

Phân lập nấm bệnh *Neoscytalidium dimidiatum* trên cây Thanh long và nghiên cứu kiểm soát bằng vi sinh vật

Nguyễn Như Nhứt^{1,*}, Nguyễn Thị Ngọc Bích¹, Nguyễn Thanh Trường¹, Võ Thị Xuyên²



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

TÓM TẮT

Trong những năm gần đây, nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây dịch bệnh đốm trắng nghiêm trọng trên cây Thanh long trong khi vẫn chưa có biện pháp kiểm soát hiệu quả. Trong nghiên cứu này, bằng cách phân lập trên môi trường thạch nước có bổ sung streptomycin, các kiểm tra hình thái, bệnh học *in vitro*, *in vivo* và sinh học phân tử bằng cách giải trình tự các gen ITS1 và ITS4 đã thu nhận được hai chủng *N. dimidiatum* NdGV và NdBT. Bằng kỹ thuật nuôi cấy kép trên môi trường thạch khoai tây cho thấy 100% chủng *Trichoderma* spp., 75% chủng *Bacillus* spp. và 20% chủng *Streptomyces* spp. có khả năng đối kháng với *N. dimidiatum*. Hiệu quả đối kháng trung bình với *N. dimidiatum* của các chủng *Trichoderma* spp. cao hơn *Bacillus* spp. và thấp nhất là *Streptomyces* spp. tương ứng là 56,8%, 55,3% và 54,3%. Đặc biệt là 5 chủng *Trichoderma* sp. 8.3.5, 8.3.7, 8.3.14, 8.3.19 và 8.3.20 có hiệu quả đối kháng trên 60%. Tiềm năng ứng dụng của 5 chủng *Trichoderma* này để kiểm soát bệnh do *N. dimidiatum* được củng cố thêm khi hiệu quả đối kháng của chúng tương đối ổn định trên môi trường thạch Thanh long trong khi tất cả các chủng *Bacillus* sp. và *Streptomyces* sp. bị mất khả năng đối kháng. Đáng chú ý là bốn trong năm chủng *Trichoderma* này có khả năng tương thích cao nên đã cho thấy cần có những nghiên cứu sâu hơn để ứng dụng tiềm năng phối hợp của chúng trong việc tăng cường khả năng kiểm soát bệnh do nấm *N. dimidiatum* NdGV và NdBT trên cây Thanh long.

Từ khoá: Thanh long, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Trichoderma*

MỞ ĐẦU

Cây Thanh long là loại cây ăn quả mà trong những năm gần đây có tiềm năng xuất khẩu và mang lại lợi ích kinh tế khá cao¹. Thanh long là một trong những loại trái cây quan trọng không những ở cấp quốc gia mà lẫn quốc tế². Tuy nhiên, trong những năm gần đây dịch hại là nguyên nhân làm giảm năng suất và chất lượng quả, đặc biệt là bệnh đốm trắng do nấm *Neoscytalidium dimidiatum* (thuộc họ Botryosphaeriaceae; bộ Botryosphaeriales; lớp nấm túi Ascomycetes) gây ra³. Loài nấm này có khả năng lây lan nhanh và kháng với nhiều loại thuốc hóa học đặc trị nấm. Do đó, vi sinh vật được hy vọng là hướng tiếp cận tiềm năng để góp phần phòng trừ bệnh hại do nấm *N. dimidiatum* và nâng cao chất lượng quả Thanh long⁴. Gần đây, một số nghiên cứu đã chứng minh nhiều vi sinh vật khác nhau như *Bacillus* spp.⁵, *Streptomyces* spp.⁶ và *Trichoderma* sp.⁴ ... có hoạt tính đối kháng với *N. dimidiatum*. Mặc dù vậy, các nghiên cứu này chỉ dừng lại ở bước phân lập, định danh các vi sinh vật có khả năng đối kháng với *N. dimidiatum* và đánh giá hiệu quả đối kháng trong điều kiện *in vitro*. Thêm vào đó, các nghiên cứu chỉ thực hiện trên một số ít các chủng vi sinh vật đã phân lập được và chưa có các

nghiên cứu đánh giá so sánh hiệu quả đối kháng giữa các vi sinh vật với nhau. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá khả năng kiểm soát *in vitro* và tiềm năng ứng dụng của các chủng nấm bệnh đã phân lập được bằng nhiều chủng *Bacillus*, *Streptomyces* và *Trichoderma* trong kiểm soát nấm *N. dimidiatum*.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Chủng vi sinh vật

Hai mươi chủng *Trichoderma* spp., hai mươi chủng *Bacillus* spp. và hai mươi chủng *Streptomyces* spp. được cung cấp bởi Chi nhánh công ty TNHH Gia Tường tỉnh Bình Dương. Các chủng vi sinh vật được nuôi cấy và bảo quản tương ứng trên các môi trường thạch nghiêng nước chiết khoai tây (PGA), cao thịt – peptone và Gause.

Mẫu Thanh long *in vitro* và *in vivo*

Các mẫu Thanh long bị bệnh đốm trắng được thu tại các vườn trồng ở Hàm Thuận Nam (Bình Thuận) và Gò Vấp (Tp. Hồ Chí Minh) được dùng để phân lập nấm bệnh *N. dimidiatum*. Các mẫu đoạn cành Thanh long *in vitro* (5 – 10 cm) và cây Thanh long *in vivo*

¹Công ty TNHH Gia Tường

²Trường Đại học Văn Lang

Liên hệ

Nguyễn Như Nhứt, Công ty TNHH Gia Tường

Email: nhunhutnguyen@yahoo.co.uk

Lịch sử

- Ngày nhận: 04-12-2018
- Ngày chấp nhận: 7-10-2019
- Ngày đăng: 31-12-2019

DOI: 10.32508/stdjns.v3i4.585



Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Trích dẫn bài báo này: Như Nhứt N, Ngọc Bích N T, Thanh Trường N, Xuyên V T. **Phân lập nấm bệnh *Neoscytalidium dimidiatum* trên cây Thanh long và nghiên cứu kiểm soát bằng vi sinh vật.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 3(4):286-293.

(mang cành non dài 40 – 50 cm) không bị bệnh được dùng để kiểm tra bệnh học tương ứng *in vitro* và *in vivo*.

Phương pháp

Phân lập nấm *Neoscytalidium dimidiatum*

Nấm bệnh *N. dimidiatum* được phân lập từ các mẫu Thanh long bị bệnh đốm trắng theo phương pháp của Thongkham và Soyotong^{2,7}. Sau 2 - 3 ngày đặt mẫu bệnh (0,5 - 1 cm) trên môi trường thạch nước (water agar) có bổ sung streptomycin sulfate 50 mM, tách sợi nấm mọc lên trên mẫu và lan ra môi trường để làm thuần. Các chủng nấm thu được được kiểm tra đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên môi trường PGA và khuẩn ty dưới kính hiển vi theo Thongkham, Soyotong², Yi và cộng sự¹. Kiểm tra bệnh học *in vitro* và *in vivo* được thực hiện bằng cách dùng que cấy hoặc kim tiêm tạo vết thương và bôi một ít sinh khối của chủng nấm tương ứng trên các đoạn cành Thanh long (đã được khử trùng bề mặt bằng cồn 70% trong 5 giây trước khi rửa lại bằng nước vô trùng và để khô) hoặc cành non trên cây trong nhà lưới⁸. Triệu chứng bệnh được ghi nhận theo thời gian sau khi gây nhiễm. Đồng thời, các chủng nấm cũng được gửi đi phân tích trình tự của các gen ITS1 và ITS4⁹ ở Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học (Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM).

Xác định hiệu quả đối kháng của các chủng vi sinh vật với nấm bệnh

Kỹ thuật nuôi cấy kép trên môi trường PGA được ứng dụng để xác định hiệu quả đối kháng *in vitro* của các chủng vi sinh vật với nấm bệnh. Hiệu quả đối kháng của các chủng *Trichoderma* được xác định bằng cách cấy điểm theo kiểu đối xứng với nấm bệnh qua tâm đĩa petri và các điểm cấy cách mép đĩa khoảng 1,5 cm¹⁰. Với *Streptomyces* và *Bacillus*, cấy sinh khối *Bacillus* sp. (hoặc *Streptomyces*) thành 2 vệt dài 3 cm, đối xứng với điểm cấy nấm bệnh ở tâm đĩa petri, vệt cấy cách mép đĩa 1,5 cm¹¹. Đĩa đối chứng là đĩa chỉ cấy nấm bệnh mà không có *Trichoderma*, *Bacillus* hay *Streptomyces*. Các đĩa sau khi cấy được ủ trong tối đến khi nấm bệnh trên đĩa đối chứng phát triển đến mép đĩa.

Cách tính hiệu quả đối kháng của các chủng vi sinh vật với nấm bệnh Ferreira và cộng sự (1991)¹⁰:

$$H (\%) = ((A - B)/A) \times 100$$

Trong đó:

H: Hiệu quả ức chế (%);

A: Đường kính nấm bệnh trên đĩa đối chứng (mm);

B: Đường kính nấm bệnh trên đĩa đối kháng (mm).

Đánh giá tiềm năng ứng dụng trên cây Thanh long

Các chủng vi sinh vật có hiệu quả đối kháng cao được đánh giá tiềm năng kiểm soát nấm bệnh *N. dimidiatum* trên cây Thanh long bằng cách xác định hiệu quả đối kháng *in vitro* trên môi trường thạch Thanh long (chứa 20 g agar trong 1 lít nước chiết sau khi đun sôi 30 phút 200 g cành Thanh long). Các chủng có khả năng đối kháng trên môi trường thạch Thanh long tiếp tục được xác định khả năng tương thích theo Ilham và cộng sự¹⁰ để đánh giá tiềm năng ứng dụng phối hợp trong kiểm soát *N. dimidiatum*.

Xử lý số liệu

Số liệu thu được từ kết quả các thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS version 20.0 theo phép thử Duncan, p = 0,05 và được trình bày dưới dạng số trung bình của 3 lần lặp lại.

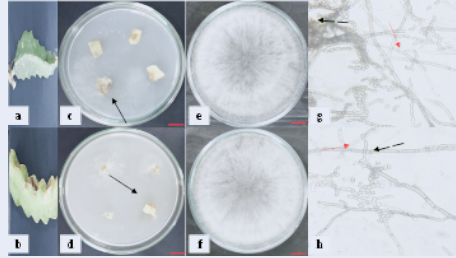
KẾT QUẢ

Phân lập nấm bệnh *N. dimidiatum*

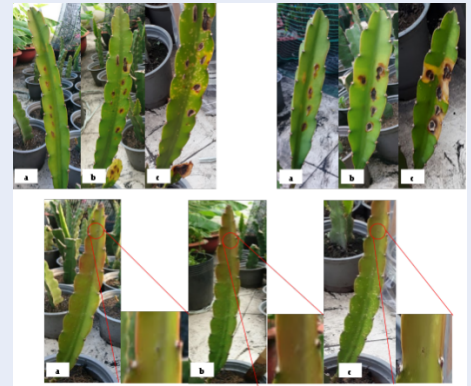
Từ các mẫu Thanh long bị bệnh đốm trắng thu được từ Hàm Thuận Nam và Gò Vấp (Hình 1a và b) đã phân lập được 2 dòng nấm trên môi trường thạch nước có bổ sung streptomycine sulfate 50 mM (Hình 1c và d). Trong đó, dòng nấm NdBT được phân lập từ mẫu bệnh thu ở Bình Thuận và NdGV từ mẫu bệnh thu được ở Gò Vấp. Các đặc điểm hình thái khuẩn lạc của hai dòng nấm NdBT và NdGV (Hình 1e và f) tương tự với các báo cáo trước đây^{1,2,7}. Dưới kính hiển vi quang học ở vật kính 40X, hai dòng NdBT và NdGV có cơ quan sinh dưỡng dạng sợi đa bào có vách ngăn và phân nhánh phức tạp (Hình 1g và h). Sợi nấm sinh sản có dạng chuỗi mang bào tử hay còn gọi là bào tử đốt. Các bào tử có hình tròn hoặc bầu dục.

Kiểm tra bệnh học trên các đoạn cành Thanh long *in vitro* cho thấy các mẫu đối chứng không được gây nhiễm với hai dòng nấm NdBT và NdGV vào vết thương đều không xuất hiện các triệu chứng của bệnh đốm trắng và có hiện tượng vết thương lành lại (Hình 2). Đối với các mẫu được gây nhiễm với nấm vào vết thương, vết nhiễm lan rộng, chuyển sang màu xám đen, vùng xung quanh mô có màu vàng (biểu hiện hoại tử) và lan rộng ra các vùng lân cận theo thời gian tương tự như triệu chứng được mô tả bởi Mohd và cộng sự⁸.

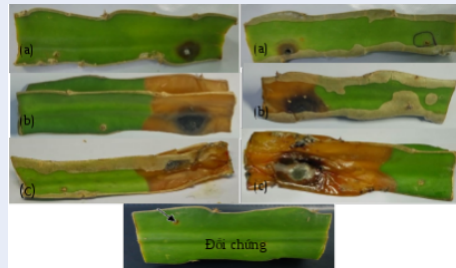
Các kết quả thu được cũng tương tự trên cây Thanh long *in vivo* (Hình 3). Hai dòng nấm NdBT và NdGV có khả năng gây bệnh trở lại trên cành Thanh long *in vivo* với các triệu chứng giống với mẫu Thanh long *in vitro*. Ngoài ra, sau 9 ngày gây nhiễm, trên cành Thanh long xuất hiện các đốm trắng tương tự như



Hình 1: Kết quả phân lập nấm bệnh *N. dimidiatum*. **a và b:** mẫu Thanh long bị bệnh đốm trắng ở Hàm Thuận Nam và Gò Vấp; **c và d:** sợi nấm bệnh phát triển xung quanh mẫu bệnh trên môi trường thạch nước (mũi tên màu đen); **e và f:** khuẩn lạc nấm bệnh NdBT và NdGV trên môi trường PGA sau 3 ngày nuôi cấy; **g và h:** hình thái khuẩn ty nấm bệnh NdBT và NdGV dưới kính hiển vi quang học (X40, mũi tên màu đỏ chỉ vị trí phân nhánh, mũi tên nét đứt chỉ vị trí vách ngăn); thanh ngang = 1 cm.



Hình 3: Triệu chứng do nấm NdBT (trên, trái) và NdGV (trên, phải) gây ra trên Thanh long *in vivo*. Mẫu đối chứng (dưới) chỉ tạo vết thương và không gây nhiễm; (a), (b) và (c): Sau 3, 6 và 9 ngày gây nhiễm.



Hình 2: Triệu chứng bệnh do dòng nấm NdBT (trái) và NdGV (phải) gây ra trên mô Thanh long *in vitro*. (a), (b) và (c): Sau 3, 6 và 9 ngày gây nhiễm; Đối chứng sau 9 ngày tạo vết thương và không gây nhiễm.

mẫu được dùng để phân lập ban đầu. Dựa vào nguồn gốc mẫu phân lập, các đặc điểm hình thái và kiểm tra bệnh học đã cho thấy hai dòng nấm thu được là hai chủng thuộc loài *N. dimidiatum*.

Kết quả giải trình tự các đoạn gen ITS1 và ITS4 của hai chủng NdBT và NdGV này có độ tương đồng cao so với trình tự các đoạn gen tương ứng của *N. dimidiatum* đã được công bố trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI. Điều này giúp một lần nữa khẳng định hai chủng nấm bệnh NdBT và NdGV thuộc loài *N. dimidiatum* và không mất khả năng gây bệnh sau phân lập.

Sàng lọc chủng vi sinh vật có khả năng đối kháng với các chủng nấm bệnh *in vitro*

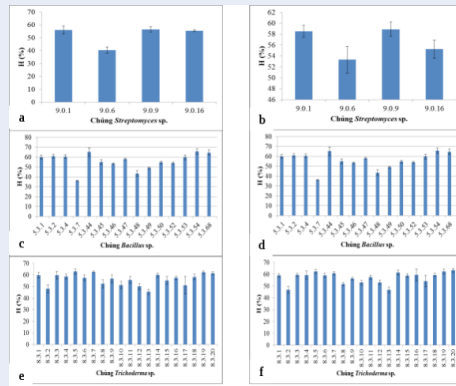
Sàng lọc chủng vi sinh có khả năng đối kháng với hai chủng nấm bệnh

Trong số 20 chủng *Streptomyces* spp. chỉ có bốn chủng *Streptomyces* sp. 9.0.1, 9.0.6, 9.0.9 và 9.0.16 có hiệu quả đối kháng với hai chủng NdBT và NdGV (Hình 4). Trong khi đó, có đến 14 và 15 chủng trong số 20 chủng *Bacillus* spp. có khả năng đối kháng tương ứng với chủng nấm bệnh NdGV và NdBT. Với *Trichoderma* spp., tất cả 20 chủng được khảo sát đều có khả năng đối kháng với cả 2 chủng nấm bệnh. Trong số các chủng có khả năng đối kháng với nấm bệnh, hai chủng *Streptomyces* sp. (gồm 9.0.1 và 9.0.9), ba chủng *Bacillus* sp. (gồm 5.3.44, 5.3.54 và 5.3.68) và năm chủng *Trichoderma* sp. (gồm 8.3.5, 8.3.7, 8.3.14, 8.3.19 và 8.3.20) (Hình 5) cho hiệu quả đối kháng tốt với cả hai chủng nấm NdBT và NdGV (theo mức phân hạng của Nwankiti và Gwa¹² được chọn lọc để tiếp tục nghiên cứu.

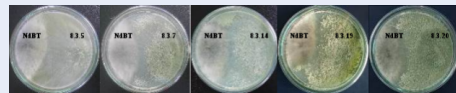
Tiềm năng ứng dụng các chủng vi sinh vật đối kháng kiểm soát nấm bệnh *N. Dimidiatum* trên Thanh long

Hiệu quả đối kháng của các chủng vi sinh vật chọn lọc với hai chủng nấm bệnh trên môi trường thạch Thanh long

Trên môi trường trường thạch Thanh long, các chủng *Bacillus* sp. và *Streptomyces* sp. được chọn lọc đã mất khả năng đối kháng với hai chủng nấm bệnh NdBT và NdGV (Hình 6). Ngược lại, trên môi trường này, các chủng *Trichoderma* sp. chọn lọc vẫn thể hiện được khả năng đối kháng với hai chủng nấm bệnh (Hình 7 và 8). Ngoại trừ chủng *Trichoderma* sp. 8.3.5 có hiệu quả đối kháng tăng lên trên môi trường thạch Thanh long so với môi trường thạch khoai tây, hiệu quả đối kháng của bốn chủng *Trichoderma* sp. chọn

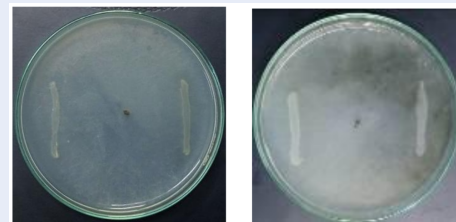


Hình 4: Hiệu quả đối kháng của các chủng *Strep-tomyces* spp., *Bacillus* spp. và *Trichoderma* spp. đối với NdBT (trái) và NdGV (phải) trên môi trường PGA sau 3 ngày nuôi cấy.



Hình 5: Khả năng đối kháng của các chủng *Tricho-derma* sp. có hiệu quả đối kháng cao với chủng nấm *N. dimidiatum* NdBT trên môi trường PGA sau 3 ngày nuôi cấy.

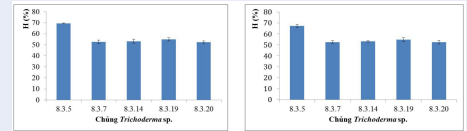
lọc còn lại đều có xu hướng giảm từ mức tốt trên môi trường thạch khoai tây xuống mức trung bình trên môi trường thạch Thanh long (Bảng 1).



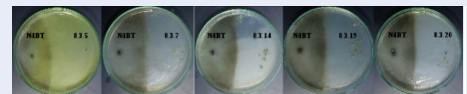
Hình 6: Hiện tượng mất hoạt tính đối kháng chủng *Bacillus* sp. 5.3.44 (trái) và *Streptomyces* sp. 9.0.9 (phải) với nấm bệnh NdBT trên môi trường thạch Thanh long.

Khả năng tương thích của các chủng *Trichoderma* sp. chọn lọc

Bốn trong năm chủng *Trichoderma* sp. được chọn lọc khi được nuôi cấy đồng thời có khả năng tương thích với nhau một phần hay hoàn toàn, ngoại trừ các tổ hợp từ chủng 8.3.5 (gồm các tổ hợp các chủng 8.3.5 – 8.3.7, 8.3.5 – 8.3.14, 8.3.5 – 8.3.19 và 8.3.5 – 8.3.20) có hiện tượng ức chế từ xa (Bảng 2 Hình 9).



Hình 7: Hiệu quả đối kháng của năm chủng *Tri-choderma* sp. được chọn lọc đối với NdBT (trái) và NdGV (phải) trên môi trường thạch Thanh long sau 3 ngày cấy.

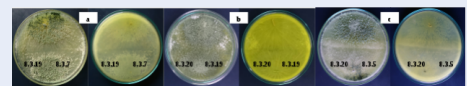


Hình 8: Khả năng đối kháng của năm chủng *Tri-choderma* chọn lọc với nấm bệnh trên môi trường thạch Thanh long sau 3 ngày nuôi cấy.

Bảng 1: So sánh hiệu quả đối kháng của các chủng *Trichoderma* sp. được chọn lọc trên môi trường PGA và môi trường thạch Thanh long

Chủng <i>Trichoderma</i> sp.	H (%) trên môi trường PGA	H (%) trên môi trường MTTL
8.3.5	63,02 ^b	69,44 ^a
8.3.7	62,59 ^a	52,72 ^b
8.3.14	59,94 ^a	53,30 ^b
8.3.19	62,28 ^a	54,94 ^b
8.3.20	61,36 ^a	52,47 ^b

Trong cùng một dòng, các số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa p = 0,05. PGA : thạch khoai tây ; MTTL: thạch Thanh long.



Hình 9: Khả năng tương thích của một số tổ hợp chủng *Trichoderma* sp. (a) Mặt trước (trái) và mặt sau (phải) của tổ hợp chủng *Trichoderma* sp. 8.3.7 và 8.3.19 tương thích một phần; (b) Mặt trước (trái) và mặt sau (phải) của tổ hợp chủng *Trichoderma* sp. 8.3.19 và 8.3.20 tương thích toàn phần; (c) Mặt trước (trái) và mặt sau (phải) của tổ hợp chủng *Trichoderma* sp. 8.3.5 và 8.3.20 ức chế từ xa.

Bảng 2: Khả năng tương thích của các chủng *Trichoderma* sp. được chọn lọc

Chủng <i>Trichoderma</i> sp.	8.3.5	8.3.7	8.3.14	8.3.19	8.3.20
8.3.5	++	--	--	--	--
8.3.7	--	++	++	++	+
8.3.14	--	++	++	+	+
8.3.19	--	++	+	++	+
8.3.20	--	+	+	+	++

Quy ước ức chế theo Ilham và cộng sự (2013)⁸: ++: tương thích hoàn toàn; +: tương thích không hoàn toàn; ---: thay thế; --: ức chế từ xa; -: ức chế tại nơi tiếp xúc.

THẢO LUẬN

Mặc dù bệnh đốm trắng do *N. dimidiatum* trên Thanh long đã xuất hiện từ nhiều năm qua ở nhiều nước trên thế giới như Việt Nam, Trung Quốc, Mỹ, Thái Lan..., tuy nhiên, cho đến nay, chỉ có một số lượng ít các nghiên cứu phân lập và nhận diện tác nhân gây bệnh này như báo cáo của Mohd và cộng sự⁸, Thongkham, Soyton², Yi và cộng sự¹. Trong nghiên cứu này, 2 chủng nấm *N. dimidiatum* NDBT và NdGV đã được phân lập từ các mẫu Thanh long bị bệnh đốm trắng thu được từ Hàm Thuận Nam và Gò Vấp và nhận diện dựa trên trình tự gen ITS1 và ITS4. Cả 2 chủng nấm này đều có hình thái tương tự như mô tả của Thongkham và Soyton, Yi và cộng sự^{1,2}, có khả năng gây bệnh trên cành Thanh long *in vitro* và *in vivo* với các triệu chứng tương tự như báo cáo của Mohd và cộng sự⁸. Việc phân lập được *N. dimidiatum* đã giúp chủ động nguồn nấm cho các nghiên cứu các biện pháp kiểm soát bệnh do chúng gây ra.

Trước đây, các nghiên cứu của Luis và cộng sự⁵, Luong và cộng sự⁶, Wan và cộng sự⁴ đã cho thấy tiềm năng ứng dụng của *Bacillus*, *Trichoderma* và *Streptomyces* trong kiểm soát nấm bệnh *N. dimidiatum in vitro*. Trong nghiên cứu này, 20 chủng *Trichoderma* spp., 20 chủng *Bacillus* spp. và 20 chủng *Streptomyces* spp. đã được khảo sát hiệu quả đối kháng *in vitro* với hai chủng nấm bệnh *N. dimidiatum* NDBT và NdGV. Tuy nhiên, kết quả cho thấy chỉ có 20% chủng thuộc chi *Streptomyces* có khả năng đối kháng. Tỷ lệ các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng đối kháng là 75%, cao hơn nhiều so với *Streptomyces*. Trong khi đó, tất cả 20 chủng (100%) thuộc chi *Trichoderma* đều có khả năng đối kháng. Hiệu quả đối kháng trung bình của *Trichoderma* spp. cao hơn so với *Bacillus* spp. và *Streptomyces* spp (tương ứng là 56,8 %, 55,3% và 54,3%). Sự khác nhau trong khả năng đối kháng giữa các chủng vi sinh vật không cùng một chi và giữa các chủng trong cùng một chi được cho là do khả năng tiết ra các loại kháng sinh, các

enzyme thủy phân vách nấm bệnh và khả năng tăng trưởng để cạnh tranh không gian sống và cạnh tranh dinh dưỡng khác nhau giữa các chủng¹³. Kết quả này cho thấy ngoài khả năng tiết ra các hợp chất kháng sinh hay các enzyme như *Bacillus* và *Streptomyces*, các chủng *Trichoderma* còn có ưu thế phát triển hệ sợi nhanh giúp chúng tăng cường hiệu quả ức chế các nấm bệnh nhờ vào khả năng cạnh tranh không gian sống và dinh dưỡng. Ngoài ra, sự tiếp xúc trực tiếp của hệ sợi cũng có lẽ đã giúp *Trichoderma* tăng cường khả năng đối kháng thông qua khả năng ký sinh vào hệ sợi nấm *N. dimidiatum*¹².

Tiềm năng ứng dụng vào thực tế được nghiên cứu bằng cách nuôi cấy kép các chủng có hiệu quả đối kháng cao với nấm bệnh trên môi trường thạch chứa nước chiết từ cành Thanh long. Trên môi trường này, các chủng vi sinh vật chọn lọc và nấm bệnh vẫn phát triển, tuy nhiên, kết quả quan sát cho thấy *Trichoderma* và nấm bệnh có hệ khuẩn ty với các sợi rất mảnh và mọc sát mặt thạch. Điều này có thể do trong nước chiết Thanh long có thành phần dinh dưỡng thấp hơn so với nước chiết khoai tây đã làm hạn chế sự tăng trưởng của các chủng vi sinh vật nói chung. Ngoài ra, có thể trong nước chiết Thanh long cũng có chứa hợp chất gây ức chế sự phát triển cả *Trichoderma* và hai chủng nấm bệnh NDBT và NdGV.

Đáng chú ý hơn, khi được nuôi cấy trên môi trường thạch nước chiết Thanh long, khả năng đối kháng với nấm bệnh của các chủng *Bacillus* sp. và *Streptomyces* sp. chọn lọc bị mất hoàn toàn trong khi hiệu quả đối kháng của các chủng *Trichoderma* sp. không thay đổi đáng kể. Khả năng đối kháng nấm bệnh của *Bacillus* và *Streptomyces* chủ yếu dựa trên khả năng sinh kháng sinh^{5,6}. Hiện tượng mất khả năng đối kháng có thể là do các chủng *Bacillus* sp. và *Streptomyces* sp. bị mất khả năng tiết kháng sinh khi được nuôi cấy trên môi trường thạch nước chiết Thanh long. Trong khi đó, do có sự tiếp xúc trực tiếp của hệ sợi, các chủng *Trichoderma* sp. có thể đã ký sinh trên nấm bệnh¹². Khả

năng ký sinh trên nấm bệnh của *Trichoderma* nhờ chúng tiết các enzyme có khả năng phân hủy vách tế bào⁴ để sử dụng các chất dinh dưỡng bên trong nấm bệnh, qua đó đã giữ được khả năng đối kháng của chúng với nấm bệnh.

Các kết quả đã cho thấy 5 chủng *Trichoderma* được chọn lọc có tiềm năng ứng dụng vào thực tế hơn so với các chủng *Bacillus* và *Streptomyces* được nghiên cứu. Tuy nhiên, các kết quả khảo sát khả năng tương thích cho thấy chủng *Trichoderma* sp. 8.3.5 là chủng có hiệu quả đối kháng cao nhất lại không có khả năng tương thích với các chủng còn lại. Điều này là phù hợp vì chủng 8.3.5 có hoạt tính đối kháng mạnh nhất (trong đó có khả năng chủng 8.3.5 đã tổng hợp những hợp chất kháng sinh mạnh hơn) nên dẫn đến ức chế những chủng còn lại. Tuy nhiên, khó có thể xác định chính xác tương thích giữa các loài nếu chỉ dựa vào biểu hiện bên ngoài khuẩn lạc. Vì các chủng *Trichoderma* sp. có những đặc điểm hình thái gần giống nhau như màu sắc, hình dạng khuẩn ty và bào tử... Do đó, các đánh giá ở mức tương thích hoàn toàn và tương thích một phần chỉ mang tính chất tương đối và cần nghiên cứu sâu hơn.

KẾT LUẬN

Đã phân lập được hai chủng nấm *N. dimidiatum* NdBT và NdGV từ mẫu Thanh long bị bệnh đốm trắng ở Hàm Thuận Nam (Bình Thuận) và Gò Vấp (Thành phố Hồ Chí Minh). Tỷ lệ chủng có khả năng đối kháng với *N. dimidiatum* trong số 20 chủng *Trichoderma* spp., 20 chủng *Bacillus* spp. và 20 chủng *Streptomyces* spp. được khảo sát tương ứng 100%, 75% và 20%. *Trichoderma* spp. có hiệu quả đối kháng trung bình cao nhất, lần lượt đến *Bacillus* spp. và *Streptomyces* spp. Các kết quả thực nghiệm đã cho thấy năm chủng *Trichoderma* sp. (gồm 8.3.5, 8.3.7, 8.3.14, 8.3.19 và 8.3.20) có khả năng đối kháng tốt với hai chủng nấm *N. dimidiatum* NdBT và NdGV (hơn 60%). Đặc biệt, cả năm chủng chọn lọc vẫn giữ được hoạt tính đối kháng trên môi trường thạch nước chiết Thanh long đã cho thấy tiềm năng ứng dụng các chủng này để kiểm soát bệnh đốm trắng do nấm *N. dimidiatum* trên cây Thanh long ngoài đồng ruộng. Ngoài ra, khả năng tương thích giữa các chủng *Trichoderma* sp. 8.3.7, 8.3.14, 8.3.19 và 8.3.20 cũng cho thấy tiềm năng được sử dụng phối hợp với nhau để tăng cường khả năng kiểm soát bệnh do nấm *N. dimidiatum*.

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

CT : Môi trường thạch cao - thịt pepton

ITS : Internal Transcribed Spacer

MTTL : Môi trường thạch nước chiết Thanh long

NdBT : Chủng nấm *Neoscytalidium dimidiatum* NdBT

NdGV : Chủng nấm *Neoscytalidium dimidiatum* NdGV

PGA : Môi trường thạch nước chiết khoai tây

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Bài báo được dựa trên các kết quả nghiên cứu thực nghiệm hoàn toàn trung thực và được nhóm tác giả thống nhất đồng ý công bố mà không có bất kỳ tác động xung đột lợi ích nào.

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Nguyễn Như Như: tư vấn, thực nghiệm và thu thập số liệu, tổng hợp số liệu; viết, trình bày và chỉnh sửa bài báo

Nguyễn Thị Ngọc Bích, Nguyễn Thanh Trường: thực nghiệm và thu thập số liệu

Võ Thị Xuyên : tư vấn

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yi RH, Lin QL, Mo J, Wu F, Chen J. Fruit internal brown rot caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on pitahaya in Guangdong province China. *Australasian Plant Disease Notes*. 2015;10(13):1-4.
2. Thongkham D, Soyong K. Isolation, identification, and pathogenicity test from *Neoscytalidium dimidiatum* causing stem canker of dragon fruit. *International Journal of Agricultural Technology*. 2016;12(7.2):2187-2190.
3. Bakhshizadeh M, Hashemian HR, Najafzadeh MJ, Dolatabadi S, Zarrinfar H. First report of rhinosinusitis caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Iran. *Journal of Medical Microbiology*. 2014;63:1017-1019.
4. Wan Z, Wan R, Shah M, Kalsom U, Mohd P, Hun G. Identification of *Trichoderma harzianum* T3.13 and its interaction with *Neoscytalidium dimidiatum* U1, a pathogenic fungus isolated from dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia. *International Journal of Agriculture and Environmental Research*. 2017;3(3):3205-3228.
5. Luis G, Tomas RG, Mirella RB, Csar J, Francisco H, Roberto G. Antagonistic potential of bacteria and marine yeasts for the control of phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2018;20:4311-4321.
6. Luong HT, Nguyen K, Vu TN, Ha TT, Tong HV, Hua TS, et al. Study on the possibility of using microorganisms as biological agents to control fungal pathogens *Neoscytalidium dimidiatum* causing disease of brown spots on the dragon fruit. *Journal of Vietnamese Environment*. 2016;8(1):41-44.
7. Masratul HM, Baharuddin S, Latiffah Z. Identification and molecular characterizations of *Neoscytalidium dimidiatum* causing stem canker of red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia. *Journal of Phytopathology*. 2013;161:841-849.
8. Mohd MH, Salleh B, Zakaria L. Identification and molecular characterizations of *Neoscytalidium dimidiatum* causing stem canker of red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia. *Journal of Phytopathology*. 2014;161:841-849.
9. Le BF, Vaillant F, Pitahaya IE. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): A new fruit crop, a market with a future. *Fruits*. 2006;61:237-250.
10. Ilham M, Amer MS, Assawah M, Draz SM. Vegetative compatibility and strain improvement of some Egyptian *Trichoderma* isolates. *Life Science Journal*. 2013;10(3):187-197.

11. Andhare AP, Subramanian B. Compatibility of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in growth promotion of groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2017;89(2):1027–1040.
12. Nwankiti AO, Gwa VI. Evaluation of antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum* causal agent of white yam (*Dioscorea rotundata* poir) tuber rot. *Trends in Technical & Scientific Research*. 2018;1(1):001–007.
13. Lân DN, Nguyễn QD, Phạm TV. *Ví sinh vật học*. NXB Giáo dục Việt Nam; 2010.

Isolate *Neoscytalidium dimidiatum* fungal pathogens from pitaya (*Hylocereus undatus*) and research controlling by microorganisms

Nguyen Nhu Nhut^{1,*}, Nguyen Thi Ngoc Bich¹, Nguyen Thanh Truong¹, Vo Thi Xuyen²



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

ABSTRACT

In recent years, *Neoscytalidium dimidiatum* has caused severe white spot disease in Pitaya, while no effective controls have been taken. In this study, two strains of *N. dimidiatum* NdGV and NdBT were obtained by isolation on water agar medium containing streptomycin, morphological tests, *in vitro* and *in vivo* pathogenical tests, and molecular biology tests by sequencing the genes ITS1 and ITS4. By using dual culture technique on potato-glucose agar medium, 100% of *Trichoderma* spp., 75% of *Bacillus* spp. and 20% of *Streptomyces* spp. were able to antagonize *N. dimidiatum*. The mean antagonistic effect with *N. dimidiatum* of *Trichoderma* spp. was higher than *Bacillus* spp. and the lowest was *Streptomyces* spp. 56.8%, 55.3% and 54.3% respectively. Especially 5 strains *Trichoderma* sp. 8.3.5, 8.3.7, 8.3.14, 8.3.19, and 8.3.20 had antagonistic effects of over 60%. The application potential of the 5 selected *Trichoderma* strains to control *N. dimidiatum* disease was further strengthened when their antagonistic effect was relatively stable on Pitaya juice agar medium while all *Bacillus* sp. and *Streptomyces* sp. were lost the ability to antagonize. It was noteworthy that four of the five strains of *Trichoderma* sp. were highly compatible, suggesting further studies are needed to apply their combined potency in enhancing the control of *N. dimidiatum* NdBT and NdGV on Pitaya.

Key words: Bacillus, Neoscytalidium dimidiatum, Pitaya, Streptomyces, Trichoderma

¹Giattung Company Ltd.

²Van Lang University

Correspondence

Nguyen Nhu Nhut, Giattung Company Ltd.

Email: nhunhutnguyen@yahoo.co.uk

History

- Received: 04-12-2018
- Accepted: 7-10-2019
- Published: 31-12-2019

DOI : 0.32508/stdjns.v3i4.585



Copyright

© VNU-HCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Nhu Nhut N, Thi Ngoc Bich N, Thanh Truong N, Thi Xuyen V. Isolate *Neoscytalidium dimidiatum* fungal pathogens from pitaya (*Hylocereus undatus*) and research controlling by microorganisms. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 3(4):286-293.