

DOI:10.22144/ctu.jvn.2021.044

NGHIÊN CỨU *in vitro* CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN SỰ PHÁT TRIỂN CỦA NẤM *Alternaria alternata* GÂY BỆNH THỐI NGỌN CÀNH TRÊN CÂY THANH LONG (*Hylocereus SPP.*)

Đỗ Quang Trung^{1*}, Nguyễn Thị Thu Hằng², Phạm Bích Ngọc³, Đinh Mai Văn², Trần Thị Hằng² và Lưu Thế Anh¹

¹Viện Tài nguyên và Môi trường, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Trường Đại học Lâm nghiệp Việt Nam

³Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đỗ Quang Trung (email: trungcnsinh@gmail.com)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 02/12/2020

Ngày nhận bài sửa: 09/01/2021

Ngày duyệt đăng: 28/04/2021

Title:

In vitro assay of factors affecting the growth of *Alternaria alternata*, a casual of stem end rot disease on pitaya (*Hylocereus spp.*)

Từ khóa:

Alternaria alternata, độ mặn, kiểm soát sinh học, nhiệt độ, pH, thanh long

Keywords:

Alternaria alternata, salinity, biocontrol, temperature, pH, pitaya

ABSTRACT

Knowing the environment that is unfavorable for the growth of pathogens can be used as basic information to develop appropriate strategies to prevent the occurrence of disease in dragon fruit. In this paper, a number of environmental factors including temperature, pH and salinity, as well as biological factors including endogenous bacteria species isolated from pitaya showing antagonistic activity on fungi, *Alternaria alternata* was studied. The growth of *A. alternata* mycelium is inhibited at 35°C, while 25°C is quite suitable for their growth. The temperature of 30°C is favorable for the development of *A. alternata*. Under different pH conditions, the growth of *A. alternata* is most inhibited at pH 4. Moreover, the salinity test results show that *A. alternata* is not significantly affected by salt concentrations tested. Meanwhile, *in vitro* testing of antagonistic bacteria showed that both EC120 and EC121 were highly effective in inhibiting the growth of the fungus under investigation. The results of the experiment show that the proper combination of environmental regulation and care regimen can be very beneficial for crop growth in the field as well as the longevity of fruit after harvest.

TÓM TẮT

Biết được môi trường không thuận lợi cho sự phát triển của nấm bệnh có thể được sử dụng làm thông tin cơ bản để xây dựng các chiến lược thích hợp để ngăn ngừa sự xuất hiện của bệnh trên thanh long. Nghiên cứu nhằm đánh giá một số yếu tố môi trường bao gồm nhiệt độ, độ pH và độ mặn, cũng như yếu tố sinh học bao gồm các loài vi khuẩn nội sinh phân lập từ cây thanh long đối kháng với nấm gây bệnh, *Alternaria alternata*. Sự phát triển của sợi nấm *A. alternata* bị ức chế ở nhiệt độ 35°C, trong khi nhiệt độ 25°C khá thích hợp cho sự phát triển của chúng. Nhiệt độ 30°C là thuận lợi cho sự phát triển của *A. alternata*. Trong điều kiện pH khác nhau, sự phát triển của nấm *A. alternata* hầu hết bị ức chế cực đại ở pH 4. Hơn nữa, kết quả thử nghiệm độ mặn cho thấy *A. alternata* không bị ảnh hưởng nhiều bởi các nồng độ muối được thử nghiệm. Trong khi đó, việc kiểm tra vi khuẩn đối kháng trong ống nghiệm cho kết quả là cả EC120 và EC121 đều có hiệu quả cao trong việc ức chế sự phát triển của loại nấm được khảo sát. Các kết quả thí nghiệm cho thấy sự kết hợp thích hợp của việc điều chỉnh môi trường và chế độ chăm sóc có thể rất hữu ích cho sự phát triển của cây trồng trên đồng ruộng cũng như tuổi thọ của trái cây sau thu hoạch.

1. GIỚI THIỆU

Thanh long (*Hylocereus* spp.) thuộc họ xương rồng và có nguồn gốc từ Nam Mỹ (Crane & Balardi, 2005). 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 (Nguyễn Như Nhứt và ctv., 2020). 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% (Tel Zur, 2015). Với ưu thế về điều kiện đất đai khí hậu và kinh nghiệm canh tác của người dân, 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 đang diễn ra nghiêm trọng, có nhiều bệnh trên cây thanh long đã được ghi nhận từ một số quốc gia sản xuất các loài ruột trắng, đỏ và vàng. Ví dụ như các bệnh do nấm gây ra, chẳng hạn như *Alternaria* sp., *Ascochyta* sp., *Aspergillus* sp., *Bipolaris cactivora*, *Botryosphaeria dothidea*, *Capnodium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Dothiorella* sp., *Fusarium* sp., *Gloeosporium agaves*, *Macssonina agaves*, *Phytophthora* sp. và *Sphaceloma* sp. (Jin et al., 2020; Le Bellec et al., 2006; Nguyễn Như Nhứt và ctv., 2020; Palmateer et al., 2007; Paull, 2007; Sijam et al., 2008). Trong các bệnh trên cây thanh long, đáng chú ý là bệnh thối ngọn cảnh do nấm *Alternaria* sp. gây ra. Bệnh thường xuất hiện quanh năm, đặc biệt vào điều kiện nhiệt độ, độ ẩm cao như vào đầu mùa mưa. Ngọn cảnh hay đầu cảnh thanh long bị bệnh sẽ chuyển sang màu vàng, mềm ra sau đó bị thối. Bệnh thối ngọn khiến ngọn cây bị chết, cảnh 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.

Kiến thức sinh học cơ bản của mầm bệnh, chẳng hạn như sự liên quan giữa sự nảy mầm và hình thành bào tử với các yếu tố môi trường, sẽ rất hữu ích trong việc phát triển các chiến lược quản lý bệnh bền vững hơn (Xu et al., 2001). Cần phải hiểu chính xác các điều kiện môi trường cho sự lây nhiễm và phát triển của bệnh để xác định thời điểm sử dụng thuốc trừ nấm thích hợp và có thể là thực hiện các biện pháp kiểm soát bệnh thay thế (Percich et al., 1997). Nghiên cứu này đánh giá các yếu tố môi trường cũng như hai vi khuẩn nội sinh (VKNS) đối kháng (EC120 và EC121) với nấm gây bệnh thối ngọn cảnh (*Alternaria alternata*) đã phân lập được trên cây thanh long trong điều kiện *in vitro*.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các thí nghiệm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Vi sinh, Viện Tài nguyên và Môi trường, Đại học Quốc gia Hà Nội. Các chủng VKNS đối kháng phân lập từ cây thanh long (EC120 và EC121) và mẫu nấm gây bệnh thối ngọn cảnh sử dụng trong thí nghiệm này được lấy từ bộ sưu tập các chủng vi sinh vật của Phòng thí nghiệm Vi sinh. Một số yếu tố môi trường bao gồm nhiệt độ, pH và độ mặn và các chủng VKNS đối kháng chống lại các loại nấm gây bệnh đó đã được nghiên cứu.

2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Chủng nấm nghiên cứu được nuôi cấy trên đĩa có chứa môi trường PDA và sau đó được ủ ở 4 nhiệt độ khác nhau là 20, 25, 30, hoặc 35°C trong 10 ngày theo phương pháp được phát triển bởi Baird (2004). Sự phát triển của nấm được theo dõi bằng cách đo đường kính sợi nấm bằng thước đo (Digimatic Calibre, Japan) hai ngày một lần. Các thí nghiệm được lặp lại ba lần.

2.2. Ảnh hưởng của pH

Chủng nấm nghiên cứu được nuôi cấy trên môi trường PDA. Giá trị pH đã được điều chỉnh thành 4; 5,5; 7; 8,5 hoặc 10 (Fayzalla et al., 2008). pH được xác định bằng máy đo pH Delta 320 (Mettler, Toledo). Sự phát triển của nấm được theo dõi bằng cách đo đường kính sợi nấm bằng thước cặp kỹ thuật số hai ngày một lần. Các thí nghiệm được lặp lại ba lần.

2.3. Ảnh hưởng của độ mặn

Các chủng nấm phân lập được nuôi cấy trên đĩa PDA trong 10 ngày với nồng độ độ muối NaCl khác nhau (0, 1, 10, 100, 1.000 mg L⁻¹) (Al-Rokibah et al., 1998). Sự phát triển của nấm được theo dõi bằng cách đo đường kính sợi nấm bằng thước cặp kỹ thuật số hai ngày một lần. Các thí nghiệm được lặp lại ba lần.

2.4. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đối kháng

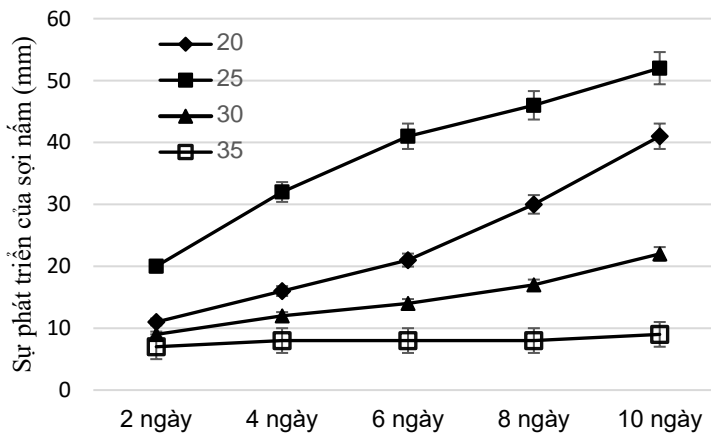
Thí nghiệm này được thực hiện với quy trình nuôi cấy kép theo phương pháp do Sijam and Dikin (2005) phát triển bằng cách nuôi cấy cả nấm phân lập và vi khuẩn đối kháng trong đĩa PDA trong 10 ngày ở nhiệt độ phòng. VKNS đối kháng, EC120 và EC121, được nuôi cấy trên LB (Oxoid Ltd., Basingtoke, Hampshire, Anh) từ bộ sưu tập của Phòng thí nghiệm vi sinh, Viện Tài nguyên và Môi trường, Đại học Quốc gia Hà Nội. Mẫu nấm (đường kính 4 mm) được đặt cách mép đĩa cấy 2 cm; trong khi VKNS đối kháng cấy ở phía đối diện trên cùng

một đĩa. Sự phát triển của nấm được theo dõi bằng cách đo cả hướng tâm của sợi nấm về phía rìa đĩa (được coi là R_o) và về phía VKNS (được coi là R_t) bằng thước cặp kỹ thuật số 2 ngày một lần. Các thí nghiệm được lặp lại ba lần. Sự ức chế của VKNS đối kháng chống lại các chủng nấm được phân lập theo công thức sau:

$$H = (R_o - R_t) / R_o \times 100$$

Trong đó, H: Hiệu quả ức chế (%); R_o = Sự phát triển của sợi nấm về phía mép đĩa (mm); R_t = Sự phát triển của sợi nấm về phía vi khuẩn (mm).

2.5. Phân tích thống kê



Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển của nấm *A. alternata* trong điều kiện *in vitro*

3.2. Ảnh hưởng của pH

Thí nghiệm *in vitro* về ảnh hưởng của pH nói chung cho thấy sự phát triển của nấm *A. alternata* bị ức chế bởi pH 4. Sự ức chế do pH 4 có hiệu quả cho

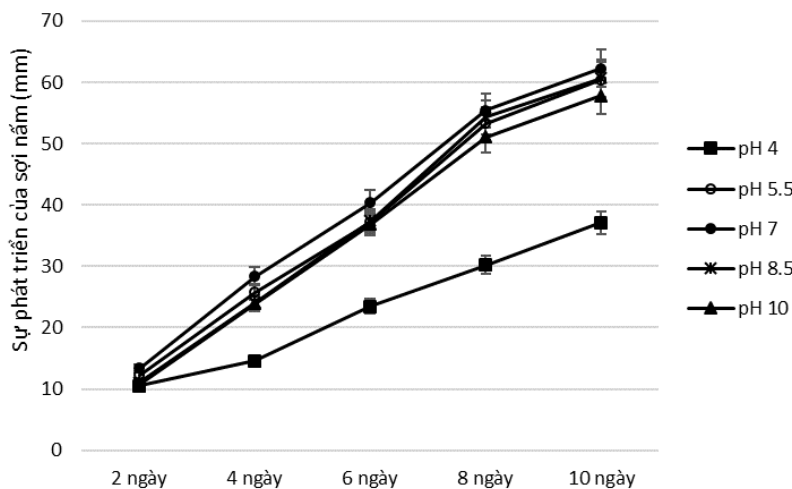
Các số liệu thí nghiệm được đánh giá bằng các phương pháp thống kê phân tích biến thiên (Analysis of Variance, ANOVA), so sánh trung bình theo phép thử Duncan. Các số liệu ghi nhận được xử lý bằng Excel và phần mềm SPSS phiên bản 19.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhìn chung, kết quả thí nghiệm xử lý nhiệt độ cho thấy sự phát triển liên tục của sợi nấm bị ức chế ở nhiệt độ 30 và 35°C; trong khi nhiệt độ 20°C khá thích hợp cho sự phát triển của chúng. Nhiệt độ 25°C thuận lợi cho sự phát triển của *A. alternata* (Hình 1).

đến thời điểm kết thúc thí nghiệm. Kết quả thí nghiệm cho thấy giá trị pH trong khoảng 5,5-10 ít ảnh hưởng hơn tới sự phát triển của nấm *A. alternata* và pH 7 là lý tưởng và tạo ra sự phát triển sợi nấm trung bình tối đa (Hình 2).

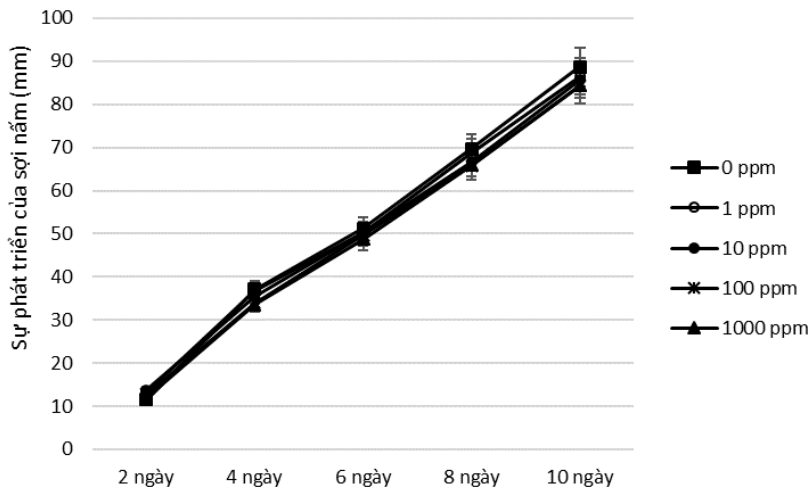


Hình 2. Ảnh hưởng của pH đến sự phát triển của nấm *A. alternata* trong điều kiện *in vitro*

3.3. Ảnh hưởng của độ mặn

Các kết quả thí nghiệm về sự kháng mặn cho thấy các nồng độ mặn khác nhau đều có những tác

động khác biệt đáng kể đối với *A. alternata* so với đối chứng (Hình 3).

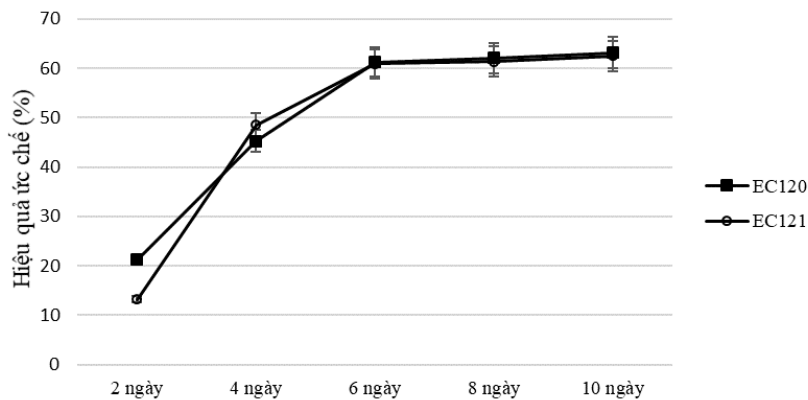


Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl đến sự phát triển của nấm *A. alternata* trong điều kiện *in vitro*

3.4. Ảnh hưởng của VKNS đối kháng

Kết quả kiểm tra VKNS đối kháng cho thấy cả EC120 và EC121 có hiệu quả cao trong việc ức chế sự phát triển của nấm *A. alternata* (Hình 4). Trong

6 ngày đầu tiên khả năng ức chế của hai chủng đạt 60%. Trong các ngày tiếp theo khả năng ức chế của các chủng VKNS này ổn định và dao động trong khoảng 60-63%.



Hình 4. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đối kháng đến sự phát triển của nấm *A. alternata* trong điều kiện *in vitro*

4. THẢO LUẬN

Nhìn chung, sự phát triển của nấm gây bệnh thối nhũn *A. alternata* bị ức chế đáng kể bởi mức độ cực đoan (tối thiểu và tối đa) của các nghiệm thức, ngoại trừ xử lý bằng độ mặn. Trong khi đó, hai loại VKNS đối kháng được sử dụng có thể hạn chế sự phát triển sợi nấm của mầm bệnh. Tuy nhiên, những phát hiện này không giống như những phát hiện trên các loài nấm khác nhau trên các cây trồng khác nhau. Tỷ lệ

này mầm tối đa của nấm *Bipolaris sorokiniana* gây ra phức hợp bệnh trên cây *Poa pratensis* và *Agrostis palustris* là lớn nhất ở 25 và 30°C, nhưng nó không nảy mầm ở 35°C (Hodges, 1975); trong khi Barba et al. (2002) quan sát thấy sự hình thành bào tử của *B. sorokiniana* trên hạt lúa mạch đạt cực đại ở 19,3°C.

Nấm thường chỉ sử dụng cơ chất ở dạng dung dịch để tạo ra các chất cần thiết cho sự phát triển và sự trao đổi chất của chúng. Do đó, pH có vai trò quan

trong trong quá trình phát triển của sợi nấm. Kết quả thí nghiệm chỉ ra rằng sự phát triển sợi nấm *A. alternata* thích hợp khoảng pH từ 7 đến 10. Môi trường pH kiềm cho *A. alternata* phù hợp với các nghiên cứu khác trước đó (Gawai & Mangnalikar, 201-8). Bischoff and Garraway (1987) giả định rằng sự tích tụ ammonium và tăng độ pH trên môi trường rắn có thể làm tăng sản xuất NADP-glutamate dehydrogenase và NAD-glutamate dehydrogenase trong nuôi cấy lỏng nấm *Bipolaris maydis* có liên quan đến sự hiện diện của sợi nấm và của sợi nấm với bào tử.

Sự ức chế không đáng kể của các mức độ mặn nhất định đối với sự phát triển của nấm *A. alternata* trong nghiên cứu này phù hợp với một số kết quả thu được từ các nghiên cứu trước đó. Thí nghiệm *in vitro* do Hopkins and McQuilken (2000) cho thấy nấm *Pestalotiopsis sydowiana* (tác nhân gây bệnh trên lá, gốc và rễ trên cây cảnh tại các vườn ươm thương mại ở Anh) có tỷ lệ mở rộng sợi nấm nhanh nhất khi được nuôi trên PDA có bổ sung muối NaCl. Trong một nghiên cứu khác về ảnh hưởng của độ mặn đến sự phát triển của sợi nấm thì dung dịch muối (nồng độ 0,1 và 0,2 M) đã làm tăng cường sự phát triển của bệnh thối rễ trên cây Cúc (do nấm *Phytophthora cryptogea* gây ra) lên tương ứng là 70 và 88% (MacDonald, 1982).

Tuy nhiên, những phát hiện của nghiên cứu này có sự sai khác với một số công trình nghiên cứu vai trò của muối NaCl trong việc ngăn chặn bệnh thối ngọn và thối rễ trên cây măng tây (*Asparagus officinalis* L.) do *F. oxysporum* hoặc *F. proliferatum* gây ra (Elmer, 2003). Trong báo cáo đó, tác giả đã công bố mức độ giảm các vết thương ở rễ tiếp xúc trực tiếp với NaCl (giảm 51%) cao hơn đáng kể so với rễ không tiếp xúc (giảm 31%).

Mặt khác, thí nghiệm *in vitro* này đã chứng minh rằng cả EC120 và EC121 có thể là tác nhân kiểm soát sinh học nấm *A. alternata*. Kết quả này phù hợp với một số báo cáo trước đây về khả năng tạo ra chất kháng nấm của các chủng vi khuẩn (Dikin et al., 2007; Luu et al., 2021). Ví dụ như Dikin et al. (2007) báo cáo rằng các chất kháng khuẩn của vi khuẩn *B. multivorans* có thể hạn chế sự phát triển của nấm *Schizophyllum commune*, tác nhân gây bệnh của mầm nâu và bệnh thối hạt trên cò dầu.

5. KẾT LUẬN

Sự phát triển của sợi nấm được thử nghiệm bị ảnh hưởng nhiều bởi điều kiện nhiệt độ khác nhau (35°C) và pH (pH 4,0). Các nồng độ muối có thể ức chế đáng kể đến sự phát triển của nấm *A. alternata*;

trong khi các vi khuẩn nội sinh đối kháng được sử dụng, chủng EC120 và EC121, có hiệu quả nhất trong việc hạn chế sự phát triển của nấm thử nghiệm trong điều kiện *in vitro*. Các kết quả thí nghiệm cho thấy sự tương quan thuận nghịch giữa sự cải biến môi trường một cách hợp lý và sự phát triển của cây trồng trên đồng ruộng cũng như tuổi thọ của trái cây sau thu hoạch.

LỜI CẢM ƠN

Xin cảm ơn Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và 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

- Al-Rokibah, A.A., Abdalla, M.Y., & El-Fakharani, Y.M. (1998). Effect of water salinity on *Thielaviopsis paradoxa* and growth of date palm seedlings. *J. King Saud Univ. Agric. Sci.*, 10, 55-63.
- Baird, R.E. (2004). Laboratory Exercises Illustrating Some Fungi in Deuteromycota. In: Plant Pathology, Concepts and Laboratory Exercises, Trigiano, R.N., Windham M.T. & Windham A.S. (Eds.). CRC Press, New York, pp. 141-149.
- Barba, J.T., Reis E.M., & Forcelini, C.A. (2002). Effect of temperature and fungicide on the transmission of *Bipolaris sorokiniana* from seeds to barley plants. *Fitopatol. Brasileira*, 27, 500-507.
- Bischoff, T.W., & Garraway, M.O. (1987). Effects of glycose on NADP and NAD glutamate dehydrogenase activities and their relation to ammonium and pH levels in cultures of *Bipolaris maydis* race T. *Mycopathologia*, 98, 141-148.
- Crane, J.H. & Balerdi, C.F. (2005). Pitaya growing in the Florida home landscape. IFAS Extension. HS1068, 1-9.
- Dikin, A., Sijam, K., Kadir, J., & Seman, I.A. (2007). Mode of action of antimicrobial substances from *Burkholderia multivorans* and *Microbacterium testaceum* against *Schizophyllum commune* Fr. *Int. J. Agric. Biol.*, 9, 311-314.
- Elmer, W.H. (2003). Local and systemic effects of NaCl on root composition, *Rhizobacteria* and *Fusarium crown* and root rot of *Asparagus*. *Phytopathology*, 93, 186-192.
- Fayzalla, E.S.A., Shabana, Y.M., & Mahmoud, N.S. (2008). Effect of environmental conditions on wilting and root rot fungi pathogenic to solanaceous plants. *Plant Pathol. J.*, 7, 27-33.

- Gawai, D.U., & Mangalakar, S.S. (2018). Effect of Temperature and pH on growth of *Alternaria alternata*, leaf spot pathogen of soyabean. *Bioscience Discovery*, 9(1), 162-165.
- Hodges, C.F. (1975). Comparative total and proportional rate of germination of *Bipolaris sorokiniana* and *Curvularia geniculata* conidia is influenced by culture age and temperature. *Mycopathologia*, 57, 9-14.
- Hopkins, K.E., & McQuilken, M.P. (2000). Characteristics of *Pestalotiopsis* associated with hardy ornamental plants in the UK. *Eur. J. Plant Pathol.*, 106, 77-85.
- Jin, X.L., Ko, Y.Z., Siti Nordahliawate, M.S., Mohd, M.H., & Chiang, Y.C. (2020). First report of stem canker of dragon fruit caused by *Alternaria* spp. in Taiwan. *New Disease Reports*, 41, 35.
- Le Bellec, F., Vaillant, F., & Imbert, E. (2006). Pitahaya (*Hylocereus* spp.): A new fruit crop, a market with a future. *Fruits*, 61, 237-250.
- Luu, T.A., Phi, Q.T., Nguyen, T.T.H., Dinh, M.V., Pham, B.N. & Do, Q.T. (2021). Antagonistic activity of endophytic bacteria isolated from weed plant against stem end rot pathogen of pitaya in Vietnam. *Egyptian journal of pest biocontrol*, 31(14), 1-8.
- MacDonald, J.D. (1982). Effect of salinity stress on the development of *Phytophthora* root rot of *Chrysanthemum*. *Phytopathology*, 72, 214-219.
- Nguyễn Như Nhứt, Nguyễn Thị Ngọc Bích, Nguyễn Thanh Trường, Võ Thị Xuyên (2019). 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.
- Percich, J.A., Nyvall R.F., Malvick D.K., & Kohls C.L. (1997). Interaction of temperature and moisture on infection of wild rice by *Bipolaris oryzae* in the growth chamber. *Plant Dis.*, 81, 1193-1195.
- Palmateer, A.J., Ploetz, R.C., Van Santen, E., & Correll, J.C. (2007). First report of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on Pitaya. *Plant Dis.*, 91, 631-631.
- Paull, R.E. (2007). Dragon Fruit. Department of Tropical Plant and Soil Sciences University of Hawaii, Manoa, Honolulu.
- Sijam, K., & Dikin, A. (2005). Biochemical and physiological characterization of *Burkholderia cepacia* as biological control agent. *Int. J. Agric. Biol.*, 7, 385-388.
- Sijam, K., Awang, Y., & Satar, M.G.M. (2008). Fungi associated with diseases on dragon fruit (*Hylocereus* spp.) in Peninsular Malaysia. Proceedings of the Microbes: Biotechnology Engine for Health and Wealth Creation. Hyatt Regency Resort, Kuantan, Pahang Darul Makmur, Malaysia, Aug. 16-19, Malaysian Society for Microbiology, pp. 234-237.
- Tel Zur, N. (2015). Research and development of pitahayas - dragonfruit - vine cacti: limitations and challenges and the current global market. *Acta Hortic. (Wagening.)*, 1067, 365-370.
- Xu, X.M., Guerin, L., & Robinson, J.D. (2001). Effects of temperature and relative humidity on conidial germination and viability, colonization and sporulation of *Monilinia fructigena*. *Plant Pathol.*, 50, 561-568.