

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

Nguyễn Bá Thọ*, Nguyễn Thị Liên, Võ Đình Quang

Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TP.HCM

*Email: nguyenbatho0705@gmail.com

Ngày nhận bài: 19/5/2020; Ngày chấp nhận đăng: 24/7/2020

TÓM TẮT

Bệnh khô cành cây cà phê là một trong những bệnh hại quan trọng tại Đắk Nông. Nghiên cứu này cho thấy kết quả phân lập 55 mẫu cà phê ở tỉnh Đắk Nông có 3 nhóm nấm chính gây bệnh khô cành khô quả, trong đó nhóm *Colletotrichum* CC1.5 có khả năng gây bệnh nhanh và mạnh. Trong 21 chủng *Bacillus* sp. phân lập ở đất rừng nguyên sinh và đất vườn cà phê khỏe mạnh tại Đắk-Nông, chủng *Bacillus subtilis* ĐR2B1 có khả năng đối kháng tốt với *Colletotrichum* CC1.5 ở phương pháp đối kháng trực tiếp 67,41% và đối kháng khuếch tán qua lỗ thạch 24,67 mm sau 6 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA. Nghiên cứu này góp phần cung cấp thêm thông tin về sử dụng vi khuẩn đối kháng trong phòng chống nấm *Colletotrichum* gây bệnh khô cành khô quả cây cà phê.

Từ khóa: Bệnh khô cành khô quả, *Bacillus* sp., *Colletotrichum* sp., cây cà phê, Đắk Nông.

1. MỞ ĐẦU

Cây cà phê (*Coffea* spp.) là cây trồng xuất khẩu chính mang lại hiệu quả kinh tế cao ở nhiều nước như Brazil, Việt Nam, Indonesia, Colombia và Ấn Độ. Có nhiều loài cà phê được trồng trên thế giới, trong đó cà phê vối (*Coffea arabica*) và cà phê chè (*Coffea robusta*) mang lại hiệu quả kinh tế cao nhất. Mặc dù, cây cà phê có giá trị kinh tế cao, nhưng sản xuất cà phê hiện nay đang bị ảnh hưởng nhiều bởi dịch bệnh. Đặc biệt bệnh khô cành khô quả trên cà phê do loài *Colletotrichum* gây ra ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng của cà phê. Các nghiên cứu trước đây cho thấy có nhiều loài *Colletotrichum* gây bệnh khô cành khô quả trên cà phê, cụ thể các loài *Colletotrichum* ảnh hưởng đến cà phê đã được công bố ở một số nước: 3 loài ở Thái Lan (*C. asianum*, *C. fructicola* và *C. siamense*), 2 loài ở Angola (*C. cuscatae* và *C. fragariae*) và một loài ở các quốc gia: Úc (*C. theobromicola*), Colombia (*C. gigasporum*), Costa Rica (*C. costarricense*), Fiji (*C. queenslandicum*) và Kenya (*C. kahawae* subsp. *kahawae*) [1-6]. Một số nghiên cứu đã xác định được nấm *Colletotrichum* sp. dựa trên hình thái vi thể, đại thể của nấm và sử dụng các phương pháp sinh học phân tử [1, 2].

Việc lạm dụng thuốc bảo vệ thực vật để phòng trừ bệnh khô cành khô quả do nấm *Colletotrichum* sp. trên cây cà phê ngày càng tăng dẫn tới nguy cơ kháng thuốc nên khó phòng trừ bệnh. Hơn nữa, sử dụng nhiều thuốc hóa học để phòng trừ bệnh cũng làm gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến sức khỏe của người nông dân và giảm giá trị nông sản xuất khẩu. Đặc biệt, dư lượng thuốc bảo vệ thực vật tồn dư trong đất nhiễm vào các nguồn nước sinh hoạt của người nông dân, làm gia tăng các bệnh hiểm nghèo ở người, như: bệnh ung thư, v.v. Chính vì vậy, để phát triển cà phê theo hướng bền vững, thân thiện với môi trường, biện pháp phòng trị bệnh khô cành do nấm *Colletotrichum* bằng vi sinh là một trong những biện pháp tối ưu nhất.

Theo một số nghiên cứu trong và ngoài nước cho thấy, việc sử dụng các chủng *Bacillus* để kiểm soát các loại nấm bệnh thực vật là biện pháp an toàn và hiệu quả được thể hiện qua các nghiên cứu về khả năng đối kháng của *Bacillus* với nấm bệnh *Colletotrichum* sp. trên cây cà phê [7], bệnh thán thư trên lá hành [8]. Do đó, việc nghiên cứu chọn lựa những chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng vi nấm *Colletotrichum* gây bệnh khô cành khô quả trên cà phê là phù hợp với hướng sản xuất cà phê an toàn.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu nấm *Colletotrichum* gây bệnh khô cành khô quả trên cà phê được phân lập từ cành, lá, trái ở các vườn cà phê bị bệnh trên địa bàn tỉnh Đắk Nông.

Các mẫu vi khuẩn đối kháng *Bacillus* được phân lập từ các mẫu đất thu thập ở các vườn cà phê khỏe mạnh, không có dấu hiệu bị bệnh và đất tại khu vực rừng nguyên sinh thuộc tỉnh Đắk Nông.

2.1.2. Môi trường sử dụng nghiên cứu

Môi trường phân lập, nuôi cấy *Colletotrichum* và thử nghiệm đối kháng: PDA (Potato Dextrose Agar): Khoai tây 200 g/L, Dextrose 20 g/L, Agar: 20 g/L, nước cất vừa đủ 1 L.

Môi trường phân lập và nuôi cấy *Bacillus*: LB (Luria-Bertani) Tryptone: 10 g, cao nấm men: 5 g, NaCl: 5 g, nước cất vừa đủ: 1 L, môi trường thạch bổ sung agar: 20 g/L. Sau cùng, các môi trường được hấp khử trùng ở 121 °C, 1,5 atm trong 15 phút.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập *Colletotrichum*

Tại mỗi địa điểm vườn cà phê, lấy 10 mẫu cho mỗi loại thân, quả non, quả chín có triệu chứng bị bệnh khô cành khô quả. Phần mẫu có triệu chứng điển hình của bệnh khô cành khô quả được cô lập để phân lập. Chọn mô thực vật mới bị bệnh để phân lập, rửa mẫu trong nước để loại bỏ bụi và các tạp chất khác. Khử trùng bề mặt bằng ethanol 75%, sau đó rửa lại 3 lần với nước cất vô trùng, để khô trên giấy vô trùng. Dùng dụng cụ được khử trùng cắt những miếng nhỏ 5×5 mm từ phần ranh giới giữa mô khỏe và mô bệnh, sau đó cấy lên môi trường PDA, ủ ở nhiệt độ 25-28 °C trong tối. Kiểm tra đĩa cấy hằng ngày, khi các tán nấm phát triển từ những mẫu nhiễm bệnh, cấy truyền chúng sang môi trường PDA mới. Quan sát vi thể đại thể ở vật kính 40X để xác định nấm *Colletotrichum*. Mẫu nấm nghi ngờ *Colletotrichum* được lưu trữ trong glycerol 25% ở -80 °C và trong các ống thạch nghiêng PDA.

2.2.2. Phương pháp thử nghiệm khả năng gây bệnh của chủng *Colletotrichum* sp. phân lập được

Nuôi cấy nấm bệnh *Colletotrichum* trên môi trường PDA (ủ trong tối ở nhiệt độ 25-28 °C) khoảng 7-10 ngày, sau đó ly tâm 8000 vòng/phút thu sinh khối, hòa tan bào tử và đưa về mật độ 10⁶ CFU/mL. Chọn trái cà phê khỏe mạnh rửa dưới vòi nước chảy, sau đó để khô. Đặt miếng giấy lọc tiệt trùng và 2 miếng lam kính tiệt trùng vào đĩa petri đã được khử trùng. Sau đó, giấy lọc được làm ẩm bằng nước cất vô trùng. Quả cà phê khỏe được tạo vết thương bằng kim tiêm vô trùng và đặt trên lam kính trong đĩa petri. Tiến hành phun dịch treo bào tử của vi nấm *Colletotrichum* ở nồng độ 5×10⁶ CFU/mL lên bề mặt trái cà phê, ủ trong 2 tuần ở nhiệt độ phòng. Nghiệm thức đối chứng tiến hành phun nước cất vô trùng [9].

Ghi nhận kết quả: Quan sát hằng ngày và đánh giá biểu hiện bệnh trên đoạn thân cây và quả được gây bệnh và so sánh các đặc điểm của bệnh trong tự nhiên. Chọn mẫu nấm có khả

năng gây bệnh tương tự mô tả ngoài tự nhiên để tiếp tục nghiên cứu. Tính tỷ lệ gây bệnh: $TLB(\%) = \text{Số quả bệnh}/\text{tổng số quả} \times 100$.

2.2.3. Phương pháp phân lập *Bacillus*

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

2.2.4. Phương pháp đối kháng giữa *Bacillus* và *Colletotrichum*

Thử nghiệm đối kháng trực tiếp bằng cách cấy kép [8, 10, 11]. Nấm bệnh được cấy vào đĩa petri chứa môi trường PDA và ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 ngày. Sau 2 ngày tiến hành cấy vi khuẩn, xạ khuẩn lên bề mặt đĩa nấm đã ủ, chia đĩa làm 4 phần, dùng que cấy chủng vi khuẩn hoặc xạ khuẩn lên 3 điểm (1 điểm không cấy dùng làm đối chứng) trên đĩa cách bìa sợi nấm 1,5 cm. Sau 5 ngày quan sát sự hình thành vùng kháng nấm và tính hiệu suất ức chế sự phát triển của sợi nấm bởi vi khuẩn và xạ khuẩn theo công thức:

$$H = (R - r) / R \times 100$$

Trong đó: H là hiệu suất đối kháng của vi khuẩn (%), R là bán kính của hệ sợi nấm đối chứng (cm), r là bán kính của hệ sợi nấm trên đĩa có chủng vi khuẩn.

Với phương pháp khuếch tán qua lỗ thạch, khả năng đối kháng sau 4 ngày thử nghiệm được đánh giá thông qua kích thước vòng đối kháng (vòng tròn trong suốt bao quanh khuẩn lạc), tính bằng mm theo công thức:

$$\text{Kích thước vòng đối kháng} = D - d.$$

Trong đó: D (mm) là đường kính vòng đối kháng; d (mm) là đường kính khuẩn lạc.

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần đối với mỗi chủng vi khuẩn cần chọn lọc.

2.2.5. Phương pháp định danh các nấm *Colletotrichum* và vi khuẩn *Bacillus* bằng sinh học phân tử

Đối với nấm *Colletotrichum* được định danh bằng phương pháp giải trình tự với cặp mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Chu trình phản ứng PCR gồm: bước biến tính 5 phút ở 95 °C, sau đó là 35 chu kỳ ở (1) biến tính 95 °C, 30 giây; (2) bắt cặp, 55 °C, 30 giây; (3) kéo dài 72 °C, 1 phút và bước cuối cùng là 10 phút ở 72 °C.

Chủng vi khuẩn *Bacillus* được định danh bằng phương pháp định danh với cặp mồi 16S rDNA (16sF: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 16sR: 5'-AAGGAGGTGATCCAACC-3'). Chu trình phản ứng PCR gồm: bước biến tính 2 phút ở 94°C, sau đó là 30 chu kỳ ở (1) biến tính 94 °C, 1 phút; (2) bắt cặp, 58 °C, 1 phút; (3) kéo dài 72 °C, 1 phút 20 giây và bước cuối cùng là 10 phút ở 72 °C.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân lập và sàng lọc chủng vi nấm *Colletotrichum*

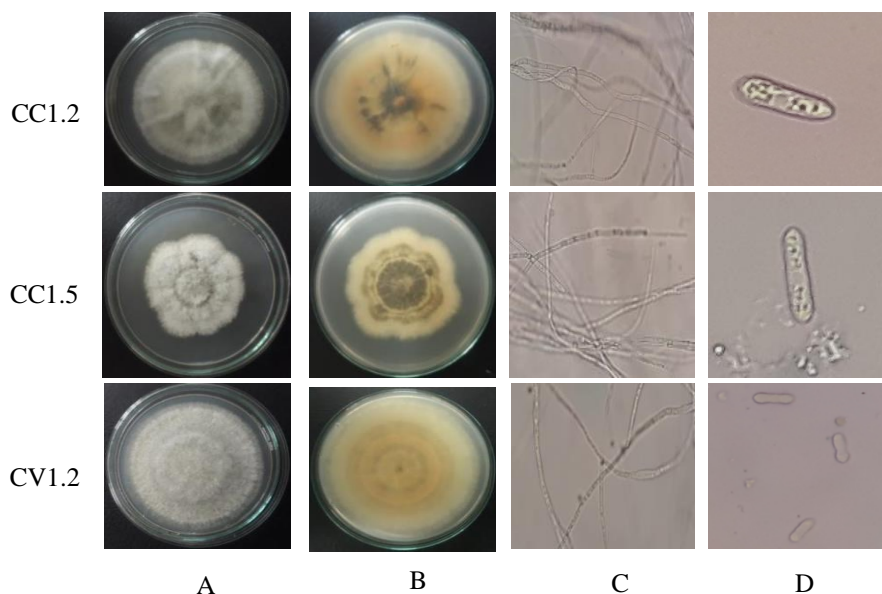
3.1.1. Phân lập và làm thuần

Từ các mẫu cà phê bị bệnh khô cành khô quả thu được, tiến hành phân lập nấm *Colletotrichum* trên môi trường PDA và tuyển chọn các dòng có đặc điểm của nấm *Colletotrichum*

theo mô tả của Stephen & Rebecca năm 1991 [12]. Sự khác biệt của các chủng nấm phân lập được sau 7 ngày nuôi cấy trên PDA, về hình thái đại thể, màu sắc, hình dạng bào tử và tốc độ phát triển của các chủng nấm phân lập được cho phép chia chúng thành 3 nhóm (Bảng 1). Hình thái nấm (Hình 1 A-B) của nhóm 1 (đại diện là chủng CC 1.2): đường kính tản nấm 68-72 mm, tơ nấm trên không dày, khuẩn lạc ban đầu chỉ có màu xám ở trung tâm, tơ nấm mới có màu trắng, sau 7 ngày nuôi thì toàn bộ khuẩn lạc có màu xám, bề mặt thạch môi trường chứa khuẩn lạc có màu cam, có xuất hiện những khu vực màu đen nằm rải rác trong khu vực màu cam; Nhóm 2 (đại diện là chủng CC 1.5): đường kính tản nấm 45-50 mm, khuẩn lạc có màu từ trắng đến xám đen, có xuất hiện vòng đồng tâm, vòng phát triển không tròn đều nhìn thấy rõ ở 2 mặt đĩa, khuẩn ty cơ chất tạo các vòng tròn đồng tâm và các sắc tố màu đen, sau 10 ngày nuôi cấy có xuất hiện hạt dầu bên trong tản nấm (Hình 2); Nhóm 3 (đại diện là chủng CV1.2): đường kính tản nấm 75-77 mm, tơ nấm trên không dày, khuẩn lạc có màu trắng đến xám đen, bề mặt thạch môi trường chứa khuẩn lạc có màu cam nhạt xen kẽ là các vòng tròn đồng tâm màu đen rõ ràng. Quan sát bào tử của 3 nhóm nấm (Hình 1D) dưới kính hiển vi quang học ở vật kính 40X cho thấy bào tử hình thoi đến elip, không có vách ngăn, các đặc điểm trên phù hợp với miêu tả của Damm và cộng sự năm 2012 về bào tử nấm *Colletotrichum* sp. [13].

Bảng 1. Đặc điểm hình thái của nhóm nấm *Colletotrichum* phân lập được

Tên chủng nấm	Đặc điểm đại thể của nấm	Đường kính nấm sau 7 ngày
<i>Colletotrichum</i> nhóm 1 (CC1.2)	Tơ nấm có màu xám, bề mặt thạch môi trường chứa khuẩn lạc có màu cam, có xuất hiện những khu vực màu đen nằm rải rác.	68-72 mm
<i>Colletotrichum</i> nhóm 2 (CC1.5)	Khuẩn lạc có màu từ trắng đến xám đen, có xuất hiện vòng đồng tâm, vòng phát triển không tròn đều, khuẩn ty cơ chất tạo các vòng tròn đồng tâm và các sắc tố màu đen	45-50 mm
<i>Colletotrichum</i> nhóm 3 (CV1.2)	Khuẩn lạc có màu trắng đến xám đen, bề mặt thạch môi trường chứa khuẩn lạc có màu cam nhạt xen kẽ là các vòng tròn đồng tâm màu đen rõ ràng.	75-77 mm



Hình 1. Đặc điểm hình thái của các chủng nấm *Colletotrichum* phân lập được. (A) Mặt trên đĩa petri; (B) Mặt dưới đĩa petri của các chủng nấm trên môi trường PDA sau 7 ngày nuôi cấy ở 28 °C; (C) Sợi nấm; (D) Bào tử phân sinh nấm quan sát ở vật kính 40X.

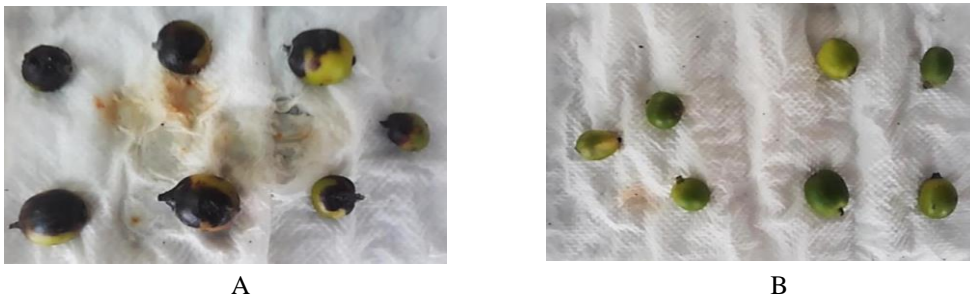


Hình 2. Hạt dầu hình thành trên tán nấm của mẫu CC1.5 sau 10 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 28 °C trên môi trường PDA

3.1.2. Khả năng gây bệnh của chủng *Colletotrium* phân lập được trong quy mô phòng thí nghiệm

Với đặc điểm gây bệnh mạnh trên trái cà phê non nên trong thử nghiệm gây bệnh sẽ được tiến hành trên trái. Cả 3 chủng nấm bệnh được tiến hành thử nghiệm khả năng gây bệnh trên quả cà phê xanh bằng phương pháp tiêm dịch nấm bệnh với nồng độ 5×10^6 CFU/mL vào quả cà phê và thường xuyên cấp ẩm. Kết quả thí nghiệm cho thấy, chỉ sau 7 ngày gây bệnh tại vị trí tiêm có xuất hiện những vết lõm sâu, màu nâu. Đến thời điểm 14 ngày sau khi tiêm gây bệnh vết bệnh lõm sâu, nâu sẫm cho đến đen gần $\frac{3}{4}$ quả, rất nhiều mẫu đen và khô cả quả. Trong khi đó, ở thí nghiệm đối chứng vẫn không quan sát thấy hiện tượng nhiễm bệnh sau 14 ngày tiêm (Hình 3).

Tỷ lệ bệnh đối với từng chủng nấm sau 14 ngày được thể hiện qua Bảng 2. Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, tỷ lệ bệnh trên quả tăng theo thời gian. Tại thời điểm sau 7 ngày tiêm gây bệnh tỷ lệ bệnh từ 76,19-100%, trong đó chủng ký hiệu CC1.5 tỷ lệ gây bệnh đạt 100%. Sau 14 ngày tiêm, cả 3 chủng đều có tỷ lệ gây bệnh trên quả cà phê là 100%. Nghiệm thức đối chứng tiêm nước vô trùng qua 14 ngày không có hiện tượng bệnh. Kết quả trên cho thấy, cả 3 chủng nấm bệnh phân lập đều có khả năng gây bệnh với những đặc điểm của bệnh khô cành khô quả trên cà phê, trong đó chủng CC1.5 cho khả năng gây độc cao và nhanh.



Hình 3. Kết quả thử nghiệm khả năng gây bệnh của nấm *Colletotrichum* phân lập được lên quả cà phê sau 14 ngày.

A: Quả cà phê được tiêm gây bệnh bằng nấm; B: Quả cà phê được tiêm bằng nước vô trùng.

Bảng 2. Tỷ lệ bệnh trên quả cà phê theo thời gian sau khi lây nhiễm các chủng CC1.2; CC1.5; CV1.2

Nghiệm thức	Tỷ lệ bệnh trên quả cà phê (%)	
	Sau 7 ngày	Sau 14 ngày
Đối chứng	0,00 ^a	0,00 ^a
CC1.5	100 ^e	100 ^d
CC1.2	76,19 ^{cd}	100 ^d
CV1.2	85,71 ^d	100 ^d

(^{abcd}: Các ký tự theo hàng dọc khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa $p \leq 0,05$)

Định danh 3 chủng nấm bằng cặp mồi ITS1/ITS4 đều cho ra kết quả là chủng nấm *Collectotrichum* sp. Chủng *Colletotrichum* CC1.5 được dùng cho các thử nghiệm đối kháng về sau.

3.2. Phân lập và chọn lọc vi khuẩn *Bacillus* có khả năng đối kháng tốt với chủng nấm *Colletotrichum* CC1.5 trên môi trường PDA

Từ các mẫu đất thu được đã phân lập được 21 chủng có đặc điểm hình thái khuẩn lạc giống với *Bacillus* như: khuẩn lạc tròn, có màu trắng trong, trắng đục, vàng đậm, vàng nhạt, rìa tròn đều, lượn sóng hoặc răng cưa (Hình 4).



Hình 4. Hình ảnh khuẩn lạc chủng *Bacillus* trên môi trường LB

Đối kháng với chủng vi khuẩn *Bacillus*

Khả năng đối kháng nấm *Colletotrichum* gây bệnh khô cành khô quả trên cà phê của các chủng *Bacillus* tuyển chọn được xác định thông qua hiệu quả ức chế (phương pháp đối kháng trực tiếp) và xác định kích thước vòng kháng khuẩn (phương pháp khuếch tán trên lỗ thạch). Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Khả năng đối kháng của một số chủng *Bacillus* tuyển chọn có tiềm năng kháng nấm *C. coffeanum* gây bệnh khô cành khô quả trên cây cà phê (hiệu quả ức chế nấm bệnh sau 6 ngày > 23% và kích thước vòng kháng khuẩn > 11mm).

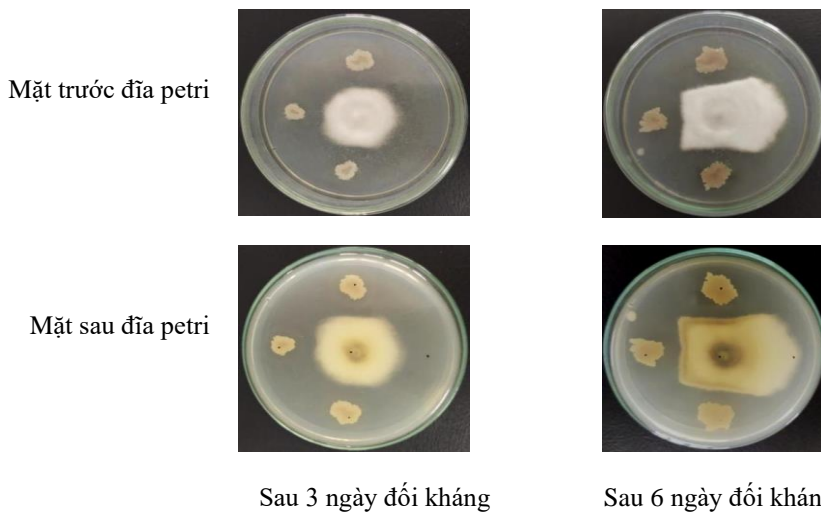
STT	Phương pháp đối kháng trực tiếp			Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch
	Tên chủng	Hiệu quả ức chế sau 3 ngày (%)	Hiệu quả ức chế sau 6 ngày (%)	$(\overline{D} - \overline{d})$ mm
1	ĐR2B1	38,88 ^a	67,41 ^a	24,67 ^a
2	ĐV3B1	34,37 ^{bcd}	62,33 ^{ab}	21,90 ^c
3	ĐV4B1	35,33 ^{bc}	65,56 ^{ab}	23,20 ^b
4	ĐV4B2	35,08 ^{bcd}	61,85 ^b	21,03 ^c
5	ĐV4B3	35,05 ^{bcd}	62,22 ^b	21,67 ^c
6	ĐV5B1	35,08 ^{bcd}	47,41 ^c	19,23 ^d
7	ĐV10B3	34,83 ^{bcd}	48,15 ^c	19,53 ^d
8	ĐR1B1	35,09 ^{bcd}	37,78 ^{def}	16,90 ^e
9	ĐR1B2	34,37 ^{bcd}	40,37 ^{de}	17,10 ^e
10	ĐR1B3	35,02 ^{bcd}	37,41 ^{efg}	15,17 ^f
11	ĐR1B4	34,34 ^{bcd}	39,26 ^{de}	17,03 ^e
12	ĐR2B2	36,29 ^b	42,60 ^d	17,23 ^e
13	ĐR2B3	33,57 ^{bcd}	34,07 ^{fgh}	15,30 ^f
14	ĐR2B4	35,04 ^{bcd}	31,11 ^{hi}	14,60 ^{fg}
15	ĐR3B1	33,83 ^{bcd}	33,33 ^{fgh}	15,50 ^f

STT	Phương pháp đối kháng trực tiếp			Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch
	Tên chủng	Hiệu quả ức chế sau 3 ngày (%)	Hiệu quả ức chế sau 6 ngày (%)	$(D - d)$ mm
16	ĐR3B2	32,32 ^d	32,60 ^{ghi}	15,27 ⁱ
17	ĐR4B1	33,57 ^{bcd}	32,96 ^{fghi}	15,10 ^f
18	ĐR4B4	33,78 ^{bcd}	28,12 ^{ik}	13,07 ^{hi}
19	ĐR5B1	34,50 ^{bcd}	31,11 ^{hi}	13,53 ^{gh}
20	ĐV9B4	33,10 ^{cd}	33,33 ^{fgh}	14,47 ^{fg}
21	ĐV10B1	27,30 ^e	23,70 ^k	11,83 ⁱ

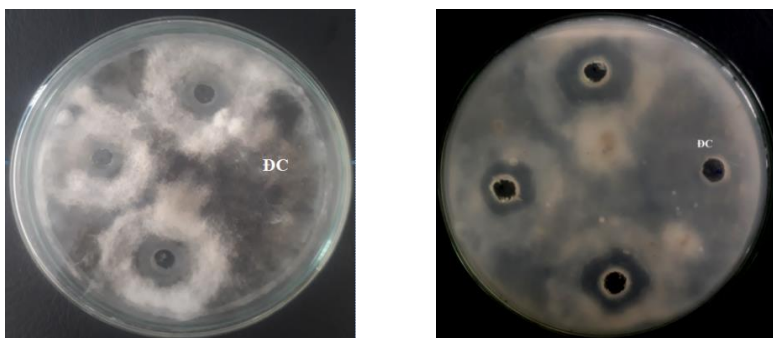
(^{abc...}: Các ký tự theo hàng dọc khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa $p \leq 0,05$)

Tất cả các mẫu vi khuẩn *Bacillus* phân lập được đều có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* CC1.5, tuy nhiên, mức độ đối kháng khác nhau. Quan sát kết quả đối kháng trực tiếp sau 3 ngày theo dõi cho thấy chưa có sự tiếp xúc giữa *Bacillus* và *Colletotrichum* CC1.5, đường kính vòng nấm bệnh ở đĩa đối chứng và đĩa đối kháng không chênh lệch đáng kể (Hình 5). Sau 3 ngày quan sát thấy đã xuất hiện vòng kháng khuẩn xung quanh khuẩn lạc *Bacillus*, hiệu quả ức chế dao động từ 27,30% đến 38,88%. Sau 6 ngày theo dõi vòng kháng khuẩn xung quanh khuẩn lạc rõ hơn (Hình 5), hiệu quả ức chế dao động 23,70-67,41%. Trong 21 chủng *Bacillus* được thử nghiệm khả năng đối kháng trực tiếp với nấm *Colletotrichum* CC1.5 thì có các chủng ĐR2B1, ĐV4B1 và ĐV3B1 có hiệu quả đối kháng cao lần lượt là 67,41%; 65,56% và 62,33%.

Phương pháp đối kháng trực tiếp chỉ cho biết chủng khảo sát có đối kháng hay không mà không biết rõ các chủng thử nghiệm đối kháng có phải do sinh các hợp chất kháng khuẩn hay do cạnh tranh dinh dưỡng. Trong khi đó, phương pháp khuếch tán trên lỗ thạch cho biết được các chủng nào có khả năng sinh chất đối kháng với nấm bệnh *Colletotrichum*. Vòng vô khuẩn xung quanh lỗ thạch chứng tỏ chủng có tiết chất kháng khuẩn ức chế khả năng sinh trưởng của *Colletotrichum* (Hình 6). Đường kính vòng vô khuẩn $(D - d)$ càng lớn thì khả năng sinh ra chất kháng nấm *Colletotrichum* càng cao. Kết quả đối kháng qua lỗ thạch được thể hiện ở Bảng 3 cho thấy có 2 chủng ĐR2B1 và ĐV4B1 cho vòng kháng khuẩn cao lần lượt là 24,67 mm và 23,20 mm.



Hình 5. Đối kháng giữa chủng *Bacillus subtilis* ĐR2B1 với nấm *Colletotrichum* CC1.5 trên môi trường PDA ở 28 °C, theo thời gian



Hình 6. Khả năng ức chế sự phát triển nấm *Colletotrichum* CC1.5 của một số chủng *Bacillus* bằng phương pháp phương pháp khuếch tán trên lỗ thạch

Trong số 21 chủng *Bacillus* sp. được đánh giá khả năng ức chế sự phát triển của *Colletotrichum* cho thấy, chủng ĐR2B1 có khả năng đối kháng cao với nấm *Colletotrichum* CC1.5 ở cả 2 phương pháp đối kháng trực tiếp và đối kháng khuếch tán qua lỗ thạch. Kết quả phân tích trình tự rRNA 16S và so sánh trình tự trên NCBI-Blast cho thấy chủng ĐR2B1 là chủng *Bacillus subtilis* với mức độ tương đồng là 99,0%.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã phân lập được 3 chủng nấm *Colletotrichum* gây bệnh khô cành khô quả trên cây cà phê ở tỉnh Đắk Nông. Triệu chứng bệnh có thể biểu hiện trong 7 ngày.

Trong số 21 chủng *Bacillus* phân lập được tại đất rừng nguyên sinh và đất vườn ở tỉnh Đắk Nông, chủng *Bacillus* ĐR2B1 có khả năng đối kháng cao với nấm *Colletotrichum* CC1.5 sau 6 ngày nuôi cấy ở cả 2 phương pháp đối kháng trực tiếp và đối kháng gián tiếp lần lượt là 67,41% và 24,67 mm. Phân tích trình tự 16S- rRNA và so sánh trình tự trên NCBI-Blast cho thấy chủng ĐR2B1 là chủng *Bacillus subtilis*. Với khả năng đối kháng cao với nấm *Colletotrichum* gây bệnh khô cành và khô quả cây cà phê, chủng vi khuẩn *B. subtilis* phân lập được trong nghiên cứu này có thể được sử dụng để nghiên cứu thêm về khả năng phòng chống bệnh ngoài thực địa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Damm U., Cannon P.F., Woudenberg J.H.C., Crous P.W. - The *Colletotrichum acutatum* species complex, *Studies in Mycology* **73** (1) (2012) 37-113.
2. Damm U., Cannon P.F., Woudenberg J.H.C., Johnston P.R., Weir B.S., Tan Y.P., Shivas R.G., Crous P.W. - The *Colletotrichum boninense* species complex, *Studies in Mycology* **73** (1) (2012) 1-36.
3. Prihastuti H., Cai L., Chen H., McKenzie E.H.C., Hyde K.D. - Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand, *Fungal Divers* **39** (2009) 89-109.
4. Rakotoniriana E.F., Scauflaire J., Rabemanantsoa C., UrvegRatsimamanga S., Corbisier A.M., Quetin-Leclercq J., Declerck S., Munaut F. - *Colletotrichum gigasporum* sp. nov., a new species of *Colletotrichum* producing long straight conidia, *Mycol. Prog* **12** (2013) 403-412.
5. Silva D.N., Várzea V., Cai L., Salgueiro P.O., Batista D. - Application of the *Apn2/MAT* locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides*

- complex: an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts, *Mycologia* **104** (2) (2012) 396-409.
6. Weir B.S., Johnston P.R., Damm U. - The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex, *Stud Mycol* **73** (3) (2012) 115-180.
 7. Kejela V.R., Thakkar P., Thakor T. - *Bacillus* species (BT42) isolated from *Coffea arabica* L. rhizosphere antagonizes *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* and also exhibits multiple plant growth promoting activity, *BMC Microbiol* **16** (1) (2012) 1-13.
 8. Nguyễn Thị Liên, Hà Trọng Nhân, Trần Thị Xuân Mai, Nguyễn Thị Pha, Nguyễn Lan Minh - Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên hành lá, *Tạp chí Khoa học Đại học Đồng Tháp* **26** (2017) 104-110.
 9. Song Jiaojiao, Pongnak Wattanachai, Soyong Kasem - Biological activity of endophytic fungi from palm trees against chili anthracnose caused by *Colletotrichum capsici*, *Journal of Agricultural Technology* **11** (8) (2015) 1927-1940.
 10. Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Thị Yến Như, Trần Thị Xuân Mai, Nguyễn Thị Pha - Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn từ đất vùng rễ ớt có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên ớt, *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ* **47** (2016) 16-23.
 11. Nguyễn Thị Pha, Nguyễn Thị Phương Oanh, Nguyễn Hữu Hiệp - Khả năng đối kháng nấm *Pyricularia oryzae* của vi khuẩn sinh chitinase phân lập từ đất vùng rễ lúa, *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ* **31** (2014) 7-11.
 12. Stephen A. Ferreira, Rebecca A. Boley - *Colletotrichum coffeanum*, University of Hawaii at Manoa, *Journal of Crop Knowl Master* (1991).
 13. Damm U., Cannon P.F., Crous P.W. - *Colletotrichum*: complex species or species complexes, *Studies in Mycology* **73** (2012) 1-215.

ABSTRACT

ISOLATION OF SEVERAL ANTAGONISTIC *Bacillus* sp. SPECIES AGAINST COFFEE BERRY DISEASE BY *Colletotrichum* sp. IN DAK NONG PROVINCE

Nguyen Ba Tho*, Nguyen Thi Lien, Vo Dinh Quang
Branch of National Center for Technological Progress in HCM City
*Email: nguyenbatho0705@gmail.com

The diseases of dried branches and dried fruits are dangerous for coffee plants. Results of isolating 55 coffee samples in Dak Nong province with 3 main groups of fungi causing dried branches and dried fruits showed that *Colletotrichum* CC1.5 group has the ability to cause fast and strong disease. Among these 21 strains of *Bacillus* sp. isolated in primary forest land and healthy coffee garden land in Dak Nong, *Bacillus subtilis* strain ĐR2B1 has good resistance to *Colletotrichum* CC1.5 in the direct antagonistic method of 67.41% and diffuse through the 24.67 mm agar after 6 days of culture on PDA. This study provides more further information on antagonistic bacteria for controlling *Colletotrichum* causing dried branches and dried fruits of coffee plants.

Keywords: *Bacillus* sp., coffee berry disease, coffee plant, *Colletotrichum* sp., Dak Nong province.