

# PHÂN LẬP MỘT SỐ CHỦNG *BACILLUS* SP. ĐỐI KHÁNG VỚI *COLLETOTRICHUM* SP. GÂY BỆNH KHÔ CÀNH KHÔ QUẢ TRÊN CÂY CÀ PHÊ Ở TỈNH ĐẮK NÔNG

## TÓM TẮT

Bệnh khô cành khô quả là nguyên nhân chính gây thiệt hại lớn trên cây cà phê (*Coffea* spp.) ở Việt Nam. Với xu hướng dùng vi sinh để đối kháng với các tác nhân gây bệnh trên cây trồng, việc kiểm soát bệnh khô cành khô quả trên cây cà phê do nấm *Colletotrichum* gây ra bằng *Bacillus* là giải pháp đang nhận được nhiều quan tâm. Kết quả phân lập 55 mẫu cà phê ở tỉnh Đắk-Nông có 3 nhóm nấm chính gây bệnh khô cành khô quả cho thấy và trong đó nhóm *Colletotrichum* CC1.5 có khả năng gây bệnh nhanh và mạnh. Trong 21 chủng *Bacillus* sp. phân lập ở đất rừng nguyên sinh và đất vườn cà phê khỏe mạnh tại Đắk-Nông, chủng *Bacillus subtilis* ĐR2B1 có khả năng đối kháng tốt với *Colletotrichum* CC1.5 ở phương pháp đối kháng trực tiếp 67,41 % và đối kháng khuếch tán qua lỗ thạch 24,67 mm sau 6 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA.

**Từ khóa:** khô cành khô quả, *Colletotrichum*, *Bacillus*.

## ABSTRACT

**Keywords:** *Coffee berry disease*; *Colletotrichum*; *Bacillus*.

## 1. MỞ ĐẦU

Cây cà phê (*Coffea* spp.) là cây trồng xuất khẩu chính mang lại hiệu quả kinh tế cao ở nhiều nước như Brazil, Việt Nam, Indonesia, Colombia và Ấn Độ (FAOSTA, 2013). Có nhiều loài cà phê được trồng trên thế giới, trong đó cà phê vối (*Coffea arabica*) và cà phê chè (*Coffea robusta*) mang lại hiệu quả kinh tế cao nhất. Mặc dù, cây cà phê có giá trị kinh tế cao, tuy nhiên sản xuất cà phê hiện nay đang bị ảnh hưởng nhiều bởi dịch bệnh. Đặc biệt bệnh khô quả khô cành trên cà phê do loài *Colletotrichum* gây ra ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng. Nghiên cứu cho thấy có nhiều loài *Colletotrichum* gây bệnh khô cành khô quả trên cà phê, cụ thể các loài *Colletotrichum* ảnh hưởng đến cà phê đã được công bố ở một số nước: ba loài ở Thái Lan (*C. asianum*, *C. fructicola* và *C. siamense*), hai loài ở Angola (*C. cuscutae* và *C. fragariae*) và một loài cho các quốc gia gồm: Úc (*C. theobromicola*), Colombia (*C. gigasporum*), Costa Rica (*C. costarricense*), Fiji (*C. queenslandicum*) và Kenya (*C. kahawae* subsp. *kahawae*) [1],[2],[3],[4],[5],[6]. Một số nghiên cứu đã xác định được nấm *Colletotrichum* sp. dựa trên về hình thái vi thể, đại thể của nấm và sử dụng các phương pháp sinh học phân tử [1],[2].

Việc lạm dụng thuốc bảo vệ thực vật để phòng trừ bệnh khô cành, khô quả do nấm *Colletotrichum* sp. trên cây cà phê ngày càng tăng làm nấm bệnh lờn thuốc, bệnh bùng phát trở lại nhiều lần. Do đó biện pháp dùng thuốc BVTV vừa tốn kém vừa gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến sức khỏe cho người nông dân và giảm giá trị nông sản xuất

khẩu. Đặc biệt dư lượng thuốc bảo vệ thực vật tồn dư trong đất, nhiễm vào các nguồn nước sinh hoạt của người nông dân, làm gia tăng các bệnh hiểm nghèo ở người, như bệnh ung thư... Chính vì vậy, để phát triển cà phê theo hướng bền vững, thân thiện với môi trường, biện pháp phòng trị bệnh khô cành do nấm *Colletotrichum* bằng vi sinh là một trong những biện pháp tối ưu nhất.

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

## **2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1 Vật liệu**

#### ***Đối tượng nghiên cứu***

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

Chủng *Bacillus* được phân lập từ các mẫu đất ở các vườn cà phê khỏe mạnh, không có dấu hiệu bị bệnh và đất tại khu vực rừng nguyên sinh thuộc tỉnh Đắk-Nông.

#### ***Môi trường sử dụng nghiên cứu***

Môi trường phân lập, nuôi cấy *Colletotrichum* và thử nghiệm đối kháng: PDA (Potato D-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 *Bacillus*: 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: 20 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**

#### ***Phân lập Colletotrichum***

Tại mỗi địa điểm vườn cà phê, lấy 10 mẫu cho mỗi loại thân, quả non, quả chín có triệu chứng bị bệnh khô quả khô cành. Phần mẫu có triệu chứng điển hình của bệnh khô quả khô cành được cô lập để phân lập. Chọn mô thực vật mới bị bệnh để phân lập, rửa mẫu trong nước để loại bỏ bụi và các tạp chất khác. Khử trùng bề mặt bằng ethano 75 %, sau đó rửa lại ba lần với nước cất vô trùng, để khô trên giấy vô trùng. Dùng dụng cụ được khử trùng cắt những miếng nhỏ 5x5 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 cấy hằng ngày, khi các tán nấm phát triển từ những mẫu nhiễm bệnh, cấy truyền chúng sang môi trường PDA mới. Quan sát vi thể đại thể ở vật kính 40X để xác định nấm *Colletotrichum*. Mẫu nấm nghi ngờ *Colletotrichum* được lưu trữ trong glycerol 25% ở -80°C và trong các ống thạch nghiên PDA.

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

Nuôi cấy nấm bệnh *Colletotrichum* trên môi trường PDA (ủ trong tối ở 25°C- 28°C) khoảng 7 -10 ngày, sau đó ly tâm 8000 vòng/phút thu sinh khối, hòa tan bào tử và đưa về mật độ 10<sup>6</sup> CFU/ml. Chọn trái cà phê khỏe mạnh rửa dưới vòi nước chảy sau đó để khô. Đặt miếng giấy lọc tiệt trùng và 2 miếng lam kính tiệt trùng vào đĩa petri đã được khử trùng. Sau đó giấy lọc được làm ẩm bằng nước cất vô trùng. Quả cà phê khỏe được tạo vết thương bằng kim tiêm vô trùng và đặt trên lam kính trong đĩa petri. Tiến hành phun dịch treo bào tử của vi nấm *Colletotrichum* ở nồng độ 5x10<sup>6</sup> CFU/ml lên bề mặt trái cà phê, ủ trong 2 tuần ở nhiệt độ phòng. Nghiệm thức đối chứng tiến hành phun nước cất vô trùng [9].

*Ghi nhận kết quả:* Quan sát hằng ngày và đánh giá biểu hiện bệnh trên đoạn thân cây và quả được gây bệnh và so sánh các đặc điểm của bệnh trong tự nhiên. Chọn mẫu nấm có khả năng gây bệnh tương tự mô tả ngoài tự nhiên để tiếp tục nghiên cứu. Tính tỉ lệ gây bệnh: TLB(%) = Số quả hoặc đoạn thân cây bệnh/tổng số quả hoặc đoạn thân x 100.

#### **Phương pháp phân lập *Bacillus***

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

#### **Phương pháp đối kháng giữa *Bacillus* và *Colletotrichum***

Thử nghiệm đối kháng trực tiếp bằng cách cấy kép [8],[10],[11]. Nấm bệnh được cấy vào đĩa petri chứa môi trường PDA và ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 ngày. Sau 2 ngày tiến hành cấy vi khuẩn, xạ khuẩn lên bề mặt đĩa nấm đã ủ, chia đĩa làm 4 phần, dùng que cấy chủng vi khuẩn hoặc xạ khuẩn lên 3 điểm (1 điểm không cấy dùng làm đối chứng) trên đĩa cách bìa sợi nấm 1,5cm. Sau 5 ngày quan sát sự hình thành vùng kháng nấm và tính hiệu suất ức chế sự phát triển của sợi nấm bởi vi khuẩn và xạ khuẩn theo công thức:  $I = (R - r) / R \times 100$ . Trong đó : H: Hiệu suất đối kháng của vi khuẩn (%), R: Bán kính của hệ sợi nấm đối chứng (cm), r: Bán kính của hệ sợi nấm trên đĩa có chủng vi khuẩn. Với phương pháp khuếch tán qua lỗ 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.

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

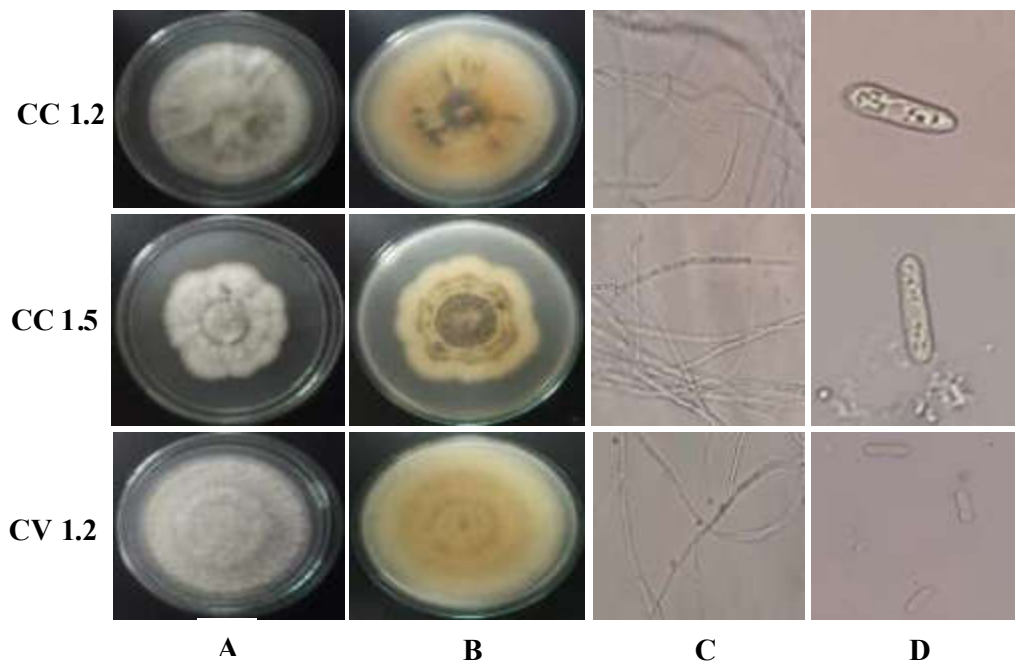
Đối với nấm *Colletotrichum* được định danh bằng phương pháp giải trình tự ITS-rRNA. Chủng vi khuẩn *Bacillus* được định danh bằng phương pháp sử dụng khối phổ protein (MALDI-TOF).

### 3. KẾT QUẢ

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

##### *Phân lập và làm thuần*

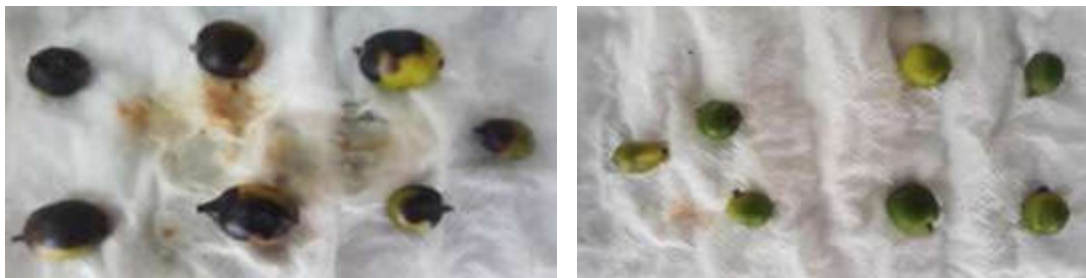
Từ các mẫu cà phê bị bệnh khô cành, khô quả thu được, tiến hành phân lập nấm *Colletotrichum* trên môi trường PDA và tuyển chọn các dòng có đặc điểm của nấm *Colletotrichum* theo mô tả của Stephen A.F vào năm 1991 [12]. Sự khác biệt của các chủng nấm phân lập được sau 7-10 ngày nuôi cấy trên PDA, về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



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

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

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



**A**

**B**

**Hình 3:** Kết quả thử nghiệm khả năng gây bệnh của nấm bệnh phân lập được lên quả cà phê sau 14 ngày. A: Quả cà phê được tiêm gây bệnh bằng nấm; B: Quả cà phê được

Ti lệ bệnh đối với từng chủng nấm sau 14 ngày được thể hiện qua Bảng 1. Kết quả bảng 1



**Hình 2:** Hạt đậu trên chủng nấm CC 1.5 sau 10 ngày nuôi cấy ở  $28^\circ\text{C}$  trên môi trường PDA

cho thấy, tỉ lệ bệnh trên quả tăng theo thời gian. Tại thời điểm sau 7 ngày tiêm gây bệnh tỉ lệ bệnh từ 76.19-100%, trong đó chủng ký hiệu CC1.5 tỉ lệ gây bệnh đạt 100%. Sau 14 ngày tiêm thì cả ba chủng đều có tỉ lệ gây bệnh trên quả cà phê là 100%. Nghiệm thức đối chứng tiêm nước vô trùng qua 14 ngày không có hiện tượng bệnh. Từ kết quả trên cả ba chủng nấm bệnh phân lập đều có khả năng gây bệnh với những đặc điểm của bệnh khô cành khô quả trên cà phê, trong đó chủng CC1.5 cho khả năng gây độc cao và nhanh.

**Bảng 1:** Tỷ lệ bệnh trên quả cà phê theo thời gian sau khi lây nhiễm các chủng *CC1.2*; *CC1.5*; *CV1.2*

Nghiệm thức	Tỷ lệ bệnh trên quả cà phê (%)	
	Sau 7 ngày	Sau 14 ngày
Đối chứng	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>
<b>CC1.5</b>	<b>100<sup>e</sup></b>	<b>100<sup>d</sup></b>
CC1.2	76.19 <sup>cd</sup>	100 <sup>d</sup>
CV1.2	85.71 <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>

(Các kí tự mẫu tự theo hàng dọc khác nhau có khác biệt có ý nghĩa  $p < 0.05$ )

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

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

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



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

### Đối kháng với chủng vi khuẩn *Bacillus*

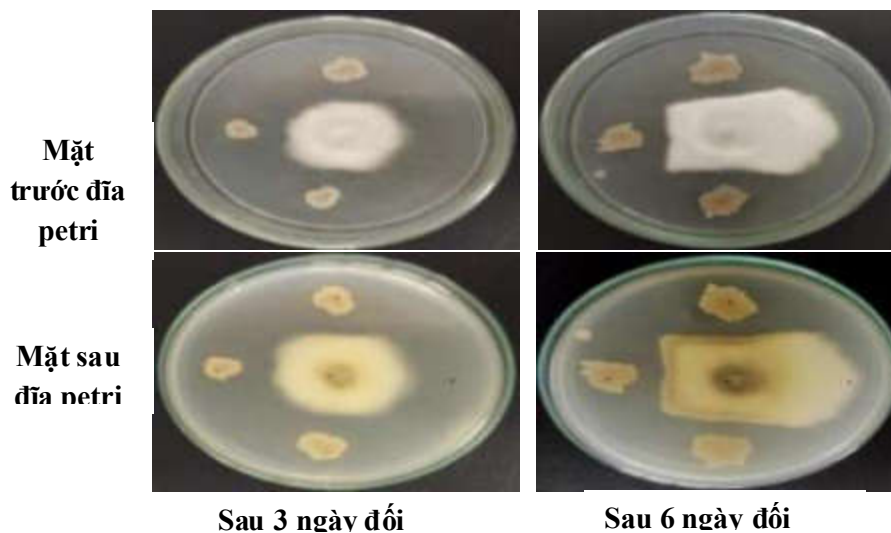
Khả năng đối kháng nấm *Colletotrichum* gây bệnh khô cành khô quả trên cà phê của các chủng *Bacillus* tuyển chọn được xác định thông qua hiệu quả ức chế (phương pháp đối kháng trực tiếp) và xác định kích thước vòng kháng khuẩn (phương pháp khuếch tán trên lỗ thạch). Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Bảng 2.

**Bảng 2:** Khả năng đối kháng của một số chủng *Bacillus* tuyển chọn có tiềm năng kháng nấm *C. coffeanum* gây bệnh khô cành, khô quả trên cây cà phê (hiệu quả ức chế nấm bệnh sau 6 ngày >23 % và kích thước vòng kháng khuẩn >11mm).

Tên chủng	Phương pháp đối kháng trực tiếp		Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch
	Hiệu quả ức chế sau 3 ngày (%)	Hiệu quả ức chế sau 6 ngày (%)	$\overline{(D - d)}$ mm
ĐR2B1	<b>38,88a</b>	<b>67,41a</b>	<b>24,67a</b>
ĐV3B1	34,37bcd	62,33ab	21,90c
ĐV4B1	35,33bc	65,56ab	23,20b
ĐV4B2	35,08bcd	61,85b	21,03c
ĐV4B3	35,05bcd	62,22b	21,67c

(Các kí tự mẫu tự theo hàng dọc khác nhau có khác biệt có ý nghĩa  $p < 0.05$ )

Tất cả các vi khuẩn *Bacillus* phân lập được đều có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* CC1.5 ở các mức độ khác nhau. Quan sát kết quả đối kháng trực tiếp sau 3 ngày theo dõi cho thấy chưa có sự tiếp xúc giữa *Bacillus* và *Colletotrichum* CC1.5, đường kính vòng nấm bệnh ở đĩa đối chứng và đĩa đối kháng không chênh lệch đáng kể (Hình 5). Sau 4 ngày quan sát thấy đã xuất hiện vòng kháng khuẩn xung quanh khuẩn lạc *Bacillus*, hiệu quả ức chế dao động từ 27,30% đến 38,88%. Sau 6 ngày theo dõi vòng kháng khuẩn xung quanh khuẩn lạc rõ hơn (Hình 5), hiệu quả ức chế giao động từ 23,70% đến 67,41% sau 6 ngày theo dõi. Trong đó, các chủng ĐR2B1, ĐV4B1 và ĐV3B1 có hiệu quả đối kháng cao nhất lần lượt là 67,41 %; 65,56 % và 62,33%.



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

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

Trong số 21 chủng *Bacillus* sp. khảo sát, chủng ĐR2B1 có khả năng đối kháng đạt hiệu quả cao với nấm *Colletotrichum* CC1.5 ở cả hai phương pháp đối kháng trực tiếp và đối kháng khuếch tán qua lỗ thạch. Kết quả phân tích trình tự rRNA 16S và so sánh trình tự trên NCBI-Blast cho thấy chủng ĐR2B1 là chủng *Bacillus subtilis* với mức độ tương đồng 99 %.



**Hình 6:** Khả năng kháng *Colletotrichum* CC1.5 của một số chủng *Bacillus* bằng phương pháp khuếch tán trên lỗ thạch

#### 4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã phân lập được 3 chủng nấm bệnh *Colletotrichum* có khả năng gây bệnh khô cành khô quả trên cây cà phê ở tỉnh Đắk Nông. Với thời gian biểu hiện bệnh nhanh từ 3-5 ngày.

Trong số 21 chủng *Bacillus* phân lập được tại đất rừng nguyên sinh và đất vườn ở tỉnh Đắk Nông, chúng tôi nhận thấy chủng *Bacillus* ĐR2B1 có khả năng đối kháng cao với nấm *Colletotrichum* CC1.5 sau 6 ngày nuôi cấy ở cả hai phương pháp đối kháng trực tiếp và đối kháng gián tiếp lần lượt là 67,41 % và 24,67 mm. Phân tích trình tự 16S- rRNA và so sánh trình tự trên NCBI-Blast cho thấy chủng ĐR2B1 là chủng *Bacillus subtilis*.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P. W. Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., & Crous, “The *Colletotrichum acutatum* species complex,” *Studies in Mycology*, vol. 73, pp. 37–114, 2012.
- [2] P. W. Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., Johnston, P. R., Weir, B. S., Tan, Y. P., Shivas, R. G., & Crous, “The *Colletotrichum boninense* species complex,” *Studies in Mycology*, vol. 73, pp. 1–36, 2012.
- [3] K. D. Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E. H. C., & Hyde, “Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand,” *Fungal Divers.*, vol. 39, pp. 89–109, 2009.
- [4] F. Rakotoniriana, E. F., Scauflaire, J., Rabemanantsoa, C., UrvegRatsimamanga, S., Corbisier, A. M., Quetin-Leclercq, J., Declerck, S., & Munaut, “). *Colletotrichum gigasporum* sp. nov., a new species of *Colletotrichum* producing long straight conidia,” *Mycol. Prog.*, vol. 12, pp. 403–412, 2013.
- [5] D. Silva, D. N., Várzea, V., Cai, L., Salgueiro, P. O., & Batista, “Application of the *Apn2/MAT* locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts,” *Mycologia*, vol. 104, pp. 396–409, 2012.
- [6] U. Weir, B. S., Johnston, P. R., & Damm, “The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex,” *Stud. Mycol.*, vol. 73, pp. 115–180, 2012.
- [7] T. Kejela, V. R. Thakkar, and P. Thakor, “*Bacillus* species (BT42) isolated from *Coffea arabica* L. rhizosphere antagonizes *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* and also exhibits multiple plant growth promoting activity,” *BMC Microbiol.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–13, 2016, doi: 10.1186/s12866-016-0897-y.
- [8] Nguyễn Thị Liên; Hà Trọng Nhân; Trần Thị Xuân Mai; Nguyễn Thị Pha; Nguyễn Lan Minh, “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên hành lá,” *Khoa học (Đại học Đồng Tháp)*, vol. 26, pp. 104–110, 2017.
- [9] P. W. and S. K. Song Jiaojiao, “Biological activity of endophytic fungi from palm trees against chili anthracnose caused by *Colletotrichum capsici*,” *J. Agric. Technol.*, vol. 11 (8), pp. 1927–1940, 2015.
- [10] T. T. X. M. và N. T. P. Nguyễn Thị Liên; Nguyễn Thị Yến Như, “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn từ đất vùng rễ ớt có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên ớt,” *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, vol. Phần B: Nông, pp. 16–23, 2016.
- [11] Nguyễn Thị Pha; Nguyễn Thị Phương Oanh và Nguyễn Hữu Hiệp, “Khả năng đối kháng nấm *Pyricularia oryzae* của vi khuẩn sinh chitinase phân lập từ đất vùng rễ lúa,” *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, vol. Phần B: Nông, pp. 7–11, 2014.
- [12] A. B. Stephen, A. F., and Rebecca, “*Colletotrichum coffeanum*,” *Univ. Hawaii Manoa. J. Crop Knowl. master*, 1991.
- [13] P. W. (Eds. . Damm, U., Cannon, P. F., & Crous, “*Colletotrichum*: complex species or species complexes,” *Stud. Mycol.*, vol. 73, pp. 1–215, 2012.