



## Original Article

# Antagonistic Activity of Endophytic Bacteria Isolated from Man Trau Grass on Stem Rot Disease Of Pitaya (*Hylocereus Undatus*)

Do Quang Trung<sup>1,\*</sup>, Nguyen Thi Thu Hang<sup>2</sup>, Dinh Mai Van<sup>2</sup>, Pham Bich Ngoc<sup>3</sup>,  
Tran Thi Hang<sup>2</sup>, Luu The Anh<sup>1</sup>, Phi Quyet Tien<sup>3</sup>

<sup>1</sup>VNU University of Science, 19 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Ha Noi.

<sup>2</sup>Vietnam National University of Forestry, Xuan Mai, Chuong My, Ha Noi.

<sup>3</sup>Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Ha Noi

Received 4 September 2020

Revised 15 April 2021; Accepted 24 June 2021

**Abstract:** Endophytic bacteria reside in the intercellular spaces in different plant tissues without causing damage. This study aimed to select endophytic bacterial strains from Man Trau grass (*Eleusine indica*) that are able to inhibit the fungus *A. alternata* causing stem rot disease on pitaya. The result showed that one fungal isolate was pathogenic and caused stem rot disease on dragonfruit. The analysis results based on morphological characteristics and ITS region sequence indicated that the isolated fungal strain is 100% identical to *A. alternata*. In addition, a total of 16 endophytic bacterial strains were isolated from Man Trau grass samples in Binh Thuan and screened for antifungal activity. Ten bacterial strains with antagonistic activity against *A. alternata* causing stem rot disease on pitaya were detected. Among those, strain MT47 showed the strongest antifungal activity with an efficiency of 36.67%. Moreover, the result also presented that the antagonistic strain MT47 possesses the ability of biofilm formation significantly higher than the control. The results suggest that these endophytic bacteria can be used in biocontrol of the stem rot disease on pitaya.

**Keywords:** Stem rot disease, *Hylocereus undatus*, *Eleusine indica*, *Alternaria alternata*, biofilm.

\*Corresponding author.

Email address: [trungensinh@gmail.com](mailto:trungensinh@gmail.com)

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5020>

# Khả năng đối kháng của vi khuẩn nội sinh từ cỏ Mần Trầu với vi nấm gây bệnh thối ngọn cành trên thanh long (*Hylocereus undatus*)

Đỗ Quang Trung<sup>1,\*</sup>, Nguyễn Thị Thu Hằng<sup>2</sup>, Đinh Mai Vân<sup>2</sup>, Phạm Bích Ngọc<sup>3</sup>,  
Trần Thị Hằng<sup>2</sup>, Lưu Thế Anh<sup>1</sup>, Phí Quyết Tiến<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội,  
19 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội.

<sup>2</sup> Trường Đại học Lâm nghiệp, Xuân Mai, Chương Mỹ, Hà Nội

<sup>3</sup>Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội.

Nhận ngày xx tháng xx năm xxxx (Cỡ chữ: 10)

Chính sửa ngày xx tháng xx năm xxxx; Chấp nhận đăng ngày xx tháng xx năm xxxx

**Tóm tắt:** Vi khuẩn nội sinh (VKNS) khu trú ở các khoang gian bào trong các mô thực vật khác nhau mà không gây tổn thương. Nghiên cứu này nhằm tuyển chọn các chủng VKNS từ cỏ Mần Trầu (*Eleusine indica*) có khả năng đối kháng với vi nấm *A. alternata* gây bệnh thối ngọn cành (TNC) trên thanh long. Kết quả phân lập đã chọn được 01 chủng vi nấm gây nhiễm bệnh TNC trên thanh long. Dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS cho thấy chủng vi nấm này 100% tương đồng với *A. alternata*. Về VKNS, đề tài đã phân lập và sàng lọc được 16 chủng VKNS từ mẫu cỏ Mần Trầu thu tại Bình Thuận. Trong đó, có 10 chủng đối kháng với *A. alternata* gây bệnh TNC trên thanh long. Chủng MT47 cho kết quả đối kháng tốt nhất với hiệu suất đối kháng là 32,24%. Kết quả cũng cho thấy khả năng tạo màng sinh học của chủng VKNS kháng nấm (MT47) cao hơn nhiều so với đối chứng. Các kết quả này cho thấy các chủng VKNS này có tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát sinh học nấm *A. alternata* gây bệnh trên thanh long.

**Từ khóa:** bệnh thối ngọn cành, Thanh Long, cỏ Mần Trầu, *Alternaria alternata*, màng sinh học

## 1. Mở đầu

Ở Việt Nam, phần lớn thanh long được trồng là loài *Hylocereus undatus*, có đặc điểm vỏ đỏ hay hồng và ruột trắng hoặc ruột đỏ. Quả thanh long là loại trái cây phổ biến, mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe con người, vì chúng chứa hàm lượng natri, kali và vitamin A cao; tổng hàm lượng chất rắn lên tới 16,6% [1]. Với ưu thế về điều kiện đất đai khí hậu và kinh nghiệm canh tác, thanh long đang là một cây trồng chiếm một vị trí quan trọng trong ngành trồng cây ăn quả theo hướng xuất khẩu của Việt Nam.

Tuy nhiên hiện nay, tình hình dịch bệnh trên thanh long diễn ra nghiêm trọng, trong đó đáng chú ý là bệnh thối ngọn cành (TNC). Bệnh TNC do nấm *A. alternata* gây ra. Bệnh thường xuất hiện quanh năm, đặc biệt vào điều kiện nhiệt độ, độ ẩm cao như vào đầu mùa mưa. Ngọn cành hay đầu cành thanh long bị bệnh sẽ chuyển sang màu vàng, mềm ra sau đó bị thối. Bệnh thối ngọn khiến ngọn cây bị chết, cành không phát triển, ảnh hưởng đến sự phát triển của cây thanh long. Đặc biệt, bệnh xảy ra không những trên đất phèn (đất thấp) mà còn cả trên đất cao.

Đã có một số công trình nghiên cứu nhằm kiểm soát mầm bệnh trên cây thanh long bằng

\*Tác giả liên hệ.

Email address: trungcnsinh@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5020>

phương pháp vật lý và hóa học [2-3]. Tuy nhiên, những phương pháp này vẫn còn tồn tại một số hạn chế như chỉ áp dụng trong phạm vi nhỏ, nhiều khi ảnh hưởng đến chất lượng và mức độ an toàn của quả thanh long. Vì vậy, nghiên cứu ứng dụng các giải pháp phòng trừ sâu bệnh bằng biện pháp sinh học là lựa chọn ưu tiên trong chiến lược phát triển sản xuất thanh long nhằm đáp ứng tiêu chuẩn an toàn thực phẩm khi xuất khẩu sang các thị trường khó tính như Mỹ, Châu Âu và các nước khác. Trong đó, sử dụng vi khuẩn nội sinh (VKNS) với vai trò như tác nhân sinh học để kiểm soát bệnh (trong đó có bệnh thối ngọn cành) là một hướng nghiên cứu có ý nghĩa thực tiễn, đáp ứng được yêu cầu về sản phẩm an toàn để xuất khẩu, tiêu dùng trong nước, cũng như góp phần hạn chế sử dụng hóa chất trong sản xuất nông nghiệp.

VKNS khu trú ở các khoảng gian bào trong các mô thực vật khác nhau mà không gây tổn thương. Chúng thường xâm nhập vào thân rễ và đôi khi tận dụng các vị trí vết thương hoặc có thể xâm nhập vào các mô bên trong thông qua các lỗ mở ở gốc rễ bên, giữa các tế bào biểu bì và ở lông rễ. Ứng dụng vi khuẩn nội sinh để ngăn chặn dịch bệnh (kiểm soát sinh học) có thể là một cách tiếp cận thân thiện với môi trường [4-7] trong sản xuất nông nghiệp bền vững. Ví dụ, VKNS và các chất chuyển hóa của chúng được phát hiện có tiềm năng đầy hứa hẹn trong việc kiểm soát các mầm bệnh và bệnh tật trên cây nho [8]. Những vi khuẩn như vậy cũng có thể là những tác nhân tốt của cơ chế bảo vệ thực vật bên cạnh việc gây ra các tác động đối kháng trực tiếp với nấm bệnh và vi khuẩn. Đề kháng toàn thân do cảm ứng (ISR) có thể tạo ra các gen khác nhau để tạo miễn dịch cho cây trồng về mặt chuyển hóa hoặc cơ học bằng cách thay đổi sinh lý vật chủ hoặc các phản ứng trao đổi chất, tăng sức bền thành tế bào và tăng cường tổng hợp các hóa chất bảo vệ thực vật [9]. Các chất chuyển hóa thứ cấp này cứu vật chủ khỏi sự tấn công của mầm bệnh trong tương lai [9]. Bằng cách kết hợp các sinh vật thúc đẩy tăng trưởng thực vật (PGP) với các vi sinh vật nội sinh đối kháng với mầm bệnh, một chiến lược kiểm soát sinh học toàn diện có thể được phát triển. Trên thế giới, đã có nghiên cứu tìm ra

các chủng VKNS từ một số loài cỏ dại mọc tự nhiên trên các ruộng trồng thanh long có khả năng ức chế bệnh đốm nâu trên cây thanh long và có khả năng kích thích sự sinh trưởng và phát triển của cây thanh long [10]. Tuy nhiên, ở Việt Nam việc khai thác các loài vi sinh vật nội sinh từ cây cỏ dại còn nhiều hạn chế và chưa được quan tâm.

Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng loài cỏ Mầu Trầu (*Eleusine indica*) dại mọc trên cùng địa điểm trồng cây thanh long để phân lập và tuyển chọn các chủng VKNS có khả năng ức chế nấm *A. alternata* gây ra bệnh thối ngọn cành trên cây thanh long.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

#### 2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng VKNS phân lập từ các mẫu cỏ Mầu Trầu mọc hoang trong vườn thanh long tại huyện Hàm Thuận Bắc, tỉnh Bình Thuận.

Chủng vi nấm *A. alternata* gây bệnh thối ngọn cành thanh long được phân lập từ mẫu thanh long bị bệnh tại huyện Hàm Thuận Bắc, tỉnh Bình Thuận.

#### 2.1.2. Môi trường sử dụng nghiên cứu

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

Môi trường phân lập và nuôi cấy VKNS: LB (Luria – Bertani): tryptone: 10 g, cao nấm men: 5 g, NaCl: 5 g, nước cất vừa đủ: 1l, môi trường thạch bổ sung agar: 15 g/l.

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

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phương pháp phân lập, làm thuần nấm gây bệnh TNC.

Phân lập, làm thuần nấm gây bệnh TNC theo phương pháp của Meena và cộng sự [11]. Chọn

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

### 2.2.2. Phương pháp định danh nấm gây bệnh TNC.

Các chủng nấm được định danh sơ bộ mô tả của Meena và cs [11].

Sau khi định danh hình thái và sinh hóa và thử nghiệm đối kháng, các chủng nấm được định danh đến loài bằng phương pháp giải trình tự vùng ITS – của rDNA: Tách chiết bộ gen vi nấm bằng bộ kit của QIAGEN, khuếch đại trình tự bằng phản ứng PCR với cặp mồi có trình tự như sau ITS1 (3'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-5') và ITS4 (3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5'). Phản ứng PCR được thực hiện trong ống PCR 0,1 ml có chứa: 25 µl 2X Taq Master Mix (Biobasic Canada); mỗi loại mồi nồng độ 10 µM: 1,5 µL; 11 µL nước cất (dH<sub>2</sub>O) và 1 µL DNA từ nấm. Phản ứng PCR gồm 35 chu kỳ bao gồm 2 giai đoạn tiền biến tính: 95°C trong 5 phút; giai đoạn biến tính 95°C trong 30 giây; giai đoạn bắt cặp của các mồi: 58°C trong 1 phút; giai đoạn kéo dài đoạn khuếch đại: 72°C trong 1 phút và giai đoạn kéo dài cuối: 72°C trong 10 phút. Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong dung dịch TBE 1X. Sử dụng 10 µL sản phẩm cho vào từng giếng. Chạy điện di với hiệu điện thế 100 V trong 25 phút. Kết quả điện di được quan sát bằng máy chụp ảnh gel (Bio-Rad, Hoa Kỳ). Đoạn khuếch đại PCR của vùng ITS của từng mẫu nấm được gửi giải trình tự tại hãng First Base (The Gemini, Singapore Science Park II, Singapore). Các trình tự nucleotide hoàn chỉnh được so sánh với ngân hàng dữ liệu GenBank của NCBI bằng cách sử dụng công cụ BLAST.

### 2.2.3 Phương pháp thử nghiệm khả năng gây bệnh của chủng *A. alternata* phân lập

Nuôi cấy nấm bệnh *A. alternata* trên môi trường PDA (ủ trong tối ở 25°C-28°C) khoảng 4-7 ngày, sau đó hòa tan bào tử và đưa về mật độ 10<sup>5</sup> CFU/ml. Sử dụng kim tiêm vô trùng tiêm 100 µl dịch treo bào tử (10<sup>5</sup> CFU/ml) vào cành thanh long (*H. undatus*) khỏe mạnh. Nghiệm thức đối chứng tiêm nước cất vô trùng. Tất cả các mẫu đoạn cành thanh long sau khi tiêm được đặt trong các hộp nhựa kín ở 25°C-28°C, ủ trong điều kiện tối [12]. Mỗi thí nghiệm sử dụng 5 đoạn cành thanh long cho mỗi lần lặp. Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

- Ghi nhận kết quả: Quan sát hằng ngày và đánh giá biểu hiện bệnh trên đoạn thân cây được gây bệnh và so sánh các đặc điểm của bệnh trong tự nhiên. Chọn mẫu nấm có khả năng gây bệnh tương tự mô tả ngoài tự nhiên để tiếp tục nghiên cứu.

Tính tỉ lệ gây bệnh: TLB (%) = Số đoạn thân cây bệnh/tổng số đoạn thân x 100.

### 2.2.4 Phân lập VKNS từ cây cỏ Mần Trầu.

Rễ, chồi, lá được cắt thành những mảnh nhỏ có kích thước 5 × 5 mm bằng lưỡi dao vô trùng trong luồng không khí. Các mảnh được đặt trên đĩa thạch LB bổ sung chất chống nấm (bavistin, 30µg/mL) và ủ trong 2-4 ngày ở 37°C. Sau khi ủ, các khuẩn lạc vi khuẩn hình thái khác nhau đã được lựa chọn và cấy sang đĩa mới để có được các khuẩn lạc phân lập. Các vi khuẩn phân lập được nghiên cứu cho các đặc tính gram và hóa sinh của chúng.

### 2.2.5. Phương pháp khảo sát khả năng đối kháng với nấm bệnh *A. alternata*

Sử dụng phương pháp đối kháng trực tiếp [13] và phương pháp khuếch tán qua đĩa thạch [14-15] để khảo sát đặc tính đối kháng với vi nấm gây bệnh TNC Thanh long.

Với phương pháp đối kháng trực tiếp đánh giá khả năng đối kháng thông qua hiệu quả ức chế (%) sau  $H = (Ddc - D) / Ddc \times 100$ , theo dõi sau 4 ngày thử nghiệm. Trong đó: H: Hiệu quả ức chế (%); D: Đường kính khuẩn lạc nấm bệnh

trung bình trên đĩa đối kháng; Ddc: Đường kính khuẩn lạc nấm bệnh trung bình trên đĩa đối chứng.

Với phương pháp khuếch tán qua đĩa thạch đánh giá khả năng đối kháng sau 4 ngày thử nghiệm được đánh giá thông qua kích thước vòng đối kháng (vòng tròn trong suốt bao quanh khuẩn lạc), tính bằng mm theo công thức: Kích thước vòng đối kháng = D – d. Trong đó: D (mm) là đường kính vòng đối kháng; d (mm) là đường kính khuẩn lạc.

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần đối với mỗi chủng vi khuẩn cần chọn lọc, kết quả là giá trị trung bình cộng của các lần lặp lại.

#### 2.2.6. Phương pháp đánh giá khả năng tạo màng sinh vật của các chủng vi sinh vật [16]

Các chủng vi khuẩn lựa chọn được nuôi lắc (200 vòng/phút) riêng rẽ trong ống nghiệm chứa 10ml môi trường LB lỏng tại tủ lắc ổn nhiệt ở 30°C. Ống nghiệm chỉ chứa môi trường LB lỏng được dùng làm đối chứng. Sau 3 ngày nuôi cấy, hút 1ml dịch vi khuẩn vào ống eppendorf đã khử trùng và ủ trong tủ lắc ổn nhiệt ở 30°C, tốc độ 200 vòng/phút. Sau 3 ngày tiếp theo, dịch nuôi cấy được chuyển sang ống eppendorf khác để xác định mật độ tế bào bằng cách đo mật độ quang học ở  $\lambda = 600$  (OD<sub>600</sub>). Ống eppendorf (sau khi đã hút hết dịch nuôi cấy ở bước 3) được rửa sạch 2 lần bằng nước cất khử trùng. Sau đó mỗi ống eppendorf được bổ sung 1ml dung dịch tím kết tinh 1% và giữ trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Dung dịch nhuộm tím kết tinh sau đó được loại bỏ, rửa sạch 2 lần bằng nước cất và quan sát sự bắt màu của các tế bào bám trên thành ống với tím kết tinh.

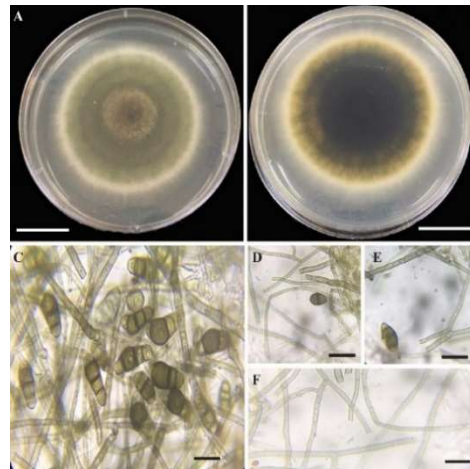
#### 2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu

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

### 3. Kết quả và thảo luận

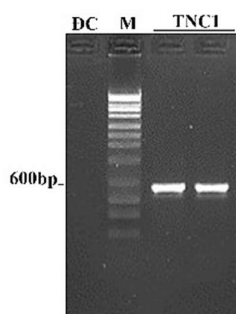
#### 3.1. Phân lập và sàng lọc chủng vi nấm *A. alternata*

Từ các mẫu thanh long bệnh thu được tiến hành phân lập *A. alternata* trên môi trường PDA và lựa chọn các dòng có đặc tính của vi nấm *A. alternata* theo mô tả của Meena và cs [11] như: Tán nấm có màu xám đen đến nâu đen (Hình 1A), mặt sau tán nấm có màu đen, có vòng đồng tâm (Hình 1B). Sợi nấm phân nhánh có màu nâu đến nâu đậm, vươn cao như bông gòn trên bề mặt môi trường (Hình 1A). Quan sát dưới kính hiển vi quang học cho thấy sợi nấm phân nhánh có vách ngăn (Hình 1C và 1F). Bào tử hình chữ nhật, hình bầu dục hoặc hình que (Hình 1C, 1D và 1E). Kết quả thí nghiệm đã chọn được 1 chủng là TNC1 mang các đặc điểm của *Alternaria alternata*.



Hình 1. Đặc điểm hình thái vi nấm *A. alternata* sau 5 ngày nuôi trên môi trường PDA. Khuẩn lạc vi nấm mặt trước (A) và mặt sau (B); C-F: Sợi nấm và bào tử được quan sát ở vật kính x100. Thanh tỷ lệ: A, B: 1 cm; C-F: 20  $\mu$ m.

Chủng vi nấm sau khi định danh hình thái được lựa chọn tiếp tục được định danh đến loài bằng phương pháp giải trình tự vùng ITS – rDNA. Kết quả PCR được minh họa trong Hình 2. Kết quả cho thấy sản phẩm PCR có kích thước khoảng 600 bp, đây là kích thước của đoạn gen ITS khi được PCR bằng cặp mồi ITS1 và ITS4.



Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm PCR. M: thang chuẩn DNA; TNC1: sản phẩm PCR mẫu nấm; DC: đối chứng âm

Vùng trình tự sau khi khuếch đại được gửi giải trình tự tại Công ty 1st Base (Singapore) (Bảng 1) và so sánh độ tương đồng di truyền với các loài trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST (Bảng 2).

Bảng 1. Trình tự đoạn gen ITS của chủng vi nấm TNC1

AAGAAAGGAAGGCGGGCTGGAATCTCT  
CGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATCA  
CCCTTGCTTTTGCCTACTTCTTGTTCC  
TTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGACAA  
ACATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCAGC  
GTCAGTAACAAATTAATAATTACAATT  
CTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCA  
TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT  
AAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGA  
ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG  
CCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTG  
TTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTT  
GCTTGGTGTGGGGCGTCTTGCTCTAGCT  
TTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTG  
GCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCA  
GCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAG  
GTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTCCAC  
TTTTGACCTCGGATCAGGTACGGATACC  
CGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGG  
AGGAA

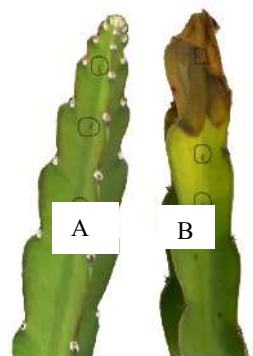
Dựa trên kết quả phân tích trình tự của chủng tuyển chọn xác định được chủng phân lập được có độ tương đồng 100% với chủng nấm *A. alternata* (Bảng 2).

Bảng 2. Tóm tắt kết quả định danh chủng vi nấm TNC1

Tên chủng	Điểm đạt cao nhất	Tổng điểm	Tỷ lệ trùng lặp	Mã số trên NCBI
<i>Alternaria alternata</i> strain YZU	874	874	100%	MN822486.1

### 3.2. Khả năng gây bệnh của chủng *Alternaria alternata*

Chủng nấm bệnh sau khi định danh được tiến hành thử nghiệm khả năng gây bệnh trên cành thanh long. Tiến hành thí nghiệm và quan sát ở các thời điểm cho thấy: Với các nghiệm thức tiêm nấm bệnh, tại 6-7 ngày sau khi tiêm ở một số vị trí tiêm nấm bệnh trên thân đã bắt đầu xuất hiện đốm bệnh màu vàng tương tự với mô tả bệnh thối ngọn cành. Đến thời điểm sau 2 tuần gần như các mẫu thân nấm bệnh đều có biểu hiện bệnh (Hình 3B). Trong khi đó, ở nghiệm thức đối chứng vẫn không quan sát thấy hiện tượng nhiễm bệnh sau 2 tuần tiêm (Hình 3A).



Hình 3. Cành thanh long sau khi lây nhiễm. A: Cành thanh long ở nghiệm thức tiêm nước cất vô trùng (sau 2 tuần); B: Triệu chứng bệnh xuất hiện trên cành thanh long sau khi tiêm vi nấm TNC1 sau 2 tuần.

Tiến hành xác định tỉ lệ bệnh đối với từng nghiệm thức sau 1 tuần và 2 tuần theo dõi thu được kết quả Bảng 3.

Bảng 3. Tỷ lệ bệnh trên cành thanh long theo thời gian sau khi lây nhiễm *A. alternata*.

Nghiệm thức	Tỷ lệ bệnh trên đoạn cành thanh long (%)	
	Sau 1 tuần	Sau 2 tuần
Đối chứng	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
TNC1	60,32 ± 4,72 <sup>b</sup>	92,23 ± 2,41 <sup>b</sup>

Các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình trong cùng một thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê ( $p < 0,05$ ).

Kết quả Bảng 3 cho thấy, tỷ lệ bệnh thối ngọn cành trên đoạn cành thanh long tăng dần theo thời gian theo dõi sau khi tiêm chủng vi nấm *A. alternata*. Tại thời điểm sau 1 tuần tiêm nấm bệnh, đoạn thân đã có tỷ lệ bệnh khá cao 60,32 ± 4,72 %. Tỷ lệ này đạt 92,23 ± 2,41 % sau 2 tuần thí nghiệm và khác biệt thống kê so với đối chứng. Với nghiệm thức đối chứng chỉ tiêm nước cất vô trùng thì không cho hiện tượng bệnh trong suốt thời gian theo dõi. Từ kết quả đánh giá khả năng gây bệnh của chủng vi nấm *A. alternata* phân lập được cho thấy chủng TNC1 có độc lực cao gây bệnh thối ngọn cành trên thanh long và có thể lựa chọn dòng nấm này để tiến hành nghiên cứu tiếp theo.

### 3.3. Phân lập và sàng lọc sơ bộ chủng VKNS từ cỏ Mần Trầu

Nhiều nghiên cứu liên quan đến VKNS phân lập từ các loài thực vật được trồng đã được công bố, trong khi chỉ có một vài nghiên cứu tập trung vào đặc tính của hệ VKNS từ cỏ dại [17-18]. Những cây cỏ dại này có nguồn gốc tự nhiên và rất phong phú, phát triển trong quần thể dày đặc và không trải qua lựa chọn hoặc nhân giống. Chúng có ảnh hưởng tích cực đến sự đa dạng vi sinh vật đất, chất lượng và sức khỏe của đất [1]. Đặc biệt, khả năng này mầm và phát triển nhanh chóng của cỏ dại trên đồng ruộng, tạo ra nhiều hạt và giữ cho lá quang hợp hoạt động trong suốt mùa đông, có thể một phần là do các phân tử được tạo ra bởi VKNS [19]. Loài cỏ Mần trầu mọc tự nhiên ở Việt Nam đã được nghiên cứu khá nhiều theo hướng dược liệu. Tuy nhiên, những nghiên

cứ sử dụng các chủng VKNS được phân lập từ loài cỏ dại này để kiểm soát bệnh thối ngọn cành cây thanh long trên thế giới và ở Việt Nam còn rất ít. Ngoài ra, Bình Thuận là địa phương với điều kiện khí hậu đặc thù, đặc biệt trong những năm gần đây có nhiều biến đổi khí hậu gây khó khăn trong việc sử dụng các chế phẩm vi sinh. Do đó, để có thể phân lập các chủng vi sinh có khả năng đối kháng với nấm *A. alternata* và thích nghi tốt với điều kiện khí hậu Bình Thuận và các vùng có điều kiện sinh thái tương đương thì cỏ Mần trầu mọc tự nhiên tại huyện Hàm Thuận Bắc thuộc tỉnh Bình Thuận đã được lựa chọn. Từ các mẫu cỏ Mần Trầu (kí hiệu MT) đã phân lập được 16 chủng với các đặc điểm nhận dạng như: khuẩn lạc tròn, có màu trắng trong, trắng đục, vàng đậm, vàng nhạt, rìa tròn đều, lượn sóng hoặc răng cưa để tuyển chọn Hình 4.



Hình 4. Hình dạng khuẩn lạc của chủng vi khuẩn MT47 (bên trái) và MT54 (bên phải) phân lập được sau 48 giờ nuôi cấy trên môi trường LB.

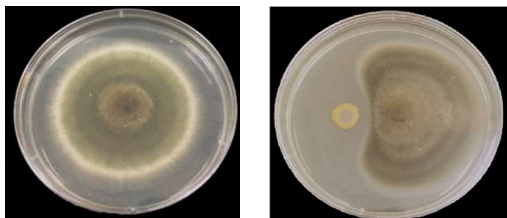
Với 16 chủng vi khuẩn phân lập được, số chủng phân lập được từ thân, lá và rễ lần lượt là 5, 5, và 6. Các chủng này là nguồn đầu vào để sàng lọc các chủng VKNS có khả năng kháng vi nấm gây bệnh TNC trên thanh long.

### 3.4. Khả năng kháng *A. alternata* gây bệnh thối ngọn cành của chủng VKNS nghiên cứu

Việc đánh giá khả năng kháng *A. alternata* gây bệnh thối ngọn cành thanh long của các chủng VKNS đã phân lập được xác định thông qua hiệu quả ức chế (phương pháp đối kháng trực tiếp).

Kết quả thí nghiệm cho thấy với phương pháp đối kháng trực tiếp 10/16 chủng khảo sát có hiệu quả ức chế nấm bệnh *A. alternata* giao động từ 0 đến 32,24 % sau 6 ngày theo dõi. Chủng đối

kháng mạnh nhất là MT47 với hiệu suất đối kháng sau 6 ngày là 32,24 % (Hình 5).



Hình 5. Khả năng kháng *A. alternata* của chủng MT47 từ cỏ Mần trâu bằng phương pháp đối kháng trực tiếp sau 5 ngày nuôi cấy (bên phải) và đối chứng (bên trái)

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 lô thạch cho biết được các chủng có khả năng sinh chất kháng nấm hay không. Vòng vô khuẩn xung quanh lô thạch chứng tỏ chủng có tiết chất kháng khuẩn ức chế khả năng sinh trưởng của *A. alternata* (Hình 6).

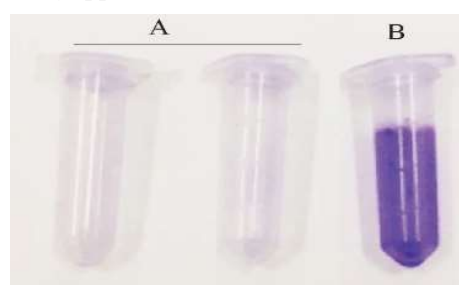


Hình 6. Khả năng kháng *A. alternata* của chủng MT47 từ cỏ Mần trâu bằng phương pháp đối kháng gián tiếp sau 6 ngày nuôi cấy (mặt sau của đĩa).

Từ kết quả thí nghiệm đã chọn được 6/10 chủng có khả năng sinh chất kháng nấm *A. alternata* chiếm tỉ lệ 60 %. Trong đó, chủng MT47 có khả năng đối kháng mạnh nhất.

3.4. Khả năng tạo màng sinh học của các chủng VKNS kháng *A. alternata* gây bệnh thối ngọn cành.

Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự hình thành màng sinh học bằng VKNS đóng một vai trò quan trọng không chỉ đối với các chất dinh dưỡng trong chu trình mà còn trong việc kiểm soát sinh học đối với bệnh cây và do đó cải thiện năng suất cây trồng [20-22]. Do đó, khả năng tạo màng sinh học của các chủng VKNS kháng vi nấm gây bệnh thối ngọn cành cũng đã được nghiên cứu. Hình ảnh tạo biofilm được bắt màu với tím kết tinh của các chủng nghiên cứu đã chỉ ra ở Hình 7, các chủng MT47 có màu tím đậm trên ống eppendorf.



Hình 7. Khả năng tạo màng của một số chủng VKNS từ cỏ Mần trâu. A - Đối chứng, B - Mẫu MT47.

Màng sinh học đã được chứng minh khả năng tạo ra các chất có hoạt tính sinh học như màng sinh học của *B. cereus* tạo ra hai loại kháng sinh là zwittermicin A và kanosamine, góp phần vào việc kiểm soát sinh học cỏ linh lăng. Sự dễ dàng trong việc xây dựng và bảo quản các sản phẩm là chìa khóa cho sự thành công về mặt thương mại của những sinh vật này như là tác nhân kiểm soát sinh học [23]. Hơn nữa, rõ ràng là một số chức năng liên quan đến kiểm soát sinh học của bệnh tật cũng ảnh hưởng đến sự hình thành màng sinh học [24-25].

#### 4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, từ các mẫu thanh long bệnh thối ngọn cành được lấy tại Bình Thuận đã phân lập, làm thuần và sàng lọc được 1 chủng nấm thuộc loài *A. alternata* cho tỉ lệ bệnh đạt  $92,23 \pm 2,41$  % sau 2 tuần thử nghiệm trên cành thanh long. Đã phân lập và sàng lọc được 16



chủng VKNS từ các mẫu cỏ Mần Trầu lấy tại Bình Thuận. Trong đó 10 chủng có khả năng đối kháng với *A. alternata* trên 2 phương pháp thử nghiệm. Chủng MT47 cho kết quả đối kháng tốt nhất với hiệu suất đối kháng là 32,24 %. Thêm vào đó, chủng MT47 còn có khả năng tạo màng sinh học. Các đặc tính này cho thấy chủng vi khuẩn nội sinh MT47 có tiềm năng sử dụng trong chế phẩm phòng trừ bệnh thối ngọn cành trên thanh long. Các nghiên cứu tiếp theo về cơ chế kháng nấm và các điều kiện ảnh hưởng đến sự kháng nấm của chủng MT47.

### Lời cảm ơn

Xin cảm ơn Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này dưới hình thức Học bổng sau tiến sĩ (Mã số GUST.STS.ĐT2020-SH05).

### Tài liệu tham khảo

- [1] N. Tel zur, R&D of pitahayas - Dragonfruit - Vine Cacti: Limitations and Challenges and the Current Global Market, *Acta Horti*, Vol. 1067, 2015, pp. 365-370.
- [2] N. H. Son, N. T. Hieu, N. T. B. Ngoc, T. M. Tien, M. T. T. Kieu, N. T. T. Vinh, Research on some urgent measures to limit the spread and harms of dragon fruit stem rot disease caused by *Neoscytalidium dimidiatum* fungus, *Science and Technology Journal of Agriculture and Rural Development*, Vol. 9, 2015, pp. 27-32.
- [3] N. K. Ngoc, N. V. Nguyen, P. T. M. An, A. Woolf, R. Fullerton, Effect of storage temperatures on postharvest diseases of dragon fruit (*Hylocereus undatus* Haw.) in the Mekong Delta Region, Vietnam, *Acta Horticulturae*, 2018, pp. 453-460.
- [4] P. A. Backman, R. A. Sikora, Endophytes: An Emerging Tool for Biological Control, *Biol. Control*, Vol. 46, 2008, pp. 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.03.009>.
- [5] D. Dutta, K. C. Puzari, R. Gogoi, P. Dutta, Endophytes: Exploitation as a Tool in Plant Protection, *Braz. Arch. Biol. Technol.*, Vol. 57, 2014, pp. 621-629. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402043>.
- [6] S. Larran, M. R. Simon, M. V. Moreno, S. M. P. Santamarina, A. Perello, Endophytes from Wheat as Biocontrol Agents Against Tan Spot Disease, *Biol. Control*, Vol. 92, 2015, pp. 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.002>.
- [7] C. E. Hong, J. M. Park, Endophytic Bacteria as Biocontrol Agents against Plant Pathogens: Current State-Of-The-Art, *Plant Biotechnol. Rep.*, Vol. 10, 2016, pp. 353-357. <https://doi.org/10.1007/s11816-016-0423-6>.
- [8] S. Compant, G. Brader, S. Muzammil, A. Sessitsch, A. Lebrühi, F. Mathieu, Use Of Beneficial Bacteria and Their Secondary Metabolites to Control Grapevine Pathogen Diseases, *BioControl*, Vol. 58, 2013, pp. 435-455. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9479-6>.
- [9] S. Compant, B. Duffy, J. Nowak, C. Clement, E.A. Barka, Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 71, 2005, pp. 4951-4959. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- [10] A. Kumar, E. Radhakrishnan, S. Droby, V. Singh, S. Singh, J. White, Entry, Colonization and Distribution of Endophytic Microorganisms in Plants, *Microbial Endophytes: Functional Biology and Applications*, Elsevier, 2019.
- [11] M. Meena, P. Swapnil, R. S. Upadhyay, Isolation, Characterization and Toxicological Potential of *Alternaria*-mycotoxins (TeA, AOH and AME) in Different *Alternaria* Species from Various Regions of India, *Sci. Rep.* Vol. 7, 2017, pp. 8777. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09138-9>.
- [12] G. B. Lan, Z. F. He, P. G. Xi, Z. D. Jiang, C. Mainland, First Report of Brown Spot Disease Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on *Hylocereus undatus* in Guangdong, *Plant Disease*, Vol. 96, 2012, pp. 1702. <http://doi.org/10.1094/PDIS-07-12-0632-PDN>.
- [13] T. M. Tuong, T. N. Hung, Research of Prevention and Treatment of Some Fungal Pathogens in Dragon Fruit by Using Trichoderma, *Journal of Thu Dau Mot University*, Vol. 4, 2012, pp. 10-15.
- [14] J. L. Balcázar, I. De Blas, I. Ruiz-Zarzuola, D. Cunningham, D. Vendrell, J. L. Múzquiz, The Role of Probiotics in Aquaculture, *Veterinary microbiology*, Vol. 114, 2006, pp. 173-186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>.
- [15] H. A. Hong, J. M. Huang, R. Khaneja, L. V. Hiep, M. C. Urdaci and S. M. Cutting, The Safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as Food Probiotics, *J. Appl. Microbiol.*, Vol. 105, 2008, pp.

- 510-520. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03773.x>
- [16] S. McEldowney, M. Fletcher, Variability of the Influence of Physicochemical Factors Affecting Bacterial Adhesion to Polystyrene Substrata, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 52, 1986, pp. 460-465. <http://doi.org/10.1128/AEM.52.3.460-465.1986>.
- [17] C. Chaintreuil, E. Giraud, Y. Prin, J. Lorquin, B. A. A. Amadou, M. Gillis, P. De Lajudie and B. Dreyfus, Photosynthetic Bradyrhizobia are Natural Endophytes of the African Wild Rice *Oryza breviligulata*, *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 66, 2000, pp. 5437-5447. <http://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5437-5447.2000>.
- [18] D. K. Zinniel, P. Lambrecht, N. B. Harris, Z. Feng, D. Kuczmariski, P. Higley, C. A. Ishimaru, A. Arunakumari, R. G. Barletta, A. K. Vidaver, Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants, *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 68, 2002, pp. 2198-2208.
- [23] Forms Biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 71, 2005, pp. 7292-7300. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7292-7300.2005>.
- [24] M. Ongena, P. Jacques, *Bacillus* Lipopeptides: Versatile Weapons for Plant Disease Biocontrol, *Trends Microbiol.* Vol. 16, 2008, pp. 115-125. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>.
- [25] A. K. Dunn, A. K. Klimowicz, J. Handelsman, Use of a Promoter Trap to Identify *Bacillus Cereus* <http://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2198-2208.2002>.
- [19] G. Strobel, B. Daisy, U. Castillo and J. Harper, Natural Products from Endophytic Microorganisms, *J. Nat. Prod.* Vol. 67, 2004, pp. 257-268. <https://doi.org/10.1021/np030397v>.
- [20] W. Haggag, S. Timmusk, Colonization of Peanut Roots by BioFilm-forming *Paenibacillus Polymyxa* Initiates Biocontrol Against Crown Rot Disease, *J. Appl. Microbiol.*, Vol. 104, 2008, pp. 961-969. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03611.x>
- [21] G. Seneviratne, R. Thilakaratne, A. Jayasekara, K. Seneviratne, K. Padmathilake, M. De Silva, Developing Beneficial Microbial Biofilms on Roots of Non Legumes: a Novel Biofertilizing Technique, In: *Microbial Strategies for Crop Improvement*, Springer, 2009, pp. 51-62. [http://doi.org/10.1007/978-3-642-01979-1\\_3](http://doi.org/10.1007/978-3-642-01979-1_3).
- [22] S. Timmusk, N. Grantcharova, E. G. H. Wagner, *Paenibacillus Polymyxa* Invades Plant Roots and Genes Regulated by Tomato Seed Exudate and a Rhizosphere Resident, *Pseudomonas Aureofaciens*, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 1197-1205. <http://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1197-1205.2003>.
- [26] L. Eberl, S. B. Von Bodman, C. Fuqua, *The Biofilm Mode of Life: Mechanisms and Adaptation*, Horizon Bioscience, Norfolk, 2007, pp. 214-233.