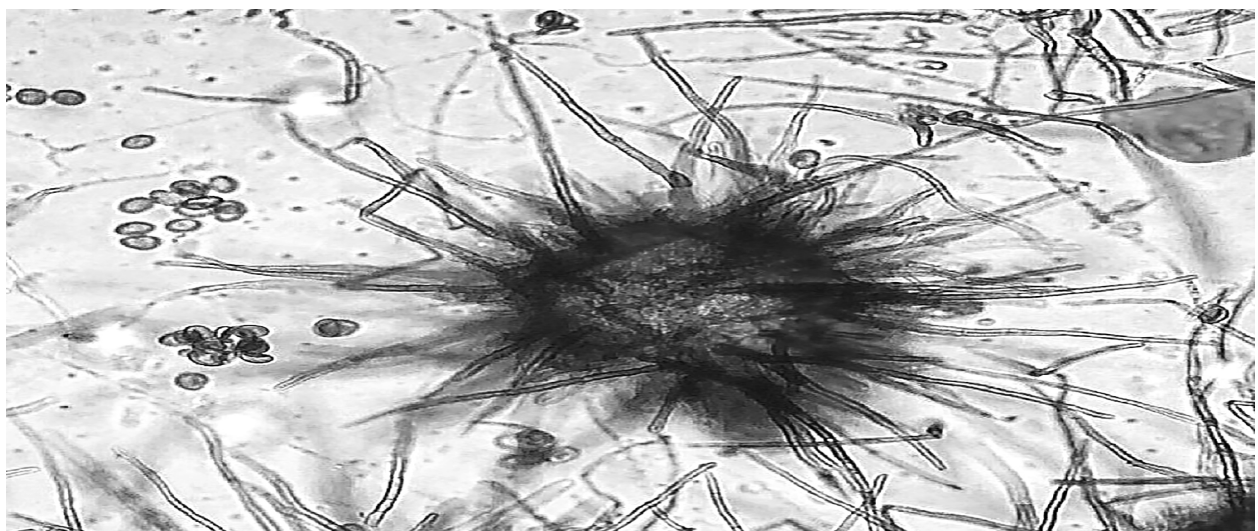


XÁC ĐỊNH ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐẾN SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN CỦA CHỦNG NẤM ĐỐI KHÁNG *CHAETONIUM*

■ Lê Minh Thanh⁽¹⁾, Nguyễn Thị Thu Hương⁽²⁾
Nguyễn Thị Ngọc⁽¹⁾



I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cam, quýt, chanh, bưởi thuộc nhóm cây ăn quả có lịch sử phát triển lâu đời và được trồng trên khắp các vùng sinh thái của Việt Nam, là một trong những mặt hàng xuất khẩu chủ lực, cũng như có nhu cầu tiêu thụ trong nước rất lớn [1]. Tuy nhiên, việc sản xuất ở Việt Nam còn nhiều khó khăn cần được giải quyết. Hiện tại, việc áp dụng các tiến bộ kỹ thuật trong sản xuất trái cây có múi như kỹ thuật cắt tỉa, tạo tán, kỹ thuật bón phân, kỹ thuật tưới nước và quản lý độ ẩm đất ở các vùng trồng cam, quýt còn hạn chế và ít kinh nghiệm; việc quản lý sâu, bệnh hại luôn gặp nhiều khó

khăn[2]. Việc phân lập lựa chọn các loài vi sinh vật có hiệu quả giúp thúc đẩy quá trình phát triển của rễ, hấp thu dinh dưỡng, tăng trưởng, năng suất và khả năng chống chịu sâu bệnh hại đã thúc đẩy các nhà nghiên cứu khám phá ra khả năng sử dụng nấm rễ và áp dụng trong sản xuất các loài cây trồng khác nhau. Nhóm nấm rễ đóng một vai trò cơ bản tác động lên năng suất và sự ổn định của hệ sinh thái nông nghiệp, tạo ra một tiềm năng lớn cho nông nghiệp bền vững. Khoảng 100.000 loài nấm trong đất đã được các nhà khoa học phát hiện và mô tả, trong đó phần lớn tập trung ở tầng đất canh tác [3]. Trong tầng đất này, bên cạnh nấm gây bệnh cho cây trồng còn có mặt các loài nấm có lợi. Một số loài nấm rễ đã được nghiên cứu và cho thấy khả năng kiểm soát tốt mầm bệnh trong đất do nấm *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia* và

⁽¹⁾ Trung tâm Ứng dụng Tiên bộ Khoa học và Công nghệ Nghệ An; ⁽²⁾ Trường Đại học Hồng Đức, tỉnh Thanh Hóa

Sclerotium, nhờ đó hạn chế thất thu năng suất cho cây trồng. Nhờ đặc tính này, nấm rễ có thể được sử dụng nhằm hạn chế lượng phân bón và thuốc hóa học trong canh tác nông nghiệp.

Nấm *Chaetomium spp.* là một trong những loại nấm túi lớn nhất với trên 300 loài đã được mô tả (von Arx et al., 1986), đã được chứng minh sản sinh nhiều loại hợp chất có hoạt tính sinh học, có ít nhất hơn 200 loại hoạt chất được tách chiết từ các loài nấm *Chaetomium spp.* Các hoạt chất này có hiệu lực phòng trừ nhiều loại tác nhân gây bệnh cây (Zhang et al., 2012). Trong quá trình sinh trưởng, các loài nấm *Chaetomium* chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác nhau và thay đổi tùy theo loài. Do đó, việc khảo sát ảnh hưởng điều kiện nuôi cấy (môi trường, pH, nhiệt độ, ánh sáng) lên sự sinh trưởng và phát triển của các chủng nấm *Chaetomium spp.* trong điều kiện phòng thí nghiệm là tiền đề để nghiên cứu, tạo điều kiện thuận lợi giúp tăng sinh khối nấm trong môi trường nhằm nâng hiệu quả sử dụng nấm *Chaetomium spp.* trong việc phòng trị bệnh hại cây trồng trong điều kiện ngoài đồng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng nấm đối kháng *Chaetomium globosum* và *Chaetomium cochliodes* đã được phân lập, tuyển chọn và bảo quản tại phòng Thí nghiệm - Trại Nghiên cứu thực nghiệm và Dịch vụ Khoa học - Công nghệ, Trung tâm Ứng dụng Tiên bộ Khoa học và Công nghệ Nghệ An.

2. Phương pháp nghiên cứu

a) Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy

- Thí nghiệm gồm có 3 công thức:

+ Công thức 1: Môi trường CMA (Nước chiết ngô 60g/l, glucose 25g/l, agar 20g/l).

+ Công thức 2: Môi trường PDA (Khoai tây 200g/l, glucose 25g/l, agar 20g/l).

+ Công thức 3: Môi trường PDB (Nước chiết thịt bò 20g/l, glucose 25g/l, agar 20g/l).

- Chỉ tiêu theo dõi: Đường kính tản nấm sau 3, 5, 7 ngày nuôi cấy, thời gian xuất hiện và số lượng bào tử.

b) Ảnh hưởng của nhiệt độ

- Môi trường nuôi cấy là môi trường tối ưu trong

thí nghiệm xác định môi trường nuôi cấy. Thí nghiệm được tiến hành với 3 lần nhắc lại, 6 công thức:

+ Công thức 1: 15°C.

+ Công thức 2: 20°C.

+ Công thức 3: 25°C.

+ Công thức 4: 30°C.

+ Công thức 5: 35°C.

+ Công thức 6: 40°C.

- Chỉ tiêu theo dõi: Đường kính tản nấm sau 3, 5, 7 ngày nuôi cấy, thời gian xuất hiện và số lượng bào tử.

c) Ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng

- Thí nghiệm được tiến hành với 3 công thức, 3 lần lặp lại:

+ Công thức 1: Sáng xen tối (ánh sáng ngày và đêm).

+ Công thức 2: Sáng liên tục (ánh sáng trong suốt thời gian nuôi cấy).

+ Công thức 3: Tối liên tục (nuôi trong buồng tối).

- Chỉ tiêu theo dõi: Đường kính tản nấm sau 3, 5, 7 ngày nuôi cấy, thời gian xuất hiện và số lượng bào tử.

d) Ảnh hưởng của pH tới sự phát triển của các chủng nấm đối kháng

- Thí nghiệm được tiến hành trên môi trường đã được lựa chọn, gồm 6 công thức, được nhắc lại 3 lần.

+ Công thức 1: pH 5.0.

+ Công thức 2: pH 5.5.

+ Công thức 3: pH 6.0.

+ Công thức 4: pH 6.5.

+ Công thức 5: pH 7.0.

+ Công thức 6: pH 7.5.

- Chỉ tiêu theo dõi: Đường kính tản nấm sau 3, 5, 7 ngày nuôi cấy, thời gian xuất hiện và số lượng bào tử.

e) Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng Excel và phần mềm IRRISTAT 5.0.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy

Môi trường là một trong những yếu tố

HOẠT ĐỘNG KH-CN

quan trọng và cần thiết nhất cho các loại nấm phát triển. Trong thí nghiệm này, chúng tôi lựa chọn 3 môi trường khác nhau (PDA, PDB, CMA) để thử nghiệm và lựa chọn môi trường phát triển thuận lợi nhất cho chủng nấm *Chaetonium*.

Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng tới sự phát triển của nấm *Chaetonium* được thể hiện thông qua đường kính tản nấm và số lượng bào tử. Nấm *Chaetonium* phát triển chậm hơn so với *Trichoderma* nên chúng tôi theo dõi tại 3 thời điểm: 3, 5, 7 ngày sau cấy. Kết quả thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sự phát triển nấm *Chaetonium*

Thời gian sau cấy	Đường kính tản nấm trên các môi trường			LSD 0.05	CV (%)
	PDB	PDA	CMA		
1. <i>C.globosum</i>					
3 ngày	3,4c	3,2b	2,7a	0,13	1,8
5 ngày	6,8c	6,5b	5,7a	0,29	2
7 ngày	8,2b	8,1b	7,4a	0,35	2
Thời gian hình thành bào tử	3	3	3	-	-
Số lượng bào tử	6,0x10 ⁸	5,7x10 ⁸	3,2x10 ⁸	-	-
2. <i>C.cochliodes</i>					
3 ngày	2,7b	2,6b	2,4a	0,19	3,4
5 ngày	4,6 c	4,1b	3,8 a	0,28	3,1
7 ngày	6,6 b	6,4 b	5,9 a	0,3	2,1
Thời gian hình thành bào tử	3	3	3	-	-
Số lượng bào tử	4,7x10 ⁸	4,2x10 ⁸	2,8x10 ⁸	-	-

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một hàng chỉ sự sai khác có ý nghĩa với $P \leq 0.05$

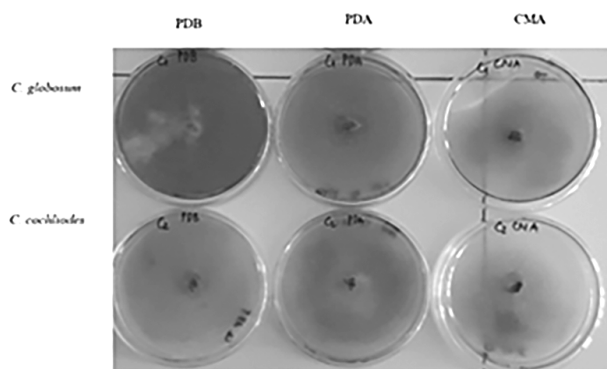
Qua bảng 1 chúng tôi nhận thấy, đường kính phát triển của tản nấm ở 3 loại môi trường có sự khác biệt nhau rõ rệt. Môi trường PDA và PDB cho đường kính tản nấm phát triển mạnh hơn cả sau 7 ngày, trong khi đó môi trường CMA cho hiệu quả thấp nhất. Số lượng bào tử của hai chủng *Chaetonium* trên môi trường PDB và PDA là cao gần tương đương nhau, và cao hơn nhiều so với môi trường CMA. Kết quả xử lý số liệu cho thấy, sai số thấp CV%, đồng thời sự sai

khác giữa các thí nghiệm có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất 95%. Do vậy, kết quả thí nghiệm là đáng tin cậy.

Như vậy, môi trường PDB là môi trường có đường kính tản nấm và số lượng bào tử nấm cao nhất. Tuy nhiên, để tiết kiệm chi phí, đồng thời tăng hiệu quả kinh tế, chúng tôi lựa chọn môi trường PDA để sử dụng cho các thử nghiệm tiếp theo.

2. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ là yếu tố sinh thái quan trọng ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và phát triển của các loài nấm nói chung. Trong thử nghiệm này, chúng tôi tiến hành nuôi cấy chủng nấm *Chaetonium* trên môi trường PDA, trong đĩa petri ở các mức nhiệt độ 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C và 40°C để đánh giá ngưỡng nhiệt tối ưu cho sự phát triển của tản nấm. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển của nấm *Chaetonium* được trình bày tại bảng 2.



Hình 1: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sự phát triển của các chủng nấm *Chaetonium*

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự phát triển nấm *Chaetonium*

Thời gian sau cấy	Đường kính tản nấm (cm)						LSD 0.05	CV(%)
	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C		
1. <i>C.globosum</i>								
3 ngày	1,6a	2,7c	3,3d	4,0e	3,1d	2,7b	0,1	1,9
5 ngày	2,7a	4,5b	6,2d	6,7e	6,0c	4,2b	0,33	3,7
7 ngày	3,8a	6,2c	8,1e	8,4f	7,9d	5,7b	0,17	1,4
Thời gian hình thành bào tử	4	3	3	3	3	3		
Số lượng bào tử	1,2x10 ⁸	1,6x10 ⁸	3,2x10 ⁸	5,7x10 ⁸	4,7x10 ⁸	-		
2. <i>C.cochliodes</i>								
3 ngày	1,6a	2,8c	3,4d	3,5e	2,9c	2,5b	0,26	3,3
5 ngày	2,0a	4,4c	5,7d	6,2e	5,6d	3,7b	0,33	2,2
7 ngày	3,1a	5,9c	7,8e	8,1f	7,5d	4,9b	0,15	2,2
Thời gian hình thành bào tử	-	4	3	3	3	-	--	
Số lượng bào tử	-	1,2x10 ⁸	3,8x10 ⁸	4,3x10 ⁸	3,4x10 ⁸	-	-	-

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một hàng chỉ sự sai khác có ý nghĩa với $P \leq 0,05$

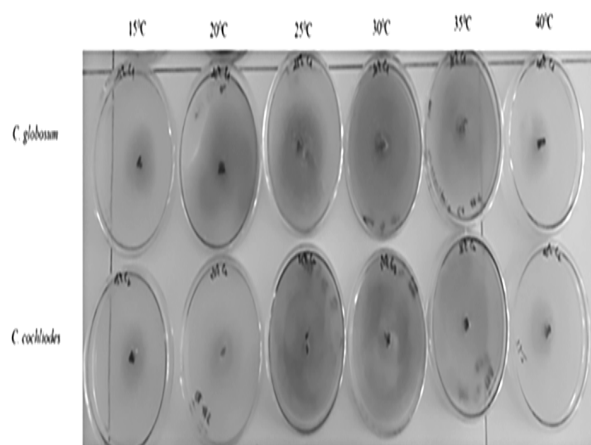
Kết quả bảng 2 cho thấy, nấm *Chaetonium* phát triển trên môi trường PDA từ nhiệt độ 15-40°C. Tuy nhiên, ở nhiệt độ từ 15-20°C, nấm phát triển chậm, số lượng bào tử thấp. Trong khoảng nhiệt độ từ 25-35°C, nấm phát triển tương đối mạnh, trong đó, phát triển tối ưu nhất ở nhiệt độ 30°C. Tại nhiệt độ này, số lượng bào tử cũng đạt giá trị lớn nhất (5,7x10⁸ đối với chủng *C.globosum*, 4,3x10⁸ đối với chủng *C.cochliodes*). Ở nhiệt độ 40°C, tản nấm phát triển không bình thường và không xuất hiện

bào tử. CV% của thí nghiệm thấp, công thức thí nghiệm có độ sai khác có ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa 95%.

Như vậy, hai chủng nấm *Chaetonium* có khả năng sinh trưởng và phát triển trong khoảng nhiệt độ từ 15-40°C, nhưng tại giá trị 30°C, quá trình sinh trưởng và phát triển (đường kính nấm và số lượng bào tử) đạt giá trị lớn nhất.

3. Ảnh hưởng của ánh sáng

Ánh sáng là yếu tố sinh thái có vai trò quan trọng với sự sinh trưởng và phát triển của nấm nói riêng và vi sinh vật nói chung. Tuy nhiên, đối với nấm hoại sinh, quá trình sinh trưởng và phát triển không hoàn toàn cần đến ánh sáng. Ánh sáng chỉ đóng vai trò quan trọng trong một số giai đoạn nhất định, ví dụ: hình thành bào tử, quả thể, đĩa cành. Trên thực tế, các chủng nấm của chúng tôi đều được phân lập trong đất hoặc trên rễ cây nằm dưới đất. Thí nghiệm này được tiến hành nhằm nghiên cứu ảnh hưởng của ánh sáng đến sự phát triển của các chủng nấm đã phân lập được trên môi trường PDA, từ đó xác định điều kiện nuôi cấy tối ưu. Thời điểm theo dõi nấm *Chaetonium* là 7 ngày sau cấy. Kết quả thể hiện ở bảng 3.



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự phát triển của các chủng nấm đối kháng *Chaetonium*

Bảng 3. Ảnh hưởng của ánh sáng nuôi cấy đến sự phát triển của các chủng nấm đối kháng *Chaetonium*

Ánh sáng	Đường kính tản nấm (cm)	
	<i>C.globosum</i>	<i>C. cochliodes</i>
Sáng hoàn toàn	6,6a	6,3a
Tối hoàn toàn	8,8c	8,1c
Sáng tối xen kẽ	8,3b	7,8b
LSD 0.05	0,3	0,35
CV (%)	1,7	2,1

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa với $P \leq 0,05$

Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở công thức tối hoàn toàn, đường kính tản nấm cũng như số lượng bào tử nấm đạt giá trị lớn nhất. Kết quả xử lý số liệu cho thấy, CV% dao động ở mức chấp nhận được, sự sai khác giữa các công thức có ý nghĩa thống kê với xác suất 95%. Vì vậy, có thể kết luận cả 2 chủng phân lập được đều thích nghi tốt ở điều kiện không có ánh sáng, hoặc ít ánh sáng, điều này hoàn toàn phù hợp với môi trường sống trong đất của các chủng phân lập được.

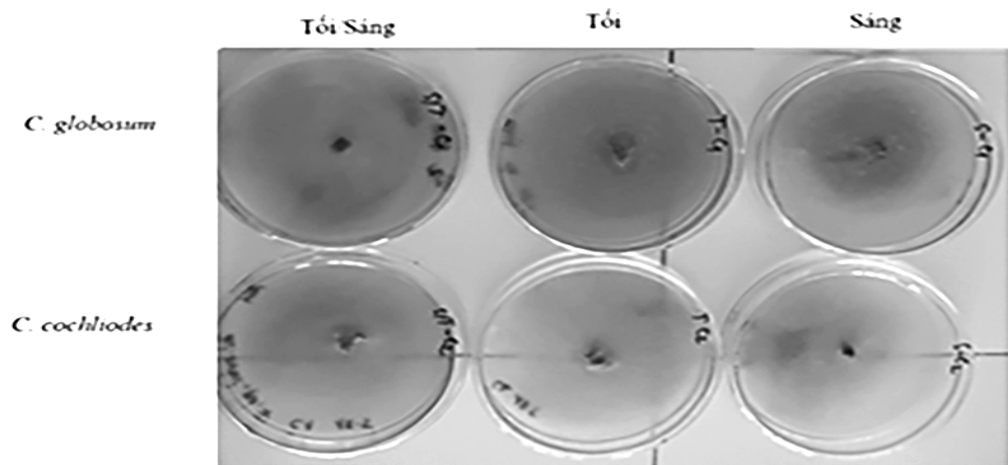
4. Ảnh hưởng của pH

pH là yếu tố hóa học có tác động mạnh tới sự phát triển của các loại nấm khác nhau, vì vậy tìm hiểu ảnh hưởng của pH để đánh giá tác động giữa yếu tố này với sự phát triển của các chủng nấm là cần thiết. Mặc dù các loài nấm có dải pH khá rộng nhưng mỗi loài lại thích nghi với mức pH khác nhau. Trên cơ sở đó, chúng tôi tiến hành nuôi cấy các chủng nấm phân lập được trên nền môi trường PDA, ở 30°C, với các mức pH khác nhau từ 5,0-7,5. Tác động của pH môi trường nuôi cấy đến sự phát triển của nấm *Chaetonium* thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của pH đến sự phát triển của nấm *Chaetonium*

Thời gian sau cấy	Đường kính tản nấm (cm)						LSD 0.05	CV(%)
	5	5,5	6	6,5	7	7,5		
1. <i>C.globosum</i>								
3 ngày	3,1a	3,4b	3,7c	3,9d	3,4b	3,1a	0,18	2,9
5 ngày	4,9a	5,3b	6,2d	6,6e	6,2d	5,6c	0,16	1,5
7 ngày	6,6a	7,5b	7,8c	8,5e	8,1d	7,4b	0,12	1,9
Thời gian xuất hiện bào tử	4-5	3-4	3-4	3-4	3-4	4-5		
Số lượng bào tử	9,6x10 ⁷	1,8x10 ⁸	1,5x10 ⁸	5,7x10 ⁸	3,2x10 ⁸	2,4x10 ⁸		
2. <i>C. cochliodes</i>								
3 ngày	2,7	2,9	3	3,5	3,3	3,1	0,17	4,4
5 ngày	4	4,4	5,4	6,1	5,8	5,7	0,31	3,3
7 ngày	6,3	6,9	7,5	8,2	7,7	7,1	0,29	2,2
Thời gian xuất hiện bào tử	4-5	3-4	3-4	3-4	3-4	4-5	-	-
Số lượng bào tử	9,3x10 ⁷	1,1x10 ⁸	1,5x10 ⁸	4,2x10 ⁸	2,9x10 ⁸	1,1x10 ⁷	-	-

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một hàng chỉ sự sai khác có ý nghĩa với $P \leq 0,05$



Hình 3. Ảnh hưởng của ánh sáng đến sự phát triển các chủng nấm đối kháng *Chaetium*

Hai chủng nấm *Chaetium* phát triển tốt trong khoảng pH từ 6,0-7,0. Tại giá trị pH=6,5, đường kính tản nấm đạt giá trị lớn nhất và số lượng bào tử cũng cao nhất. Khi giá trị pH tăng lên $\geq 7,5$ hoặc giảm xuống $\leq 5,5$, sự phát triển của nấm giảm xuống.

IV. KẾT LUẬN

Môi trường PDA được lựa chọn để nuôi cấy cấp 1 các chủng *Chaetium globosum* và *Chaetium cochliodes*.

Nhiệt độ nuôi cấy tối ưu của các chủng nấm phân lập được là 30°C.

Ở điều kiện tối hoàn toàn hoặc sáng tối xen kẽ, các chủng nấm sinh trưởng, phát triển và cho số lượng bào tử nấm cao nhất.

Giá trị pH= 6,5 thích hợp cho sự phát triển chủng nấm *Chaetium globosum* và *Chaetium cochliodes*.

Tài liệu tham khảo:

1. Begoude, B. A. D., Lahlali, R., Friel, D., Tondje, P. R., & Jijakli, M. H. (2007). Response surface methodology study of the combined effects of temperature, pH, and aw on the growth rate of *Trichoderma asperellum*. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 845-854.
2. Di-pietro, A., R.Kung, M, Gutrella and F.J. Schwinn. (1991), "Parameters influencing efficacy of *Chae globosum* in control *Pythium ultimum* damping off of sugar - beet", *J. Plant Diseases and protection* 98, pp. 565-573.
3. Kubicek, C. P., & Harman, G. E. (1998). *Tricho-*

derma and Gliocladium. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor and Francis Ltd.

4. Mukherjee, P. K., & Raghu, K. (1997). Effect of temperature on antagonistic and biocontrol potential of shape *Trichoderma* sp. on *Sclerotium rolfsii*. *Mycopathologia*, 139(3), 151-155.

5. Samuels, G. J., Pardo-Schultheiss, R., Hebbar, K. P., Lumsden, R. D., Bastos, C. N., Costa, J. C., & Bezerra, J. L. (2000). *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycological Research*, 104(6), 760-764.

6. Sekita, K.,S. Yoshihira, S. Natari, S. Udagawa, T. Muroi, H. Sugiyama, H. Kurata and M. Umeda (1981), "Micotoxin production by *Chae* spp. And related fungi". *Can.J.Bot.*27.

7. Shahrim, Z., Sabaratnam, V., Rahman, N. A. A., Abd-Aziz, S., Hassan, M. A., & Karim, M. I. A. (2008). Production of reducing sugars by *Trichoderma* sp. KUPM0001 during solid substrate fermentation of sago starch processing waste Hampas. *Research Journal of Microbiology*, 3(9), 569-579.

8. Singh, A., Srivastava, S., & Singh, H. B. (2007). Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. *Bioresource technology*, 98(2), 470-473.

9. Soyong, K. (1988), Species of *Chae* in the Philippines and screening for their biocontrol properties against seed-borne fungi for rice, Ph.D.thesis. UPLB, Los Banos, Philippines.

10. Soyong, K. (1990), A taxonomic study of *Chae* spp. In Thailand. Abstract, 4th International Mycological Congress, Regensburg, Germany, August 28-September 3.

11. Soyong, K. (1991), Species of *Chae* in Thailand soils, *Thai Phytopathology*, 11, pp. 86-94.

12. V.P.Prokhorov and M.A.Linnik .(2009), Morphological, Cultural and Biodestructive Peculiarities of *Chae* Species, Moscow state University, Moscow, pp. 119-991.