. Tỷ lệ mắc bệnh thán thư trên xoài xảy ra gần như 100% trong điều kiện ẩm ướt. Bệnh thán thư xoài là bệnh phổ biến trên toàn thế giới, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng xoài trước và sau thu hoạch.



**Hình 1. 1.** Triệu chứng bệnh thán thư trên các bộ phận của xoài [3]

(A). Lá xoài; (B). Hoa xoài; (C). Quả xoài

Bệnh thán thư xoài biểu hiện trên lá, cành, cuống lá, chùm hoa và quả. Ở lá, vết bệnh bắt đầu từ những đốm nhỏ, góc cạnh, màu nâu đến đen, có thể lan rộng thành những vùng chết rộng. Vết bệnh có thể rụng lá khi thời tiết khô ráo. Triệu chứng đầu tiên trên hoa là những đốm nhỏ màu đen hoặc nâu sẫm, có thể to ra, liên kết và làm chết hoa trước khi đậu quả, làm giảm năng suất đáng kể. Cuống lá, cành và thân cũng dễ bị nhiễm bệnh, phát triển các vết bệnh màu đen, lan rộng điển hình trên quả, lá và hoa. Những đốm hoại tử màu đen này có thể kết hợp lại để tạo thành các vùng nhiễm bệnh lớn hơn. Các mô bị nhiễm bệnh trở nên khô, cuối cùng các bộ phận bị nhiễm bệnh của cây sẽ chết [4].

Quả chín nhiễm bệnh sẽ phát triển thành các đốm sâu trũng, nổi rõ, màu nâu sẫm đến đen trước hoặc sau khi hái. Quả có thể rụng khỏi cây sớm. Các vết đốm trên quả thường liên kết lại và xâm nhập sâu vào quả, dẫn đến quả bị thối trên diện rộng. Hầu hết các bệnh nhiễm ở quả còn xanh đều ở dạng tiềm ẩn và phần lớn không thể nhìn thấy được cho đến khi chín. Vì vậy, những quả có vẻ khỏe mạnh khi thu hoạch có thể nhanh chóng phát triển các triệu chứng bệnh thán thư khi chín. Triệu chứng thứ hai trên quả bao gồm triệu chứng vết rách, trong đó là các vùng hoại tử trên quả, có thể có hoặc không liên quan đến vết nứt bề mặt của lớp biểu bì, tạo ra hiệu ứng da cá sấu và thậm chí khiến quả bị hư hại, phát triển các vết nứt rộng và sâu ở lớp biểu bì kéo dài vào bên trong quả. Các vết bệnh trên thân và quả có thể tạo ra các khối bào tử màu hồng cam dễ thấy trong điều kiện ẩm ướt. Điều kiện thời tiết ẩm ướt, ẩm áp tạo điều kiện thuận lợi cho bệnh thán thư lây lan [3].

### 1.1.2. Tình hình nghiên cứu bệnh thán thư xoài trên thế giới

*Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* là tác nhân gây bệnh thán thư xoài phổ biến trên thế giới. Trong một số nghiên cứu, *Colletotrichum acutatum sensu lato* cũng đã được báo cáo là có liên quan đến bệnh thán thư xoài. Phân tích phát sinh loài dựa trên trình tự vùng gen ITS cho thấy *C. gloeosporioides* bao gồm các nhóm hoặc quần thể loài đa dạng và *Colletotrichum* spp. khác có thể liên quan đến bệnh thán thư xoài [5, 6].

Nghiên cứu Weir và cộng sự (2012) đã mô tả các phân tích phát sinh loài *Colletotrichum* bằng cách sử dụng nhiều dấu ấn sinh học, một số loài trong phức hợp *C. gloeosporioides* và *C. acutatum* được báo cáo là có liên quan đến bệnh thán thư xoài [7].

Ở Đông Bắc Brazil, năm loài *Colletotrichum* cụ thể là *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. karstii* và *C. dianesei* đã được tìm thấy là các tác nhân gây bệnh thán thư trên xoài và được báo cáo lần đầu tiên trên xoài ở Brazil [8]. Nhiều dấu ấn di truyền

(GAPDH, actin,  $\beta$ -tubulin, calmodulin, GS và vùng ITS) được sử dụng để xác định các loài.

Ở Colombia, nghiên cứu Pardo-De la Hoz và cộng sự (2016) đã báo cáo một số mức độ xuất hiện của các loài *Colletotrichum* spp. liên quan đến bệnh thán thư xoài, bao gồm *C. asianum* và *C. gloeosporioides* [9].

Nhiều báo cáo được công bố ở Ấn Độ, quốc gia có sản lượng xoài lớn nhất thế giới, loài *C. gloeosporioides* là tác nhân gây bệnh chính của bệnh thán thư xoài. Dựa trên phân tích giới hạn và giải trình tự vùng gen ITS, Chowdappa và Kumar (2012) đã báo cáo rằng *C. gloeosporioides* liên quan đến bệnh thán thư xoài ở Ấn Độ bao gồm các phân nhóm khác nhau. Các thử nghiệm khả năng gây bệnh cho thấy sự thay đổi về mức độ độc lực giữa các chủng *C. gloeosporioides* phân lập, cùng với sự tồn tại của nhiều hơn một loài gây bệnh [5].

Ở Trung Quốc, bệnh thán thư trên xoài cũng được báo cáo ở nhiều khu vực. Nghiên cứu của Li và cộng sự (2019) đã công bố 13 loài nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh trên xoài ở miền Nam Trung Quốc [10]. Một nghiên cứu khác phân tích phát sinh loài đa gen được thực hiện bởi Mo và cộng sự (2018) ở các vùng khác nhau của Quảng Tây, miền Nam Trung Quốc, cho thấy ba loài thuộc phức hợp *C. gloeosporioides* gây bệnh cho quả và lá xoài bao gồm *C. asianum*, *C. fructicola* và *C. siamense* [11]. Wu và cộng sự (2020) đã báo cáo về loài *Colletotrichum* spp. liên quan đến bệnh thán thư xoài ở Đài Loan. Nghiên cứu này đã xác định *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. siamense*, *C. tropicale* và *C. scovillei* [12].

Trong số các loài trong phức hợp *C. gloeosporioides*, *C. asianum* là loài gây bệnh thán thư phổ biến nhất ở xoài trên toàn thế giới. Loài này đã được báo cáo ở Brazil, Sri Lanka, Thành phố Tam Á và các khu vực khác của Trung Quốc, Nam Phi, Malaysia, Đài Loan, Mexico, Philippines và Indonesia [13].

### 1.1.3. Tình hình nghiên cứu bệnh thán thư xoài ở Việt Nam

Ở Việt Nam, báo cáo đầu tiên về bệnh thán thư trên xoài phân lập được chủng *Colletotrichum asianum* trên lá xoài [14]. Loài này cũng được báo cáo là tác nhân phổ biến gây bệnh thán thư xoài ở nhiều nước trên thế giới.

Năm 2008, một nghiên cứu của Lê Hoàng Lệ Thủy và Phan Văn Kim đã phân lập được 73 chủng nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên xoài ở các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Trong đó, xác định được hai loài nấm gây bệnh là *Colletotrichum*

*acutatum* và *Colletotrichum gloeosporioides*. Kết quả 5/6 loại thuốc sát khuẩn có hiệu quả đối với các chủng nấm gây bệnh thán thư trên xoài [15].

Năm 2016, Nguyễn Hồng Quý và Lê Minh Tường đánh giá khả năng phòng trị của xạ khuẩn đối với tác nhân gây bệnh thán thư trên xoài. Kết quả nghiên cứu cho thấy hai chủng xạ khuẩn HG10, HG21 có hiệu quả phòng trị bệnh tương đương với thuốc hóa học Carbenzim, làm cơ sở cho việc sử dụng xạ khuẩn trong công tác phòng trừ sinh học bệnh thán thư trên xoài [16].

Năm 2019, Trần Đức Thắng và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên cây xoài, ở các tỉnh Đồng Tháp, Tiền Giang, Hậu Giang, Cần Thơ, Bà Rịa-Vũng Tàu, Đồng Nai, Khánh Hòa. Dựa vào đặc điểm hình thái, trình tự gen của 4 gen TUB2, ACT, GS và GAPDH phân lập được 24 chủng *Colletotrichum* spp. từ lá, hoa và quả xoài, xác định thuộc hai loài *Colletotrichum asianum* và *Colletotrichum acutatum* [17].

Năm 2021, Phạm Thị Lý Thu và cộng sự đã nghiên cứu và tuyển chọn nấm *Trichoderma* có khả năng đối kháng với *Colletotrichum* spp gây bệnh thán thư xoài. Kết quả đã tuyển chọn được 14/56 chủng nấm *Trichoderma* spp. có khả năng đối kháng cao với *Colletotrichum* spp. Trong đó, hai chủng Tr.X2 và Tr.X3 có hoạt tính đối kháng cao ở điều kiện *in vitro* và nhà lưới, thuộc hai loài *Trichoderma harzianum* và *Trichoderma asperellum* [18].

#### **1.1.4. Biện pháp kiểm soát bệnh**

##### **Lựa chọn địa điểm**

Cách tốt nhất để kiểm soát bệnh thán thư là tránh trồng xoài ở nơi có điều kiện thuận lợi cho bệnh phát triển. Vùng trồng xoài phù hợp nhất là các khu vực khí hậu nóng và khô [19].

##### **Giống kháng bệnh**

Chọn các giống có khả năng kháng bệnh thán thư. Có sự khác biệt lớn về khả năng kháng bệnh thán thư giữa các giống xoài. Rất ít nghiên cứu thực hiện để đánh giá khả năng kháng bệnh thán thư của các giống xoài. Tuy nhiên, một số giống có mức kháng cự được báo cáo khác nhau khi được đánh giá ở các quốc gia khác nhau. Cho đến nay, vẫn không biết rằng việc khác nhau này là do các chủng nấm khác nhau, sự khác biệt về môi trường hay phương pháp đánh giá [19].

## **Vệ sinh vườn**

Nấm bệnh tồn tại từ mùa này sang mùa khác trên các cành cây, lá và hoa già bị bệnh. Trong canh tác, cần vệ sinh vườn cây ăn quả bằng cách cắt tỉa và loại bỏ các mảnh vụn từ dưới tán cây để hạn chế lây lan mầm bệnh [19].

## **Phun thuốc diệt nấm đồng ruộng**

Các vườn cây ăn quả cần được phun thuốc diệt nấm một cách thường xuyên. Khoảng thời gian phun hàng tuần đến hàng tháng, tùy thuộc vào mưa. Phun hàng tuần trong quá trình ra hoa và cho đến khi quả dài khoảng 4-5 cm và cứ hai lần một lần trong quá trình phát triển quả, dường như là một khuyến nghị tiêu chuẩn. Thuốc diệt nấm được báo cáo là có hiệu quả chống lại bệnh thán thư trong các thử nghiệm thực địa là Benomyl, Thiophanate methyl, Captafol, Mancozeb và Vinclozolin [20]. Thuốc diệt nấm có hiệu quả chống thán thư được đăng ký sử dụng ở Hawaii là Benomyl, Captan, đồng sunfat cơ bản và lưu huỳnh cộng với đồng sunfat cơ bản [19].

Mancozeb hiện đang được khuyến cáo hàng tuần ở Úc [21], và maneb và mancozeb được khuyến nghị trong khoảng thời gian 5 - 10 ngày ở Philippines. Ferbam và Chlorothalonil đã được sử dụng ở Florida [22], nhưng hầu hết người trồng hiện đang sử dụng thuốc diệt nấm gốc đồng để kiểm soát bệnh thán thư [19].

Ở Việt Nam, trước khi hoa nở 2-3 tuần và sau khi hoa nở 1-2 tuần tiến hành phun thuốc phòng và khi thấy bệnh chớm xuất hiện có thể sử dụng thuốc Copper – B 75WP (hoạt chất Benomyl + Bordeaux + Zineb), Score 250EC (hoạt chất Difenoconazole), Ridomil Gold 68wp (hoạt chất Metalxyl + Mancozeb) hoặc các thuốc khác được khuyến cáo, sử dụng thuốc luân phiên trách sự kháng thuốc của nấm [15].

## **Phương pháp xử lý sau thu hoạch**

Xử lý nước nóng sau thu hoạch (15 phút ở 51<sup>0</sup>C) đã được chứng minh là làm giảm sự phát triển bệnh thán thư ở quả chín của giống Larravi ở Puerto Rico (12) và với các giống Zill, Haden, Sensation, Kent và Keitt trong 5 phút ở khoảng 55 <sup>0</sup>C và 15 phút ở 49<sup>0</sup>C ở Florida [23]. Do sự khác biệt về giống trong khả năng chịu nhiệt, các thử nghiệm phải được tiến hành để xác định thời gian và nhiệt độ tối ưu cho từng giống cây.

Làm lạnh tại 10<sup>0</sup>C sẽ làm chậm đáng kể sự phát triển của bệnh thán thư. Tuy nhiên, vì tổn thương lạnh có thể xảy ra, trái cây nên được chín trước khi làm lạnh.

Benomyl và Thiabendazole ở nhiệt độ 500-1000 ppm được làm nóng đến 52°C, trong đó quả xoài được nhúng trong 1-3 phút, có hiệu quả trong việc kiểm soát trên xoài [24]. Benomyl không được làm nóng là không hiệu quả. Tuy nhiên, trong một thời gian ngắn, nấm đã phát triển đề kháng với Benomyl và có khả năng kháng chéo với các loại thuốc diệt nấm liên quan Thiabendazole và Thiophanate methyl [25].

Iprodione nóng, Prochloraz không đun nóng và Imazalil không đun nóng cũng cho thấy hiệu quả trong việc kiểm soát bệnh thán thư. Bức xạ gamma đã cho thấy một số hiệu quả trong việc giảm bệnh thán thư. Bức xạ đường như không khả thi để kiểm soát dịch bệnh xoài tại thời điểm sau thu hoạch [19].

Bệnh thán thư được kiểm soát tốt nhất bằng cách kết hợp các biện pháp phòng ngừa, phun thuốc diệt nấm tại đồng ruộng và phương pháp điều trị sau thu hoạch [19].

## **1.2. TỔNG QUAN VỀ NẤM *Colletotrichum***

### **1.2.1. Giới thiệu chung**

*Colletotrichum* spp. lần đầu tiên được Tode phát hiện vào năm 1790 và được đặt tên là *Vermicularia Tode*. Sau đó, được phân nhỏ dựa theo các đặc điểm hình thái và được đặt tên là *Colletotrichum Corda* [26]. Với sự phát triển của sinh học phân tử, ngày càng có nhiều nhà nghiên cứu sử dụng các dấu ấn sinh học để xác định các loài *Colletotrichum* spp., điều này không chỉ cải thiện độ chính xác của việc xác định loài mà còn xác định được nhiều loài *Colletotrichum*.

Nấm *Colletotrichum* là một trong số 10 loại nấm gây bệnh thực vật quan trọng nhất trên thế giới [27]. Có khoảng 600 loài *Colletotrichum* ảnh hưởng đến khoảng 3200 loài thực vật một lá mầm và hai lá mầm. Hầu hết các loài *Colletotrichum* này đều có vật chủ cụ thể mặc dù có một số nghiên cứu cho rằng vấn đề về tính đặc hiệu của vật chủ là không hoàn toàn do nhiều yếu tố khác nhau.

### **1.2.2. Cơ chế gây bệnh**

Nấm *Colletotrichum* có thể lây nhiễm trên nhiều bộ phận của cây như lá, thân và quả. Khi tiếp xúc với cây, bào tử nấm *Colletotrichum* ban đầu bám vào bề mặt vật chủ và nảy mầm để tạo thành ống mầm. Sau đó, một cấu trúc nhiễm trùng chuyên biệt hình thành ở đầu ống mầm và xâm nhập vào vật chủ [28]. Sau khi thâm nhập, phần lớn các mầm bệnh *Colletotrichum* thích nghi với lối sống bán sinh dưỡng. Chúng phát triển xâm nhập tại vị trí nhiễm trùng để xâm lấn tế bào thực vật, sau đó tạo ra các cấu trúc nhiễm

trùng chuyên biệt như giác bám và sợi nấm chính để lấy chất dinh dưỡng từ các mô thực vật sống. Nấm *Colletotrichum* chuyển sang giai đoạn hoại tử, sau đó chúng tạo ra sợi nấm thứ cấp xâm lấn các tế bào lân cận và tiêu diệt các mô vật chủ [29].

Người ta phát hiện ra rằng để lây nhiễm thành công và gây bệnh thán thư cho cây trồng, nấm *Colletotrichum* đã sản xuất ra các chất chuyển hóa gây độc tế bào. Một số chất chuyển hóa gây độc tế bào đã được nghiên cứu khác nhau tùy theo cây ký chủ và loài *Colletotrichum*. Chẳng hạn, *Colletotrichum capsici* đã được báo cáo là tạo ra các chất chuyển hóa độc hại colletotrichin, colletodiol, colletoketol, colletol và colletalol, ngoài việc tăng khả năng lây nhiễm, chúng còn làm suy giảm sự nảy mầm của hạt, sự phát triển của rễ và chồi cũng như gây chết cây con ở ớt *Capsicum annuum* [30]. *Colletotrichum gloeosporioides* đã được báo cáo là giải phóng axit colletotric trong thân cây *Artemisia mongolica* [31], và ergosterol trong thân cây *Artemisia annua* [32].

Ngoài ra, nấm cũng tiết ra các enzyme để có thể lây nhiễm thành công vào cây ký chủ. Các loài *Colletotrichum* sản xuất enzyme cellulase xúc tác sự thoái hóa của thành tế bào chủ [33].

### 1.2.3. Biện pháp kiểm soát

Nấm *Colletotrichum* là loài nấm gây bệnh thực vật quan trọng nhất trên thế giới, gây ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng nhiều loại cây trồng. Chính vì thế, công tác phòng trừ nấm *Colletotrichum* spp. rất quan trọng. Việc kiểm soát các loài nấm *Colletotrichum* rất khó khăn do cơ chế chống lại các yếu tố miễn dịch thực vật. Hiện nay, hai biện pháp chính để kiểm soát nấm *Colletotrichum* là nhân giống các nguồn cây trồng kháng bệnh và sử dụng thuốc diệt nấm hóa học.

Hóa chất được sử dụng thường xuyên để kiểm soát sự lây lan của nấm. Một số loại thuốc diệt nấm thường được sử dụng bao gồm: Propiconazol, Bitertanole, Hexaconazol, Imazalil, Carbendazin và Thiabendazole. Tuy nhiên, việc kiểm soát toàn bộ vẫn là một thách thức lớn do sự biến đổi di truyền phức tạp của các chủng *Colletotrichum* dẫn đến mất tính kháng của cây trồng và xuất hiện tính kháng thuốc. Bên cạnh đó, việc sử dụng thuốc hóa học sẽ ảnh hưởng rất lớn đến sức khỏe con người và các loài sinh vật khác

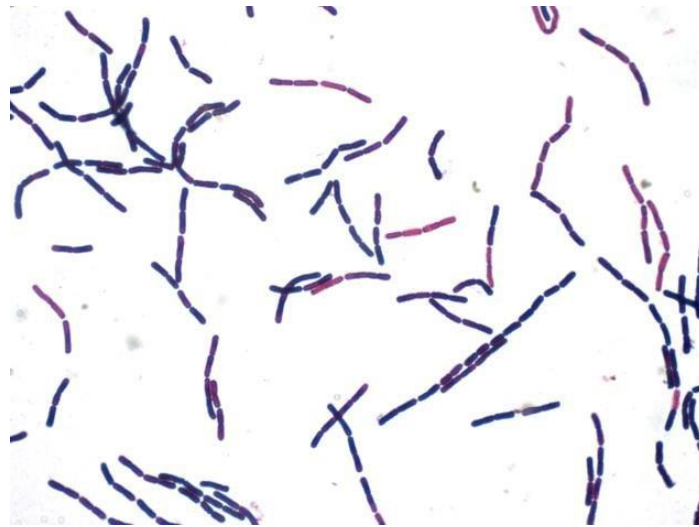
Một số nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng việc sử dụng chiết xuất thực vật có thể giúp kiểm soát nấm *Colletotrichum*. Chiết xuất cò và nước từ chanh và củ trâu đã được chứng minh là có hiệu quả chống lại sự lây lan của *Colletotrichum lindemuthianum* [34]. Việc phát triển các giống có khả năng chống chịu vẫn là một lựa chọn để hạn chế tác

động của *Colletotrichum* spp. và cải thiện năng suất cây trồng. Ngày nay, các tác nhân kiểm soát sinh học đã được sử dụng để thay thế thuốc trừ sâu hóa học tổng hợp. Các tác nhân này an toàn và thân thiện với môi trường hơn. Kiểm soát sinh học bằng vi khuẩn *Bacillus* ngày càng phổ biến và được sử dụng rộng rãi [35].

### 1.3. TỔNG QUAN VỀ VI KHUẨN *Bacillus*

#### 1.3.1. Giới thiệu chung

Chi *Bacillus* được Cohn thiết lập năm 1872 và bao gồm hơn 200 loài và phân loài được mô tả thuộc ngành *Firmicutes*. Dựa trên các đặc điểm hình thái, vi khuẩn thuộc chi này được mô tả là hình que, Gram dương, hiếu khí hoặc kỵ khí và dương tính với catalase [36]. Do khả năng sinh lý rộng và khả năng hình thành nội bào tử, *Bacillus* spp. có khả năng chống lại các điều kiện môi trường bất lợi và có mặt khắp nơi trong một loạt các môi trường sống, bao gồm cả đất. *Bacillus* spp. đại diện cho nhóm vi khuẩn đất và chiếm ưu thế, chiếm tới 95% quần thể vi khuẩn Gram dương.



**Hình 1. 2.** Tế bào vi khuẩn *Bacillus* sp. dưới kính hiển vi [37]

*Bacillus* spp. là một nhóm lớn và đa dạng của các vi khuẩn không gây bệnh và gây bệnh. Hầu hết các loài *Bacillus*, cũng như các sản phẩm của chúng, được coi là an toàn cho mục đích sử dụng và thân thiện môi trường. Những vi khuẩn này được dùng tạo ra các sản phẩm thương mại hóa vì khả năng tiết ra một số chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học, tạo ra nội bào tử chống chịu và phát triển nhanh chóng trong các môi trường khác nhau.



### 1.3.2. Ứng dụng của vi khuẩn *Bacillus* trong nông nghiệp

Nhiều nghiên cứu ở nhiều loài thực vật khác nhau cho thấy sự gia tăng số lượng vi khuẩn *Bacillus* spp. được xác định là tác nhân kiểm soát sinh học và chất kích thích tăng trưởng thực vật [38].

Các loài *Bacillus* là một trong những tác nhân kiểm soát sinh học được nghiên cứu nhiều nhất, tức là thuốc trừ sâu sinh học góp phần ngăn chặn mầm bệnh thực vật bằng sự đối kháng và cạnh tranh. Ức chế sự phát triển của mầm bệnh bởi *Bacillus* spp. đòi hỏi sự tham gia của các cơ chế như cạnh tranh chất dinh dưỡng và không gian, sản xuất kháng sinh, enzyme thủy phân, siderophore và tạo khả năng kháng bệnh. Vi khuẩn *Bacillus* cũng có thể hoạt động như phân bón sinh học hoặc chất kích thích sinh học, bằng cách tạo điều kiện cho sự hấp thu một số chất dinh dưỡng từ môi trường (cố định nitơ, hòa tan phosphate), cung cấp một số hợp chất cho cây và sản xuất các chế phẩm thương mại [39].

Do đó, *Bacillus* spp. đại diện cho một giải pháp thay thế cho hóa chất nông nghiệp như thuốc trừ sâu và phân bón tổng hợp, giúp tăng cường tăng trưởng cây trồng và phát triển nền nông nghiệp bền vững. Lợi ích của vi khuẩn *Bacillus* spp. đối với sự tăng năng suất và chất lượng cây trồng đã được chứng minh nghiên cứu ở một số loại cây nông nghiệp như lúa mì, ngô, đậu tương, hướng dương, đậu thông thường, cà chua, hạt tiêu, khoai tây, dưa chuột và nhiều loại cây trồng khác [38].

#### 1.3.2.1. Ứng dụng trong kiểm soát sinh học

Vi khuẩn *Bacillus* được coi là vi khuẩn tiềm năng được sử dụng làm tác nhân kiểm soát sinh học. Nhiều loài *Bacillus* đã được nghiên cứu là có khả năng ức chế một số loại nấm gây bệnh thực vật. Đặc điểm chủng *Bacillus* spp. có thể tăng trưởng nhanh chóng, yêu cầu chất dinh dưỡng đơn giản, có thành tế bào peptidoglycan dày và sản sinh nội bào tử giúp tế bào có khả năng chống chịu tốt hơn với điều kiện môi trường bất lợi, do đó đây là chủng tiềm năng cho tác nhân kiểm soát sinh học [40]. Tác dụng đối kháng của *Bacillus* do khả năng tạo ra các hợp chất có hoạt tính sinh học khác nhau bao gồm chất kháng khuẩn hoặc peptide chống nấm [35], enzyme phân giải [41] và các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi [40].

#### *Chất kháng sinh*

Các hoạt tính đối kháng của *Bacillus* spp. thường liên quan đến việc sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp có đặc tính kháng sinh. Các hợp chất này chủ yếu liên quan đến

peptide có phân tử thấp trọng lượng được tạo ra ribosome (bacteriocin) hoặc không ribosome (lipopeptide, peptide, polyketide) [38]. Các tác nhân kiểm soát sinh học được sử dụng phổ biến nhất là *B. subtilis* và *B. amyloliquefaciens*, với tiềm năng sản xuất hơn 20 hợp chất kháng khuẩn đa dạng về cấu trúc.

#### *Enzyme thủy phân*

Hoạt tính kháng khuẩn của *Bacillus* spp. cũng có thể là do sản xuất các enzyme thủy phân như chitinase, chitosanase, glucanase, cellulase, lipase và protease, giúp thủy phân hiệu quả các thành phần chính của thành tế bào nấm và vi khuẩn [38].

Chitinase là enzyme xúc tác cho việc thủy phân liên kết  $\beta$ -1,4-glycosid trong chitin, polysacarit tự nhiên phổ biến thứ hai sau cellulose và là thành phần chính của thành tế bào nấm. Vi khuẩn chủ yếu sản xuất chitinase để làm suy giảm chitin để sử dụng nó như một nguồn năng lượng, trong khi ở một số vi khuẩn chitinase là tác nhân kiểm soát sinh học tiềm năng chống lại nhiều loại bệnh thực vật do nấm gây bệnh thực vật gây ra. Glucanase là enzyme xúc tác cho việc thủy phân các liên kết glycosid có trong  $\alpha$ -glucan và  $\beta$ -glucan. Vai trò chính của glucan thành tế bào trong nấm là cấu trúc thành tế bào, nhưng chúng cũng có thể bị thoái hóa và được sử dụng làm nguồn dinh dưỡng. *Bacillus* spp. là một nguồn giàu  $\alpha$ -1,3-glucanase và  $\beta$ -1,3-glucanase. Bên cạnh chitin và glucan, thành tế bào nấm còn chứa cellulose, lipid và protein. Do đó, cellulase vi khuẩn, lipase và protease có thể đóng một vai trò quan trọng trong quá trình ly giải thành tế bào xảy ra trong quá trình tương tác với mầm bệnh.

#### *Siderophore*

Siderophore là các hợp chất có ái lực cao với ion sắt, với trọng lượng phân tử thấp được sản xuất bởi một số vi sinh vật và thực vật, đặc biệt là trong điều kiện thiếu sắt [42]. Vai trò chính của siderophore là thu nhận các ion sắt, cho phép hòa tan và chiết xuất từ khoáng chất và hợp chất hữu cơ. Tầm quan trọng của siderophore trong kiểm soát sinh học dựa trên sự cạnh tranh đối với sắt để giảm sự sẵn có của sắt đối với mầm bệnh.

Hầu hết các siderophore vi khuẩn là catecholates, chẳng hạn như bacillibactin được sản xuất bởi một số *Bacillus* spp. bao gồm *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, v.v., [43]. *Bacillus* spp. có khả năng sinh siderophore tốt hơn so với các chủng vi khuẩn khác được phân lập từ thân rễ ngô [44]. Siderophore được sinh ra bởi

*Bacillus* spp. đã tham gia vào việc ngăn chặn một số bệnh thực vật như làm giảm tỷ lệ héo do *Fusarium*, và tăng cường sự tăng trưởng và năng suất của hạt tiêu [45].

#### *Khả năng kháng bệnh*

Cây thích nghi với việc tiếp xúc với mầm bệnh liên tục thông qua các cơ chế bảo vệ. Khả năng kháng mầm bệnh, được phát triển sau khi kích thích thích hợp, thể hiện sự cải thiện khả năng phòng bệnh của cây. Cây bị nhiễm bệnh làm tăng mức độ phân tử tín hiệu phối hợp các gen kích hoạt để tổng hợp thích hợp, tiếp theo là thay đổi cấu trúc và mô học phòng ngừa, các chất hóa học phòng ngừa (phenol và các sản phẩm chuyển hóa thứ cấp khác) và theo những cách khác [46].

Các cơ chế bảo vệ thực vật, chẳng hạn như cơ chế kháng toàn thân (Induced systemic resistance), có thể được bắt đầu bởi các tác nhân bên ngoài trước khi nhiễm trùng hoặc được kích hoạt bởi nhiễm trùng cục bộ, dẫn đến kháng toàn thân [47]. Hệ vi khuẩn đất thúc đẩy cơ chế kháng toàn thân ở thực vật thông qua việc sản xuất các chất chuyển hóa khác nhau như kháng sinh, siderophore, hợp chất hữu cơ dễ bay hơi và các chất khác [48]. *Bacillus* spp. là một trong những vi khuẩn thân rễ được nghiên cứu nhiều nhất về khả năng kích hoạt cơ chế Induced systemic resistance (ISR) ở thực vật, đồng thời có khả năng gây ra sức đề kháng chống lại một số mầm bệnh trong cùng một cây [49]. Chandler và cộng sự [50] cho thấy *B. subtilis* kích hoạt ISR trong lúa chống lại *Rhizoctonia solani* thông qua axit jasmonic và ethylene, cũng như axit abscisic và tín hiệu auxin. Các nghiên cứu tương tự đã báo cáo một vai trò không thể thiếu lipopeptide của *B. subtilis*, cụ thể là fengycin và surfactin, trong trạng thái phòng thủ cảm ứng. Cơ chế ISR thúc đẩy *B. amyloliquefaciens* tạo ra hợp chất hữu cơ dễ bay hơi và giảm đáng kể bệnh đốm do *Xanthomonas axonopodis* pv gây ra ở hạt tiêu [51]. *Bacillus* nội sinh của ngô có thể bảo vệ cây ký chủ bằng cách sản xuất lipopeptide kháng nấm ức chế *Fusarium moniliforme* cũng như bằng cách gây ra sức đề kháng toàn thân [52].

#### **1.3.2.2. Ứng dụng trong thúc đẩy tăng trưởng thực vật**

##### *Tăng khả năng cung cấp chất dinh dưỡng*

Vi khuẩn *Bacillus* spp. tạo ra nhiều chất chuyển hóa có thể làm tăng khả năng cung cấp chất dinh dưỡng cho cây trồng, từ đó trực tiếp thúc đẩy sự phát triển và năng suất của cây. Việc sử dụng phân bón sinh học có chứa vi khuẩn *Bacillus* spp. cố định nitơ hoặc hòa tan phospho là một cách tiếp cận hợp lý để giảm tác động tiêu cực của phân bón tổng hợp đến môi trường mà không ảnh hưởng đến an toàn thực phẩm [53].

Ngoài nitơ, sự tăng trưởng của cây phụ thuộc trực tiếp vào phospho. Các vi sinh vật hòa tan phospho hữu cơ và vô cơ thuộc nhóm được chỉ định là vi sinh vật hòa tan phospho [54]. Sử dụng vi sinh vật hòa tan phospho cho cây trồng và đất là một chiến lược đầy hứa hẹn để tăng cường sự hấp thụ phospho và vi khuẩn *Bacillus* spp. là một trong những vi sinh vật mạnh nhất.

#### *Sản xuất hormone thực vật*

Vi khuẩn *Bacillus* có thể làm tăng năng suất cây trồng thông qua các cơ chế truyền đạt sản xuất hormone thực vật hoặc chất điều hòa tăng trưởng thực vật, chẳng hạn như auxin, cytokinin, gibberellin, ethylene và axit abscisic. Hormone thực vật là các chất hữu cơ ảnh hưởng đến sinh lý và sự phát triển của thực vật ở nồng độ rất thấp. Sinh tổng hợp hormone thực vật bằng *Bacillus* spp. có liên quan trực tiếp đến sự thúc đẩy tăng trưởng tiếp theo ở các cây khác nhau.

Auxin là một nhóm hormone thực vật kích thích sự phát triển của thực vật, chủ yếu thông qua việc điều hòa sự phân chia tế bào, kéo dài tế bào và biệt hóa mô. Auxin tự nhiên chính là axit indole-3-acetic (IAA) [55]. Việc áp dụng *in vitro* các chủng *Bacillus* sản xuất IAA trên rễ cây dẫn đến tăng chiều dài rễ cũng như số lượng rễ bên. Các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng *Bacillus* spp. đóng một vai trò quan trọng trong việc kiểm soát nồng độ IAA nội sinh trong rễ cây bằng cách điều chỉnh các gen đáp ứng auxin, do đó gây ra những thay đổi trong cấu trúc rễ.

Gibberellin (GA) là một nhóm hormone thực vật ảnh hưởng đến nhiều quá trình phát triển ở thực vật bậc cao, bao gồm hạt nảy mầm, kéo dài thân, ra hoa và đậu quả. Gutierrez-Manero và cộng sự [56] đã ghi nhận việc sản xuất gibberellin của *B. pumilus* và *B. licheniformis*. Tác dụng có lợi của *Bacillus methylotrophicus* đối với cây trồng do sự tiết ra một loạt các gibberellin đã được xác nhận bằng cách tăng tỷ lệ hạt nảy mầm của rau diếp, dưa hấu, đậu nành và mù tạt rau [57]. Cytokinin (CK) là một nhóm hormone thực vật đóng vai trò chính trong việc thúc đẩy sự phân chia tế bào, hoặc cytokinesis, trong rễ và chồi cây.

Ethylene là một hormone thực vật dạng khí chủ yếu điều chỉnh quá trình trưởng thành và lão hóa, cũng như phản ứng với các căng thẳng sinh học và phi sinh học. Một số vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng ở thực vật, bao gồm *Bacillus* spp., tổng hợp enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase điều chỉnh nồng độ ethylene trong thực vật có thể trở thành chất ức chế tăng trưởng [58].

Axit abscisic (ABA) là một hormone thực vật có vai trò quan trọng trong nhiều quá trình sinh lý thực vật, bao gồm hạt nảy mầm và chịu được điều kiện bất lợi. Park và cộng sự [59] cho thấy *Bacillus aryabhatai* tạo ra một lượng đáng kể ABA, IAA, CK và GA trong nuôi cấy, trong khi cây đậu nành được cấy có hàm lượng hormone thực vật cao, rễ và chồi dài hơn, và khả năng chịu nhiệt, oxy hóa và nitơ hóa tốt hơn. Vi khuẩn nội sinh *B. amyloliquefaciens* đã được tìm thấy để sản xuất ABA và tăng sự phát triển của thực vật và khả năng chống lại điều kiện mặn [60].

### *Các chế phẩm Bacillus*

Trong những năm gần đây, việc phân phối các chế phẩm dựa trên *Bacillus* thương mại đã tăng đáng kể trên toàn thế giới. Ngoài ảnh hưởng có lợi của chúng đối với cây trồng, các chủng *Bacillus* spp hiệu quả sẽ có thể tồn tại trong môi trường và ổn định và khả thi để lưu trữ kéo dài và sử dụng có mục đích trên đồng ruộng. Tuy nhiên, sức đề kháng và tính ổn định là một trong những hạn chế chính của các chế phẩm *Bacillus*.

Nội bào tử của *Bacillus* spp. không chỉ có thể chịu đựng các điều kiện môi trường bất lợi mà còn tồn tại trong tất cả các giai đoạn chế biến trong quá trình sản xuất. Để tăng cường bào tử và tổng hợp các chất chuyển hóa thích hợp, việc sản xuất các chế phẩm dựa trên *Bacillus* nên được tối ưu hóa ở từng giai đoạn, bao hàm việc lựa chọn các chủng hoặc nhóm chủng thích hợp, cũng như quá trình nhân giống và sản xuất [61].

### **1.3.3. Tình hình nghiên cứu vi khuẩn *Bacillus* phòng trừ bệnh thán thư**

#### **1.3.3.1. Vai trò vi khuẩn *Bacillus* trong phòng trừ nấm bệnh**

Vi khuẩn *Bacillus* được coi là vi khuẩn tiềm năng được sử dụng làm tác nhân kiểm soát sinh học. Nhiều loài *Bacillus* đã được nghiên cứu là có khả năng ức chế một số loại nấm gây bệnh thực vật. Đặc điểm chủng *Bacillus* có thể tăng trưởng nhanh chóng, yêu cầu chất dinh dưỡng đơn giản, có thành tế bào peptidoglycan dày và sản sinh nội bào tử giúp tế bào có khả năng chống chịu tốt hơn với điều kiện môi trường bất lợi, do đó đây là chủng tiềm năng cho tác nhân kiểm soát sinh học.

Ở Việt Nam và trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu vi khuẩn *Bacillus* về khả năng ức chế nấm *Colletotrichum*. Một vài nghiên cứu đã tiến hành khảo sát các đặc tính đối kháng của chủng *Bacillus* với nấm bệnh dựa trên khả năng sinh một số enzyme phân giải tế bào nấm như chitinase, cellulase, protease, khả năng hòa tan phosphate, khả năng sinh siderophore v.v.

### 1.3.3.2. *Tình hình nghiên cứu vi khuẩn Bacillus trên thế giới*

Năm 2012, Ruangwong và cộng sự (2012) đã phân lập và xác định các chất chuyển hóa tiềm năng do *Bacillus subtilis* LB5 tạo ra các chất chuyển hóa có tác dụng ức chế mạnh mẽ sự nảy mầm của bào tử *C. gloeosporioides* [62].

Năm 2014, nghiên cứu của Ashwini và Srividya đã khảo sát khả năng kiểm soát sinh học của vi khuẩn *Bacillus subtilis* trong quản lý bệnh thán thư trên cây ớt gây ra bởi nấm *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1 [6].

Năm 2015, một nghiên cứu ở Hàn Quốc của Joon Hee Han và cộng sự đã nghiên cứu khả năng đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập từ trầm tích thủy triều với tác nhân gây bệnh thán thư *Colletotrichum acutatum* và *Colletotrichum gloeosporioides*. Kết quả nghiên cứu làm cơ sở dữ liệu cho việc sử dụng chủng vi khuẩn *Bacillus* làm tác nhân sinh học thay thế thuốc diệt nấm để phòng trừ bệnh thán thư cây trồng [16].

Năm 2016, Rungjindamai và cộng sự đã nghiên cứu phân lập và đánh giá các tác nhân kiểm soát sinh học trong kiểm soát bệnh thán thư trên xoài ở Thái Lan. Kết quả phân lập được 8/112 vi khuẩn phân lập từ bề mặt lá và quả xoài khỏe mạnh có khả năng ức chế nấm *C. gloeosporioides* hơn 60%. Trong đó, có 2 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. MB61 và *Bacillus* sp. LB72 làm giảm kích thước vết bệnh thán thư khi lây nhiễm lên quả xoài nhiễm bệnh [63].

Năm 2021, Fadhilah và cộng sự đã nghiên cứu tiềm năng đối kháng của *Bacillus* sp. đối với nấm gây bệnh thực vật *Colletotrichum* sp. Kết quả thử nghiệm đối kháng bằng phương pháp cấy kép và đổ đĩa cho thấy tất cả các chủng *Bacillus* đều có khả năng ức chế sự phát triển của *Colletotrichum* sp. [12]. Monkhumg và cộng sự [64] đã khảo sát khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. của chủng *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* BL-59. Kết quả vi khuẩn BL-59 ức chế sự phát triển sợi nấm *Colletotrichum* sp. là 49,31% trong thí nghiệm cấy kép và 60% ức chế trong thí nghiệm khả năng tạo các hợp chất hữu cơ bay hơi. Quan sát dưới kính hiển vi hình thái sợi nấm của *Colletotrichum* sp. cho thấy sự hiện diện của cấu trúc sợi nấm bất thường.

Năm 2022, nghiên cứu của Zhou và cộng sự đã khảo sát khả năng kháng nấm của chủng vi khuẩn *Bacillus tequilensis* YYC 155 chống lại *Colletotrichum fructicola* gây bệnh thán thư ở cây trà dầu. Chủng vi khuẩn *Bacillus* tiết ra các enzyme thủy phân ngoại bào, chẳng hạn như chitinase và 1, 3-glucanase, sản xuất lipopeptide có tính kháng khuẩn

và hình thành màng sinh học mạnh. Kết quả cho thấy *B. tequilensis* YYC 155 có thể là tác nhân kiểm soát sinh học hiệu quả chống lại bệnh thán thư ở cây trà dầu [70].

Năm 2023, Ye và cộng sự [65] đã tiến hành nghiên cứu khả năng kháng nấm và cơ chế ức chế nấm bệnh của *Bacillus velezensis* ZN-S10 đối với nấm gây bệnh thực vật *Colletotrichum changpingense*. Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng *B. velezensis* ZN-S10 có tác dụng làm giảm diện tích đốm lá một cách hiệu quả do mầm bệnh *Colletotrichum changpingense* ZAFU0163-1 gây ra, ảnh hưởng đến quá trình sản sinh bào tử và nảy mầm, ức chế sự phát triển của sợi nấm và gây biến dạng sợi nấm. Một nghiên cứu khác của Jiang và cộng sự [66], đã sàng lọc và xác định cơ chế đối kháng của chủng *Bacillus* L18-7 đối với bệnh thán thư xoài. Kết quả 10/37 chủng *Bacillus* spp. có khả năng đối kháng với *C. asianum* là hơn 78%. Trong đó, chủng *Bacillus* L18-7 đạt hiệu quả phòng trừ bệnh là 83%, chủng cũng được xác định là *Bacillus velezensis*.

#### **1.3.3.3. Tình hình nghiên cứu vi khuẩn *Bacillus* ở Việt Nam**

Năm 2016, Nguyễn Thị Liên và cộng sự nghiên cứu phân lập vi khuẩn từ đất vùng rẫy ớt có khả năng đối kháng nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên ớt. Kết quả thu thập 18 mẫu đất vùng rẫy ớt tại Cần Thơ, Đồng Tháp và Tiền Giang có 79/341 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum*. Khảo sát các đặc tính đối kháng và chọn lọc được 6 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng tốt. Trong đó, dòng vi khuẩn CT10 có khả năng đối kháng mạnh nhất và xác định là vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* [27].

Năm 2020, Trần Thùy Trang và cộng sự đã phân lập và tuyển chọn vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus subtilis* có khả năng đối kháng nấm *Colletotrichum scovillei* gây bệnh thán thư trên ớt ở Thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả thu được 22 chủng nghi ngờ thuộc nhóm *B. subtilis*. Trong đó, chủng vi khuẩn BHCM8.3 có khả năng đối kháng mạnh nhất với nấm *Colletotrichum scovillei*. Bằng phương pháp sinh học phân tử xác định được chủng phân lập là vi khuẩn *B. subtilis* [61]. Một nghiên cứu khác của Nguyễn Bá Thọ và cộng sự, kết quả thu được 21 chủng *Bacillus* spp. phân lập ở đất rừng nguyên sinh và đất vườn cà phê khỏe mạnh tại Đắk Nông. Trong đó, chủng vi khuẩn *B. subtilis* ĐR2B1 có khả năng đối kháng tốt với *Colletotrichum* [57].

Năm 2023, Nguyễn Thị Như Huỳnh và cộng sự đã phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng đối kháng nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên cây đu đủ. Kết quả thu được có 6/12 chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng ức

chế nấm *Colletotrichum*. Trong đó, hai chủng có hoạt tính đối kháng cao nhất là BHL21 và BHL23. Bằng phương pháp sinh học phân tử, xác định được hai chủng vi khuẩn lần lượt là *B. methylotrophicus* và *B. amyloliquefaciens* [19].

Ở Việt Nam, có một số nghiên cứu vi khuẩn *Bacillus* có hoạt tính đối kháng với nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh trên một số loại cây trồng như đu đủ, ớt và cà phê [67-70]. Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có nghiên cứu nào về khả năng đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* với nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên cây xoài.



## **Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. ĐỐI TƯỢNG VÀ NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU**

#### **2.1.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu**

Thời gian thực hiện nghiên cứu từ tháng 03/2024 đến 08/2024

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng Công nghệ Biến đổi Sinh học, Viện Sinh học Nhiệt đới.

#### **2.1.2. Đối tượng nghiên cứu**

Chủng nấm *Colletotrichum* sp. phân lập từ mẫu lá xoài có triệu chứng bệnh thán thư. Mẫu lá xoài nhiễm bệnh được thu thập tại các vườn xoài huyện Cần Giò, Thành phố Hồ Chí Minh và phường Trường An, Thành phố Vĩnh Long.

Chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập từ đất vùng rễ xoài thu thập tại các tỉnh Tiền Giang, Đồng Tháp và Vĩnh Long. Mỗi tỉnh thu mẫu tại 5 vườn, mỗi vườn lấy mẫu tại 5 vị trí. Tổng số mẫu đất thu thập là 15 mẫu đất.

#### **2.1.3. Nguyên vật liệu nghiên cứu**

##### **2.1.3.1. Hóa chất nghiên cứu**

Môi trường và hóa chất sử dụng phân lập nấm *Colletotrichum* sp. và vi khuẩn *Bacillus* spp.: Potato Dextrose Agar (PDA), chất kháng sinh Tetracycline, Nutrient Agar, bộ thuốc nhuộm Gram, lục malachite, Luria Bertani Broth, Glycerol.

Hóa chất sử dụng cho phương pháp định danh khối phổ MALDI-TOF: HPLC-grade water, Ethanol, Axit formic, Acetonitrile, Axit a-cyano-4-hydroxy-cinnamic (HCCA) bão hòa trong 50 % Acetonitrile-2,5 % Axit trifluoroacetic.

Hóa chất sử dụng tách chiết DNA tổng số: dung dịch đệm CTAB, dung dịch Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25:24:1), Isopropanol, Ethanol, dung dịch đệm TBE.

Hóa chất sử dụng phản ứng khuếch đại PCR và tinh sạch sản phẩm PCR: cặp mồi ITS1 và ITS4 (Phusa Genomics), cặp mồi 27F và 1429R (Phusagenomics), bộ kit VeriFi™ Polymerase (PCR Biosystem Inc.), thang chuẩn DNA 1kb (Bioline), Agarose, bộ kit PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen).

Môi trường và hóa chất sử dụng cho khảo sát các đặc tính sinh hóa: Nutrient Agar, Colloidal chitin, Skim Milk powder, Carboxy methyl cellulose (CMC), CAS-Blue Agar, Pikovskaya, NaCl, dung dịch Lugol, dung dịch Congo Red.

### **2.1.3.2. Thiết bị nghiên cứu**

Máy PCR Master Cycler Nexus Gradient (Eppendorf), máy điện di ngang HE-99X (Cytiva), máy chụp hình gel UVP Chemstudio PLUS (Analytik Jena), máy vortex, máy ly tâm lạnh HERMLE Z327 K (Hermle), bể ổn nhiệt khô ThermoMixer-C (Eppendorf), máy quang phổ đo DNA/RNA/Protein QuickDrop-100 (Molecular devices), tủ cấy an toàn sinh học, tủ sấy, tủ ủ vi sinh, máy đo pH Hana HI8314.1-1 và các loại máy móc, thiết bị khác của phòng Công nghệ Biến đổi Sinh học và phòng Vi sinh Ứng dụng thuộc Viện Sinh học Nhiệt đới.

## **2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.2.1. Phân lập và định danh nấm *Colletotrichum* sp. từ mẫu lá xoài nhiễm bệnh**

#### **2.2.1.1. Thu mẫu lá xoài**

Để có được chủng nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên xoài, nghiên cứu tiến hành thu thập mẫu lá xoài có triệu chứng điển hình của bệnh thán thư tại các vườn xoài huyện Cần Giờ, Thành phố Hồ Chí Minh và phường Trường An, Thành phố Vĩnh Long để phân lập nấm bệnh.

Mỗi vườn xoài thu mẫu lá bệnh 5 cây xoài, mỗi cây thu 5 lá bệnh đựng trong túi nhựa vô trùng, ghi thông tin và tọa độ lấy mẫu. Mẫu thu thập được bảo quản trong thùng mát ở nhiệt độ 4°C và vận chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập.

#### **2.2.1.2. Phân lập nấm *Colletotrichum* sp.**

Phân lập nấm từ các vết bệnh thán thư trên lá xoài. Quy trình phân lập được thực hiện dựa theo mô tả Prihastuti (2009) [71]. Mẫu bệnh được cắt thành mảnh có kích thước 5x5 mm, sau đó được rửa với dung dịch Natri hypochlorite 1 % trong 1 phút, ngâm Ethanol 70 % trong 1 phút và rửa sạch bằng nước vô trùng 3 lần. Mẫu được sấy khô trong khăn giấy vô trùng. Sau khi xử lý mẫu được đặt lên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) bổ sung Tetracycline (20 µg/mL) sau đó ủ trong 7 ngày ở 28 °C.

Sau khi phân lập chủng nấm phân lập được tiến hành lây nhiễm nhân tạo trên lá xoài theo quy trình Koch để xác minh đối tượng gây bệnh thán thư [72]. Quy trình lây nhiễm nhân tạo được tiến hành bằng cách gây tổn thương bề mặt lá xoài, sau đó tiêm

dịch nuôi cấy nấm sau 7 ngày trên môi trường Potato Dextrose Broth (PDB) vào vị trí tổn thương, mẫu đối chứng cũng được xử lý lá tương tự nhưng thay thế dịch nuôi cấy nấm bằng môi trường PDB. Tiến hành quan sát, ghi nhận, so sánh các triệu chứng trên lá xoài gây nhiễm và không gây nhiễm với mẫu lá xoài có triệu chứng bệnh thán thư. Các chủng nấm phân lập được bảo quản ở  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.1.3. Sàng lọc nhanh các mẫu nấm gây bệnh bằng phương pháp MALDI-TOF**

Các chủng nấm phân lập và đánh giá có khả năng gây bệnh trên lá xoài được tiến hành sàng lọc nhanh bằng phương pháp MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization/Time of Flight). Phương pháp MALDI-TOF là phương pháp định danh vi sinh vật bằng kỹ thuật khối phổ MALDI-TOF là để xác định dấu ấn protein duy nhất của mỗi vi sinh vật. Mẫu phổ đặc trưng của dấu ấn protein dùng để định danh chính xác và tin cậy một loại vi sinh vật cụ thể bằng cách kết hợp hàng nghìn phổ tham chiếu từ các chủng vi sinh vật. Phương pháp này cũng được sử dụng để định danh nhanh một số loài nấm gây bệnh thực vật.

Các chủng nấm được nuôi cấy trên môi trường PDA ở  $28^{\circ}\text{C}$  trong 72 giờ. Quy trình chuẩn bị mẫu nấm để định danh MALDI-TOF được tiến hành theo quy trình hướng dẫn của hãng Bruker Daltonik. Lấy một ít khuẩn lạc nấm huyền phù với 1 mL HPLC-grade water vào Eppendorf 1,5 mL, trộn đều bằng máy vortex trong 1 phút và ly tâm 13000 vòng trong 2 phút. Sau đó, loại bỏ phần dịch nổi thêm vào 300  $\mu\text{L}$  HPLC-grade water, 900  $\mu\text{L}$  Ethanol và trộn đều bằng máy vortex. Hỗn hợp được ly tâm ở tốc độ 13000 vòng trong 2 phút, loại bỏ phần dịch nổi, làm khô và thêm vào 10  $\mu\text{L}$  Axit formic 70 %. Sau khi ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng, 10  $\mu\text{L}$  Acetonitrile được thêm vào. Các mẫu được ủ lại ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và sau đó ly tâm 13000 vòng trong 2 phút. Thử tích 1  $\mu\text{L}$  dịch nổi được chuyển vào đĩa MSP 96 (Bruker Daltonics) và để khô ở nhiệt độ phòng trước khi phủ lên 1  $\mu\text{L}$  dung dịch ma trận Axit a-cyano-4-hydroxy-cinnamic (HCCA) bão hòa trong 50% Acetonitrile - 2,5 % Axit trifluoroacetic (Bruker Daltonik) trong vòng 3 phút. Mẫu sau khi khô hoàn toàn được tiến hành phân tích sử dụng hệ thống Bruker MALDI Biotyper (Bruker Daltonik).

### **2.2.1.4. Định danh nấm *Colletotrichum* sp. dựa vào đặc điểm hình thái**

Quan sát các đặc điểm hình thái và bào tử nấm theo khóa phân loại của Sutton (1980) [73] và mô tả của Weir (2012) [7]. Xác định nấm *Colletotrichum* ở cấp độ loài dựa vào các đặc điểm hình thái, màu sắc khuẩn lạc, đặc điểm bào tử và đĩa áp. Đĩa áp

(appressorium) được tạo ra bằng cách tiến hành nuôi cấy trên lam [74]. Một mảnh môi trường PDA có kích thước 1 cm<sup>2</sup> đặt lên một lam kính vô trùng trong đĩa petri vô trùng. Bào tử nấm được cấy vào cạnh của mảnh môi trường PDA, sau đó đặt một lamen vô trùng lên trên mảnh môi trường. Đĩa petri được ủ 5-7 ngày ở 25 °C cho đến khi đĩa áp hình thành ở mặt dưới lamen, chuyển lamen sang một lam kính khác và quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 40X. Tuyển chọn chủng nấm nghi ngờ là *Colletotrichum* sp. và làm thuần trên môi trường PDA mới.

#### **2.2.1.5. Định danh nấm *Colletotrichum* sp. bằng giải trình tự vùng gen ITS**

Vùng gen ITS (Internal Transcribed Spacers) là một vùng gen phổ biến để phân loại và xác định các loài nấm. Vùng gen này đã được sử dụng để định danh nấm *Colletotrichum* [75].

Định danh nấm *Colletotrichum* sp. bằng sinh học phân tử dựa trên khuếch đại PCR sử dụng cặp mồi ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') và ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') [76] và giải trình tự vùng gen ITS.

DNA tổng số của chủng nấm M1C1 được tách chiết bằng dung dịch CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) theo quy trình của Lee và Taylor (1990) [77]. Phản ứng PCR được thực hiện bằng kit VeriFi™ Polymerase (PCR Biosystems Inc.) với cặp mồi ITS1 và ITS4. Quy trình PCR được tiến hành trên máy PCR Master Cycler Nexus Gradient (Eppendorf) với chu kỳ nhiệt như sau: khởi đầu biến tính ở 95 °C trong 10 phút; tiếp theo là 30 chu trình phản ứng gồm biến tính ở 95 °C trong 15 giây, gắn mồi ở 55 °C trong 15 giây, tổng hợp sợi ở 72 °C trong 30 giây. Phản ứng được kết thúc với 5 phút ở 72 °C, giữ ở 4 °C. Cuối cùng, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1 % trong dung dịch đệm TBE (Tris –Borate-EDTA) trên máy điện di ngang HE-99X và chụp hình bằng máy chụp hình gel UVP Chemstudio PLUS (Analytik Jena).

Đồng thời, sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen) và gửi giải trình tự ở công ty Macrogen, Hàn Quốc. Trình tự nucleotide được so sánh trên phần mềm BioEdit và BLAST của NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### **2.2.2. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn *Bacillus* sp. từ đất vùng rễ xoài có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp.**

##### **2.2.2.1. Thu thập và xác định giá trị pH mẫu đất**

Mẫu đất vùng rễ xoài được thu thập từ các vườn trồng xoài ở các tỉnh Tiền Giang, Đồng Tháp và Vĩnh Long. Mỗi tỉnh thu mẫu ở 5 vườn xoài khác nhau.

Mỗi vườn thu mẫu đất tại 5 vị trí, ở độ sâu 20 cm, trộn đều lại thành 1 mẫu chứa trong túi nhựa vô trùng, ghi thông tin mẫu thu thập và định vị tọa độ lấy mẫu, bảo quản trong thùng mát ở nhiệt độ 4 °C và vận chuyển về phòng thí nghiệm.

Mẫu đất được làm khô ở nhiệt độ phòng từ 1-4 ngày tùy theo độ ẩm và đặc tính của đất. Đất làm khô được nghiền nhỏ, rây để có kích thước hạt < 2 mm và trộn đều. Cân 10 g đất thêm vào 10 mL nước cất vô trùng, khuấy đều bằng đũa thủy tinh. Phương pháp đo pH được thực hiện ở nhiệt độ 20-25 °C, sử dụng máy đo pH Hana HI83141-1. Đọc giá trị pH sau 30-60 giây [78].

#### **2.2.2.2. Sàng lọc nhanh các mẫu đất có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp.**

Xử lý mẫu đất: mẫu đất được làm khô ở nhiệt độ phòng, nghiền nhỏ, rây để có kích thước hạt < 2 mm và trộn đều [78]. Sau đó, cân 10 g mẫu đất thêm vào 90 mL nước cất vô trùng, lắc 200 vòng/phút trong 30 phút, gia nhiệt 80 °C trong 10 phút [79].

Nấm *Colletotrichum* sp. nuôi cấy trên môi trường PDA trong 7 ngày. Dùng khoan thạch cất một khối nấm có kích thước 5 mm đặt lên đĩa petri khác chứa môi trường PDA ở vị trí tâm đĩa. Tiếp theo, dùng khoan thạch kích thước 5 mm đục 3 giếng xung quanh khối nấm cách mép đĩa 3 cm. Hút 10 µL dịch đất đã được xử lý cho vào mỗi giếng. Nuôi cấy đồng thời dịch đất và khối nấm bệnh, tiến hành quan sát sự phát triển của nấm bệnh. Mỗi mẫu đất lặp lại 3 lần. Mẫu đối chứng âm là đĩa môi trường PDA chỉ chứa khối nấm bệnh.

Quan sát và ghi nhận kết quả sau 1, 3, 5, 7 ngày nuôi cấy và lựa chọn các mẫu đất có khả năng ức chế nấm bệnh.

#### **2.2.2.3. Phân lập và quan sát đặc điểm hình thái vi khuẩn *Bacillus* sp.**

Các mẫu đất có khả năng ức chế nấm bệnh được tiến hành phân lập vi khuẩn *Bacillus*. Các bước tiến hành như sau: cân 10 g mẫu đất thêm vào 90 mL nước cất vô trùng, lắc 200 vòng/phút trong 30 phút, gia nhiệt 80 °C trong 10 phút. Pha loãng thập phân đến  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  và  $10^{-5}$ , sau đó cấy trang 0,1 mL dung dịch pha loãng ở mỗi nồng độ trên môi trường Nutrient Agar và ủ ở 37 °C trong 24 giờ [79].

Quan sát đặc điểm hình thái các chủng vi khuẩn phân lập và nhuộm Gram để tiến hành sàng lọc sơ bộ các chủng vi khuẩn phân lập. Các chủng vi khuẩn này được chọn

lọc, cấy chuyên để có được chủng thuần, bảo quản -80°C trong môi trường Luria-Bertani Broth bổ sung 20 % glycerol và tiến hành thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

### **2.2.3. Tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. mạnh nhất**

Khả năng ức chế nấm của vi khuẩn *Bacillus* được thực hiện bằng phương pháp cấy kép theo nghiên cứu của Trần Thùy Trang (2020) có hiệu chỉnh và bổ sung [70]. Nấm *Colletotrichum* sp. được nuôi cấy trên môi trường PDA ở 28 °C trong 7 ngày. Các chủng vi khuẩn được sàng lọc từ nội dung 2 được nuôi cấy trên môi trường Nutrient Agar ở 37°C trong 24 giờ. Dùng khoan thạch cắt một khối nấm có kích thước 5 mm đặt lên đĩa petri chứa môi trường PDA ở vị trí cách mép đĩa 3cm. Đồng thời, cấy 1 đường cấy vi khuẩn *Bacillus* dài 4,5 cm cách khối nấm 3 cm. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần, nuôi cấy ở 28 °C, tiến hành quan sát sự hình thành vùng ức chế sau 3, 7, 11 và 15 ngày. Đo bán kính nấm gây bệnh và thực hiện tính hiệu quả ức chế (HQUC) với công thức:

$$H = \frac{D_{dc} - D}{D_{dc}} \times 100 (\%)$$

Trong đó:

D: bán kính tản nấm gây bệnh trong đĩa thí nghiệm (mm)

D<sub>dc</sub>: bán kính tản nấm gây bệnh trong đĩa đối chứng (mm)

Mức đánh giá hiệu quả ức chế được mô tả theo tỷ lệ sau [80]:

- HQUC > 75 %: Hiệu quả ức chế rất cao
- HQUC = 61 – 75 %: Hiệu quả ức chế cao
- HQUC = 51 – 60 %: Hiệu quả ức chế vừa phải
- HQUC < 50 %: Hiệu quả ức chế thấp
- HQUC = 0 %: Không có hoạt động ức chế

### **2.2.4. Khảo sát đặc tính sinh hóa và định danh vi khuẩn *Bacillus* sp. được tuyển chọn bằng phương pháp sinh học phân tử**

#### **2.2.4.1. Khảo sát các đặc tính sinh hóa**

*Khả năng sinh enzyme chitinase*

Khả năng phân giải chitin được thử nghiệm trên môi trường Nutrient Agar bổ sung 1 % Colloidal Chitin. Chúng vi khuẩn thử nghiệm được nuôi cấy trên môi trường Nutrient Agar ở 37 °C trong 24 giờ. Cấy 1 đường vi khuẩn lên môi trường có bổ sung chitin, sau đó ủ ở 25 °C trong 3 ngày. Vi khuẩn phân giải chitin sẽ xuất hiện vùng phân giải không bắt màu sau khi nhuộm với dung dịch Lugol. Quan sát vùng phân giải trên đĩa [81].

*Khả năng sinh enzyme protease*

Khả năng phân giải protein được thử nghiệm trên môi trường Nutrient Agar bổ sung 3 % Skim Milk [82]. Chúng vi khuẩn thử nghiệm được nuôi cấy trên môi trường Nutrient Agar ở 37 °C trong 24 giờ. Cấy 1 đường vi khuẩn lên môi trường có bổ sung Skim Milk, sau đó ủ ở 25 °C trong 3 ngày. Quan sát vùng phân giải trên đĩa.

*Khả năng sinh enzyme cellulase*

Khả năng phân giải cellulose được thử nghiệm trên môi trường Nutrient Agar bổ sung 1 % CMC [83]. Chúng vi khuẩn thử nghiệm được nuôi cấy trên môi trường Nutrient Agar ở 37 °C trong 24 giờ. Cấy 1 đường vi khuẩn lên môi trường có bổ sung CMC, sau đó ủ ở 25 °C trong 3 ngày. Sau khi ủ, môi trường thạch được ngâm trong dung dịch Congo Red 0,1 % trong 15 phút đến 20 phút, sau đó thêm NaCl 1M trong 15 phút đến 20 phút. Sau khi nhuộm màu, quan sát đĩa thạch để tìm các vùng xung quanh khuẩn lạc. Sự phát triển của vùng phân giải cho thấy khả năng phân giải cellulose của vi khuẩn [84].

*Khả năng hòa tan phosphate*

Khả năng hòa tan phosphate được thử nghiệm trên môi trường thạch Pikovskaya. Chúng vi khuẩn thử nghiệm được nuôi cấy trên môi trường Nutrient Agar ở 37 °C trong 24 giờ. Cấy 1 đường vi khuẩn lên môi trường thạch Pikovskaya. Sau khi ủ ở 28 °C trong 14 ngày, sự xuất hiện vùng phân giải cho thấy khả năng hòa tan phosphate [85].

*Khả năng sinh siderophore*

Khả năng sinh siderophore được thực hiện bằng thử nghiệm trên môi trường thạch CAS-Blue Agar theo mô tả của Schwyn và Neilands (1987) [86]. Chúng vi khuẩn thử nghiệm được nuôi cấy trên môi trường Nutrient Agar ở 37 °C trong 24 giờ. Cấy 1 đường vi khuẩn lên môi trường thạch CAS-Blue Agar. Khả năng sinh siderophore được quan sát sau 5 ngày ủ ở 25 °C. Vùng phân giải màu vàng cam xung quanh khuẩn lạc cho thấy sự sản sinh siderophore của vi khuẩn.

#### 2.2.4.2. Định danh vi khuẩn *Bacillus sp.* bằng sinh học phân tử

Chủng vi khuẩn *Bacillus sp.* có hiệu quả ức chế cao nhất được tiến hành định danh bằng phương pháp sinh học phân tử dựa trên khuếch đại PCR sử dụng cặp mồi 27F và 1492R có trình tự như sau: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') [87].

DNA tổng số của chủng vi khuẩn ĐT5.2 được tách chiết bằng dung dịch CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) theo quy trình của Lee và Taylor (1990) [77]. Phản ứng PCR được thực hiện bằng kit VeriFi™ Polymerase (PCR Biosystems Inc.) với cặp mồi 27F và 1492R. Quy trình PCR được tiến hành trên máy PCR Master Cycler Nexus Gradient (Eppendorf) với chu kỳ nhiệt như sau: khởi đầu biến tính ở 94 °C trong 10 phút; tiếp theo là 30 chu trình phản ứng gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 49 °C trong 30 giây, tổng hợp sợi ở 72 °C trong 45 giây. Phản ứng được kết thúc với 10 phút ở 72 °C, giữ ở 4 °C. Cuối cùng, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1 % trong dung dịch đệm TBE (Tris –Borate-EDTA) trên máy điện di ngang HE-99X và chụp hình bằng máy chụp hình gel UVP Chemstudio PLUS (Analytik Jena).

Đồng thời, sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen) và gửi giải trình tự 16S rRNA ở công ty Macrogen, Hàn Quốc. Trình tự nucleotide được so sánh trên phần mềm BioEdit và BLAST của NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sử dụng phần mềm MEGA 11 để xây dựng cây phát sinh chủng loài.

#### 2.2.5. Phương pháp tính toán và xử lý số liệu

Dữ liệu thô được xử lý bằng Microsoft Excel. Phân tích phương sai (ANOVA) một nhân tố và kiểm định Duncan được thực hiện để so sánh sự khác biệt giữa trung bình các nghiệm thức bằng phần mềm IBM SPSS Statistics 27.

So sánh trình tự sử dụng phần mềm BioEdit và BLAST trong NCBI để kiểm tra mức độ tương đồng của chủng nấm *Colletotrichum* và vi khuẩn *Bacillus* trên cơ sở dữ liệu Genbank. Đồng thời, sử dụng phần mềm MEGA 11 để xây dựng cây phát sinh chủng loài vi khuẩn *Bacillus*.



### Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. KẾT QUẢ PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH NẤM *Colletotrichum* sp. TỪ MẪU LÁ XOÀI NHIỄM BỆNH

##### 3.1.1. Thu mẫu lá xoài

Mẫu lá xoài có triệu chứng bệnh thán thư được thu thập tại 3 vườn xoài Cần Giờ, Thành phố Hồ Chí Minh và 2 vườn xoài tại Trường An, Thành phố Vĩnh Long (Hình 3.1 và Bảng 3.1).



**Hình 3. 1.** Thu thập mẫu lá xoài

**Bảng 3. 1.** Thông tin các mẫu lá xoài thu thập tại các vườn

STT	Mã số vườn	Địa điểm	Tọa độ lấy mẫu
1	CG1	Cần Giờ, TP. Hồ Chí Minh	10.406660, 106.960436
2	CG2	Cần Giờ, TP. Hồ Chí Minh	10.394363, 106.916430
3	CG3	Cần Giờ, TP. Hồ Chí Minh	10.393174, 106.911245
4	VL1	Trường An, Vĩnh Long	10.2672320, 105.9365460
5	VL2	Trường An, Vĩnh Long	10.2672460, 105.9365501

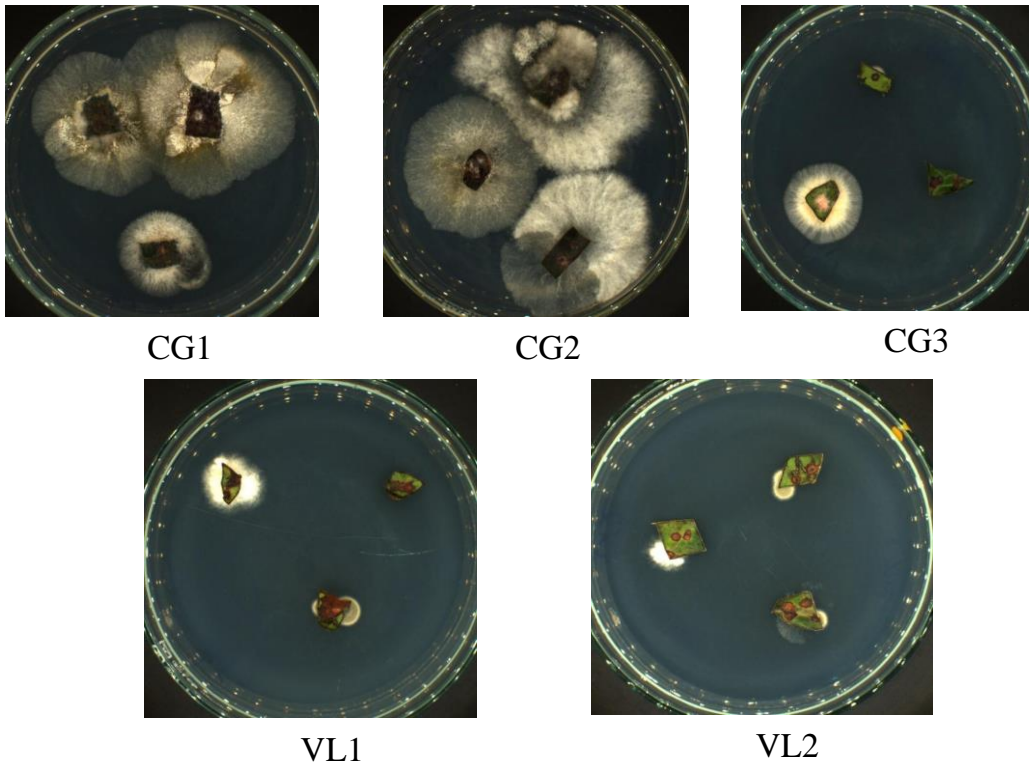
Triệu chứng bệnh thán thư trên lá xoài là các đốm nhỏ, góc cạnh, hình dạng không đều, màu nâu đến đen, có thể lan rộng trên lá (Hình 3.1).



**Hình 3. 2.** Triệu chứng bệnh thán thư trên mẫu lá xoài nhiễm bệnh

### 3.1.2. Phân lập nấm *Colletotrichum* sp. từ mẫu xoài nhiễm bệnh

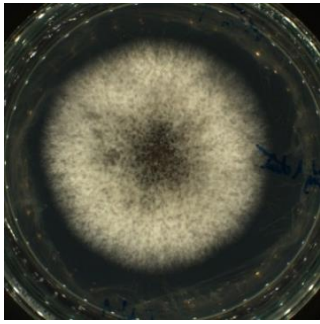
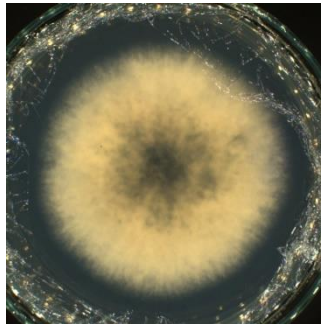
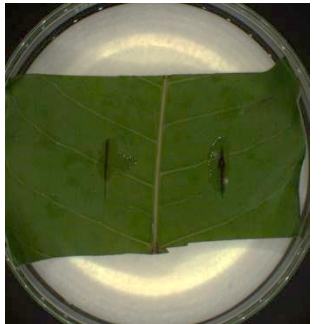
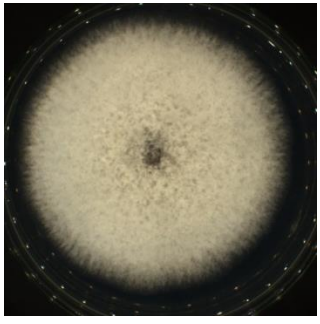
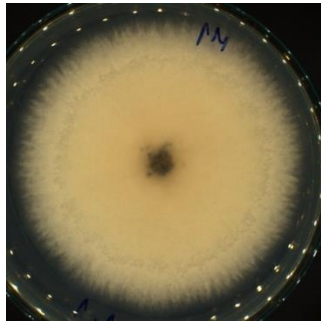
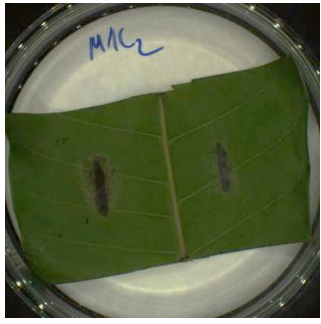
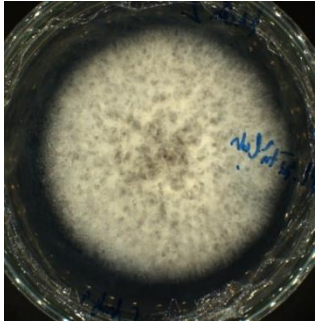
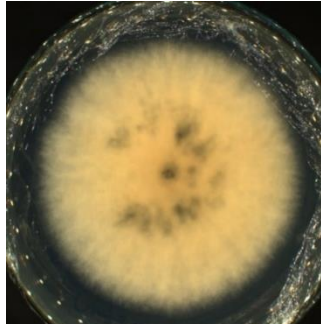

Từ mẫu lá xoài có triệu chứng bệnh thán thư, nghiên cứu đã tiến hành phân lập trên môi trường PDA (Hình 3.3).



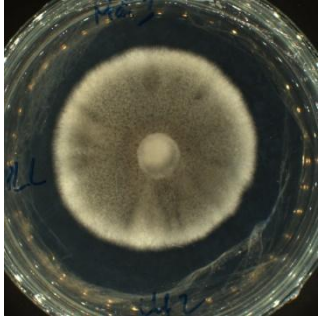
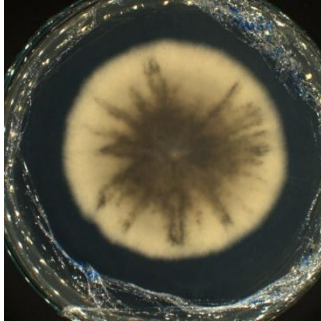
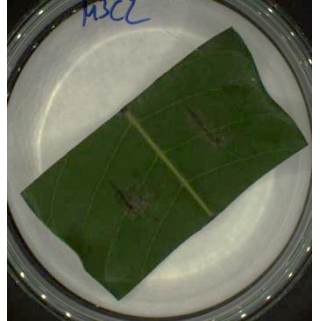
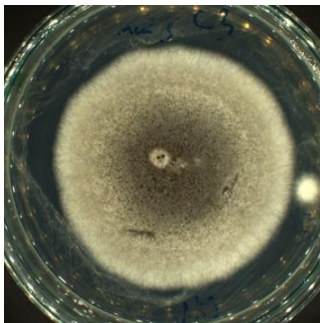
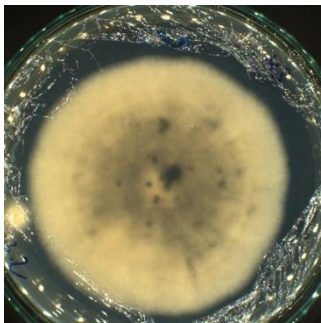
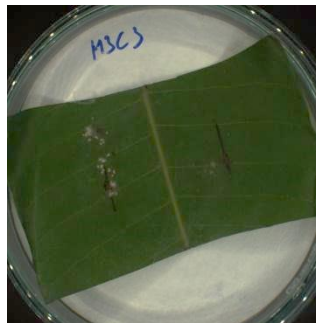
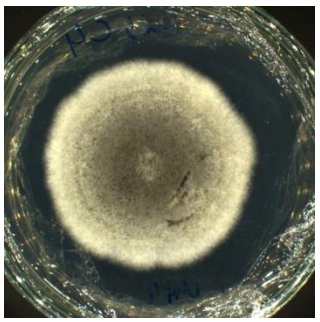
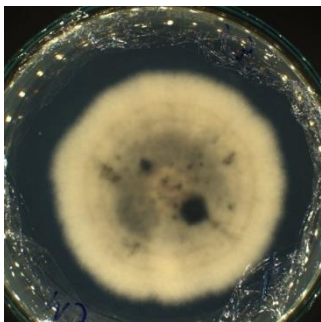
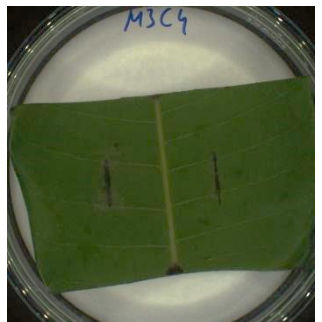
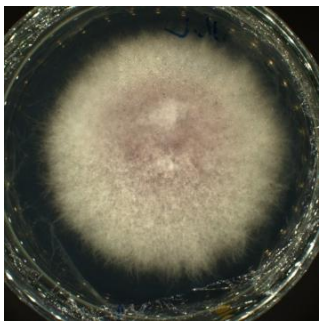
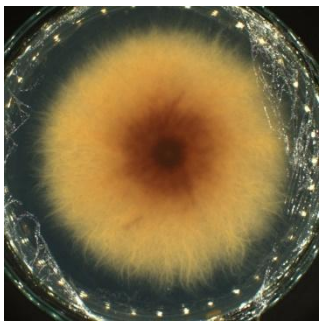
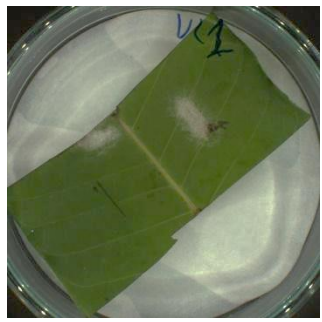
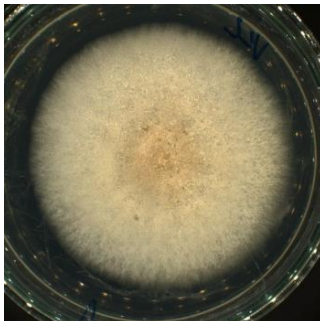
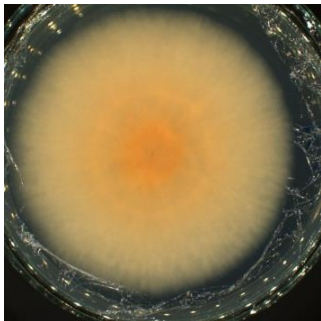
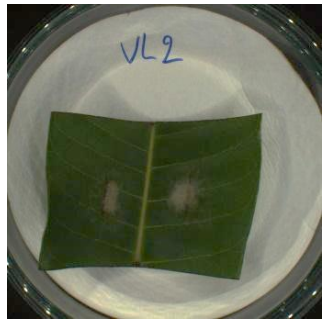
**Hình 3. 3.** Phân lập nấm từ mẫu lá xoài nhiễm bệnh trên môi trường PDA

Kết quả phân lập được 8 chủng nấm thuần trên môi trường PDA, quan sát đặc điểm hình thái sau 7 ngày nuôi cấy cho thấy đường kính tản nấm có kích thước 60-70 mm, tơ nấm mọc lan khắp bề mặt thạch. Sau khi phân lập, 8 chủng nấm được khảo sát khả năng gây bệnh trên lá xoài bằng cách tiến hành lây nhiễm nhân tạo lên lá xoài. Kết quả lây nhiễm nhân tạo cho thấy vết thương trên lá xoài gây nhiễm rộng thêm so với mẫu lá xoài đối chứng, có màu nâu sẫm đến đen. Vì vậy, 8 chủng nấm phân lập được đều có khả năng gây bệnh trên lá xoài (Bảng 3.2). Các chủng nấm này được tiến hành cấy chuyển để tiến hành sàng lọc nhanh bằng phương pháp MALDI-TOF.

**Bảng 3. 2.** Kết quả phân lập và lây nhiễm nhân tạo các chủng nấm phân lập

STT	Chủng	Khuẩn lạc mặt trước	Khuẩn lạc mặt sau	Lây nhiễm nhân tạo
1	M1C1			
2	M1C2			
3	M2C1			



4	M3C2	 A petri dish with a white agar surface. A circular, light-colored fungal colony is growing in the center. The colony has a slightly raised, textured appearance. The petri dish lid is marked with "M3C2" in blue ink.	 A petri dish with a white agar surface. A circular, light-colored fungal colony is growing in the center. The colony has a slightly raised, textured appearance. The petri dish lid is marked with "M3C2" in blue ink.	 A petri dish with a white agar surface. A green leaf is placed on the agar. The leaf shows several small, dark, circular spots, likely fungal lesions. The petri dish lid is marked with "M3C2" in blue ink.
5	M3C3	 A petri dish with a white agar surface. A circular, light-colored fungal colony is growing in the center. The colony has a slightly raised, textured appearance. The petri dish lid is marked with "M3C3" in blue ink.	 A petri dish with a white agar surface. A circular, light-colored fungal colony is growing in the center. The colony has a slightly raised, textured appearance. The petri dish lid is marked with "M3C3" in blue ink.	 A petri dish with a white agar surface. A green leaf is placed on the agar. The leaf shows several small, dark, circular spots, likely fungal lesions. The petri dish lid is marked with "M3C3" in blue ink.
6	M3C4	 A petri dish with a white agar surface. A circular, light-colored fungal colony is growing in the center. The colony has a slightly raised, textured appearance. The petri dish lid is marked with "M3C4" in blue ink.	 A petri dish with a white agar surface. A circular, light-colored fungal colony is growing in the center. The colony has a slightly raised, textured appearance. The petri dish lid is marked with "M3C4" in blue ink.	 A petri dish with a white agar surface. A green leaf is placed on the agar. The leaf shows several small, dark, circular spots, likely fungal lesions. The petri dish lid is marked with "M3C4" in blue ink.
7	VL1	 A petri dish with a white agar surface. A circular, light-colored fungal colony is growing in the center. The colony has a slightly raised, textured appearance. The petri dish lid is marked with "VL1" in blue ink.	 A petri dish with a white agar surface. A circular, light-colored fungal colony is growing in the center. The colony has a slightly raised, textured appearance. The petri dish lid is marked with "VL1" in blue ink.	 A petri dish with a white agar surface. A green leaf is placed on the agar. The leaf shows several small, dark, circular spots, likely fungal lesions. The petri dish lid is marked with "VL1" in blue ink.
8	VL2	 A petri dish with a white agar surface. A circular, light-colored fungal colony is growing in the center. The colony has a slightly raised, textured appearance. The petri dish lid is marked with "VL2" in blue ink.	 A petri dish with a white agar surface. A circular, light-colored fungal colony is growing in the center. The colony has a slightly raised, textured appearance. The petri dish lid is marked with "VL2" in blue ink.	 A petri dish with a white agar surface. A green leaf is placed on the agar. The leaf shows several small, dark, circular spots, likely fungal lesions. The petri dish lid is marked with "VL2" in blue ink.

### 3.1.3. Sàng lọc nhanh các mẫu nấm gây bệnh bằng phương pháp MALDI-TOF

Kết quả định danh bằng phương pháp MALDI-TOF, định danh được 5/8 chủng nấm, kết quả định danh được thể hiện ở Bảng 3.3. Trong đó, có 3 chủng nấm thuộc nhóm *Colletotrichum* spp. và 2 chủng nấm thuộc nhóm *Fusarium* spp. Sàng lọc ban đầu các chủng nấm gây bệnh bằng phương pháp MALDI-TOF, kết quả bước đầu xác định được 3 chủng nấm M1C1, M1C2 và M3C3 thuộc phức hợp loài *Colletotrichum gloesporioides*.

**Bảng 3. 3.** Kết quả định danh các chủng nấm bằng phương pháp MALDI-TOF

STT	Chủng nấm	Tên loài định danh	Score value
1	M1C1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	2,20
2	M1C2	<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	1,87
3	M3C3	<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	1,85
4	VL1	<i>Fusarium oxysporum</i>	2,02
5	VL2	<i>Fusarium equiseti</i>	2,07

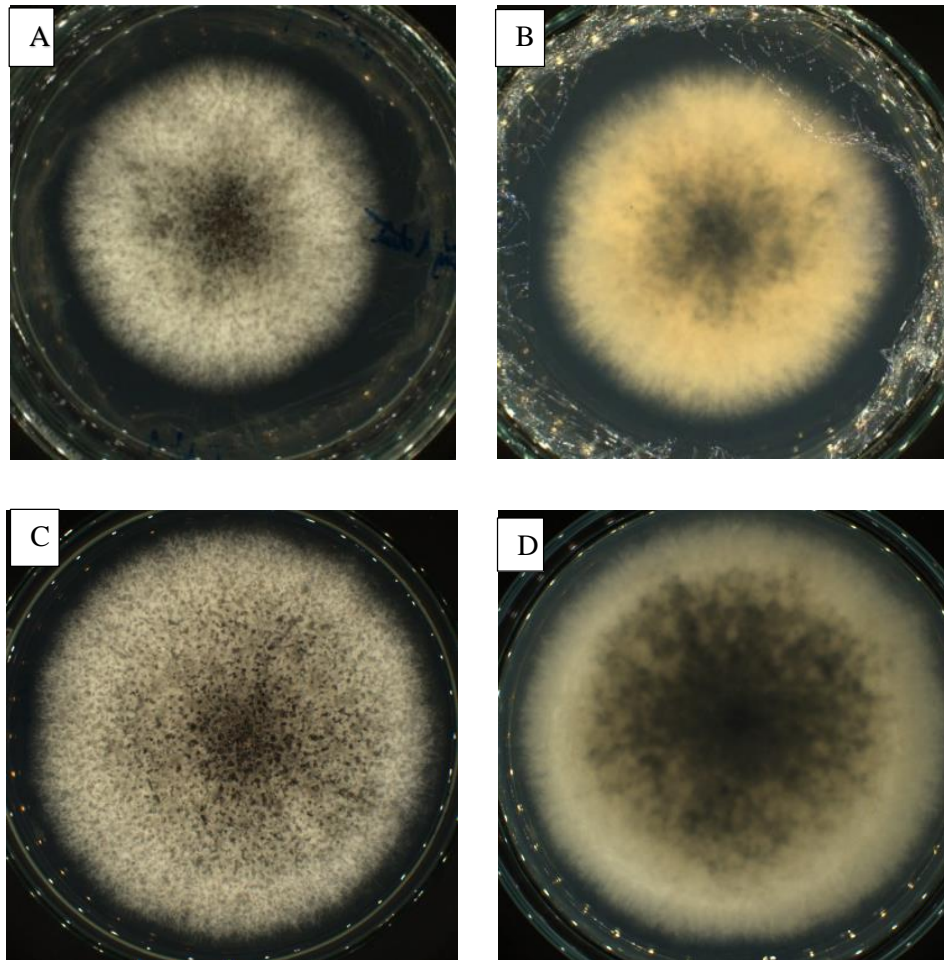
Với mục tiêu của nội dung 1 là phân lập được chủng nấm *Colletotrichum* sp. từ mẫu lá xoài nhiễm bệnh thán thư để tiến hành các nội dung tiếp theo. Qua kết quả định danh MALDI-TOF cho thấy chủng nấm M1C1 được định danh thuộc phức hợp loài *Colletotrichum gloesporioides* với giá trị score value cao nhất là 2,20 (mức độ tin cậy cao) so với 2 chủng nấm M1C2 và M3C3, đồng thời chủng nấm có khả năng gây bệnh trên lá xoài. Do đó, chủng nấm M1C1 được chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

### 3.1.4. Định danh nấm *Colletotrichum* sp. dựa vào đặc điểm hình thái

Quan sát hình thái khuẩn lạc nấm M1C1 trên môi trường PDA cho thấy, mặt trên tản nấm có màu trắng đến xám, phân bố đều trên bề mặt thạch, đường kính 70 mm sau 7 ngày nuôi cấy. Mặt dưới tản nấm có màu trắng, vàng nhạt và xen lẫn đen xám, xuất hiện vòng tròn đồng tâm. Sau 10 ngày nuôi cấy, bề mặt tản nấm xuất hiện bào tử có màu vàng cam, xem lẫn các giọt dầu. Các đặc điểm sợi nấm, bào tử và đĩa áp được quan sát dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 40X. Kết quả chủng nấm có sợi nấm trong suốt, không có cấu trúc sinh sản hữu tính và quả thể, bào tử có dạng hình trụ ngắn, một đầu tròn, một đầu hơi nhọn, không có vách ngăn, bên trong chứa chất nhân màu vàng.

Chủng nấm có hình thành đĩa áp, đĩa áp màu nâu nhạt đến đậm, dạng hình trứng (Hình 3.2 và 3.3).

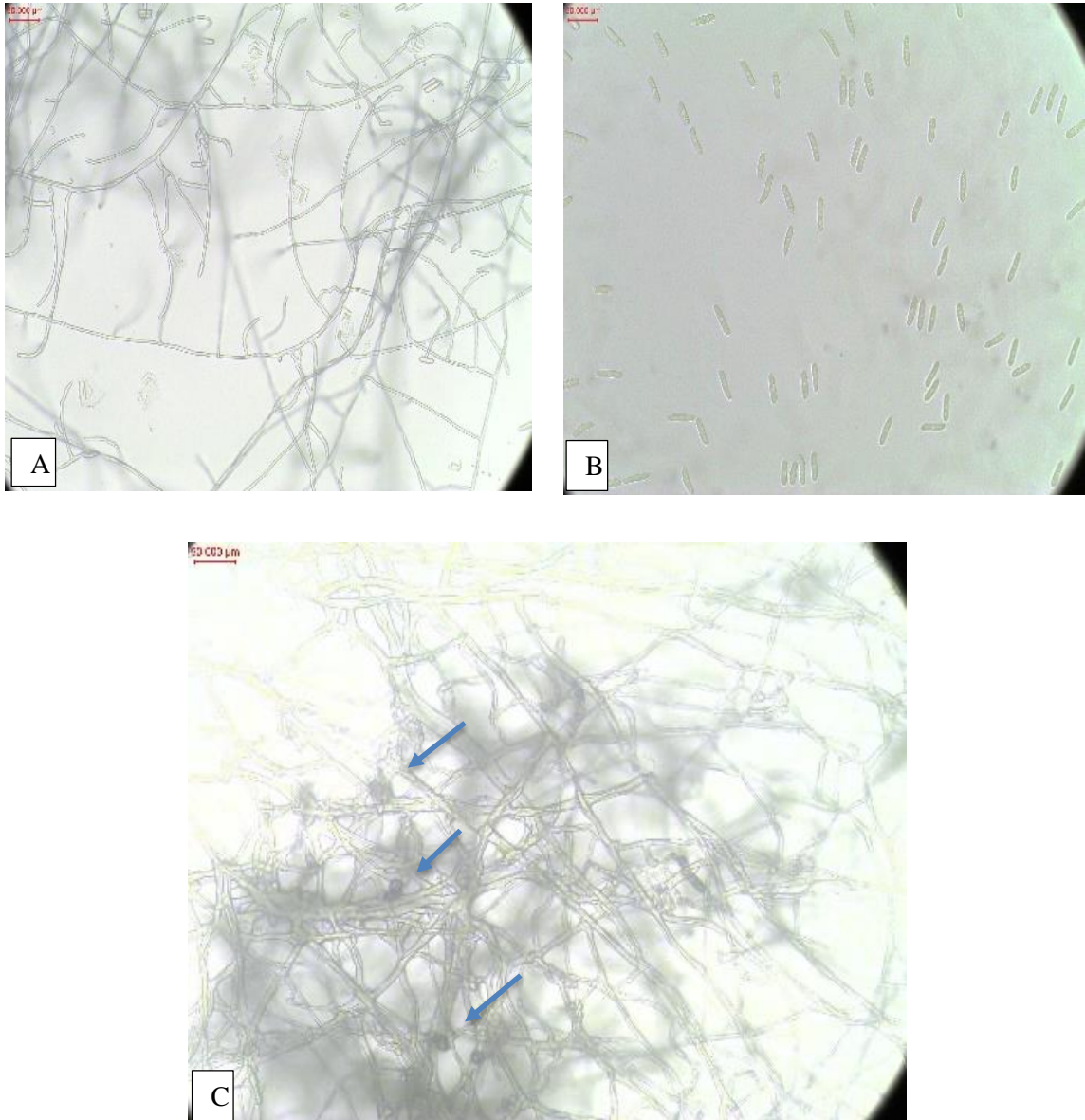
Các đặc điểm hình thái của chủng nấm M1C1 giống với đặc điểm hình thái nấm *Colletotrichum* theo khóa phân loại của Sutton và cộng sự (1980) [73] và mô tả phức hợp loài *Colletotrichum gloesporioides* của Weir và cộng sự (2012) [7]. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu tại Việt Nam về phân loài nấm *Colletotrichum* gây bệnh trên xoài tại Đồng bằng sông Cửu Long của Lê Hoàng Lê Thủy và Phan Văn Kim (2008) [15]. Phức hợp loài *Colletotrichum gloesporioides* bao gồm nhiều phân loài khác nhau, đến nay có tất cả 22 phân loài thuộc phức hợp này. Chính vì vậy, nghiên cứu tiên hành định danh nấm *Colletotrichum* sp. dựa trên giải trình tự vùng gen ITS (Internal Transcribed Spacers) để xác định chính xác tên loài của chủng nấm M1C1.



**Hình 3. 4.** Đặc điểm hình thái chủng nấm M1C1 trên môi trường PDA

(A). Khuẩn lạc mặt trước 7 ngày nuôi cấy; (B). Khuẩn lạc mặt sau 7 ngày nuôi cấy;  
(C). Khuẩn lạc mặt trước 10 ngày nuôi cấy; (D). Khuẩn lạc mặt sau 10 ngày nuôi cấy

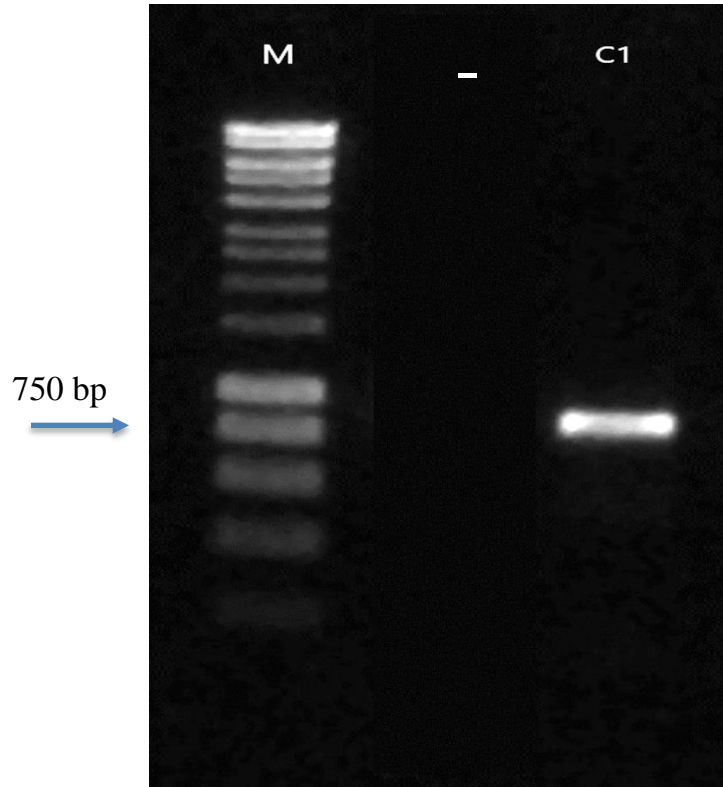




**Hình 3. 5.** Đặc điểm sợi nấm, bào tử và đĩa áp chủng nấm M1C1 dưới kính hiển vi  
(A). Sợi nấm; (B). Bào tử; (C). Đĩa áp

### 3.1.5. Định danh nấm *Colletotrichum* sp. dựa trên giải trình tự vùng gen ITS

Chủng nấm M1C1 được tách chiết DNA tổng số, khuếch đại PCR và giải trình tự vùng gen ITS. Kết quả PCR với cặp mồi ITS1 và ITS4 cho kết quả mẫu nấm M1C1 được khuếch đại thành công với một vạch sáng rõ kích thước khoảng 750 bp, phù hợp với kích thước vùng ITS.



**Hình 3. 6.** Kết quả điện di sản phẩm PCR vùng gen ITS trên gel agarose 1%

*M*: thang chuẩn 1kb; (-): đối chứng âm; *C1*: mẫu nấm M1C1

Kết quả so sánh trình tự vùng gen ITS của chủng nấm M1C1 với các trình tự gen trên ngân hàng dữ liệu NCBI cho thấy chủng nấm M1C1 tương đồng 99,82 % với chủng *Colletotrichum asianum* (Accession number PQ517026) (Hình 3.7).

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100	?			
Description		Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum asianum strain BRIP 28740 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr...	Colletotrichum ...	1050	1050	97%	0.0	99.82%	689	MK298269.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum asianum strain BRIP 28574 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr...	Colletotrichum ...	1050	1050	97%	0.0	99.82%	689	MK298265.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum asianum strain BRIP45776 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr...	Colletotrichum ...	1050	1050	97%	0.0	99.82%	606	MH057292.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum asianum strain BRIP 62535b 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib...	Colletotrichum ...	1050	1050	97%	0.0	99.82%	662	KU498263.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum asianum strain BRIP 45690 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe...	Colletotrichum ...	1050	1050	97%	0.0	99.82%	697	KU498257.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum asianum strain BRIP 28594 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr...	Colletotrichum ...	1042	1042	97%	0.0	99.82%	638	MK298268.1

**Hình 3. 7.** Kết quả so sánh mức độ tương đồng của chủng nấm M1C1 bằng công cụ BLAST trong NCBI



Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu sinh học phân tử về nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên xoài, xác định loài *Colletotrichum asianum* thuộc phức hợp loài *Colletotrichum gloesporioides* là tác nhân gây bệnh thán thư trên xoài của nhiều nước trên thế giới. Loài này đã được báo cáo ở các nước như Brazil, Sri Lanka, Thành phố Tam Á và các khu vực khác của Trung Quốc, Nam Phi, Malaysia, Đài Loan, Mexico, Philippines, Indonesia và Thái Lan [13, 88]. Ở Việt Nam, loài *Colletotrichum asianum* được báo cáo đầu tiên về bệnh thán thư xoài và phân lập được trên lá xoài [57]. Đồng thời, kết quả cũng phù hợp với nghiên cứu của Trần Đức Thắng và cộng sự [17] đã phân lập được loài này trên lá và hoa xoài.

Kết quả nội dung 1, nghiên cứu phân lập và định danh được chủng nấm *Colletotrichum asianum* từ mẫu lá xoài có triệu chứng bệnh thán thư thu thập tại huyện Cần Giờ, Thành phố Hồ Chí Minh.

### 3.2. KẾT QUẢ PHÂN LẬP VÀ SÀNG LỌC VI KHUẨN *Bacillus* sp. TỪ ĐẤT VÙNG RỄ XOÀI CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM *Colletotrichum* sp.

#### 3.2.1. Thu thập mẫu đất vùng rễ xoài

Tổng cộng 15 mẫu đất được thu thập tại các vườn trồng xoài ở các tỉnh Tiền Giang, Đồng Tháp, Vĩnh Long và được ghi nhận tọa độ lấy mẫu. Các mẫu đất được phân tích giá trị pH cho thấy pH nằm trong khoảng 4,2 đến 6,9 (Hình 3.8).



Hình 3. 8. Một số vườn xoài thu thập mẫu đất

Trong quá trình thu mẫu đất, được biết hầu hết các vườn xoài trên không sử dụng chế phẩm vi sinh, ngoại trừ hai vườn xoài có mã số TG4 và TG5 có sử dụng chế phẩm vi sinh với mục đích giải độc paclo trong đất (Bảng 3.4).

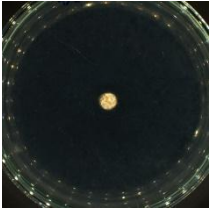
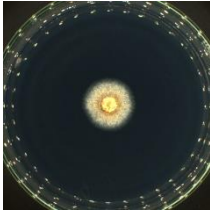
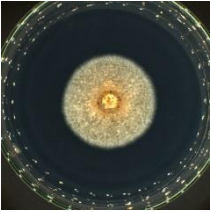
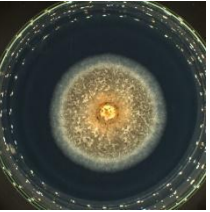
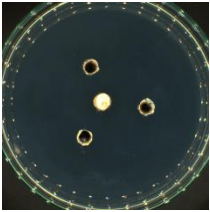
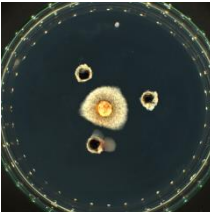
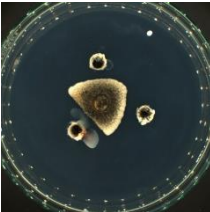

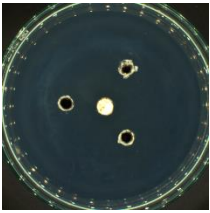
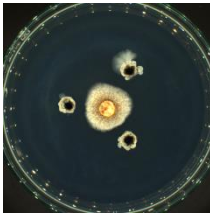


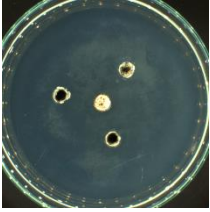


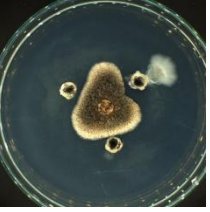
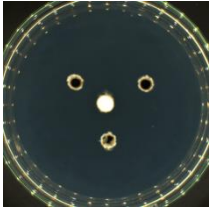
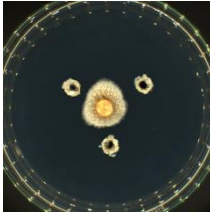

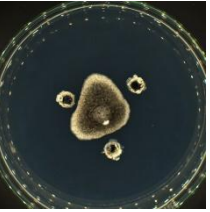
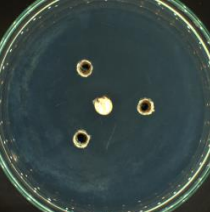
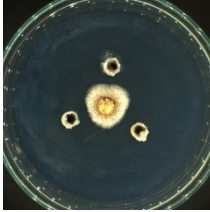
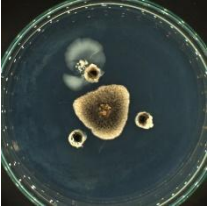
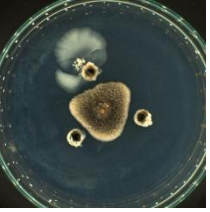
**Bảng 3. 4.** Thông tin mẫu đất vùng rẫy xoài thu thập tại các tỉnh

STT	Mã số vườn	Địa điểm	Tọa độ lấy mẫu	pH đất
1	TG1	Tiền Giang	10.2839317, 105.9101988	5.1
2	TG2	Tiền Giang	10.2847539, 105.9099943	4.9
3	TG3	Tiền Giang	10.2839317, 105.9101988	6.9
4	TG4	Tiền Giang	10.3042367, 105.9402492	4.5
5	TG5	Tiền Giang	10.3034044, 105.9400886	4.8
6	ĐT1	Đồng Tháp	10.2219881, 105.6770185	5.0
7	ĐT2	Đồng Tháp	10.4329298, 105.6546981	4.4
8	ĐT3	Đồng Tháp	10.4347222, 105.6600278	4.5
9	ĐT4	Đồng Tháp	10.2581226, 105.6091449	4.4
10	ĐT5	Đồng Tháp	10.2308188, 105.7259846	3.9
11	VL1	Vĩnh Long	10.1505198, 106.1660492	5.0
12	VL2	Vĩnh Long	10.1487073, 106.1682735	4.6
13	VL3	Vĩnh Long	10.1500350, 106.1686151	4.2
14	VL4	Vĩnh Long	9.9771298, 105.9308765	5.2
15	VL5	Vĩnh Long	9.9730786, 105.9335212	4.6

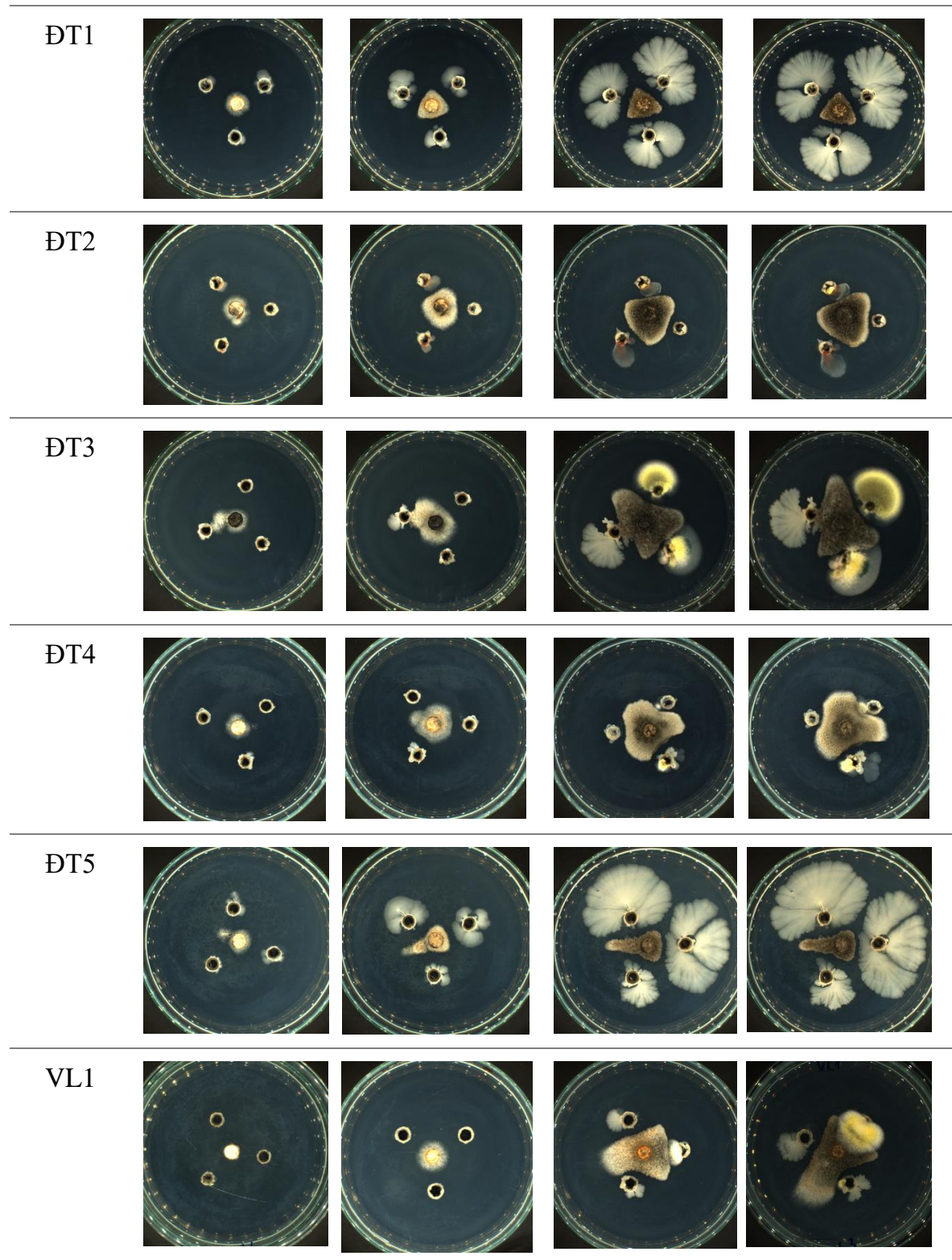
### 3.2.2. Sàng lọc nhanh mẫu đất có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp.

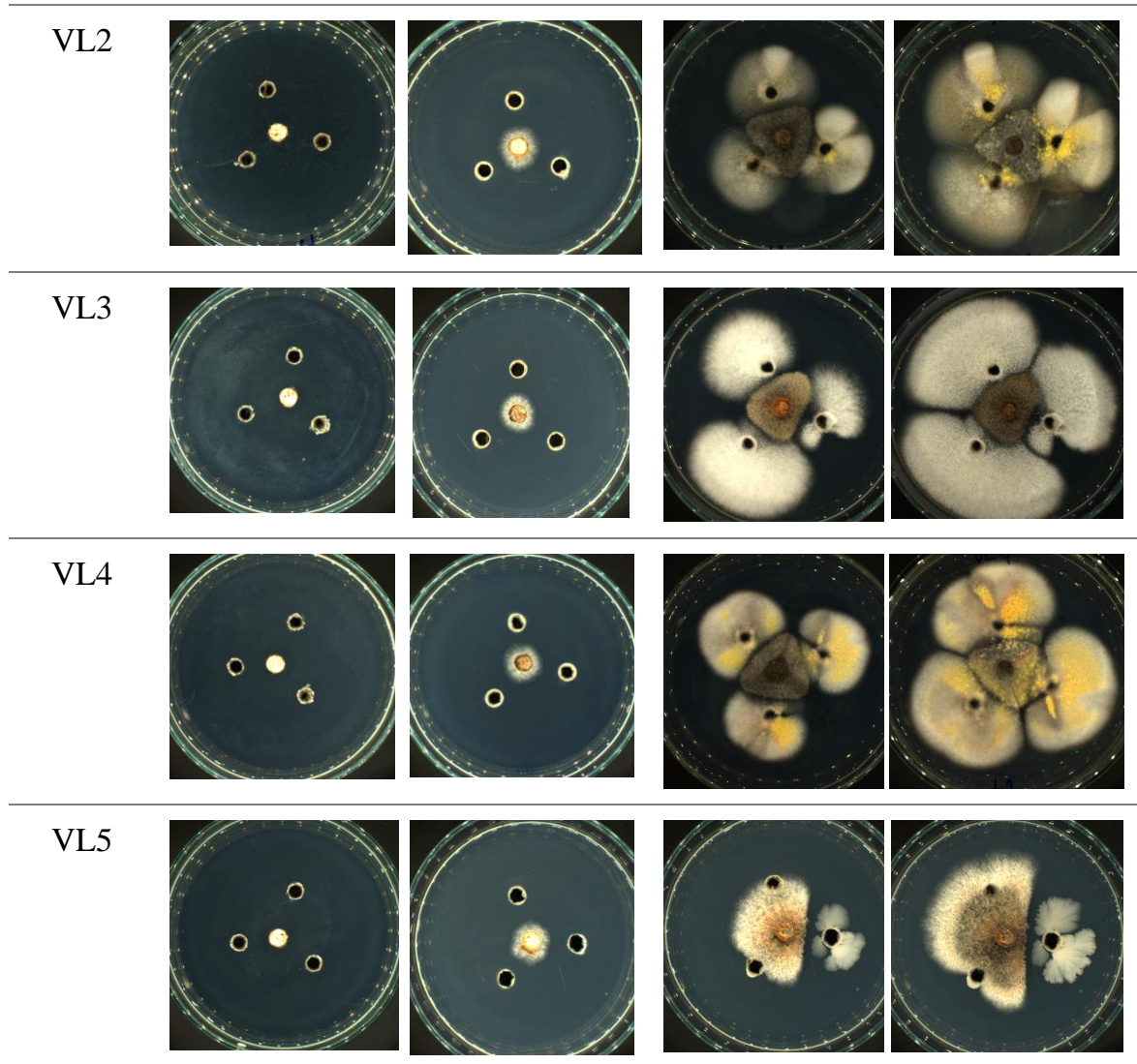
Kết quả sàng lọc mẫu đất cho thấy, tất cả 15/15 dịch mẫu đất thu thập được đều có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Colletotrichum*. Sau 1 ngày đồng nuôi cấy dịch đất và nấm *Colletotrichum*, khuẩn lạc nấm vẫn phát triển bình thường, chưa bị biến dạng so với mẫu nấm đối chứng. Sau 3 ngày đồng nuôi cấy, khả năng ức chế nấm của các chủng vi sinh vật trong dịch đất bắt đầu thể hiện rõ, khuẩn lạc nấm bắt đầu bị biến dạng so với mẫu nấm đối chứng. Sau 5 ngày và 7 ngày nuôi cấy, khuẩn lạc nấm *Colletotrichum* sp. bị biến dạng rõ rệt ở tất cả các nghiệm thức thí nghiệm (Bảng 3.5). Do đó, 15 mẫu đất được tiến hành phân lập vi khuẩn *Bacillus* để khảo sát khả năng ức chế đối với nấm *Colletotrichum* sp.

**Bảng 3. 5.** Kết quả đồng nuôi cây dịch đất và nấm *Colletotrichum* sp.

Tên mẫu	Ngày 1	Ngày 3	Ngày 5	Ngày 7
Đôi chứng				
TG1				
TG2				
TG3				
TG4				
TG5				







### 3.2.3. Phân lập và quan sát đặc điểm hình thái vi khuẩn *Bacillus* sp.

Từ 15 mẫu đất vùng rễ xoài thu thập tại các tỉnh Tiền Giang, Đồng Tháp và Vĩnh Long, nghiên cứu đã phân lập được 77 chủng vi khuẩn trên môi trường Nutrient Agar. Dựa vào đặc điểm hình thái và kết quả nhuộm Gram, sàng lọc sơ bộ được 46/77 chủng vi khuẩn. Trong đó có 15 chủng từ các mẫu đất ở Tiền Giang, 17 chủng từ Đồng Tháp và 14 chủng ở Vĩnh Long.

Quan sát đặc điểm hình thái 46 chủng vi khuẩn sàng lọc, về hình dạng khuẩn lạc đa số các chủng có hình dạng không đều (78,3 %) và tròn (21,3 %). Về màu sắc khuẩn lạc, chủ yếu các chủng có màu trắng đục (87%) và trắng vàng (13 %). Rìa khuẩn lạc đa số răng cưa (80,4 %) và tròn (19,6 %). Độ nổi khuẩn lạc gồm có phẳng (34,8 %), lồi (52,2 %) và phân thùy (13 %). Kết quả nhuộm Gram, các khuẩn lạc đều có hình que, bất

màu Gram dương (Bảng 3.6). Tất cả 46 chủng vi khuẩn sàng lọc được chọn để tiến hành khảo sát khả năng ức chế với nấm *Colletotrichum* sp.

**Bảng 3. 6.** Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn phân lập từ đất vùng rễ xoài

Chủng	Gram	Hình thái	Đặc điểm khuẩn lạc				Kích thước
			Hình dạng	Màu sắc	Rìa	Độ nổi	
TG1.1	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phân thù	3,5-4
TG1.2	+	Que	Tròn	Trắng đục	Răng cưa	Lồi	2-2,5
TG2.1	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phẳng	3,5-4
TG2.2	+	Que	Tròn	Trắng vàng	Răng cưa	Phẳng	2-2,5
TG2.3	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Lồi	2-2,5
TG2.4	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phẳng	3,5-4
TG3.1	+	Que	Không đều	Trắng vàng	Răng cưa	Phân thù	3,5-4
TG3.2	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Lồi	2-3
TG3.3	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phẳng	3-3,5
TG4.1	+	Que	Tròn	Trắng đục	Tròn	Lồi	2,5-3
TG4.2	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phẳng	3.5-4
TG5.1	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phân thù	2,5-3
TG5.2	+	Que	Tròn	Trắng đục	Tròn	Lồi	2-3
TG5.3	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Lồi	2-3
TG5.4	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Lồi	2-3,5
ĐT1.1	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Lồi	1,5-2,5
ĐT1.2	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phẳng	1-2
ĐT1.3	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phẳng	3-3,5
ĐT1.4	+	Que	Không đều	Trắng đục	Tròn	Lồi	2-2,5
ĐT2.1	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phẳng	3-3,5
ĐT2.2	+	Que	Không đều	Trắng vàng	Răng cưa	Phân thù	2-2,5
ĐT3.1	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Lồi	3,5-4
ĐT3.2	+	Que	Không đều	Trắng vàng	Răng cưa	Lồi	2-2,5
ĐT3.3	+	Que	Tròn	Trắng đục	Răng cưa	Lồi	1,5-2
ĐT4.1	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phẳng	3,5-4
ĐT4.2	+	Que	Không đều	Trắng đục	Tròn	Lồi	2-2,5

ĐT5.1	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phẳng	3,5-4
ĐT5.2	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Lồi	1-2
ĐT5.3	+	Que	Tròn	Trắng đục	Tròn	Lồi	1,5-2
ĐT5.4	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phân thùy	2,5-3
ĐT5.5	+	Que	Tròn	Trắng đục	Tròn	Lồi	2,5-3
ĐT5.6	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Lồi	2-2,5
VL1.1	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phẳng	3,5-4
VL1.2	+	Que	Tròn	Trắng đục	Tròn	Lồi	1-2
VL1.3	+	Que	Tròn	Trắng đục	Tròn	Phẳng	2,5-3
VL1.4	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Lồi	1,5-2
VL2.1	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phẳng	2,5-3
VL2.2	+	Que	Không đều	Trắng vàng	Răng cưa	Lồi	1-2
VL3.1	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phẳng	3,5-4
VL4.1	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phẳng	1-2
VL4.2	+	Que	Tròn	Trắng vàng	Răng cưa	Lồi	1,5-2
VL4.3	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phẳng	2,5-3
VL5.1	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Lồi	1-1,5
VL5.2	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Lồi	1-1,5
VL5.3	+	Que	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phân thùy	2-2,5
VL5.4	+	Que	Không đều	Trắng đục	Tròn	Lồi	2-2,5

Ghi chú: có: +; không có: -; Gram dương: +; Gram âm: -

Kết quả nội dung 2, tất cả 15 mẫu đất vùng rễ xoài thu thập được đều có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. Phân lập và sàng lọc sơ bộ được 46/77 chủng vi khuẩn có khả năng là *Bacillus* spp.

### 3.3. KẾT QUẢ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN *Bacillus* sp. CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM *Colletotrichum* sp. MẠNH NHẤT

Khảo sát khả năng ức chế của 46 chủng vi khuẩn sàng lọc được từ nội dung 2 đối với nấm *Colletotrichum* sp. Kết quả cho thấy 39/46 chủng vi khuẩn (84,8 %) có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* và 7/46 chủng vi khuẩn (15,2 %) không có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum*. Phần lớn hiệu quả ức chế tăng dần theo thời gian khảo sát, mức độ đối kháng là khác nhau và có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các chủng vi khuẩn (Bảng 3.7).

**Bảng 3. 7.** Hiệu quả ức chế của các chủng vi khuẩn nghi ngờ *Bacillus* với nấm *Colletotrichum* sp.

Chủng	Hiệu quả ức chế (%)			
	3 ngày	7 ngày	11 ngày	15 ngày
ĐT 1.1	4,76 <sup>kl</sup>	58,33 <sup>gh</sup>	70,12 <sup>e</sup>	71,11 <sup>f</sup>
ĐT 1.2	4,76 <sup>kl</sup>	11,67 <sup>r</sup>	5,17 <sup>op</sup>	5,56 <sup>qrs</sup>
ĐT 1.3	7,14 <sup>hijk</sup>	49,17 <sup>i</sup>	45,40 <sup>hi</sup>	45,00 <sup>j</sup>
ĐT 1.4	9,52 <sup>ghij</sup>	64,17 <sup>cde</sup>	74,71 <sup>bc</sup>	75,00 <sup>cde</sup>
ĐT 2.1	4,76 <sup>kl</sup>	22,50 <sup>p</sup>	18,96 <sup>n</sup>	6,66 <sup>q</sup>
ĐT 2.2	2,38 <sup>kl</sup>	50,83 <sup>i</sup>	56,32 <sup>f</sup>	50,56 <sup>h</sup>
ĐT 3.3	7,14 <sup>hijk</sup>	65,83 <sup>bc</sup>	76,44 <sup>b</sup>	76,67 <sup>bc</sup>
ĐT 4.1	7,14 <sup>hijk</sup>	35,83 <sup>k</sup>	43,10 <sup>ij</sup>	16,11 <sup>p</sup>
ĐT 4.2	9,52 <sup>ghij</sup>	61,67 <sup>defg</sup>	71,84 <sup>de</sup>	72,78 <sup>ef</sup>
ĐT 5.1	4,76 <sup>kl</sup>	30,83 <sup>l</sup>	47,13 <sup>gh</sup>	22,78 <sup>no</sup>
ĐT 5.2	23,81 <sup>cd</sup>	72,50 <sup>a</sup>	81,03 <sup>a</sup>	81,67 <sup>a</sup>
ĐT 5.3	4,76 <sup>kl</sup>	60,00 <sup>fgh</sup>	72,41 <sup>cde</sup>	73,33 <sup>de</sup>
ĐT 5.4	4,76 <sup>kl</sup>	63,33 <sup>cdef</sup>	71,84 <sup>de</sup>	72,78 <sup>ef</sup>
ĐT 5.5	7,14 <sup>hijk</sup>	61,67 <sup>defg</sup>	73,56 <sup>cd</sup>	73,89 <sup>de</sup>
ĐT 5.6	14,29 <sup>fg</sup>	60,83 <sup>efgh</sup>	71,84 <sup>de</sup>	72,78 <sup>ef</sup>
TG 1.1	33,33 <sup>a</sup>	65,83 <sup>bc</sup>	71,7 <sup>de</sup>	74,14 <sup>de</sup>
TG 1.2	12,96 <sup>fgh</sup>	30,00 <sup>l</sup>	9,43 <sup>o</sup>	4,02 <sup>stu</sup>
TG 2.1	24,07 <sup>cd</sup>	61,67 <sup>defg</sup>	71,07 <sup>de</sup>	73,56 <sup>de</sup>
TG 2.2	0,00 <sup>l</sup>	25,00 <sup>nop</sup>	0,63 <sup>q</sup>	2,3 <sup>u</sup>
TG 2.3	0,00 <sup>l</sup>	29,17 <sup>lm</sup>	11,32 <sup>n</sup>	6,32 <sup>qr</sup>
TG 2.4	7,41 <sup>hijk</sup>	45,00 <sup>j</sup>	40,25 <sup>k</sup>	34,48 <sup>k</sup>
TG 3.1	11,11 <sup>ghi</sup>	50,83 <sup>i</sup>	55,97 <sup>f</sup>	55,75 <sup>g</sup>
TG 3.2	0,00 <sup>l</sup>	28,33 <sup>lmn</sup>	6,29 <sup>o</sup>	7,47 <sup>q</sup>
TG 3.3	3,71 <sup>kl</sup>	30,83 <sup>l</sup>	6,92 <sup>o</sup>	3,45 <sup>tu</sup>
TG 4.1	1,85 <sup>kl</sup>	25,83 <sup>mnp</sup>	0,63 <sup>q</sup>	4,6 <sup>rst</sup>
TG 4.2	0,00 <sup>l</sup>	38,33 <sup>k</sup>	38,99 <sup>kl</sup>	21,26 <sup>o</sup>
TG 5.1	29,63 <sup>ab</sup>	65,00 <sup>bcd</sup>	71,7 <sup>de</sup>	74,14 <sup>de</sup>
TG 5.2	12,96 <sup>fgh</sup>	25,00 <sup>nop</sup>	3,77 <sup>p</sup>	2,3 <sup>u</sup>
TG 5.3	11,11 <sup>ghi</sup>	35,83 <sup>k</sup>	49,06 <sup>g</sup>	47,13 <sup>i</sup>



TG 5.4	27,78 <sup>bc</sup>	62,5 <sup>cdef</sup>	71,07 <sup>de</sup>	73,56 <sup>de</sup>
VL1.1	2,22 <sup>kl</sup>	28,57 <sup>lm</sup>	37,66 <sup>l</sup>	32,20 <sup>l</sup>
VL1.3	6,67 <sup>ijk</sup>	30,48 <sup>l</sup>	41,36 <sup>jk</sup>	35,03 <sup>k</sup>
VL1.4	17,78 <sup>ef</sup>	58,09 <sup>h</sup>	72,84 <sup>cde</sup>	75,14 <sup>cd</sup>
VL2.1	6,67 <sup>ijk</sup>	24,76 <sup>op</sup>	44,44 <sup>i</sup>	25,99 <sup>m</sup>
VL2.2	8,89 <sup>ghij</sup>	42,86 <sup>j</sup>	55,55 <sup>f</sup>	57,06 <sup>g</sup>
VL4.3	13,33 <sup>fg</sup>	27,62 <sup>lmno</sup>	40,12 <sup>kl</sup>	23,73 <sup>n</sup>
VL5.1	4,45 <sup>ijkl</sup>	15,24 <sup>q</sup>	34,57 <sup>m</sup>	15,82 <sup>p</sup>
VL5.3	26,67 <sup>bc</sup>	67,62 <sup>b</sup>	77,16 <sup>b</sup>	77,97 <sup>b</sup>
VL5.4	20,00 <sup>de</sup>	58,09 <sup>h</sup>	72,84 <sup>cde</sup>	74,58 <sup>de</sup>
Trung bình	10,24	44,66	47,83	44,07
SD	9,15	17,46	26,20	29,18
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có chữ cái theo sau giống nhau thì không có sự khác biệt về mặt thống kê theo kiểm định Duncan ( $P < 0.05$ )

Kết quả sau 3 ngày khảo sát, hiệu quả ức chế nấm dao động từ 0 - 33,33 %. Trong đó, các chủng có hiệu quả ức chế cao nhất là TG1.1 và TG5.1 lần lượt là 33,33 % và 29,63 %.

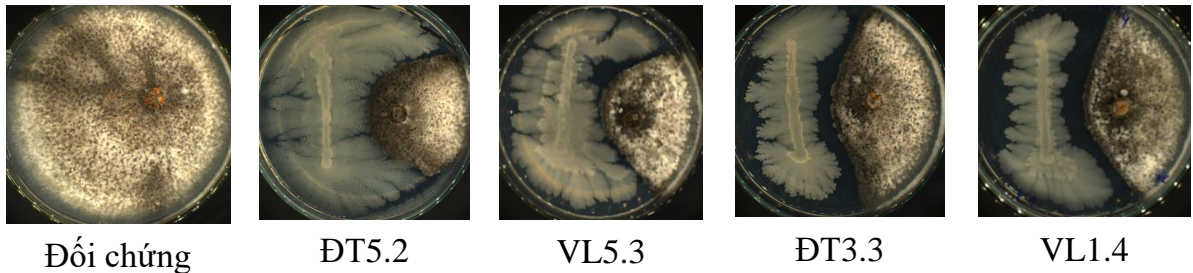
Kết quả sau 7 ngày khảo sát, khuẩn lạc nấm bắt đầu biến dạng, hiệu quả ức chế nấm tăng mạnh dao động từ 11,67 - 72,50 %. Trong đó, các chủng có hiệu quả ức chế cao nhất là ĐT5.2 và VL5.3 lần lượt là 72,50 % và 67,62 %.

Kết quả sau 11 ngày khảo sát, hiệu quả ức chế nấm của các chủng vi khuẩn tăng chậm và dao động từ 0,63 - 81,03 %. Trong đó, các chủng có hiệu quả ức chế cao nhất là ĐT5.2 và VL5.3 lần lượt là 81,03 % và 77,16 %. Một số chủng vi khuẩn hiệu quả ức chế bắt đầu giảm xuống và khuẩn ty nấm phát triển mạnh hơn, điều này có thể giải thích là do sự cạnh tranh dinh dưỡng và không gian giữa nấm và vi khuẩn, dẫn đến nấm phát triển mạnh hơn và khả năng ức chế nấm của vi khuẩn suy yếu dần.

Kết quả sau 15 ngày khảo sát, khuẩn lạc nấm biến dạng rõ rệt so với nghiệm thức đối chứng, hiệu quả ức chế đạt từ 2,3 – 81,67 %. Trong đó, chủng vi khuẩn ĐT5.2 có hiệu quả ức chế cao nhất là 81,67 %.

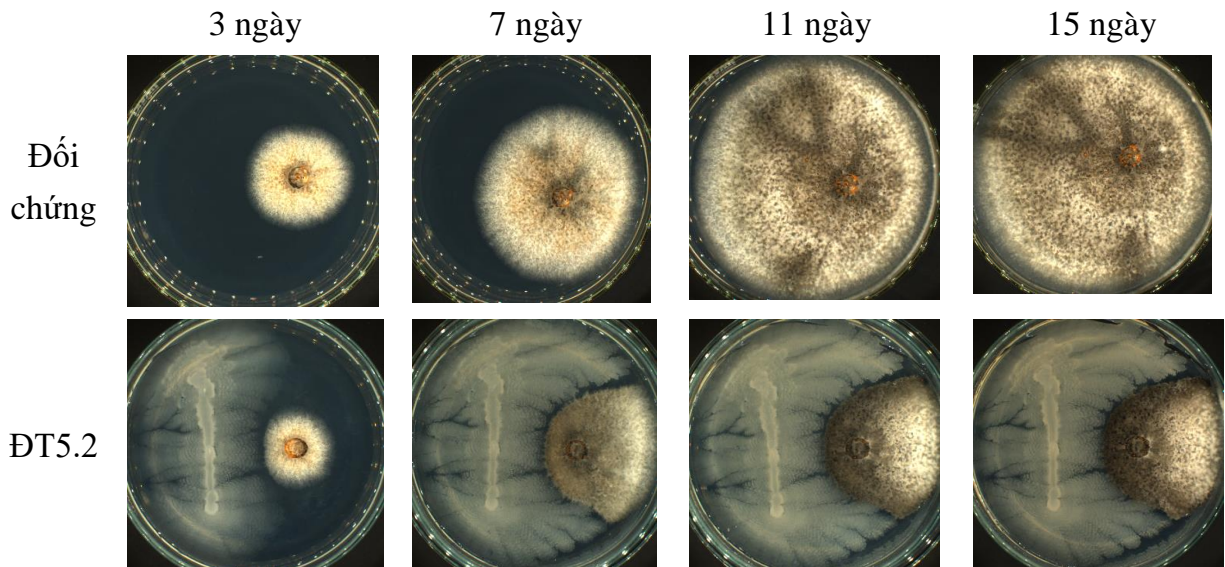
Đánh giá hiệu quả ức chế theo mô tả phân loại của Soyong [80], kết quả có 4 chủng nấm có hiệu quả ức chế rất cao (8,7 %), 12 chủng nấm có hiệu quả ức chế cao

(26,1%), 3 chủng nấm có hiệu quả ức chế trung bình (6,5 %), 20 chủng nấm có hiệu quả ức chế thấp (43,5 %) và 7 chủng nấm không có khả năng ức chế (15,2 %). Các chủng có hiệu quả ức chế rất cao là ĐT5.2, VL5.3, ĐT3.3 và VL1.4 lần lượt là 81,67 %, 77,97 %, 76,67 % và 75,14 % (kết quả sau 15 ngày khảo sát). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Rungjindamai và cộng sự (2016) [63], nhóm nghiên cứu đã phân lập được hai chủng *Bacillus* sp. MB61 và *Bacillus* sp. LB72 từ lá xoài có khả năng ức chế hơn 60 % sự phát triển sợi nấm *C. gloeosporioides* (Hình 3.9).



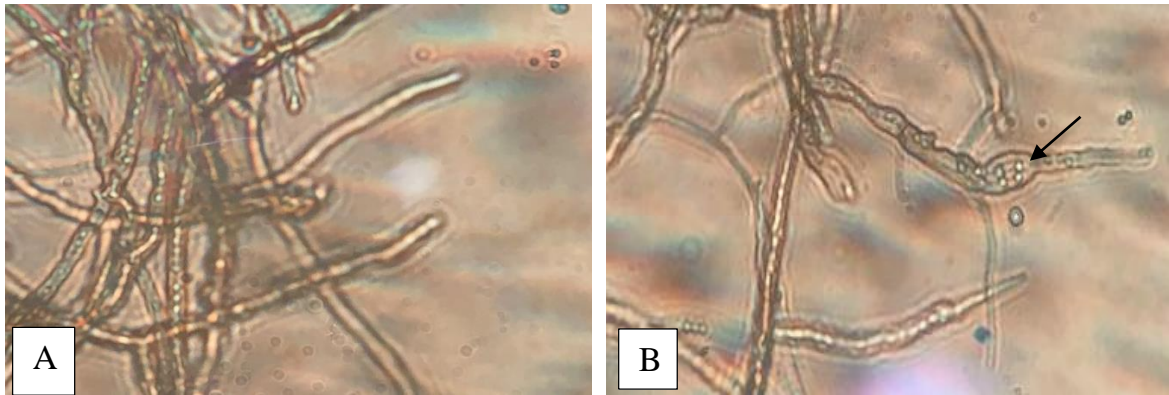
**Hình 3. 9.** Khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. của các chủng vi khuẩn có hiệu quả ức chế cao sau 15 ngày khảo sát

Kết quả chạy phân hạng sau 15 ngày khảo sát hiệu quả ức chế nấm *Colletotrichum* sp., cho thấy chủng vi khuẩn ĐT 5.2 có hiệu quả ức chế cao nhất 81,67% với mức phân hạng cao nhất. Chủng vi khuẩn ĐT5.2 có hiệu quả ức chế nấm *Colletotrichum* sp. tăng dần qua các mốc thời gian khảo sát. Đồng thời, sau 3 ngày khảo sát nhận thấy khuẩn ty nấm không phát triển thêm, dẫn đến bán kính tản nấm không thay đổi sau 7, 11, 15 ngày khảo sát (Hình 3.10).



**Hình 3. 10.** Khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. của chủng vi khuẩn ĐT5.2 sau 3, 7, 11, 15 ngày khảo sát

Quan sát dưới kính hiển vi hình thái sợi nấm *Colletotrichum* sp. từ đĩa đối kháng, cho thấy sự xuất hiện cấu trúc sợi nấm bất thường, sợi nấm bị sưng phồng khi đồng nuôi cấy với chủng vi khuẩn ĐT5.2 (Hình 3.8). Điều này chứng tỏ rằng, chủng vi khuẩn ĐT5.2 ức chế sự phát triển của nấm *Colletotrichum* sp.

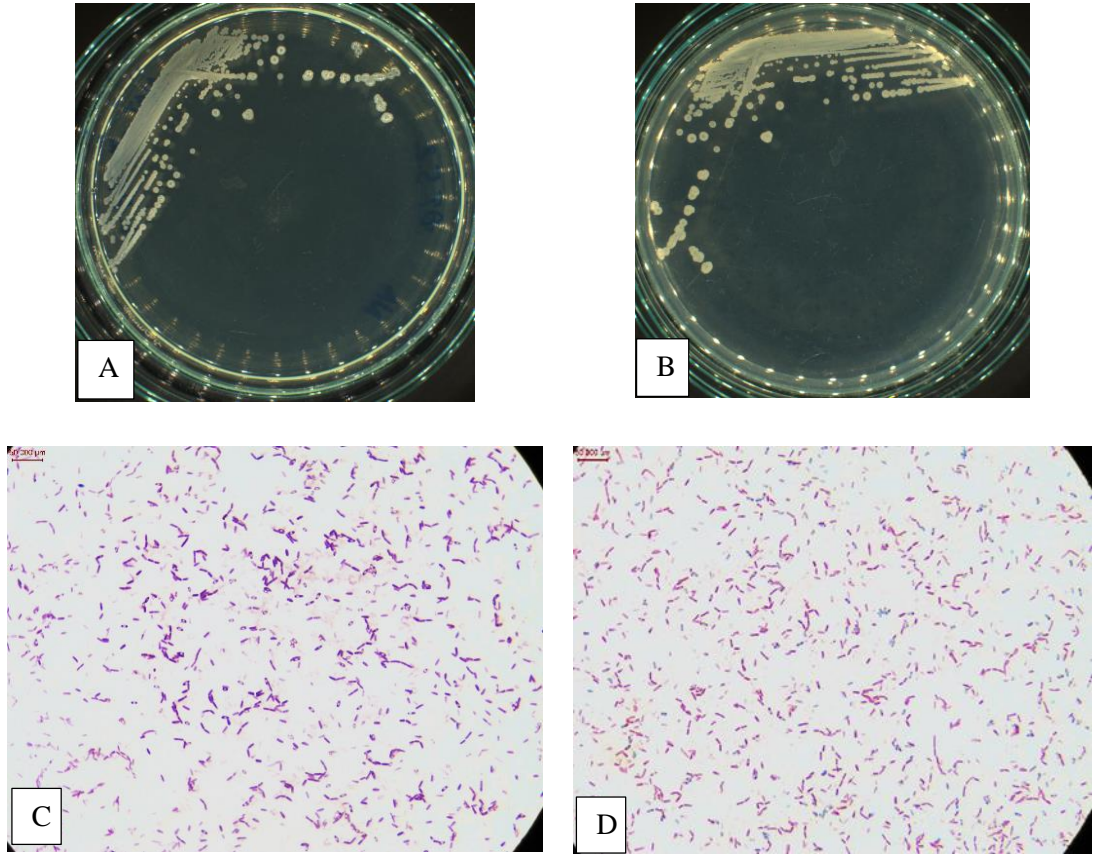


**Hình 3. 11.** Sợi nấm *Colletotrichum* sp. khi đồng nuôi cấy với chủng vi khuẩn ĐT5.2  
A: Sợi nấm *Colletotrichum* sp. đối chứng; B: Sợi nấm *Colletotrichum* sp. khi đồng nuôi cấy với chủng vi khuẩn ĐT5.2

Từ những kết quả thu được, chủng vi khuẩn ĐT5.2 được tuyển chọn có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. mạnh nhất là 81,67 %. Kết quả phù hợp với nghiên cứu của Trần Thùy Trang và cộng sự (2020) [70] đã xác định chủng vi khuẩn BHCM8.3 có khả năng đối kháng nấm *Colletotrichum* sp. cao nhất là 81,58 %. Hiệu quả ức chế của chủng vi khuẩn ĐT5.2 tương đồng với kết quả khảo sát khả năng ức chế của nhóm vi khuẩn *Bacillus* spp. đối với sự phát triển nấm *Colletotrichum asianum* của Jiang và cộng sự (2023) hơn 78 % [66].

Chủng vi khuẩn ĐT5.2 hình que, gram dương, sinh nội bào tử, khuẩn lạc nhỏ, màu trắng đục, không đều, rìa răng cưa, lồi. Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. này phân lập từ đất vùng rẫy xoài thu thập tại huyện Châu Thành, tỉnh Đồng Tháp (tọa độ 10.2308188, 105.7259846) có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. mạnh nhất. Đặc điểm hình thái và tế bào chủng vi khuẩn ĐT5.2 được thể hiện ở Hình 3.12.





**Hình 3. 12.** Đặc điểm hình thái và tế bào chủng vi khuẩn DT5.2

A: Khuẩn lạc mặt trước; B: Khuẩn lạc mặt sau; C: Nhuộm Gram; D: Nhuộm bào tử

Kết quả nội dung 3 cho thấy 39 chủng vi khuẩn phân lập có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. và tuyển chọn được chủng vi khuẩn DT 5.2 có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. mạnh nhất (81,67%).

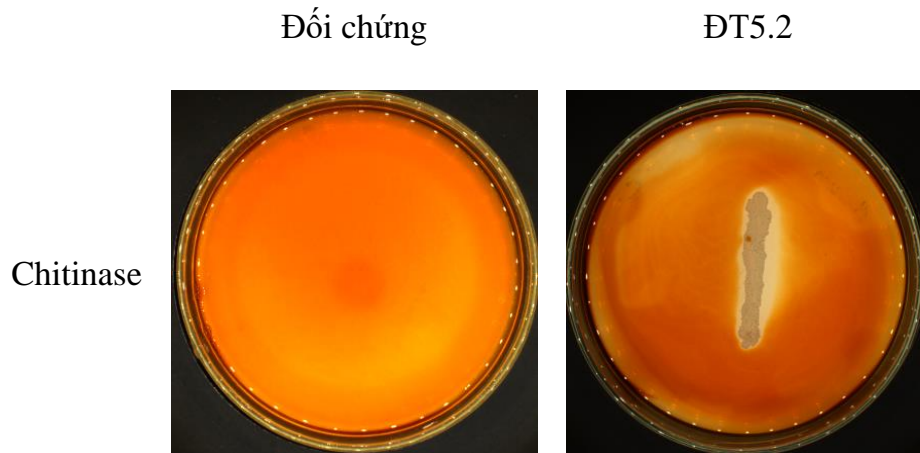
Theo các nghiên cứu trước đây, khả năng ức chế nấm bệnh của vi khuẩn *Bacillus* là do khả năng tạo ra các hợp chất có hoạt tính sinh học khác nhau bao gồm chất kháng khuẩn hoặc peptide chống nấm [35], enzyme phân giải [41] và các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi [40]. Nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học do *Bacillus* spp. tạo ra đã được báo cáo về khả năng ức chế đối với nấm *Colletotrichum*. Nghiên cứu của Ruangwong và cộng sự (2012) đã phân lập và xác định các chất chuyển hóa tiềm năng do *Bacillus subtilis* có tác dụng ức chế mạnh mẽ sự phát triển và nảy mầm của bào tử *C. gloeosporioides* [62]. Chính vì vậy, nghiên cứu tiến hành khảo sát các đặc tính sinh hóa của chủng vi khuẩn DT5.2 như khả năng sinh enzyme chitinase, protease, cellulase, khả năng sinh siderophore và hòa tan phosphate. Đồng thời, định danh sinh học phân tử để xác định tên loài của chủng vi khuẩn này.

### 3.4. KẾT QUẢ KHẢO SÁT ĐẶC TÍNH SINH HÓA VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN *Bacillus* sp. ĐƯỢC TUYỂN CHỌN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ

#### 3.4.1. Khảo sát đặc tính sinh hóa

##### 3.4.1.1. Khả năng sinh enzyme chitinase

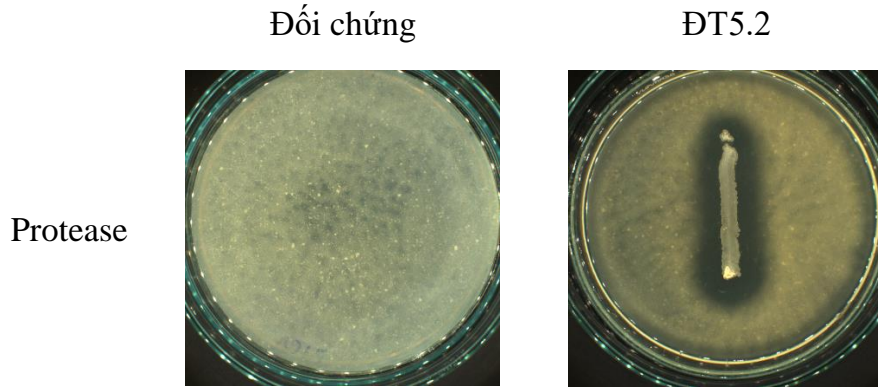
Chitin là một trong những thành phần quan trọng của thành tế bào nấm. Chitinase là enzyme xúc tác cho việc thủy phân liên kết  $\beta$ -1,4-glycosid trong chitin. Vi khuẩn đối kháng sinh tổng hợp enzyme chitinase giúp phân giải thành tế bào nấm và ức chế sự phát triển của nhiều loại nấm gây bệnh thực vật. Khả năng sinh enzyme chitinase được thử nghiệm trên môi trường thạch bổ sung 1% Colloidal chitin. Kết quả xuất hiện vùng phân giải rõ rệt xung quanh vạch cấy, cho thấy chủng vi khuẩn ĐT5.2 có khả năng sinh enzyme chitinase (Hình 3.13).



**Hình 3.13.** Khả năng sinh enzyme chitinase của chủng vi khuẩn ĐT5.2

##### 3.4.1.2. Khả năng sinh enzyme protease

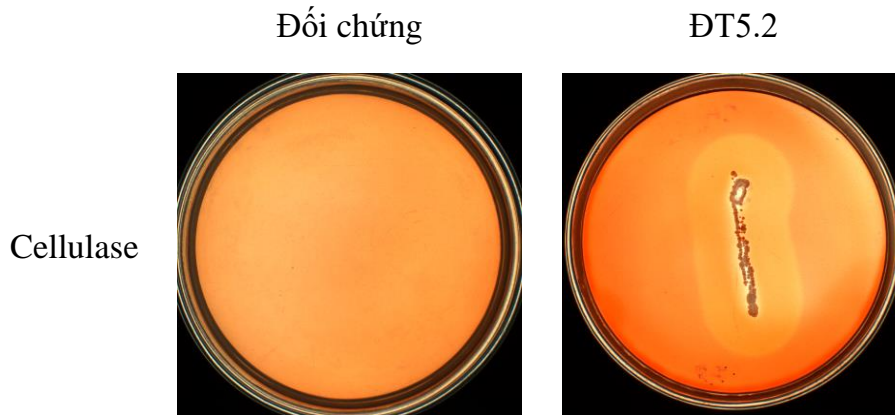
Enzyme protease đóng vai trò quan trọng trong quá trình ly giải tế bào. Vi khuẩn đối kháng sinh tổng hợp enzyme protease có khả năng phân hủy thành tế bào nấm, góp phần ức chế sự phát triển của nấm gây bệnh. Khả năng sinh enzyme cellulase được thử nghiệm trên môi trường thạch bổ sung 3% Skim Milk. Kết quả xuất hiện vùng phân giải rộng làm trong môi trường xung quanh vạch cấy, chứng tỏ chủng vi khuẩn ĐT5.2 có khả năng sinh enzyme protease khá mạnh (Hình 3.14).



**Hình 3. 14.** Khả năng sinh enzyme protease của chủng vi khuẩn ĐT5.2

#### 3.4.1.3. *Khả năng sinh enzyme cellulase*

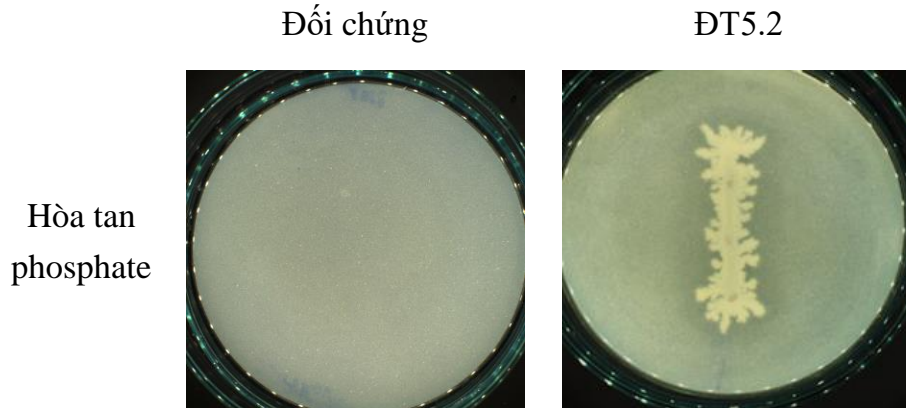
Cellulose là thành phần chính của thành tế bào nấm, vi khuẩn đối kháng sinh tổng hợp enzyme cellulase có khả năng phân hủy thành tế bào nấm và góp phần ức chế sự phát triển của nấm gây bệnh. Khả năng sinh enzyme cellulase được thử nghiệm trên môi trường thạch bổ sung 1% CMC. Kết quả xuất hiện vùng phân giải rộng xung quanh vạch cấy, điều này cho thấy chủng vi khuẩn ĐT5.2 có khả năng sinh enzyme cellulase khá mạnh (Hình 3.15).



**Hình 3. 15.** Khả năng sinh enzyme cellulase của chủng vi khuẩn ĐT5.2

#### 3.4.1.4. *Khả năng hòa tan phosphate*

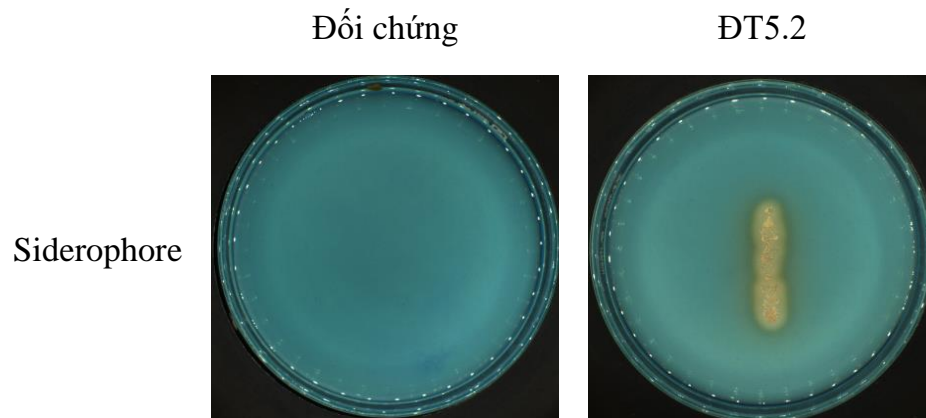
Vi khuẩn đối kháng có khả năng hòa tan phosphate giúp cây trồng tăng khả năng hấp thụ phospho, góp phần thúc đẩy tăng trưởng thực vật và giúp cây chống chịu với nấm bệnh tốt hơn. Khả năng hòa tan phosphate được thử nghiệm trên môi trường thạch Pikovskaya. Kết quả xuất hiện vùng phân giải xung quanh vạch cấy, tuy nhiên vùng phân giải không rõ cho thấy chủng vi khuẩn ĐT5.2 có khả năng hòa tan phosphate yếu (Hình 3.16).



**Hình 3. 16.** Khả năng hòa tan phosphate của chủng vi khuẩn ĐT5.2

#### 3.4.1.5. Khả năng sinh siderophore

Siderophore là các hợp chất có ái lực cao với ion sắt, với trọng lượng phân tử thấp được sản xuất bởi một số vi sinh vật và thực vật, đặc biệt là trong điều kiện thiếu sắt. Khả năng sinh siderophore được thực hiện bằng thử nghiệm trên môi trường thạch CAS-Blue Agar. Kết quả xuất hiện vùng phân giải màu vàng cam xung quanh vạch cấy, cho thấy chủng vi khuẩn ĐT5.2 có khả năng sinh siderophore (Hình 3.17).



**Hình 3. 17.** Khả năng sinh siderophore của chủng vi khuẩn ĐT5.2

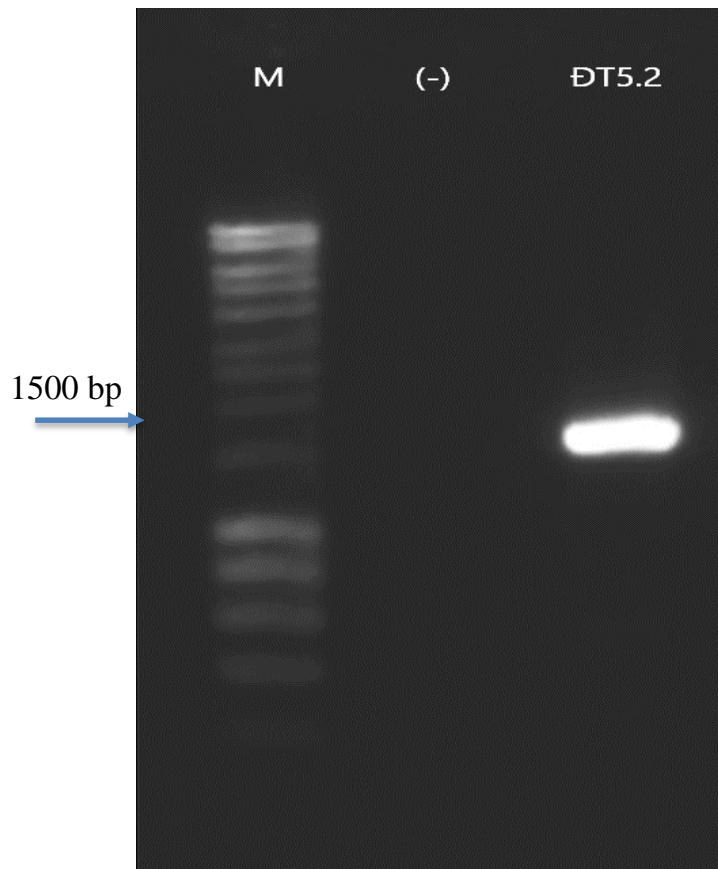
Qua kết quả khảo sát các đặc tính sinh hóa, chủng vi khuẩn ĐT5.2 có khả năng đối kháng mạnh nhất với nấm *Colletotrichum* sp. có tất cả 5/5 đặc tính sinh hóa khảo sát là khả năng sinh enzyme chitinase, protease, cellulase, siderophore và khả năng hòa tan phosphate. Điều này cho thấy, chủng vi khuẩn ĐT5.2 có khả năng ức chế sự phát triển nấm *Colletotrichum* sp. do có sự kết hợp của các đặc tính là khả năng sinh tổng hợp các enzyme ngoại bào (chitinase, protease, cellulase), khả năng sinh siderophore và hòa tan phosphate.



### 3.4.2. Định danh vi khuẩn *Bacillus* sp. bằng sinh học phân tử

Vùng gen 16S rRNA là vùng gen mã hóa các RNA ribosome, là vùng gen bảo tồn ở tất cả các loài. Trình tự nucleotide được ứng dụng trong nghiên cứu di truyền và xây dựng cây phát sinh chủng loài của các dòng vi khuẩn.

Chủng vi khuẩn ĐT5.2 được tách chiết DNA tổng số, khuếch đại PCR và giải trình tự vùng gen 16S rRNA. Kết quả PCR với cặp mồi 27F và 1429R cho kết quả chủng vi khuẩn được khuếch đại thành công với 1 vạch sáng rõ kích thước khoảng 1500 bp, phù hợp với kích thước vùng 16S rRNA (Hình 3.18).



**Hình 3. 18.** Kết quả điện di sản phẩm PCR vùng gen 16S rRNA trên gel agarose 1%

*M*: thang chuẩn 1kb; (-): đối chứng âm; ĐT5.2: mẫu vi khuẩn ĐT5.2

Kết quả so sánh trình tự vùng gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn ĐT5.2 với các trình tự trên dữ liệu NCBI cho thấy, chủng vi khuẩn ĐT5.2 có mức độ tương đồng 98,68% với các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* (OM017193.1, OQ165182.1, OQ423149.1), *Bacillus* sp. (ON221921.1, KC121041.1) (Hình 3.19).



Sequences producing significant alignments Download ▾ Select columns ▾ Show 100 ▾ ?

select all 11 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

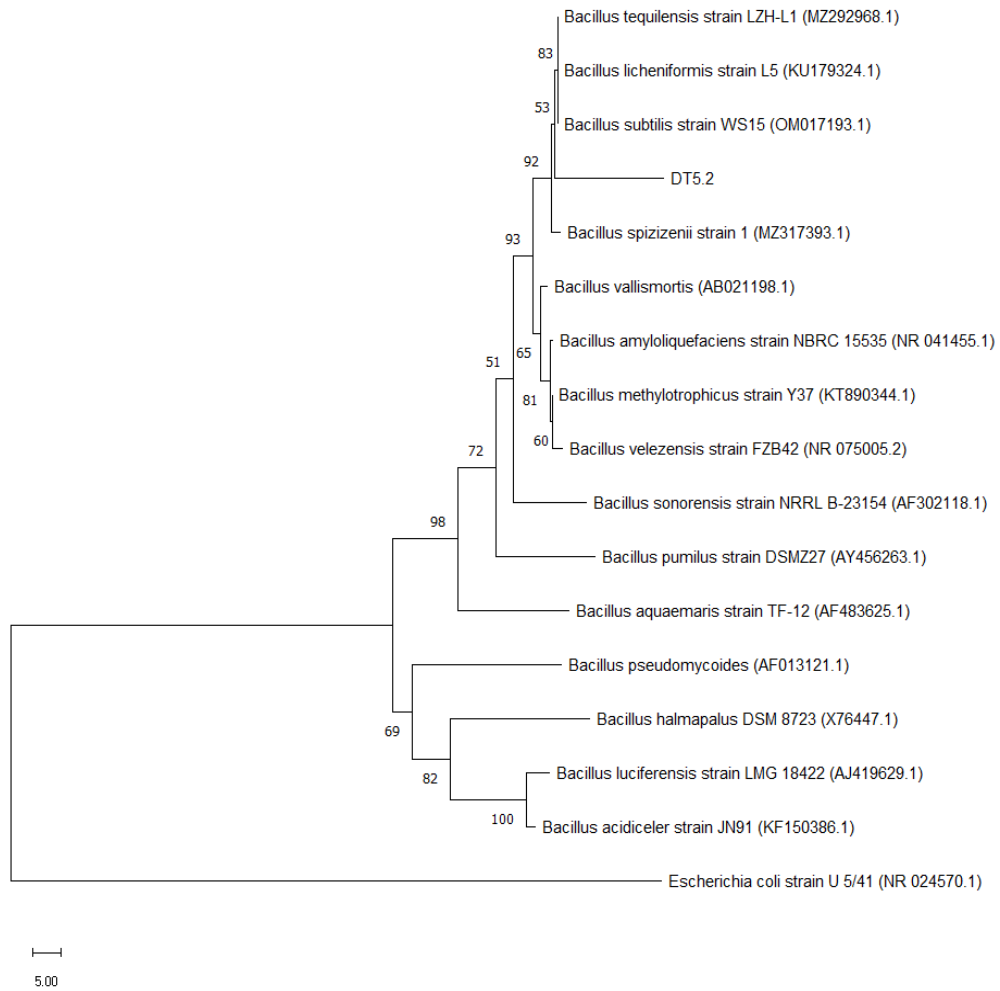
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis strain WS15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus subtilis</a>	1605	1605	97%	0.0	98.68%	1430	<a href="#">OM017193.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus sp. (in: Bacteria) strain C10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus sp. (in: firmicutes)</a>	1604	1604	97%	0.0	98.68%	1445	<a href="#">QN221921.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis strain D32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus subtilis</a>	1604	1604	97%	0.0	98.68%	1451	<a href="#">OQ165182.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus sp. JN15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus sp. JN15</a>	1604	1604	97%	0.0	98.68%	1446	<a href="#">KC121041.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis strain Bs14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus subtilis</a>	1602	1602	97%	0.0	98.68%	1490	<a href="#">OQ423149.1</a>

**Hình 3. 19.** Kết quả so sánh mức độ tương đồng của chủng vi khuẩn ĐT5.2 bằng công cụ BLAST trong NCBI

Theo các kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy vi khuẩn *Bacillus subtilis* có khả năng ức chế chế nấm *Colletotrichum gloeosporioides* [62, 89, 90]. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Trần Thùy Trang và cộng sự (2020) [70]. Như vậy, kết luận chủng vi khuẩn ĐT5.2 xác định là *Bacillus subtilis* với mức độ tương đồng 98,68 %, được cấp mã Accession number PQ517027.

Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phương pháp Neighbor joining để phân tích chủng ĐT5.2 với 16 chủng tham chiếu và chỉ số bootstrap 1000 lần lặp lại (Hình 3.20). Dựa vào kết quả cây phát sinh loài của chủng vi khuẩn ĐT5.2 với các nhóm vi khuẩn có quan hệ họ hàng gần dựa vào trình tự 16S rRNA, có thể chia thành nhóm nội với 2 nhánh chính và nhóm ngoại là *Escherichia coli*.

Trong nhóm nội, nhánh 1 có tỉ lệ bootstrap khá cao là 98 %, các nhánh nhỏ có tỉ lệ bootstrap >50 % (dao động 51-92 %). Nhánh 2 có tỉ lệ bootstrap 69 % các nhánh nhỏ phân nhánh rõ ràng hơn. Chủng ĐT5.2 thuộc nhánh 1 được xếp cùng 1 nhánh với nhóm gồm 3 loài *B. tequilensis*, *B. licheniformis* và *B. subtilis* với chỉ số bootstrap 53 %, nghĩa là khi so sánh và xếp nhóm thì chủng ĐT5.2 xếp cùng 1 nhóm 53 lần với 3 chủng vi khuẩn này. Điều này chứng tỏ chủng vi khuẩn ĐT5.2 có quan hệ gần gũi với *B. tequilensis*, *B. licheniformis* và *B. subtilis*.



**Hình 3. 20.** Cây phát sinh chủng loại dựa vào trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn ĐT5.2

Kết quả nội dung 4, chủng vi khuẩn ĐT5.2 có khả năng sinh tổng hợp các enzyme ngoại bào như chitinase, protease, cellulase, khả năng sinh siderophore và khả năng hòa tan phosphate. Định danh dựa trên kết quả giải trình tự 16S rRNA, xác định chủng vi khuẩn ĐT5.2 là *Bacillus subtilis* (PQ517027) với mức độ tương đồng 98,68 %.

## Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 4.1. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập và định danh được chủng nấm *Colletotrichum asianum* (PQ517026) từ mẫu lá xoài có triệu chứng bệnh thán thư thu thập tại huyện Cần Giò, Thành phố Hồ Chí Minh.

Từ 15 mẫu đất vùng rẫy xoài thu thập tại các tỉnh Tiền Giang, Đồng Tháp và Vĩnh Long, nghiên cứu đã phân lập và sàng lọc sơ bộ được 46 chủng vi khuẩn có khả năng là *Bacillus* spp.. Trong đó, 39 chủng vi khuẩn có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum asianum* gây bệnh thán thư trên xoài.

Tuyển chọn được chủng vi khuẩn ĐT5.2 có hiệu quả ức chế nấm *Colletotrichum asianum* cao nhất là 81,67 %. Chủng vi khuẩn ĐT5.2 được định danh là *Bacillus subtilis* với mức độ tương đồng 98,68 %, có khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase, protease, cellulase, khả năng sinh siderophore và hòa tan phosphate.

Như vậy, nghiên cứu đã phân lập và tuyển chọn được chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* (PQ517027) từ phân lập từ đất vùng rẫy xoài thu thập tại vườn xoài huyện Châu Thành, tỉnh Đồng Tháp (tọa độ 10.2308188, 105.7259846) có khả năng ức chế mạnh đối với nấm *Colletotrichum asianum* phân lập được trên lá xoài nhiễm bệnh thán thư. Chủng vi khuẩn này góp phần tạo bộ chủng giống *Bacillus* có tiềm năng tạo chế phẩm sinh học phục vụ cho việc quản lý phòng kháng bệnh thán thư cho cây xoài.

### 4.2. KIẾN NGHỊ

Khảo sát khả năng ức chế của vi khuẩn *Bacillus* tuyển chọn đối với nấm *Colletotrichum* sp. ở điều kiện *in vivo* và vườn ươm.

Khảo sát các điều kiện nuôi cấy tối ưu chủng vi khuẩn *Bacillus* tuyển chọn ở điều kiện phòng thí nghiệm.

Nghiên cứu khả năng ức chế của các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập từ đất vùng rẫy xoài đối với các chủng nấm gây bệnh trên xoài còn lại đã phân lập được, góp phần tạo bộ chủng giống *Bacillus* có tiềm năng tạo chế phẩm sinh học phục vụ cho việc quản lý phòng trừ nấm gây bệnh trên xoài.

## DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cục trồng trọt, 2019, *Thống kê của Cục trồng trọt năm 2019*.
2. Patil R., Deshmukh R., Bhaskar K., Jahagirdar S., 2018, Growth and export performance of mango in India, *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*, 6, pp. 2667-267.
3. Nelson S.C., Mango anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), *Plant Disease*, 2008. PD(48): p. 9.
4. Arauz L.F., 2000, Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management, *Plant Disease*, 84(6), pp. 600-611.
5. Chowdappa P., Kumar S., 2012, Existence of two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz in mango from India, *Pest Management in Horticultural Ecosystems*, 18(2), pp. 161-170.
6. Kamle M., Kumar P., Gupta V.K., Tiwari A.K., Misra A.K., Pandey B.K., 2013, Identification and phylogenetic correlation among *Colletotrichum gloeosporioides* pathogen of anthracnose for mango, *Biocatalysis Agricultural Biotechnology*, 2(3), pp. 285-287.
7. Weir B., Johnston P., Damm U., 2012, The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex, *Studies in mycology*, 73, pp. 115-80.
8. Lima N.B., de A.Batista M.V., De Moraes M.A., Barbosa M.A., Michereff S.J., Hyde K.D., Câmara M.P., 2013, Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil, *Fungal Diversity*, 61, pp. 75-88.
9. Pardo-De la Hoz C., Calderón C., Rincón A., Cárdenas M., Danies G., Lóspez-Kleine L., Resrepo S., Jiménez P., 2016, Species from the *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum boninense* and *Colletotrichum gloeosporioides* species complexes associated with tree tomato and mango crops in Colombia, *Plant Pathology*, 65(2), pp. 227-237.
10. Li Q., Bu J., Shu J., Yu Z., Tang L., Huang S.,...& Hsiang T., 2019, *Colletotrichum* species associated with mango in southern China, *Scientific reports*, 9(1), pp. 18891.
11. Mo J., Zhao G., Li Q., Solangi G.S., Tang L., Guo T., Huang S., Hsiang T., 2018, Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Guangxi, China, *Plant Disease*, 102(7), pp. 1283-1289.
12. Wu C.J., Chen H.K., Ni H.F., 2020, Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Taiwan, *European Journal of Plant Pathology*, 157, pp. 1-15.
13. Zakaria L., 2021, Diversity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in tropical fruit crops—A review, *Agriculture*, 11(4), pp. 297.

14. Li Q., Shu J., Tang L., Huang S., Guo T., Mo J., Ning P., Hsiang T., 2020, First report of mango leaf anthracnose caused by *Colletotrichum asianum* in Vietnam, *Plant Disease*, 104, pp. 1558.
15. Lê Hoàng Lê Thủy và Phan Văn Kim, 2008, Phân loài nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên xoài và sầu riêng tại Đồng bằng sông Cửu Long và thử hiệu lực của sáu loại thuốc đối với các loài nấm này, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, (10), pp. 31-40.
16. Nguyễn Hồng Quý và Lê Minh Trường, 2016, Đánh giá khả năng phòng trị của xạ khuẩn đối với bệnh thán thư trên xoài do nấm *Colletotrichum* sp. gây ra, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 3, pp. 120-127.
17. Trần Đức Thắng, Đào Uyên Trân Đa, Nguyễn Ngọc Linh, Lê Đình Đôn, 2016, Nghiên cứu nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên cây xoài, *Bảo vệ thực vật*, 6, pp. 24-31.
18. Phạm Thị Lý Thu, Lê Trung Thành, Lưu Thị Mỹ Dung, Hà Việt Cường, Nguyễn Đức Thành, Nguyễn Thị Hồng Hải, 2021, Tuyển chọn nấm *Trichoderma* spp. có khả năng đối kháng với tác nhân gây bệnh thán thư trên cây xoài, *Tạp Chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 19(12), pp. 1617-1627.
19. Nishijima W., 1993, Mango diseases and their control, in *Conference on Mango in Hawaii*, Honolulu, Hawaii: University of Hawaii.
20. McMillan Jr R., *Control of mango anthracnose with foliar sprays*. in *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 1984.
21. Persley D.M., Pegg K.G., Syme J.R., 1989, *Fruit and nut crops: a disease management guide*, Vol. 88018, Department of Primary Industries, Queensland Government.
22. McMillan Jr, R., Mitchell K., 1992, Effect of hot water treatment on mango fruits sprayed with fungicides for anthracnose control, in *Florida State Horticultural Society. Meeting (USA)*.
23. Smoot J.J., Segall R., 1963, Hot water as a postharvest control of mango anthracnose, *Plant Disease Reporter*, 47(8), pp. 739-742.
24. Johnson G., Sangchote S., Cooke A., 1990, Control of stem end rot (*Dothiorella dominicana*) and other postharvest diseases of mangoes (cv. Kensington Pride) during short-and long-term storage, *Tropical Agriculture, Trinidad Tobago*, 67(2) pp. 183-187.
25. Spalding D., 1982, Resistance of mango pathogens to fungicides used to control postharvest diseases, *Plant Disease*, 66(12), pp. 1185-1186.
26. Sutton B., 1992, The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*, *Colletotrichum: biology, pathology and control*, 388, pp. 1-26.

27. Dean R., Van Kan J.A., Pretorius Z., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., ...& Ellis J., 2012, The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology, *Molecular plant pathology*, 13(4), pp. 414-430.
28. Kleemann J., Rincon-Rivera L.J., Takahara H., Neumann U., Van Themaat E.V.L., van der Does H.C., ...& Schmalenbach W., 2012, Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*, *PLoS pathogens*, 8(4), pp. e1002643.
29. Perfect S.E., O'Connell R.J., Green E.F., Doering-Saad C., Green J.R., 1998, Expression cloning of a fungal proline-rich glycoprotein specific to the biotrophic interface formed in the *Colletotrichum*-bean interaction, *The Plant Journal*, 15(2), pp. 273-279.
30. Anand T., Bhaskaran R., Karthikeyan T.G., Rajesh M., Senthilraja G., 2008, Production of cell wall degrading enzymes and toxins by *Colletotrichum capsici* and *Alternaria alternata* causing fruit rot of chillies, *Journal of plant protection research*, 48(4), pp. 437-451.
31. WX Z., 2000, Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*, *Journal of Natural Products*, 63, pp. 1529-1530.
32. Lu H., Zou W.X., Meng J.C., Hu J., Tan R.X., 2000, New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*, *Plant Science*, 151(1), pp. 67-73.
33. Peeran M.F., Kuppusami P., Thiruvengadam R., 2014, Pathogenesis of *Colletotrichum lindemuthianum* the incitant of anthracnose disease in beans mediated by macerating enzymes, *The Bioscan*, 9(1), pp. 295-300.
34. Amadioha A., 2003, Evaluation of some plant leaf extracts against *Colletotrichum lindemuthianum* in cowpea, *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 38(3-4), pp. 259-265.
35. Ongena M., Jacques P., 2008, *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol, *Trends in microbiology*, 16(3), pp. 115-125.
36. Logan N.A., De Vos P., 2009, Genus *Bacillus*, *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 3, pp. 21-128.
37. Ljubica Š., Popovic V., Škarlak R., Živanović L., Stevanović A., Golijan Pantović J., ...& Ikanovic J., 2019, *Ljubica Šarčević MICROBIOLOGICAL PURIFICATION OF WASTE WATER*.
38. Miljaković D., Marinković J., Balešević-Tubić S., 2020, The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops, *Microorganisms*, 8(7), pp. 1037.

39. Borriss R., 2011, Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture, *Bacteria in agrobiolgy: Plant growth responses*, pp. 41-76.
40. Mardanova A.M., Hadieva G.F., Lutfullin M.T., Khilyas I.V.e., Minnullina L.F., Gilyazeva A.G., ...& Sharipova M.R., 2016, *Bacillus subtilis* strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi, *Agricultural Sciences*, 8(1), pp. 1-20.
42. Khan A., Singh P., Srivastava A., 2018, Synthesis, nature and utility of universal iron chelator–Siderophore: A review, *Microbiological research*, 212, pp. 103-111.
43. Hertlein G., Müller S., Garcia-Gonzalez E., Poppinga L., Süßmuth R.D., Genersch E., 2014, Production of the catechol type siderophore bacillibactin by the honey bee pathogen *Paenibacillus* larvae, *PLoS One*, 9(9), pp. e108272.
44. Bjelić D., Marinković J., Tintor B., Mrkovački N., 2018, Antifungal and plant growth promoting activities of indigenous rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) rhizosphere, *Communications in Soil Science Plant Analysis*, 49(1), pp. 88-98.
45. Yu X., Ai C., Xin L., Zhou G., 2011, The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper, *European Journal of Soil Biology*, 47(2), pp. 138-145.
46. Pieterse C.M., Zamioudis C., Berendsen R.L., Weller D.M., Van Wees S.C., Bakker P.A., 2014, Induced systemic resistance by beneficial microbes, *Annual review of phytopathology*, 52, pp. 347-375.
47. Chunyu L., Weicong H., Bin P., Yan L., Saifie Y., Yuanyuan D., ...& Qirong S., 2017, Rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* strain SQRT3-mediated induced systemic resistance controls bacterial wilt of tomato, *Pedosphere*, 27(6), pp. 1135-1146.
48. Singh S., Pathak R., Choudhary V., 2016, Plant growth-promoting rhizobacteria-mediated acquired systemic resistance in plants against pests and diseases, *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants*, pp. 125-134.
49. Kloepper J.W., Ryu C.-M., Zhang S., 2004, Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp., *Phytopathology*, 94(11), pp. 1259-1266.
50. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R., 2007, Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling, *FEMS microbiology reviews*, 31(4), pp. 425-448.
51. Choi H.K., Song G.C., Yi H.S., Ryu C.M., 2014, Field evaluation of the bacterial volatile derivative 3-pentanol in priming for induced resistance in pepper, *Journal of Chemical Ecology*, 40, pp. 882-892.

52. Gond S.K., Bergen M.S., Tores M.S., White Jr J.F., 2015, Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize, *Microbiological research*, 172, pp. 79-87.
53. Souza R.d., Ambrosini A., Passaglia L.M., 2015, Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils, *Genetics molecular biology*, 38, pp. 401-419.
54. Rodríguez H., Fraga R., 1999, Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion, *Biotechnology advances*, 17(4-5), pp. 319-339.
55. Woodward A.W., Bartel B., 2005, Auxin: regulation, action, and interaction, *Annals of botany*, 95(5), pp. 707-735.
56. Gutiérrez-Mañero F.J., Ramos-Solano B., Probanza A.n., Mehouchi J., R. Tadeo F., Talon M., 2001, The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins, *Physiologia Plantarum*, 111(2), pp. 206-211.
57. Radhakrishnan R., Lee I.-J., 2016, Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce, *Plant Physiology Biochemistry*, 109, pp. 181-189.
58. Glick B.R., 2014, Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world, *Microbiological research*, 169(1), pp. 30-39.
59. Park, Y.-G., Mun B.G., Kang S.M., Hussain A., Shahzad R., Seo C.W., ... & Lee D.Y., 2017, *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones, *PLoS One*, 12(3), pp. e0173203.
60. Shahzad R., Khan A.L., Bilal S., Waqas M., Kang S.M., Lee I.J., 2017, Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*, *Environmental Experimental Botany*, 136, pp. 68-77.
61. Stamenković-Stojanović S., Karabegović I., Beškoski V., Nikolić N., Lazić M., 2019, *Bacillus* based microbial formulations: Optimization of the production process, *Hemjska industrija*, 73(3), pp. 169-182.
62. Ruangwong O.-U., Chang C.I., Lamine S.A., Liang W.J., 2012, Identification of antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* LB5 with ability to control anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, *African Journal of Microbiology Research*, 6(16), pp. 3732-3738.
63. Rungjindamai N., 2016, Isolation and evaluation of biocontrol agents in controlling anthracnose disease of mango in Thailand, *Journal of Plant Protection Research*, 56(3), pp. 301-311.



64. Duangkaew P., Monkhung S., 2021, Antifungal activity of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* BL-59 to control some important postharvest diseases of mango fruits (*Mangifera indica* L.), *International Journal of Agricultural Technology*, 17(6), pp. 2053-2066.
65. Ye Q., Zhong Z., Chao S., Liu L., Chen M., Feng X., Wu H., 2023, Antifungal Effect of *Bacillus velezensis* ZN-S10 against Plant Pathogen *Colletotrichum changpingense* and Its Inhibition Mechanism, *International Journal of Molecular Sciences*, 24(23), pp. 16694.
66. Jiang P.T., Wu Y.I., He H.Z., Meng J.R., Luo H., Fang Z.B., Li J.Q., 2023, Screening, identification and antagonistic mechanism of antagonistic bacteria strain L18-7 against mango anthracnose, *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 36(4), pp. 742-749.
67. Nguyễn Thị Như Huỳnh, Quách Văn Cao Thi, Nguyễn Trung Trực, Trần Quốc Dũng, 2023, Phân lập vi khuẩn *Bacillus* có hoạt tính đối kháng nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên cây đu đủ sau thu hoạch, *Tạp Chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 228(01), pp. 357-363.
68. Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Thị Yên Như, Trần Thị Xuân Mai, Nguyễn Thị Pha, 2016, Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn từ đất vùng rễ ớt có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên ớt, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, (47), pp. 16-23.
69. Nguyễn Bá Thọ, Nguyễn Thị Liên, Võ Đình Quang, 2020, Phân lập một số chủng *Bacillus* sp. đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh khô cành khô quả trên cây cà phê ở tỉnh Đắk Nông, *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 20(3), pp. 94-102.
70. Trần Thùy Trang, Nguyễn Thị Ánh Nguyệt, Lê Thị Mai Châm, Nguyễn Tân Đức, Phạm Nguyễn Nhất Hoàng, Dương Hoa Xô, 2020, Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus subtilis* có khả năng đối kháng tốt với nấm *Colletotrichum scovillei* gây bệnh thán thư trên ớt ở Thành phố Hồ Chí Minh, *Tạp Chí Khoa học Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh*, 15(01), pp. 72-86.
71. Prihastuti H., Cai L., Chen H., McKenzie., Hyde K., 2009, Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand, *Fungal Diversity*, 39(1), pp. 89-109.
72. Koch R., 1876, The etiology of anthrax, based on the life history of *Bacillus anthracis*, *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, 2(2), pp. 277-310.
73. Sutton B.C., 1980, The Coelomycetes, Fungi Imperfecti with Pycnidia, *Acervuli Stromata*, pp. 470-472.
74. Waller, J.M., Ritchie B.J., Holderness M., 1998, *Plant clinic handbook*.

75. Martínez-Culebras P.V., Barrio E., García M.D., Querol A., 2000, Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry based on the internal transcribed spacers of the ribosomal region, *FEMS microbiology letters*, 189(1), pp. 97-101.
76. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1989, Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics, pp. 315-322.
77. Lee S.B., Taylor J.W., 1990, Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores, *PCR protocols: a guide to methods applications*, pp. 282-287.
78. Kalra Y.P., 1995, Determination of pH of soils by different methods: collaborative study, *Journal of AOAC international*, 78(2), pp. 310-324.
79. Thapa A., Budhathoki A., Sapkota A., Sainju M., Shrestha P., Pant S.P., 2021, Isolation, Identification and Screening of *Bacillus* species with Antimicrobial Activity from Different Soil Samples of Kathmandu Valley, *Nepal Journal of Biotechnology*, 9(2), pp. 1-6.
80. Soyong K., 1988, Identification of species of *Chaetomium* in the Philippines and screening for their biocontrol properties against seed borne fungi of rice.
81. Brzezinska M.S., Kalwasińska A., Świątczak J., Żero K., Jankiewicz U., 2020, Exploring the properties of chitinolytic *Bacillus* isolates for the pathogens biological control, *Microbial Pathogenesis*, 148, pp. 104462.
82. Ghorbel B., Sellami-Kamoun A., Nasri M., 2003, Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1, *Enzyme Microbial Technology*, 32(5), pp. 513-518.
83. Teather R.M., Wood P.J., 1982, Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen, *Applied environmental microbiology*, 43(4), pp. 777-780.
84. Han J.H., Shim H., Shin J.H., Kim K.S., 2015, Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea, *The plant pathology journal*, 31(2), pp. 165.
85. Nautiyal C.S., 1999, An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms, *FEMS microbiology Letters*, 170(1), pp. 265-270.
86. Schwyn B., Neilands J., 1987, Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores, *Analytical biochemistry*, 160(1), pp. 47-56.
87. Sanger F., Coulson A.R., 1975, A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, *Journal of molecular biology*, 94(3), pp. 441-448.
88. Phoulivong S., McKenzie E., Hyde K., 2012, Cross infection of *Colletotrichum* species; a case study with tropical fruits, *Current Research in Environmental Applied Mycology*, 2(2), pp. 99-111.

89. Ashwini N., Srividya S., 2014, Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1, 3 Biotech, 4(2), pp. 127-136.
90. Wang K., Quin Z., Wu S., Zhao P., Zhen C., Gao H., 2021, Antifungal mechanism of volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* CF-3 on *Colletotrichum gloeosporioides* assessed using omics technology, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 69(17), pp. 5267-5278.

# PHỤ LỤC

## Phụ lục 1. Kết quả định danh các chủng nấm phân lập bằng phương pháp khối phổ MALDI-TOF

### Bruker MALDI Biotyper Identification Results



#### Run Info:

**Run Identifier:** 240614-1439-0023062068  
**Comment:**  
**Operator:** tof-user@MBT-WIN10-LTSC  
**Run Creation Date/Time:** 2024-06-14T14:40:38.051  
**Number of Tests:** 8  
**Type:** Standard  
**BTS-QC:** not present  
**BTS-QC Position:**  
**Instrument ID:** 1875324.40338  
**Server Version:** 4.1.100 (PYTH) 188 2020-04-112\_10-35-53

#### Result Overview

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
<a href="#">H3</a> (-) (A)	M2C1 (Filamentous Fungi)	No Organism Identification Possible	<a href="#">1.37</a>	No Organism Identification Possible	<a href="#">1.31</a>
<a href="#">H4</a> (-) (C)	M3C2 (Filamentous Fungi)	No Organism Identification Possible	<a href="#">1.30</a>	No Organism Identification Possible	<a href="#">1.33</a>
<a href="#">H5</a> (+) (B)	M3C3 (Filamentous Fungi)	<a href="#">Colletotrichum gloeosporioides</a>	<a href="#">1.85</a>	<a href="#">Colletotrichum gloeosporioides</a>	<a href="#">1.77</a>
<a href="#">H6</a> (+++)(A)	VL2 (Filamentous Fungi)	<a href="#">Fusarium equiseti</a>	<a href="#">2.07</a>	<a href="#">Fusarium equiseti</a>	<a href="#">1.72</a>
<a href="#">H7</a> (+++)(A)	VL1 (Filamentous Fungi)	<a href="#">Fusarium oxysporum</a>	<a href="#">2.02</a>	<a href="#">Fusarium proliferatum</a>	<a href="#">1.83</a>
<a href="#">H8</a> (-) (C)	M3C4 (Filamentous Fungi)	No Organism Identification Possible	<a href="#">1.28</a>	No Organism Identification Possible	<a href="#">1.28</a>

*Result overview table--continued on next page*

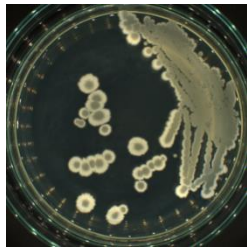
*Result overview table--continued from previous page*

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
<a href="#">H9</a> (+++)(A)	M1C1 (Filamentous Fungi)	<a href="#">Colletotrichum gloeosporioides</a>	<a href="#">2.20</a>	<a href="#">Colletotrichum gloeosporioides</a>	<a href="#">1.78</a>
<a href="#">H10</a> (+)(B)	M1C2 (Filamentous Fungi)	<a href="#">Colletotrichum gloeosporioides</a>	<a href="#">1.87</a>	No Organism Identification Possible	<a href="#">1.60</a>

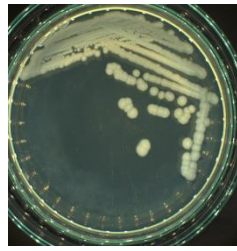
## Phụ lục 2. Kết quả giải trình tự chủng nấm M1C1 trên phần mềm BioEdit



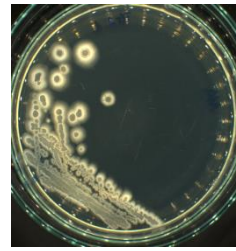
**Phụ lục 3. Khuẩn lạc các chủng vi khuẩn sàng lọc *Bacillus* phân lập từ mẫu đất Tiền Giang**



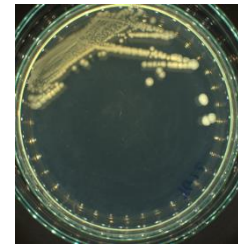
TG1.1



TG1.2



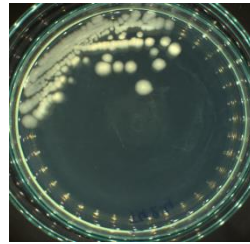
TG2.1



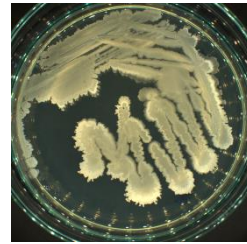
TG2.2



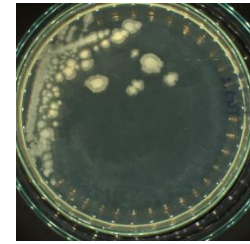
TG2.3



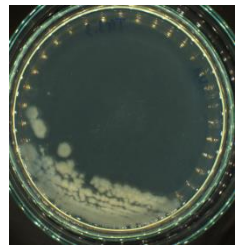
TG2.4



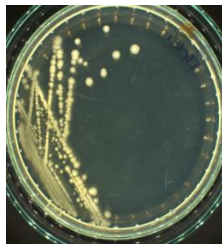
TG3.1



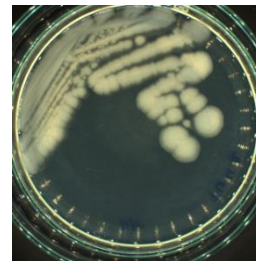
TG3.2



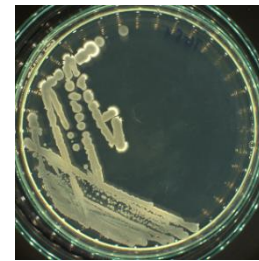
TG3.3



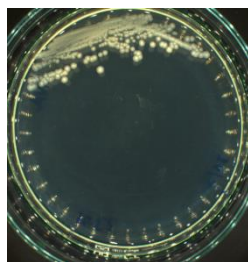
TG4.1



TG4.2



TG5.1



TG5.2



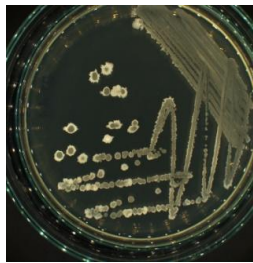
TG5.3



TG5.4



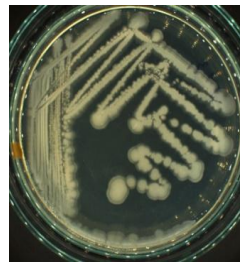
**Phụ lục 4. Khuẩn lạc các chủng vi khuẩn sàng lọc *Bacillus* phân lập từ mẫu đất  
Đồng Tháp**



ĐT1.1



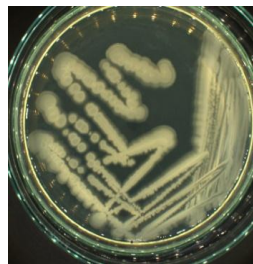
ĐT1.2



ĐT 1.3



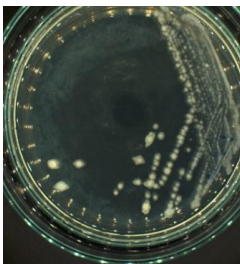
ĐT 1.4



ĐT2.1



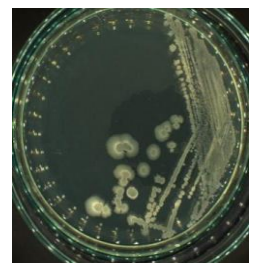
ĐT2.2



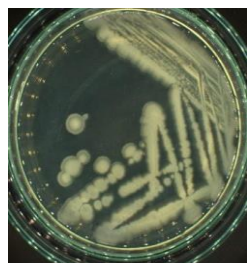
ĐT3.1



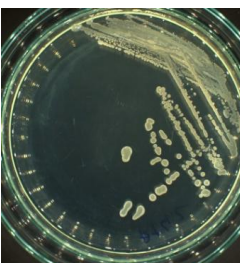
ĐT3.2



ĐT3.3



ĐT4.1



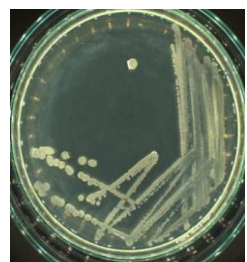
ĐT 4.2



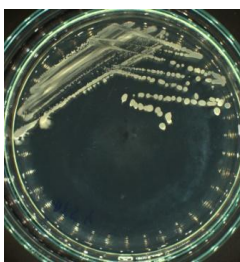
ĐT 5.1



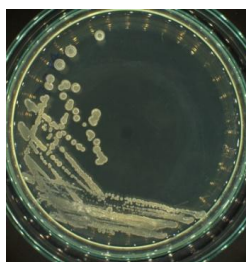
ĐT5.2



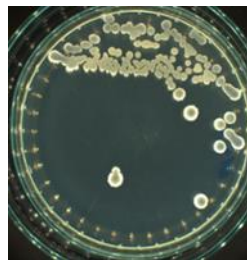
ĐT5.3



ĐT5.4



ĐT 5.5



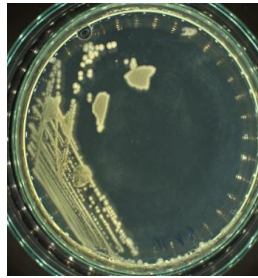
ĐT5.6



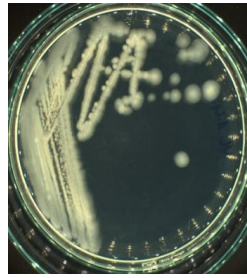
**Phụ lục 5. Khuẩn lạc các chủng vi khuẩn sàng lọc *Bacillus* phân lập từ mẫu đất  
Vĩnh Long**



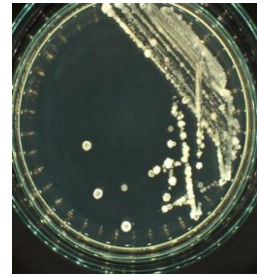
VL1.1



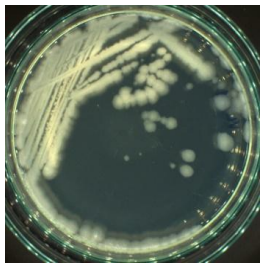
VL1.2



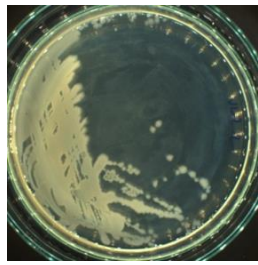
VL1.3



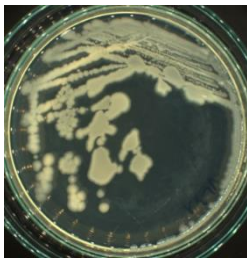
VL1.4



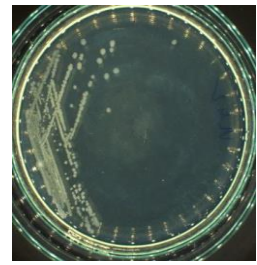
VL2.1



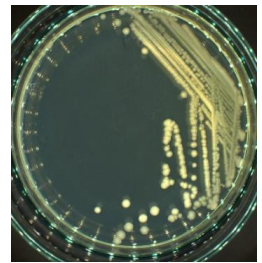
VL2.2



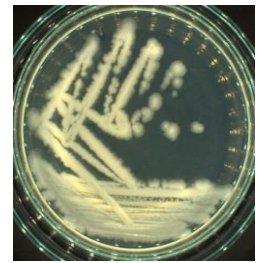
VL3.1



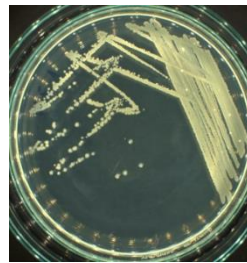
VL4.1



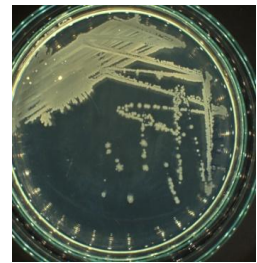
VL4.2



VL4.3



VL5.1



VL5.2

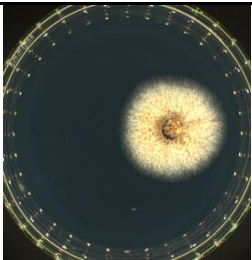
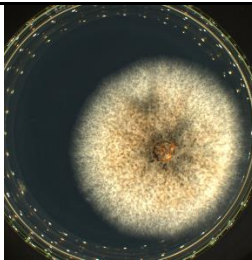
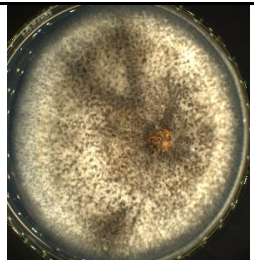
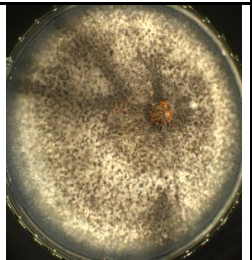
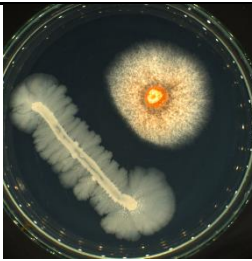
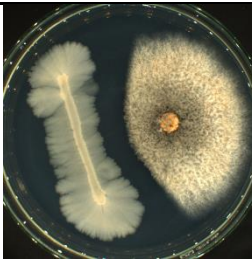


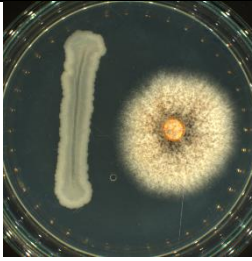
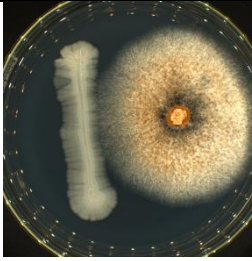
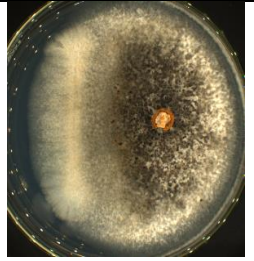
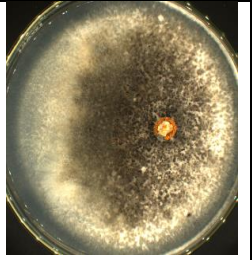
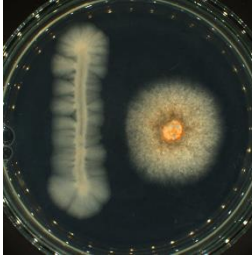

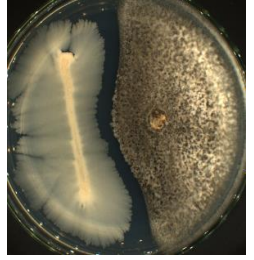
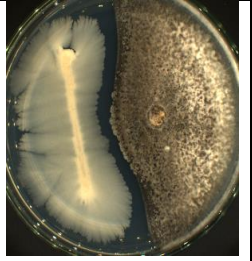
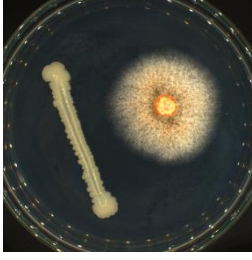
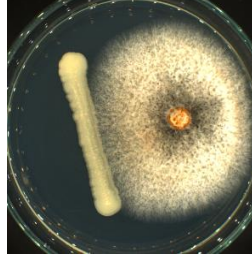
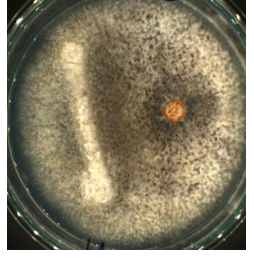
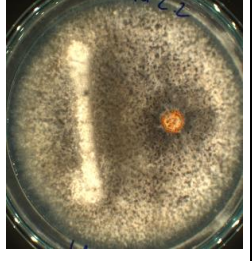


VL5.3

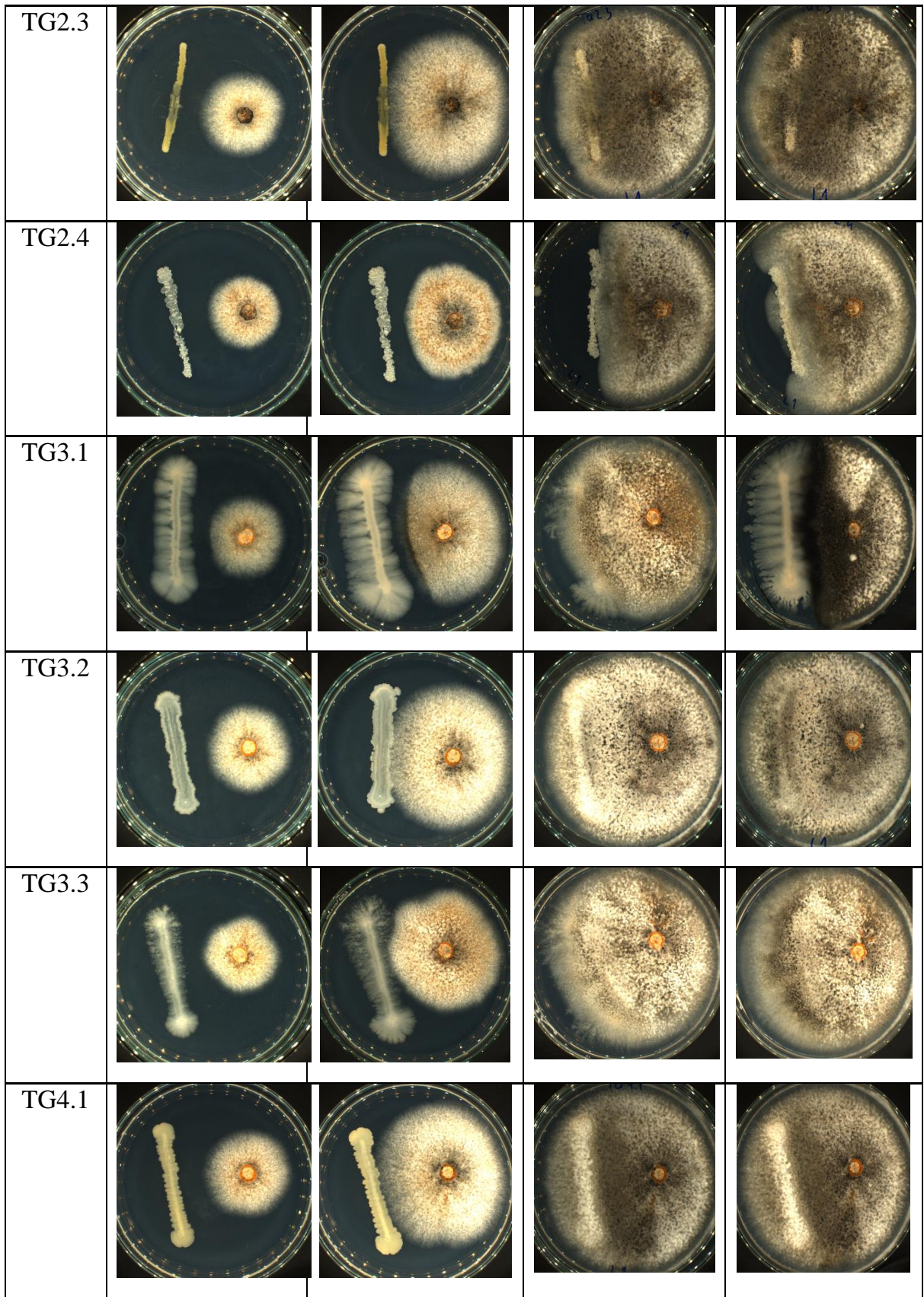


VL5.4

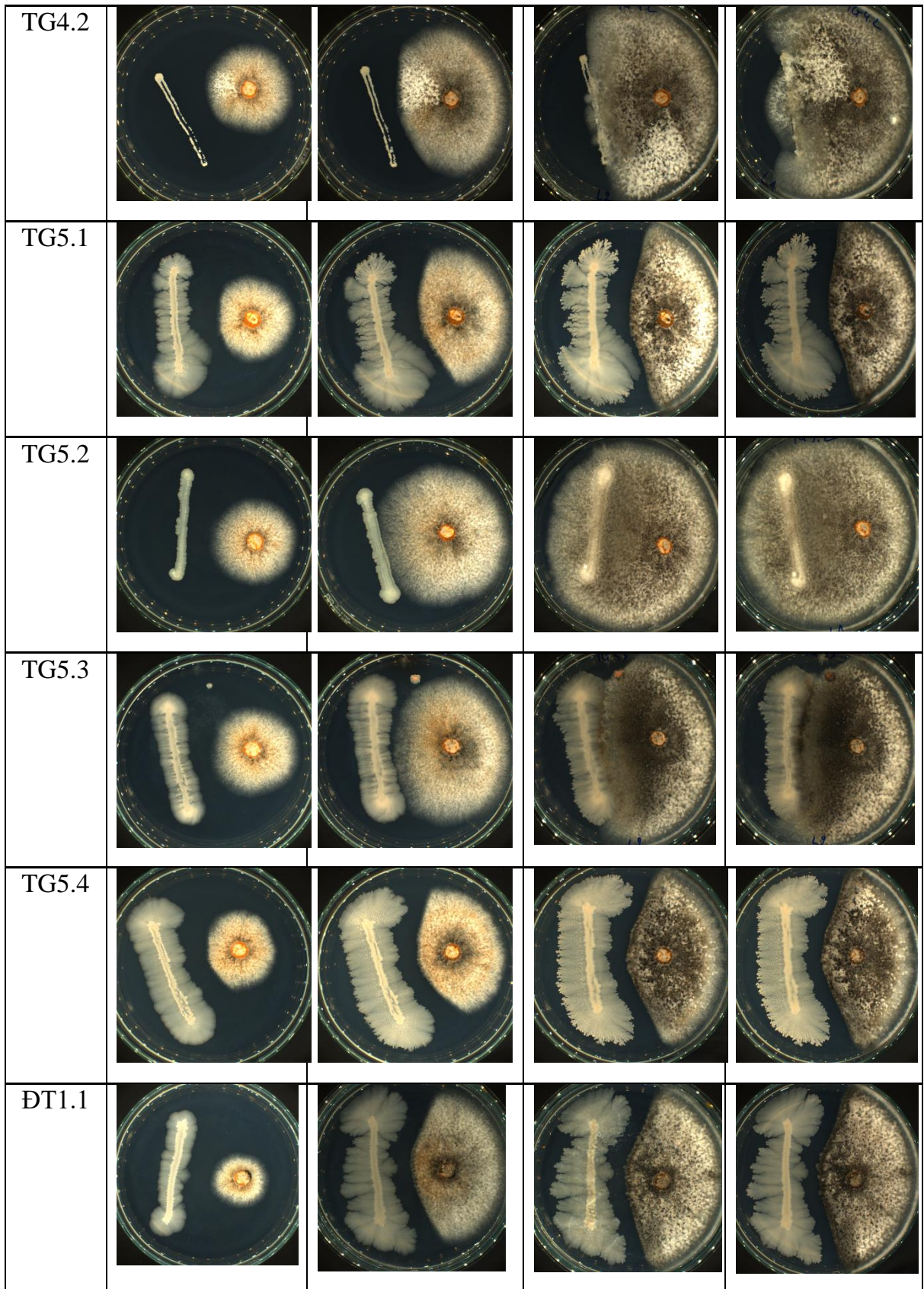
**Phụ lục 6.** Khả năng ức chế của các chủng vi khuẩn phân lập từ đất vùng rễ xoài với nấm *Colletotrichum* sp.

Chủng	Ngày 3	Ngày 7	Ngày 11	Ngày 15
Đối chứng				
TG1.1				
TG1.2				
TG2.1				
TG2.2				


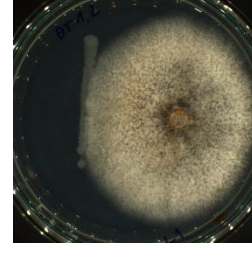
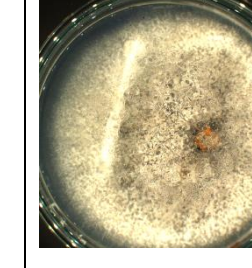
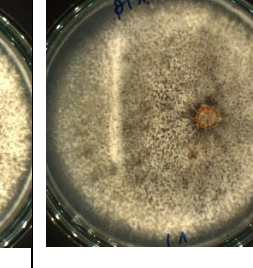


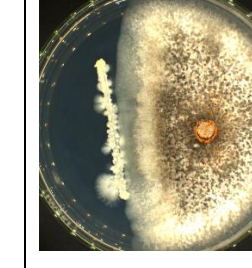
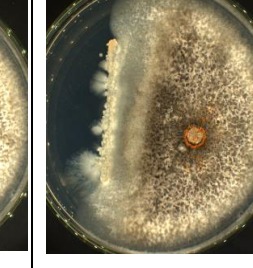

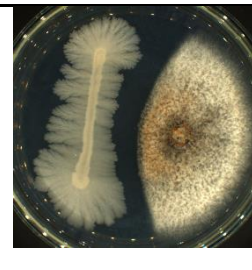
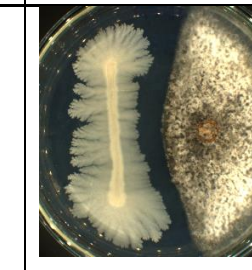
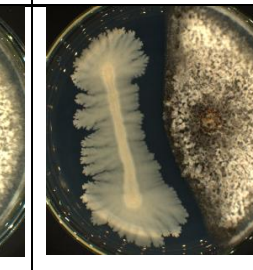

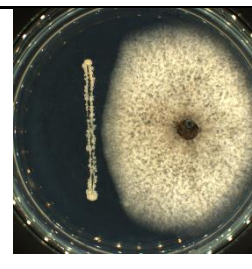
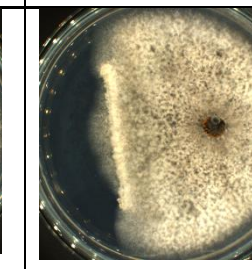
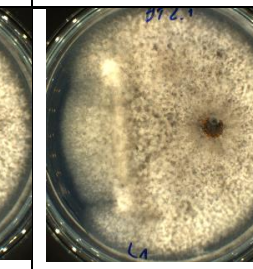

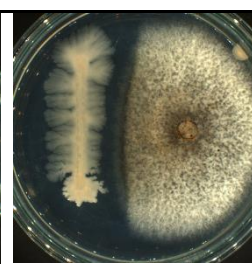
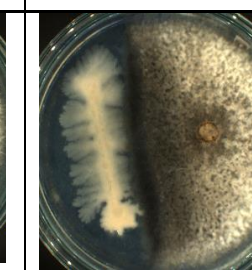
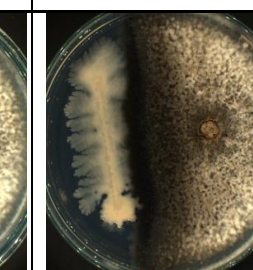


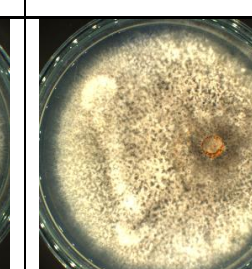
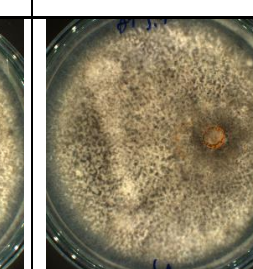




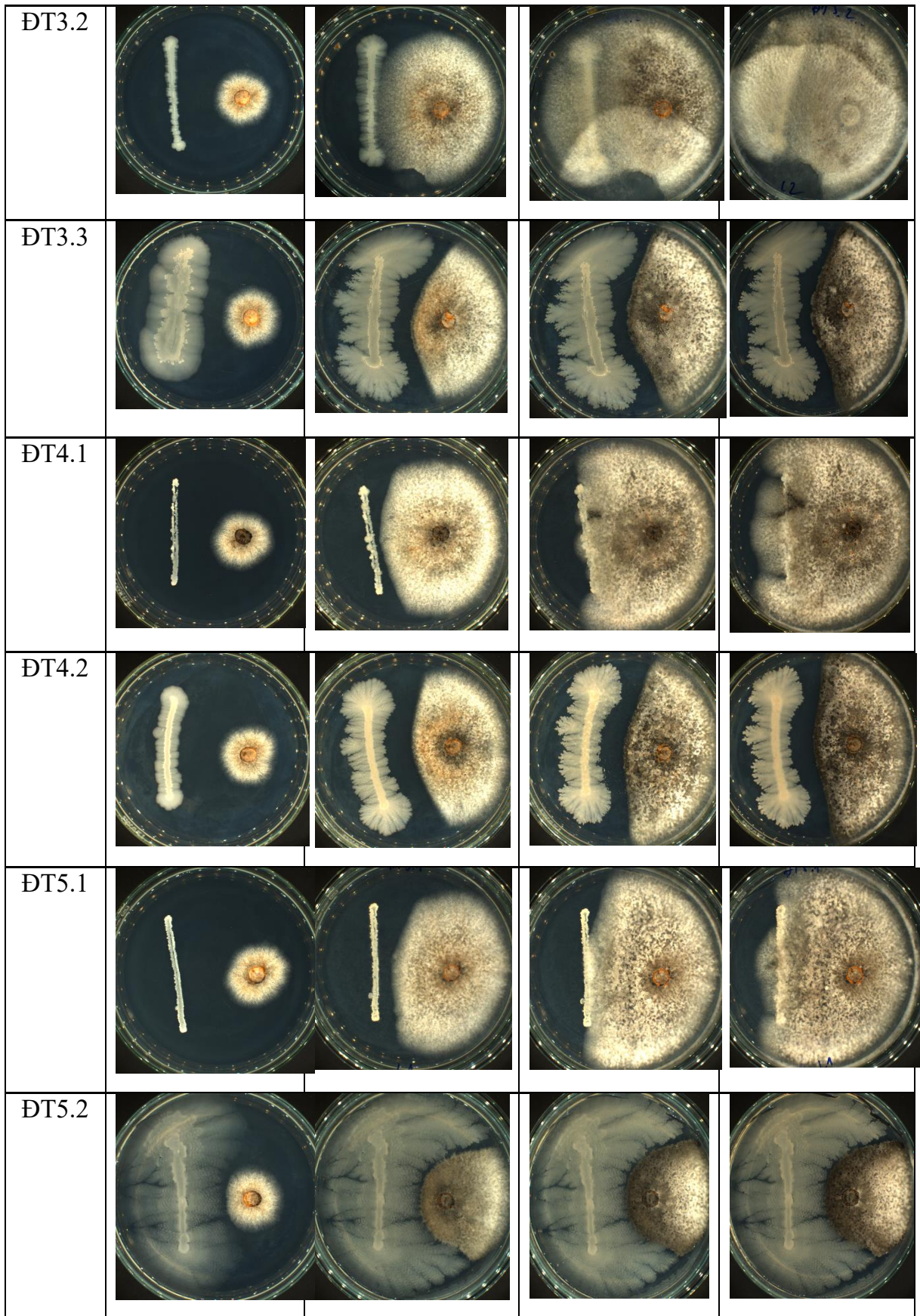




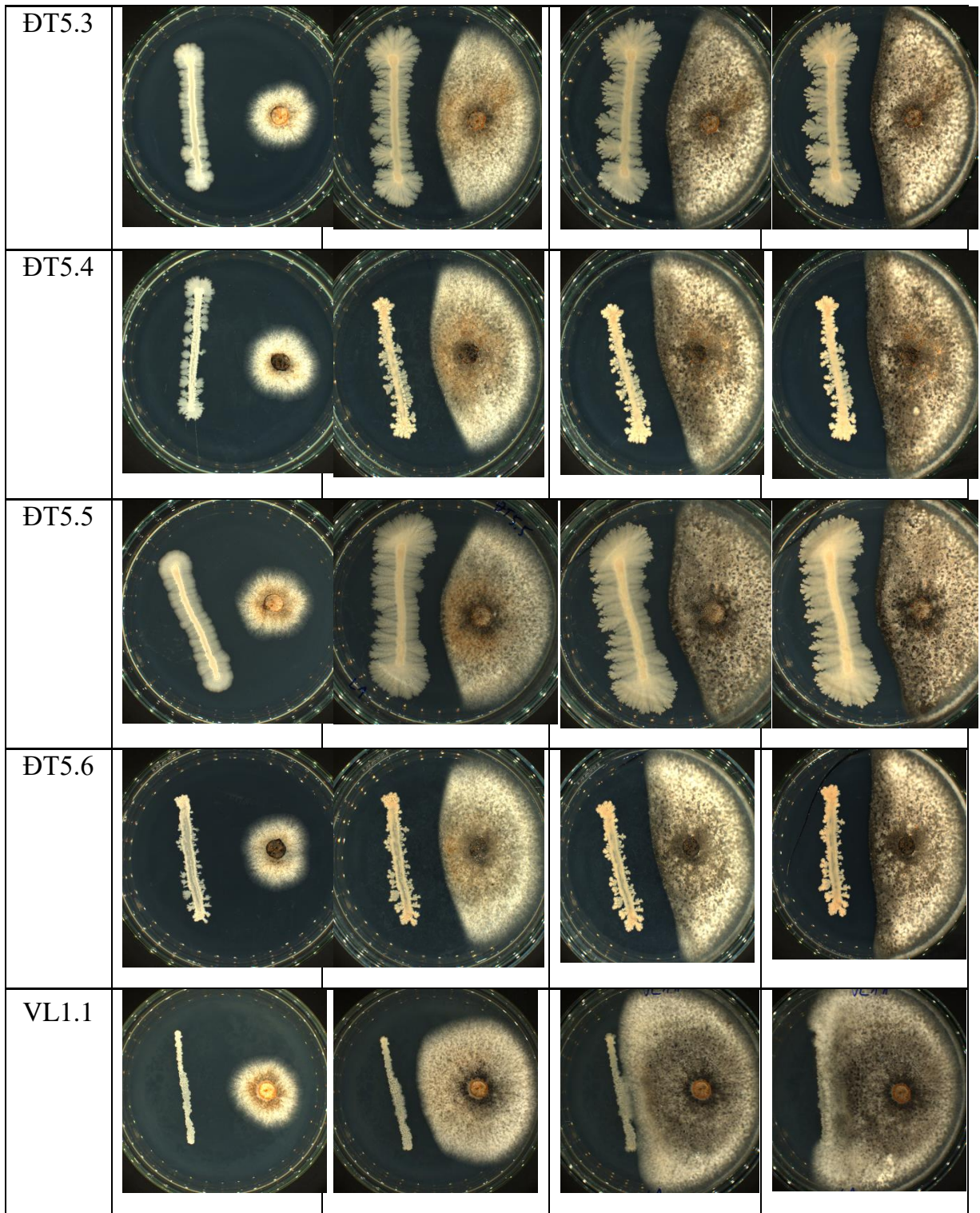


DT1.2				
DT1.3				
DT1.4				
DT2.1				
DT2.2				
DT3.1				





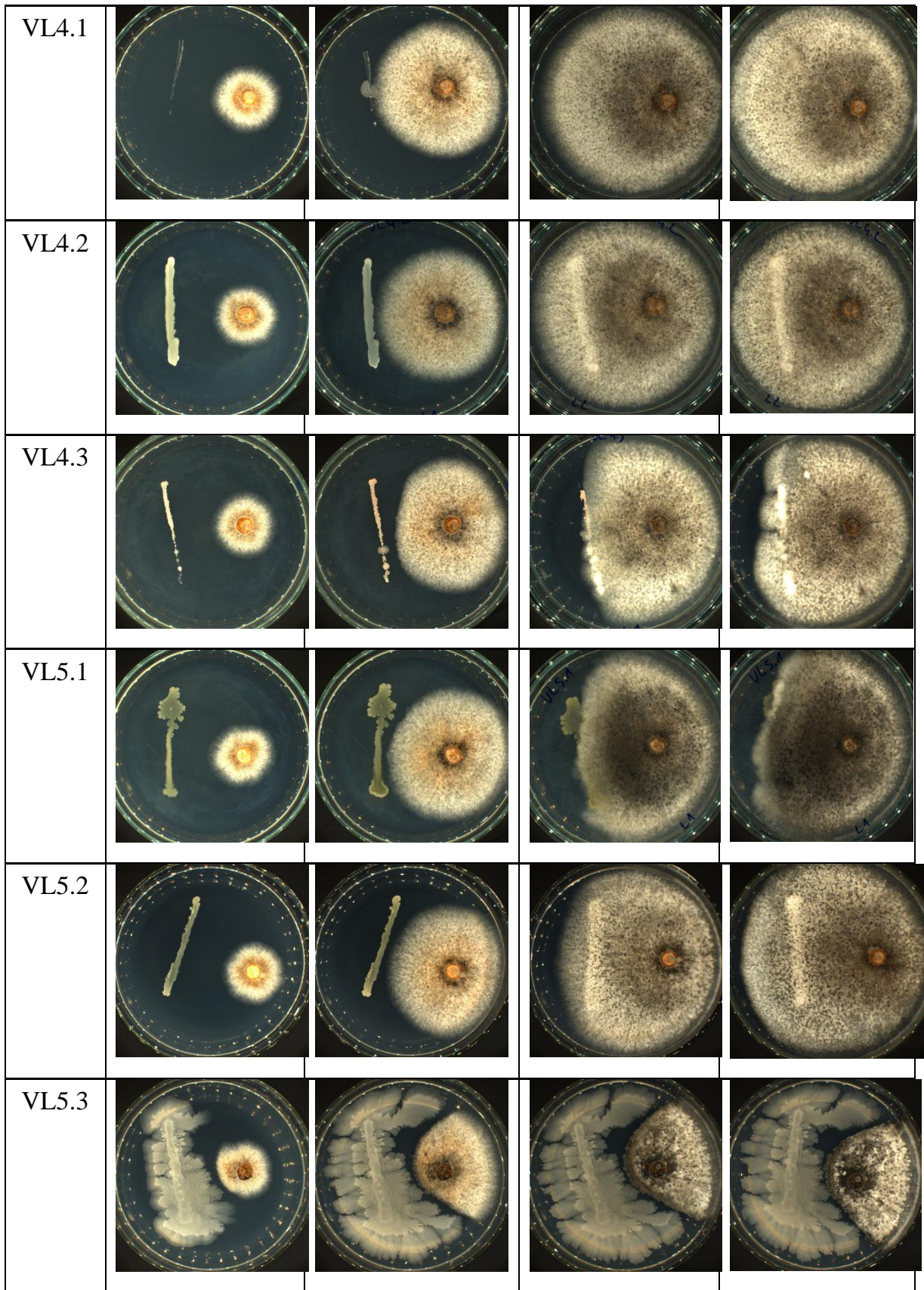




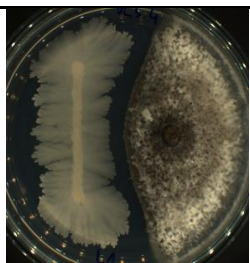


VL1.2				
VL1.3				
VL1.4				
VL2.1				
VL2.2				
VL3.1				





VL5.4



**Phụ lục 7.** Hiệu quả ức chế nấm *Colletotrichum* sp. của các chủng vi khuẩn phân lập từ đất vùng rễ xoài

STT	Mã số chủng	Hiệu quả ức chế (%)			
		3 ngày	7 ngày	11 ngày	15 ngày
1	ĐT 1.1	7.14	57.50	70.69	71.67
2	ĐT 1.1	0.00	57.50	68.97	70.00
3	ĐT 1.1	7.14	60.00	70.69	71.67
4	ĐT 1.2	0.00	10.00	5.17	5.00
5	ĐT 1.2	14.29	12.50	5.17	5.00
6	ĐT 1.2	0.00	12.50	5.17	6.67
7	ĐT 1.3	7.14	52.50	44.83	45.00
8	ĐT 1.3	7.14	45.00	44.83	45.00
9	ĐT 1.3	7.14	50.00	46.55	45.00
10	ĐT 1.4	7.14	62.50	74.14	75.00
11	ĐT 1.4	14.29	65.00	75.86	75.00
12	ĐT 1.4	7.14	65.00	74.14	75.00
13	ĐT 2.1	0.00	25.00	22.41	8.33
14	ĐT 2.1	7.14	17.50	13.79	3.33
15	ĐT 2.1	7.14	25.00	20.69	8.33
16	ĐT 2.2	0.00	50.00	55.17	50.00
17	ĐT 2.2	7.14	52.50	56.90	51.67
18	ĐT 2.2	0.00	50.00	56.90	50.00
19	ĐT 3.1	0.00	2.50	1.72	0.00
20	ĐT 3.1	7.14	0.00	3.45	0.00
21	ĐT 3.1	7.14	0.00	5.17	1.67
22	ĐT 3.2	7.14	27.50	10.34	0.00
23	ĐT 3.2	7.14	30.00	10.34	0.00
24	ĐT 3.2	7.14	30.00	12.07	0.00
25	ĐT 3.3	7.14	65.00	75.86	76.67
26	ĐT 3.3	7.14	67.50	77.59	76.67
27	ĐT 3.3	7.14	65.00	75.86	76.67
28	ĐT 4.1	7.14	35.00	43.10	15.00
29	ĐT 4.1	7.14	35.00	43.10	16.67

30	DT 4.1	7.14	37.50	43.10	16.67
31	DT 4.2	7.14	57.50	70.69	71.67
32	DT 4.2	14.29	65.00	72.41	73.33
33	DT 4.2	7.14	62.50	72.41	73.33
34	DT 5.1	7.14	32.50	48.28	21.67
35	DT 5.1	0.00	30.00	44.83	23.33
36	DT 5.1	7.14	30.00	48.28	23.33
37	DT 5.2	21.43	72.50	81.03	81.67
38	DT 5.2	28.57	72.50	81.03	81.67
39	DT 5.2	21.43	72.50	81.03	81.67
40	DT 5.3	7.14	60.00	72.41	73.33
41	DT 5.3	7.14	60.00	72.41	73.33
42	DT 5.3	0.00	60.00	72.41	73.33
43	DT 5.4	7.14	62.50	70.69	71.67
44	DT 5.4	7.14	65.00	72.41	73.33
45	DT 5.4	0.00	62.50	72.41	73.33
46	DT 5.5	7.14	62.50	74.14	75.00
47	DT 5.5	7.14	60.00	72.41	73.33
48	DT 5.5	7.14	62.50	74.14	73.33
49	DT 5.6	14.29	60.00	72.41	73.33
50	DT 5.6	14.29	60.00	70.69	71.67
51	DT 5.6	14.29	62.50	72.41	73.33
52	TG1.1	33.33	65.00	71.70	74.14
53	TG1.1	33.33	65.00	71.70	74.14
54	TG1.1	33.33	67.50	71.70	74.14
55	TG1.2	11.11	30.00	9.43	3.45
56	TG1.2	11.11	30.00	9.43	3.45
57	TG1.2	16.67	30.00	9.43	5.17
58	TG2.1	22.22	60.00	69.81	72.41
59	TG2.1	27.78	62.50	71.70	74.14
60	TG2.1	22.22	62.50	71.70	74.14
61	TG2.2	0.00	25.00	0.00	1.72
62	TG2.2	0.00	25.00	0.00	1.72

63	TG2.2	0.00	25.00	1.89	3.45
64	TG2.3	0.00	30.00	7.55	5.17
65	TG2.3	0.00	27.50	13.21	6.90
66	TG2.3	0.00	30.00	13.21	6.90
67	TG2.4	5.56	45.00	39.62	34.48
68	TG2.4	5.56	45.00	39.62	34.48
69	TG2.4	11.11	45.00	41.51	34.48
70	TG3.1	11.11	52.50	56.60	56.90
71	TG3.1	11.11	50.00	54.72	53.45
72	TG3.1	11.11	50.00	56.60	56.90
73	TG3.2	0.00	27.50	7.55	6.90
74	TG3.2	0.00	27.50	5.66	6.90
75	TG3.2	0.00	30.00	5.66	8.62
76	TG3.3	0.00	30.00	5.66	1.72
77	TG3.3	5.56	32.50	9.43	6.90
78	TG3.3	5.56	30.00	5.66	1.72
79	TG4.1	0.00	25.00	1.89	5.17
80	TG4.1	0.00	25.00	0.00	3.45
81	TG4.1	5.56	27.50	0.00	5.17
82	TG4.2	0.00	40.00	39.62	22.41
83	TG4.2	0.00	37.50	37.74	20.69
84	TG4.2	0.00	37.50	39.62	20.69
85	TG5.1	33.33	65.00	71.70	74.14
86	TG5.1	27.78	65.00	71.70	74.14
87	TG5.1	27.78	65.00	71.70	74.14
88	TG5.2	11.11	25.00	3.77	1.72
89	TG5.2	11.11	25.00	1.89	1.72
90	TG5.2	16.67	25.00	5.66	3.45
91	TG5.3	11.11	35.00	49.06	46.55
92	TG5.3	11.11	35.00	49.06	46.55
93	TG5.3	11.11	37.50	49.06	48.28
94	TG5.4	27.78	62.50	71.70	74.14
95	TG5.4	27.78	62.50	69.81	72.41

96	TG5.4	27.78	62.50	71.70	74.14
97	VL1.1	6.67	28.57	38.89	32.20
98	VL1.1	0.00	28.57	37.04	32.20
99	VL1.1	0.00	28.57	37.04	32.20
100	VL1.2	0.00	5.71	1.85	1.69
101	VL1.2	0.00	2.86	0.00	0.00
102	VL1.2	0.00	5.71	0.00	0.00
103	VL1.3	6.67	31.43	42.59	35.59
104	VL1.3	6.67	28.57	40.74	33.90
105	VL1.3	6.67	31.43	40.74	35.59
106	VL1.4	20.00	60.00	74.07	76.27
107	VL1.4	20.00	57.14	72.22	74.58
108	VL1.4	13.33	57.14	72.22	74.58
109	VL2.1	6.67	25.71	46.30	27.12
110	VL2.1	6.67	22.86	42.59	25.42
111	VL2.1	6.67	25.71	44.44	25.42
112	VL2.2	6.67	37.14	53.70	55.93
113	VL2.2	13.33	48.57	59.26	57.63
114	VL2.2	6.67	42.86	53.70	57.63
115	VL3.1	13.33	5.71	5.56	1.69
116	VL3.1	0.00	0.00	3.70	0.00
117	VL3.1	0.00	0.00	3.70	0.00
118	VL4.1	0.00	2.86	3.70	1.69
119	VL4.1	0.00	5.71	1.85	0.00
120	VL4.1	0.00	2.86	1.85	0.00
121	VL4.2	6.67	0.00	1.85	0.00
122	VL4.2	13.33	0.00	3.70	0.00
123	VL4.2	6.67	0.00	3.70	0.00
124	VL4.3	13.33	25.71	38.89	23.73
125	VL4.3	13.33	28.57	40.74	23.73
126	VL4.3	13.33	28.57	40.74	23.73
127	VL5.1	6.67	14.29	33.33	18.64
128	VL5.1	6.67	17.14	35.19	13.56

129	VL5.1	0.00	14.29	35.19	15.25
130	VL5.2	13.33	5.71	7.41	0.00
131	VL5.2	13.33	2.86	7.41	0.00
132	VL5.2	13.33	2.86	7.41	0.00
133	VL5.3	26.67	65.71	75.93	76.27
134	VL5.3	26.67	68.57	77.78	77.97
135	VL5.3	26.67	68.57	77.78	79.66
136	VL5.4	20.00	60.00	74.07	74.58
137	VL5.4	20.00	57.14	72.22	74.58
138	VL5.4	20.00	57.14	72.22	74.58



**Phụ lục 8.** Phân tích ANOVA và kiểm định Duncan các chủng vi khuẩn nghi ngờ *Bacillus* có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. sau 3, 7, 11 và 15 ngày

**ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DAY3	Between Groups	9010.720	38	237.124	26.240	<.001
	Within Groups	704.868	78	9.037		
	Total	9715.588	116			
DAY7	Between Groups	35073.342	38	922.983	258.578	<.001
	Within Groups	278.418	78	3.569		
	Total	35351.760	116			
DAY11	Between Groups	79436.366	38	2090.431	971.680	<.001
	Within Groups	167.806	78	2.151		
	Total	79604.172	116			
DAY15	Between Groups	98671.635	38	2596.622	1914.558	<.001
	Within Groups	105.788	78	1.356		
	Total	98777.422	116			

**Homogeneous Subsets**

**DAY3**

Subset for alpha = 0.05

	CHUNG	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Duncan <sup>a</sup>	TG2.2	3	.0000											
	TG2.3	3	.0000											
	TG3.2	3	.0000											
	TG4.2	3	.0000											
	TG4.1	3	1.8533	1.8533										
	VL1.1	3	2.2233	2.2233										
	DT 2.2	3	2.3800	2.3800										
	TG3.3	3	3.7067	3.7067	3.7067									
	VL5.1	3	4.4467	4.4467	4.4467									
	DT 1.1	3	4.7600	4.7600	4.7600	4.7600								
	DT 2.1	3	4.7600	4.7600	4.7600	4.7600	4.7600							
	DT 5.1	3	4.7600	4.7600	4.7600	4.7600	4.7600							
	DT 5.3	3	4.7600	4.7600	4.7600	4.7600	4.7600							
	DT 5.4	3	4.7600	4.7600	4.7600	4.7600	4.7600							
	DT 1.2	3	4.7633	4.7633	4.7633									
	VL1.3	3		6.6700	6.6700	6.6700								
	VL2.1	3		6.6700	6.6700	6.6700								
	DT 1.3	3		7.1400	7.1400	7.1400	7.1400							
	DT 3.3	3		7.1400	7.1400	7.1400	7.1400	7.1400						
	DT 4.1	3		7.1400	7.1400	7.1400	7.1400	7.1400						
	DT 5.5	3		7.1400	7.1400	7.1400	7.1400	7.1400						
	TG2.4	3		7.4100	7.4100	7.4100	7.4100	7.4100						
	VL2.2	3		8.8900	8.8900	8.8900	8.8900	8.8900						
	DT 1.4	3		9.5233	9.5233	9.5233	9.5233	9.5233						
	DT 4.2	3		9.5233	9.5233	9.5233	9.5233	9.5233						
	TG3.1	3		11.1100	11.1100	11.1100	11.1100	11.1100						
	TG5.3	3		11.1100	11.1100	11.1100	11.1100	11.1100						
	TG1.2	3			12.9633	12.9633	12.9633	12.9633	12.9633					
	TG5.2	3			12.9633	12.9633	12.9633	12.9633	12.9633					
	VL4.3	3			13.3300	13.3300	13.3300	13.3300	13.3300					
	DT 5.6	3			14.2900	14.2900	14.2900	14.2900	14.2900					
	VL1.4	3							17.7767	17.7767				
	VL5.4	3							20.0000	20.0000	20.0000			
	DT 5.2	3								23.8100	23.8100	23.8100		
	TG2.1	3								24.0733	24.0733	24.0733		
	VL5.3	3									26.6700	26.6700	26.6700	
	TG5.4	3									27.7800	27.7800	27.7800	
	TG5.1	3										29.6300	29.6300	29.6300
	TG1.1	3											33.3300	33.3300
	Sig.		.117	.069	.057	.139	.051	.065	.084	.368	.121	.145	.261	.136

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

DAY7

		Subset for alpha = 0.05																		
CHUNG	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Duncan <sup>a</sup>																				
DT 1.2	3	11.6667																		
VL5.1	3	15.2400																		
DT 2.1	3		22.5000																	
VL2.1	3		24.7600	24.7600																
TG2.2	3		25.0000	25.0000	25.0000															
TG5.2	3		25.0000	25.0000	25.0000	25.0000														
TG4.1	3		25.8333	25.8333	25.8333	25.8333														
VL4.3	3		27.6167	27.6167	27.6167	27.6167	27.6167													
TG3.2	3		28.3333	28.3333	28.3333	28.3333	28.3333													
VL1.1	3		28.5700	28.5700	28.5700	28.5700	28.5700													
TG2.3	3		29.1667	29.1667	29.1667	29.1667	29.1667													
TG1.2	3		30.0000	30.0000	30.0000	30.0000	30.0000													
VL1.3	3		30.4767	30.4767	30.4767	30.4767	30.4767													
DT 5.1	3		30.8333	30.8333	30.8333	30.8333	30.8333													
TG3.3	3		30.8333	30.8333	30.8333	30.8333	30.8333													
DT 4.1	3		35.8333	35.8333	35.8333	35.8333	35.8333	35.8333												
TG5.3	3		38.3333	38.3333	38.3333	38.3333	38.3333	38.3333												
TG4.2	3		42.8567	42.8567	42.8567	42.8567	42.8567	42.8567												
VL2.2	3		45.0000	45.0000	45.0000	45.0000	45.0000	45.0000												
TG2.4	3		49.1667	49.1667	49.1667	49.1667	49.1667	49.1667												
DT 1.3	3		50.8333	50.8333	50.8333	50.8333	50.8333	50.8333												
DT 2.2	3		50.8333	50.8333	50.8333	50.8333	50.8333	50.8333												
TG3.1	3		50.8333	50.8333	50.8333	50.8333	50.8333	50.8333												
VL1.4	3		56.0933	56.0933	56.0933	56.0933	56.0933	56.0933												
VL5.4	3		58.0933	58.0933	58.0933	58.0933	58.0933	58.0933												
DT 1.1	3		58.3333	58.3333	58.3333	58.3333	58.3333	58.3333												
DT 5.3	3		60.0000	60.0000	60.0000	60.0000	60.0000	60.0000												
DT 5.6	3		60.8333	60.8333	60.8333	60.8333	60.8333	60.8333												
DT 4.2	3		61.6667	61.6667	61.6667	61.6667	61.6667	61.6667												
DT 5.5	3		61.6667	61.6667	61.6667	61.6667	61.6667	61.6667												
TG2.1	3		61.6667	61.6667	61.6667	61.6667	61.6667	61.6667												
TG5.4	3		62.5000	62.5000	62.5000	62.5000	62.5000	62.5000												
DT 5.4	3		63.3333	63.3333	63.3333	63.3333	63.3333	63.3333												
DT 1.4	3		64.1667	64.1667	64.1667	64.1667	64.1667	64.1667												
TG5.1	3		65.0000	65.0000	65.0000	65.0000	65.0000	65.0000												
DT 3.3	3		65.8333	65.8333	65.8333	65.8333	65.8333	65.8333												
TG1.1	3		65.8333	65.8333	65.8333	65.8333	65.8333	65.8333												
VL5.3	3		67.6167	67.6167	67.6167	67.6167	67.6167	67.6167												
DT 5.2	3		72.5000	72.5000	72.5000	72.5000	72.5000	72.5000												
Sig.		1.000	1.000	.056	.103	.056	.056	.078	.130	.169	.314	.118	.060	.064	.064	.064	.060	.126	.100	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



**DAY15**

Subset for alpha = 0.05

CHUNG	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Duncan <sup>a</sup>																						
TG2.2	3	2.2967																				
TG5.2	3	2.2967																				
TG3.3	3	3.4467	3.4467																			
TG1.2	3	4.0233	4.0233	4.0233																		
TG4.1	3	4.5967	4.5967	4.5967	4.5967																	
BT 1.2	3		5.5567	5.5567	5.5567	5.5567																
TG2.3	3		6.3233	6.3233	6.3233	6.3233																
BT 2.1	3		6.6633	6.6633	6.6633	6.6633																
TG3.2	3		7.4733	7.4733	7.4733	7.4733																
VL5.1	3		15.8167	15.8167	15.8167	15.8167																
BT 4.1	3		16.1133	16.1133	16.1133	16.1133																
TG4.2	3						21.2633															
BT 5.1	3						22.7767	22.7767	22.7767													
VL4.3	3						23.7300	23.7300	23.7300													
VL2.1	3						25.8867	25.8867	25.8867													
VL1.1	3						32.2000	32.2000	32.2000													
TG2.4	3						34.4800	34.4800	34.4800													
VL1.3	3						35.0267	35.0267	35.0267													
BT 1.3	3						45.0000	45.0000	45.0000													
TG5.3	3						47.1267	47.1267	47.1267													
BT 2.2	3						50.5567	50.5567	50.5567													
TG3.1	3						55.7500	55.7500	55.7500													
VL2.2	3						57.0633	57.0633	57.0633													
BT 1.1	3						71.1133	71.1133	71.1133													
BT 4.2	3						72.7767	72.7767	72.7767													
BT 5.4	3						72.7767	72.7767	72.7767													
BT 5.6	3						72.7767	72.7767	72.7767													
BT 5.3	3						73.3300	73.3300	73.3300													
TG2.1	3						73.5633	73.5633	73.5633													
TG5.4	3						73.5633	73.5633	73.5633													
BT 5.5	3						73.8867	73.8867	73.8867													
TG1.1	3						74.1400	74.1400	74.1400													
TG5.1	3						74.1400	74.1400	74.1400													
VL5.4	3						74.5800	74.5800	74.5800													
BT 1.4	3						75.0000	75.0000	75.0000													
VL1.4	3						75.1433	75.1433	75.1433													
BT 3.3	3						76.6700	76.6700	76.6700													
VL5.3	3						77.9667	77.9667	77.9667													
BT 5.2	3						81.6700	81.6700	81.6700													
Sig.		.101	.259	.132	.090	.068	.756	.116	.319	1.000	1.000	.567	1.000	1.000	1.000	.171	.115	.053	.111	.101	.177	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## Phụ lục 9. Kết quả giải trình tự chủng vi khuẩn ĐT5.2 trên phần mềm BioEdit

```
.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....120
GGGTTGGGGGGTCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGTAACTGCCTGTAGACTGGGATAACTCCGGG

.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240
AAACCGGGGCTAATACCGGATGGTGTGTTGAAACCGCATGGTTCAAACAATAAAAGGTGGCTTCGGCTAACCACTTACAGATGGACCCCGGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTCA

.....250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....320.....330.....340.....350.....360
CCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGAC

.....370.....380.....390.....400.....410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480
GGAGCAACCGCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAGTACCCTTGAATAGGGCGGTACCTTGACCGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTA

.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....580.....590.....600
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAATGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGA

.....610.....620.....630.....640.....650.....660.....670.....680.....690.....700.....710.....720
GGGTCAATTGGAACCTGGGGAACCTTGAAGTGCAGAAAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAA

.....730.....740.....750.....760.....770.....780.....790.....800.....810.....820.....830.....840
CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCCTAA

.....850.....860.....870.....880.....890.....900.....910.....920
CGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCCAGGACTGAACTCAAAGGAAATGACCGGGGGGCCCGCAACCAAGGTCG
```

