

Phân lập, tuyển chọn chủng *Streptomyces* sp. và vi nấm *Trichoderma* sp. đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 gây bệnh khô cành, khô quả trên cây cà phê ở tỉnh Đắk Nông

Nguyễn Bá Thọ*, Trương Minh Ngọc, Đỗ Thị Mai Trinh, Nguyễn Đào Thanh Hương, Lê Thanh Bình, Nguyễn Thị Liên, Hồ Thị Nguyệt, Lê Thị Huyền

Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 4/7/2022; ngày chuyển phản biện 8/7/2022; ngày nhận phản biện 21/7/2022; ngày chấp nhận đăng 26/7/2022

Tóm tắt:

Bệnh thán thư (Anthracnose) hay còn gọi là bệnh khô cành, khô quả là một trong những bệnh gây hại nghiêm trọng trên cây cà phê. Phòng trừ bệnh khô cành, khô quả trên cây cà phê bằng biện pháp sinh học là giải pháp cần thay thế trong việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật hóa học. Nghiên cứu được tiến hành nhằm tuyển chọn được chủng *Streptomyces* và *Trichoderma* có khả năng đối kháng mạnh với vi nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 gây bệnh khô cành, khô quả trên cây cà phê. Kết quả nghiên cứu đã tuyển chọn được 1 chủng xạ khuẩn ĐR9S2 có khả năng đối kháng cao với vi nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 sau 8 ngày bằng phương pháp đối kháng trực tiếp và khuếch tán qua lỗ thạch, hiệu quả đối kháng và vòng vô khuẩn đạt lần lượt là 71,85% và 28,63 mm; 1 chủng nấm *Trichoderma* ĐR10T8 có hiệu quả đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 sau 5 ngày là 100%. Kết quả phân tích trình tự gen của chủng xạ khuẩn ĐR9S2 là *Streptomyces hiroshimensis* và vi nấm ĐR10T8 là *Trichoderma viride*.

Từ khóa: bệnh thán thư, cà phê, *Colletotrichum*, *Streptomyces*, *Trichoderma*.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Cà phê (*Coffea* spp.) là cây trồng chủ lực của Việt Nam, dù vậy sản xuất cà phê đang chịu nhiều ảnh hưởng của dịch bệnh, trong đó bệnh khô cành, khô quả trên cây cà phê do nấm *Colletotrichum* sp. gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng của cà phê. Một số nghiên cứu đã ghi nhận có nhiều loài *Colletotrichum* gây bệnh khô cành, khô quả trên cà phê, như: *C. asianum*, *C. fructicola*; *C. siamense*, *C. cuscatae*, *C. fragariae*, *C. theobromicola*, *C. gigasporum*, *C. costaricense*, *C. queenslandicum*... [1-6].

Để hạn chế và phòng trừ bệnh do nấm *Colletotrichum* sp. trên cây cà phê người nông dân đã sử dụng thuốc bảo vệ thực vật hóa học, biện pháp này có hiệu quả nhanh trong kiểm soát bệnh, tuy vậy biện pháp này không bền vững, gây ảnh hưởng xấu đến môi trường và sức khỏe người nông dân, giảm giá trị xuất khẩu cà phê. Để phát triển cây cà phê bền vững, an toàn với môi trường, thì biện pháp sinh học đang được quan tâm, trong đó sử dụng vi sinh vật là một trong những biện pháp hiệu quả nhất.

Nghiên cứu chủng xạ khuẩn *Streptomyces* và nấm *Trichoderma* đối kháng với nấm bệnh rất có triển vọng do chúng đều có khả năng tiết các sản phẩm hữu cơ kháng nấm bệnh [7, 8]. Nghiên cứu của A.C.F. Soares và cs (2006) [9] đã phân lập được chủng *Streptomyces* có khả năng đối kháng với nấm *Curvularia eragrostides* và *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh trên cây khoai mỡ. Các chủng *Streptomyces* phân lập ở Kenya đã được chứng minh có khả năng đối kháng với nấm *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* spp. và *Colletotrichum kahawae* gây bệnh trên cây trồng [10]. Kết quả nghiên cứu vi nấm *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachyatum* của A.J. Deshmukh và cs (2010) [11] đã xác định các chủng nấm trên là một tác nhân

kiểm soát sinh học hiệu quả trong việc quản lý bệnh thán thư trên cây trồng do nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây ra. Dịch môi trường nuôi cấy của chủng vi nấm *Trichoderma pseudokoningii* có hiệu quả đối kháng với nấm bệnh *Colletotrichum capsici* (65,01%), *Sclerotinia sclerotiorum* (62,82%), *Rhizoctonia solani* (50,22%) và *Fusarium oxysporum* (34,53%) [12]. Do đó, nghiên cứu nhằm chọn lựa những chủng *Streptomyces* và nấm *Trichoderma* có khả năng kiểm soát mạnh với vi nấm *Colletotrichum* gây bệnh khô cành, khô quả trên cà phê đã được thực hiện.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Chủng vi nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 gây bệnh khô cành, khô quả trên cây cà phê được phân lập trên mẫu bệnh thu nhận tại tỉnh Đắk Nông [13].

Các chủng xạ khuẩn *Streptomyces* và nấm *Trichoderma* được phân lập từ 18 mẫu đất thu thập từ các vườn cà phê khỏe mạnh và đất tại khu vực rừng nguyên sinh Tà Đùng, tỉnh Đắk Nông.

Phương pháp nghiên cứu

Phân lập và sàng lọc các chủng có khả năng là xạ khuẩn *Streptomyces*: Các mẫu đất được pha loãng trong nước muối 0,85% được khử trùng đến các nồng độ khác nhau từ 10^{-1} đến 10^{-6} . Cây trái mẫu ở các nồng độ pha loãng trên đĩa petri có chứa môi trường Gause-1 [14]. Nuôi ở nhiệt độ 30°C trong vòng 4-7 ngày để thu được các khuẩn lạc riêng lẻ. Trên mỗi mẫu đất, khuẩn lạc của xạ khuẩn được cấy 3 lần lặp lại sang đĩa Petri chứa môi trường Gause-1 để làm thuần. Xác nhận dòng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. dựa trên các đặc điểm hình thái và vi thể của các dòng xạ khuẩn phân lập.

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenthatho0705@gmail.com

Isolation and selection of *Streptomyces* sp. species and *Trichoderma* sp. species against coffee berry disease by *Colletotrichum* sp. CC1.5 in Dak Nong province

Ba Tho Nguyen*, Minh Ngoc Truong, Thi Mai Trinh Do, Dao Thanh Huong Nguyen, Thanh Binh Le, Thi Lien Nguyen, Thi Nguyet Ho, Thi Huyen Le

National Center for Technological Progress, Ho Chi Minh Branch

Received 4 July 2022; accepted 26 July 2022

Abstract:

Anthraco-nose is one of the serious diseases on coffee trees. Prevention of coffee berry disease on coffee trees by biological measures is an alternative solution to the use of chemical pesticides. The study aims to select strains of *Streptomyces* and *Trichoderma* with strong antagonistic ability against *Colletotrichum* sp. CC1.5 fungus causing coffee berry disease. Results revealed that an actinomycete strain DR92S showed a high ability to antagonize *Colletotrichum* sp. CC1.5 after 8 days by direct antagonism and diffusion through agar holes, with the antagonism efficiency and inhibition zone of 71.85% and 28.63 mm, respectively. A strain of *Trichoderma* DR10T8 showed 100% inhibitory effects against *Colletotrichum* sp. CC1.5 after 5 days of treatment. The gene sequence analyses exhibited that the closest genetic relationships of the actinomycete strain DR9S2 and the fungal strain DR10T8 were *Streptomyces hiroshimensis* and *Trichoderma viride*, respectively.

Keywords: Anthracnose, *coffea* spp., *Colletotrichum*, *Streptomyces*, *Trichoderma*.

Classification number: 4.6

Phương pháp đối kháng trực tiếp: Được thực hiện theo mô tả của D. Dhanasekaran và cs (2012) [15]. Quan sát sự hình thành vùng kháng nấm sau 4 và 8 ngày nuôi cấy. Hiệu suất ức chế của xạ khuẩn đến sự phát triển của vi nấm theo công thức sau:

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

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

Phương pháp đối kháng gián tiếp: Nuôi cấy lắc 100 vòng/phút chủng *Streptomyces* trên môi trường lỏng Gause 1 ở nhiệt độ 30°C. Sau đó ly tâm (8.000 vòng/phút trong 5 phút) để loại bỏ sinh khối thu dịch nổi. Nuôi cấy nấm bệnh *Colletotrichum* sp. CC1.5 trong môi trường PDA lỏng, pha loãng để đạt nồng độ 10^5 CFU/ml. Hút 100 µl dịch nuôi cấy chứa *Colletotrichum* sp. CC1.5 trải đều trên đĩa petri chứa môi trường PDA. Tạo những giếng nhỏ có đường kính 8 mm. Nhỏ 100 µl dịch nuôi cấy các chủng *Streptomyces* đối kháng đã

loại sinh khối. Ủ đĩa ở 4°C trong 15 phút, cho dịch trong giếng khuếch tán. Sau đó ủ ở nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 7 ngày cho nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 phát triển. Chủng xạ khuẩn nếu có khả năng sinh ra chất kháng khuẩn để ức chế *Colletotrichum* sp. CC1.5 sẽ xuất hiện vòng kháng khuẩn xung quanh lỗ thạch. Đo kích thước vòng vô khuẩn xung quanh giếng.

Kích thước vòng vô khuẩn = D-d.

trong đó, D là đường kính vòng đối kháng (mm); d là đường kính lỗ (mm).

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

Phân lập và sàng lọc các chủng có khả năng là vi nấm *Trichoderma*: Các mẫu đất được sấy khô ở 50°C trong 48 giờ, sau đó được pha loãng trong nước muối 0,85% được khử trùng đến các nồng độ khác nhau từ 10^{-1} đến 10^{-6} . Lấy 0,5 ml dung dịch pha loãng nhỏ lên trên đĩa môi trường chứa môi trường PDA và ủ ở 28°C trong 72 giờ. Chọn những tảo nấm rời, có hình thái đặc trưng của nấm *Trichoderma* cấy chuyển sang môi trường PDA mới [16].

Phương pháp đối kháng trực tiếp: Cấy nấm bệnh *Colletotrichum* sp. CC1.5 và các chủng vi nấm *Trichoderma* tiềm năng trên 2 điểm đối xứng nhau qua tâm đĩa petri, các điểm cấy cách mép đĩa 1,5 cm. Đối chứng là đĩa chỉ được cấy riêng nấm bệnh, ủ ở nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Theo dõi sự phát triển của nấm đối kháng với nấm bệnh sau 3-5 ngày ở nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Hiệu suất ức chế của chủng vi nấm *Trichoderma* sp. đến sự phát triển của nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 theo công thức sau:

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

trong đó: H là hiệu suất đối kháng của vi nấm *Trichoderma* (%); R là bán kính của hệ nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 (cm); r là bán kính của vi nấm *Trichoderma* trên đĩa có chủng vi nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 (cm).

Phương pháp đối kháng gián tiếp: Nuôi cấy lắc (100 vòng/phút) chủng vi nấm tiềm năng trên môi trường PDA lỏng trong 8 ngày. Sau đó ly tâm (8.000 vòng/phút trong 5 phút) để loại bỏ sinh khối thu dịch nổi. Nuôi cấy nấm bệnh *Colletotrichum* sp. CC1.5 trong môi trường PDA lỏng, pha loãng để đạt nồng độ 10^5 CFU/ml. Hút 100 µl dịch nuôi cấy chứa *Colletotrichum* sp. CC1.5 trải đều trên đĩa petri chứa môi trường PDA. Tạo những giếng nhỏ có đường kính 8 mm. Nhỏ 100 µl dịch nuôi cấy các chủng vi nấm đối kháng đã loại sinh khối. Ủ đĩa ở 4°C trong 15 phút cho dịch trong giếng khuếch tán. Sau đó ủ ở nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Sau 5 ngày, khả năng đối kháng được đánh giá thông qua kích thước vòng vô khuẩn. Kích thước vòng vô khuẩn được tính theo công thức sau:

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

trong đó: D là đường kính vòng đối kháng (mm); d là đường kính lỗ thạch (mm).

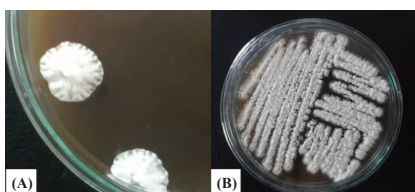
Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Định danh *Streptomyces* và *Trichoderma* bằng phương pháp sinh học phân tử: Chủng *Streptomyces* được định danh bằng phương pháp định danh giải trình tự đoạn 16S rDNA bằng cặp mồi 9F/1541R [17]. Đối với nấm *Trichoderma* được định danh bằng phương pháp giải trình tự đoạn ITS1/ITS4 với cặp mồi V9G/LS266 [18].

Kết quả và bàn luận

Phân lập, tuyển chọn chủng *Streptomyces* có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5

Tất cả 18 mẫu đất lấy từ vườn cà phê khỏe mạnh trong vùng bị bệnh và mẫu đất ở rừng tự nhiên, đã phân lập và làm thuần được 20 chủng mang đặc điểm hình thái của *Streptomyces* như khuẩn lạc khô và có hình dạng phóng xạ (hình 1).



Hình 1. Khuẩn lạc xạ khuẩn trên môi trường Gause I. (A) Khuẩn lạc chủng DR9S2 sau 4 ngày nuôi cấy; (B) Chủng DR9S2 sau 7 ngày nuôi cấy.

Khả năng đối kháng chủng vi nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 của các chủng xạ khuẩn *Streptomyces* phân lập được xác định thông qua hiệu quả ức chế và kích thước vòng kháng vô khuẩn (bảng 1).

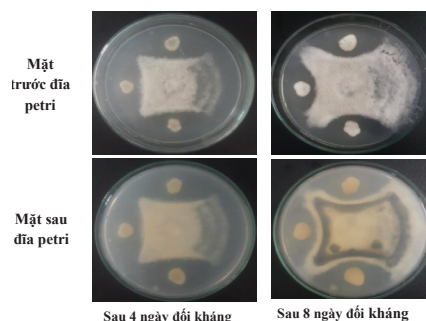
Bảng 1. Khả năng đối kháng nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 của một số chủng *Streptomyces* phân lập.

STT	Tên chủng	Đối kháng trực tiếp		Đối kháng gián tiếp (D-d, mm)
		Hiệu quả ức chế sau 4 ngày (%)	Hiệu quả ức chế sau 8 ngày (%)	
1	DR1S1	65,22 ^{hi} ±1,59	62,96 ^h ±1,13	26,90 ^h ±0,71
2	DR3S3	55,56 ^{def} ±1,13	57,04 ^h ±0,56	24,47 ^g ±0,07
3	DR7S2	62,67 ^{ghi} ±0,49	54,07 ^{gh} ±2,34	23,63 ^h ±0,70
4	DR9S2	66,67 ^{hi} ±1,13	71,85 ^a ±0,67	28,63 ^b ±0,31
5	DR9S6	56,25 ^{efg} ±2,17	51,85 ^{fg} ±1,48	23,17 ^{cd} ±1,07
6	DR10S4	68,12 [±] 2,54	67,41 ^k ±0,59	27,57 [±] 0,28
7	DR11S5	53,62 ^{def} ±0,97	43,70 ^{abcd} ±1,22	19,47 ^{cd} ±1,77
8	DR15S4	49,31 ^{abcde} ±3,24	47,41 ^{cdef} ±1,43	10,63 ^a ±1,50
9	DR12S5	49,27 ^{abcde} ±1,11	56,30 ^h ±0,59	24,33 ^{fg} ±1,01
10	DR15S3	49,27 ^{abcde} ±2,23	41,48 ^{ab} ±0,78	14,63 ^b ±0,33
11	DR17S4	48,61 ^{abcd} ±2,18	42,96 ^{abc} ±0,21	16,90 ^{bc} ±1,18
12	ĐV1S3	50,67 ^{cde} ±1,32	40,74 ^a ±1,09	17,97 ^{cd} ±0,99
13	ĐV2S5	59,42 ^{gh} ±3,07	42,96 ^{abc} ±2,11	18,50 ^{cd} ±0,20
14	ĐV4S1	52,78 ^{def} ±1,35	48,12 ^{def} ±1,26	14,40 [±] 0,83
15	ĐV8S6	57,97 ^{fg} ±1,15	48,88 ^{ef} ±1,51	20,80 ^{de} ±0,78
16	ĐV10S4	50,00 ^{bcd} ±3,95	45,93 ^{bcd} ±2,65	18,93 ^{cd} ±0,52
17	ĐV11S3	44,93 ^{abc} ±1,71	45,18 ^{abcde} ±1,70	19,97 [±] 0,31
18	ĐV13S5	45,33 ^{abc} ±1,14	46,67 ^{cde} ±1,49	11,63 ^a ±0,90
19	ĐV15S3	42,67 ^a ±0,85	45,18 ^{abcde} ±1,51	19,73 ^{cd} ±1,22
20	ĐV16S2	43,06 ^{ab} ±4,20	48,15 ^{def} ±0,89	16,80 ^{bc} ±1,18

Ghi chú: trong cùng một cột, các giá trị theo sau bởi các chữ cái giống nhau khác biệt không có ý thống kê ở mức $\alpha=0,05$ bằng trắc nghiệm phân hạng LSD.

Tất cả 20 chủng xạ khuẩn phân lập được đều có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5, tuy nhiên mức độ đối kháng giữa các chủng *Streptomyces* có sự khác biệt. Kết quả bảng 1 cho thấy, phần lớn các chủng xạ khuẩn phân lập ở mẫu đất rừng có hiệu quả đối kháng cao hơn các chủng phân lập ở mẫu đất vườn. Kết quả đối kháng trực tiếp sau 4 ngày, quan sát thấy đã xuất hiện vòng

kháng khuẩn xung quanh khuẩn lạc xạ khuẩn, hiệu quả ức chế đạt 42,67-68,12%. Sau 8 ngày, vòng kháng khuẩn xung quanh khuẩn lạc rõ ràng (hình 2), hiệu quả ức chế đạt 40,74-71,85%. Trong 20 chủng xạ khuẩn được thử nghiệm khả năng đối kháng trực tiếp với nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5, chủng DR9S2 có hiệu quả đối kháng tốt nhất (71,85%), thấp nhất là chủng ĐV1S3 (40,74%). Kết quả đối kháng độc lỗ của 20 chủng *Streptomyces* cho thấy tất cả 20 chủng phân lập được đều tạo vùng kháng nấm, với đường kính vòng vô khuẩn từ 10,63 đến 28,63 mm (bảng 1). Trong đó, chủng DR9S2 có kết quả đường kính vòng kháng khuẩn cao nhất (28,63 mm) (hình 3).

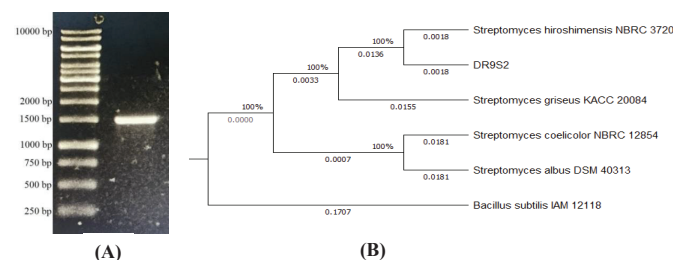


Hình 2. Đối kháng giữa chủng *Streptomyces hirosimensis* DR9S2 với nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 trên môi trường PDA ở 28°C theo thời gian.



Hình 3. Khả năng đối kháng nấm bệnh *Colletotrichum* sp. CC1.5 của chủng *Streptomyces hirosimensis* DR9S2 bằng phương pháp đối kháng gián tiếp.

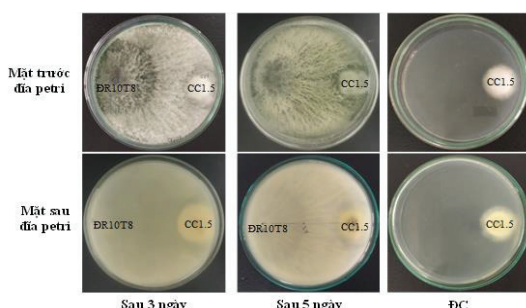
Từ kết quả thí nghiệm cho thấy, DR9S2 là chủng có khả năng đối kháng mạnh nhất, lần lượt là 71,85% và 28,63 mm. Chủng này được định danh đến loài bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Kết quả điện di sản phẩm PCR của chủng xạ khuẩn DR9S2 với cặp mồi 16S-rDNA trên gel agarose cho thấy xuất hiện một băng vạch DNA sáng rõ ràng kích thước khoảng 1,5 kb (hình 4A), sản phẩm PCR này được phân tích trình tự và so sánh trên NCBI-Blast cho thấy chủng xạ khuẩn DR9S2 là *Streptomyces hirosimensis* (độ tương đồng 100%) (hình 4B).



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi 16S-rDNA và cây phát sinh loài của chủng xạ khuẩn được tuyển chọn. (A) Kết quả điện di sản phẩm PCR đoạn 16S-rDNA của chủng DR9S2 (M: thang DNA 1 kb); (B) Cây phả hệ mối tương quan giữa các chủng *Streptomyces* bằng giải trình tự 16S-rDNA của chủng DR9S2 và các chủng *Streptomyces* tham khảo.

Phân lập, tuyển chọn chủng vi nấm *Trichoderma* có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 trên môi trường PDA

Kết quả từ mẫu đất ở vườn trồng cà phê khỏe mạnh và đất rừng nguyên sinh đã phân lập được 53 chủng vi nấm *Trichoderma* sp. và sàng lọc, đánh giá hiệu quả đối kháng của các chủng phân lập được với nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 bằng phương pháp đối kháng trực tiếp. Kết quả thu nhận được 15 chủng nấm *Trichoderma* có khả năng đối kháng (được thể hiện ở bảng 2). Sau 3 ngày, tất cả 15 chủng nấm *Trichoderma* cho hiệu quả ức chế nấm gây bệnh khô cành, khô quả trên cây cà phê ở mức trung bình đến rất cao (47,48 đến 86,56%). Sau 5 ngày, nấm bệnh *Colletotrichum* sp. CC1.5 không phát triển được và bị nấm *Trichoderma* mọc bao phủ lên (hình 5), hiệu quả đối kháng ghi nhận rất cao trong đó có 2 chủng là ĐR8T6 và ĐR10T8 ức chế hoàn toàn nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 (hiệu quả đối kháng 100%). Tuy nhiên, trong kết quả khuếch tán qua lỗ thạch của các chủng cho thấy, mặc dù chủng ĐR8T6 có khả năng đối kháng trực tiếp cao nhưng khả năng tiết chất ức chế vi nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 không cao kết quả vòng kháng nấm đạt 11,60 mm.



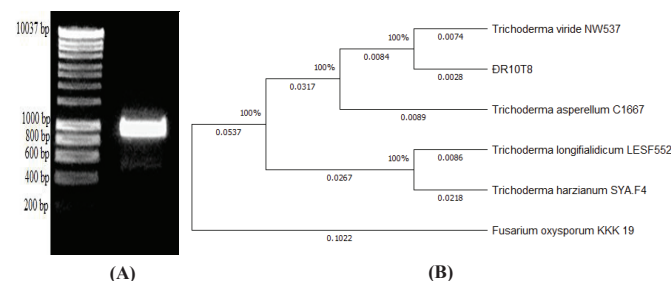
Hình 5. Đối kháng giữa chủng nấm *Trichoderma viride* ĐR10T8 với nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 trên môi trường PDA ở 28°C, theo thời gian.

Bảng 2. Khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 của một số chủng *Trichoderma*.

STT	Tên chủng	Đối kháng trực tiếp		Đối kháng gián tiếp (D-d, mm)
		Hiệu quả ức chế sau 3 ngày (%)	Hiệu quả ức chế sau 5 ngày (%)	
1	ĐR1T5	71,74 ^a ±9,38	96,11 ^b ±2,13	16,90 ^{abc} ±1,96
2	ĐR5T3	80,23 ^b ±5,54	95,66 ^b ±0,94	20,50 ^{def} ±2,02
3	ĐR8T6	84,16 ^c ±5,95	100,00 ^a ±0,00	11,60 ^a ±2,60
4	ĐR10T8	86,56 ^c ±4,80	100,00 ^a ±0,00	32,80 ^h ±2,71
5	ĐR12T7	71,48 ^d ±5,49	94,03 ^{bc} ±3,08	18,93 ^{bcd} ±1,70
6	ĐR13T3	63,89 ^d ±4,85	87,32 ^c ±4,41	22,867 ^{ef} ±0,61
7	ĐR15T3	55,81 ^e ±8,31	84,57 ^c ±5,17	24,63 ^{efg} ±0,55
8	ĐR17T4	67,34 ^d ±7,52	88,33 ^{bc} ±7,21	16,10 ^{abc} ±1,56
9	ĐV1T3	47,48 ^b ±2,47	81,00 ^a ±8,38	14,60 ^{abc} ±2,54
10	ĐV3T4	56,72 ^d ±5,45	86,41 ^b ±5,30	19,30 ^{bcd} ±2,31
11	ĐV5T3	62,07 ^d ±9,08	90,67 ^b ±5,73	17,93 ^{bcd} ±2,51
12	ĐV8T5	72,36 ^d ±8,75	91,52 ^{ab} ±3,53	18,87 ^{bcd} ±2,63
13	ĐV10T4	72,93 ^d ±7,59	91,82 ^{ab} ±4,21	13,90 ^{ab} ±0,29
14	ĐV15T2	76,27 ^d ±10,17	95,22 ^a ±2,32	30,03 ^{gh} ±1,13
15	ĐV17T5	71,50 ^d ±8,71	94,44 ^a ±2,61	26,40 ^{fg} ±0,06

Ghi chú: trong cùng một cột, các giá trị theo sau bởi các chữ cái giống nhau khác biệt không có ý thống kê ở mức $\alpha=0,05$ bằng trắc nghiệm phân hạng LSD.

Từ kết quả đối kháng của các chủng vi nấm *Trichoderma* phân lập với nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5, chúng tôi đã chọn được 1 chủng *Trichoderma* có hoạt tính cao là ĐR10T8 để thực hiện định danh đến loài bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Kết quả định danh vi nấm *Trichoderma* ĐR10T8 với cặp mồi ITS cho thấy, sản phẩm PCR điện di trên gel agarose xuất hiện 1 băng vạch DNA sáng và rõ ràng với kích thước khoảng 1000 bp (hình 6A). Kết quả giải trình tự của sản phẩm PCR và so sánh trên NCBI-Blast cho thấy chủng vi nấm ĐR10T8 là *Trichoderma viride* (độ tương đồng 99%) (hình 6B).



Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi ITS và cây phát sinh loài của chủng *Trichoderma* được tuyển chọn. (A) Kết quả điện di sản phẩm PCR đoạn ITS của chủng ĐR10T8 (M: thang DNA 1 kb); (B) Cây phát sinh loài mối tương quan giữa các chủng *Trichoderma* bằng giải trình tự ITS của chủng ĐR10T8 và các chủng *Trichoderma* tham khảo.

Bàn luận

Khả năng đối kháng với vi nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 gây bệnh khô cành, khô quả trên cây cà phê của chủng *Streptomyces hiroshimensis* ĐR9S2 và *Trichoderma viride* ĐR10T8 trong nghiên cứu này cho thấy cả 2 chủng đều có khả năng đối kháng với nhiều cơ chế. Các chủng xạ khuẩn *Streptomyces* có khả năng cạnh tranh dinh dưỡng nơi cư trú, tiết hợp chất kháng sinh, các enzyme có khả năng phân giải thành tế bào của nấm bệnh (protease, chitinase, cellulase [19, 20]. Chủng nấm *Trichoderma* có cơ chế trực tiếp liên quan đến hiệu quả đối kháng với nấm bệnh là có tốc độ phát triển nhanh, khả năng cạnh tranh dinh dưỡng, không gian sống với nấm bệnh tốt [21, 22] và tiết ra chitinase, glucanase, protease, có thể làm phá hủy vách tế bào của nấm và ký sinh trong sợi nấm bệnh [8].

Kết quả hiệu quả ức chế nấm bệnh *Colletotrichum* sp. của chủng *Streptomyces hiroshimensis* ĐR9S2 đạt 71,85%, so sánh với các nghiên cứu khác như của Đỗ Văn Sử và Lê Minh Tường (2016) [23], chủng *Streptomyces* CT10 có hiệu quả ức chế với nấm *Colletotrichum* sp. phân lập trên cây ớt là 60,73% và đường kính vòng kháng khuẩn đạt 13,7 mm; Nguyễn Thị Vân và cs (2019) [24] cho thấy, chủng *Streptomyces* VTCC-A-69 có hiệu quả ức chế nấm *Colletotrichum* sp. là 38%; Q.G. Fadhillah và cs (2021) [25] cho hiệu quả đối kháng của chủng *Streptomyces sanyensis* với vi nấm *Colletotrichum* sp. KA đạt 59,88%. Như vậy, chủng *Streptomyces hiroshimensis* ĐR9S2 phân lập được có khả năng kháng *Colletotrichum* sp. mạnh hơn các chủng *Streptomyces* sp. của các nghiên cứu trên đạt được.

Kết quả đánh giá hoạt lực kháng nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 của chủng nấm *Trichoderma viride* ĐR10T8 trong nghiên cứu này

(hiệu quả ức chế đạt 100% và đường kính vòng vô khuẩn 32,80 mm) có hoạt lực cao hơn trong các báo cáo của L.R. Shovan và cs (2008) [26], chủng *Trichoderma harzianum* đối kháng với nấm *Colletotrichum dematium* gây bệnh trên cây đậu nành đạt hiệu quả 89,44%; Nasreen Musheer và Shabbir Ashraf (2017) [27], đánh giá hoạt lực đối kháng của chủng *Trichoderma viride* với nấm gây bệnh *Colletotrichum leosporiodes* trong điều kiện phòng thí nghiệm là 69,79%.

Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và tuyển chọn được 20 chủng xạ khuẩn *Streptomyces* có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5, trong đó chủng *Streptomyces hiroshimensis* ĐR9S2 có hiệu quả đối kháng và tạo vòng kháng vô khuẩn cao lần lượt là 71,85% và 28,63 mm; 15 chủng *Trichoderma* có khả năng kháng nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5, trong đó chủng vi nấm có hiệu quả đối kháng và tạo vòng vô khuẩn mạnh là *Trichoderma viride* (86,56-100%, 32,80 mm).

Với kết quả khả năng kiểm soát mạnh với vi nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5, cả 2 chủng vi sinh tuyển chọn được trong nghiên cứu này cần được nghiên cứu sâu hơn về quy trình hình thành chế phẩm và thử nghiệm kiểm soát bệnh khô cành, khô quả trên cây cà phê ở điều kiện đồng ruộng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P.W. Damm, et al. (2012a), "The *Colletotrichum acutatum* species complex", *Studies in Mycology*, **73**, pp.37-114.
- [2] P.W. Damm, et al. (2012b), "The *Colletotrichum boninense* species complex", *Studies in Mycology*, **73**, pp.1-36.
- [3] K.D. Prihastuti, et al. (2009), "Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand", *Fungal Divers.*, **39**, pp.89-109.
- [4] F. Rakotoniriana, et al. (2013), "*Colletotrichum gigasporum* sp. nov., a new species of *Colletotrichum* producing long straight conidia", *Mycol. Prog.*, **12**, pp.403-412.
- [5] D. Silva, et al. (2012), "Application of the Apn2/MAT locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: An example from coffee (*Coffea* spp.) hosts", *Mycologia*, **104**, pp.396-409.
- [6] U. Weir, et al. (2012), "The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex", *Stud. Mycol.*, **73**, pp.115-180.
- [7] K.A. El-Tarabily, K. Sivasithamparan (2006), "Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters", *Soil Biology and Biochemistry*, **38**(7), pp.1505-1520.
- [8] Q. Wu, et al. (2017), "Identification of a novel fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy", *PLoS ONE*, **12**(6), DOI: 10.1371/journal.pone.0179957.
- [9] A.C.F. Soares, et al. (2006), "Soil streptomycetes with in vitro activity against the yam pathogens *Curvularia eragrostides* and *Colletotrichum gloeosporioides*", *Brazilian Journal of Microbiology*, **37**, pp.456-461.
- [10] J.O. Nonoh, et al. (2010), "Isolation and characterization of *Streptomyces* species with antifungal activity from selected national parks in Kenya", *Afr. J. Microbiol. Res.*, **4**, pp.856-864.
- [11] A.J. Deshmukh, et al. (2010), "In vitro evaluation of some known bioagents to control *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. and causing anthracnose of Indian bean", *Int. J. Pharm. BioSci.*, **1**(2), pp.1-6.

- [12] P. Dutta, et al. (2018), "Effect of extracellular metabolites of *Trichoderma pseudokoningii* on radial growth of *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum capsici*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*", *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, **7**(1), pp.874-879.
- [13] 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), tr.94-102.
- [14] E. Küster, S.T. Williams (1964), "Selection of media for isolation of streptomycetes", *Nature*, **202**(4935), pp.928-929.
- [15] D. Dhanasekaran, et al. (2012), *Applications of Actinobacterial Fungicides in Agriculture and Medicine*, IntechOpen, pp.29-54.
- [16] K. Kumar, et al. (2012), "Isolation and characterization of *Trichoderma* spp. for antagonistic activity against root rot and foliar pathogens", *Indian Journal of Microbiology*, **52**(2), pp.137-144.
- [17] T. Tamura, K. Hatano (1998), "Phylogenetic analyses on the strains belonging to invalidated genera of the order Actinomycetales", *Actinomycetologica*, **12**(1), pp.15-28.
- [18] H. Garcia Garces, et al. (2016), "Molecular identification and phylogenetical analysis of dermatophyte fungi from Latin America", *Mycoses*, **59**(12), pp.787-797.
- [19] Z. Jaradat, et al. (2008), "Influence of culture conditions on cellulase production by *Streptomyces* sp. (strain J2)", *Jordan Journal of Biological Sciences*, **1**(4), pp.141-146.
- [20] M. Shimizu, et al. (2009), "A promising strain of endophytic *Streptomyces* sp. for biological control of cucumber anthracnose", *Journal of General Plant Pathology*, **75**(1), pp.27-36.
- [21] S. Santos-Villalobos, et al. (2013), "Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.)", *Biological Control*, **64**(1), pp.37-44.
- [22] P. Chaverri, G.J. Samuels (2003), "Hypocrea/*Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores", *Studies in Mycology*, **48**, pp.1-116.
- [23] Đỗ Văn Sử, Lê Minh Tường (2016), "Hiệu quả phòng trị của xạ khuẩn đối với bệnh thán thư trên cây ớt do nấm *Colletotrichum* sp.", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, Chuyên đề Nông nghiệp*, tr.28-35.
- [24] Nguyễn Thị Vân và cs (2019), "Khảo sát khả năng đối kháng với 4 loại nấm gây bệnh trên thực vật của xạ khuẩn được phân lập từ Vườn quốc gia Cúc Phương và Ba Bể", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, **17**(1), tr.1-9.
- [25] Q.G. Fadhillah, et al. (2021), "The antagonistic activity of marine actinomycetes from mangrove ecosystem against phytopathogenic fungi *Colletotrichum* sp. KA", *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, **22**(2), pp.837-843.
- [26] L.R. Shovan, et al. (2008), "In vitro control of *Colletotrichum dematium* causing anthracnose of soybean by fungicides, plant extracts and *Trichoderma harzianum*", *International Journal of Sustainable Crop Production*, **3**(3), pp.10-17.
- [27] Nasreen Musheer, Shabbir Ashraf (2017), "Effect of *Trichoderma* spp. on *Colletotrichum gloeosporioides* Penz and Sacc. causal organism of turmeric leaf spot disease", *Trends in Biosciences*, **10**(48), pp.9605-9608.