

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG NẤM ĐỐI KHÁNG TRICHODERMA VÀ CHAETONIUM CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ SỰ PHÁT TRIỂN CỦA NẤM GÂY BỆNH TRÊN CÂY CAM

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

⁽¹⁾ Trung tâm Ứng dụng Tiên bộ KH&CN Nghệ An

⁽²⁾ Trường Đại học Hồng Đức



Việc phát triển cây cam đang gặp những khó khăn trong phòng và trị bệnh

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây cam (*Citrus sinensis*) là một trong những loại cây ăn quả có giá trị kinh tế và dinh dưỡng cao. Hiện nay, cây cam đang được mở rộng diện tích và với việc áp dụng khoa học kỹ thuật nên cho sản lượng khá cao, đóng góp vào sự phát triển của nền kinh tế. Tuy nhiên, việc phát triển và tăng diện tích cây cam đang gặp những vấn đề khó khăn, trong đó khó nhất là phòng và trị bệnh cho cây. Trong số các bệnh thường gặp trên cam tại Việt Nam thì bệnh nứt thân, chảy mủ do nấm *Phytophthora* sp. và bệnh vàng lá, thối rễ do nấm *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. là những bệnh phổ biến, nhất là ở khu vực Nghệ An.

Để trị bệnh nứt thân, chảy mủ do nấm

Phytophthora sp. và bệnh vàng lá, thối rễ do nấm *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., thuốc hóa học như Trepach Bull 607SL, Mexyl 80WP hoặc Alpine 80WG phối hợp với phân Naturfos hoặc thuốc Pylacol 700WP tỏ ra có hiệu quả. Tuy nhiên, sử dụng thuốc hóa học để trị bệnh cho cây cam trong thời kỳ kinh doanh không dễ dàng và tốn nhiều chi phí, phụ thuộc vào diện tích trồng.

Hơn nữa, việc sử dụng thuốc hóa học về lâu dài sẽ ảnh hưởng đến hệ vi sinh vật đối kháng và cân bằng có ích khác, từ đó sẽ ảnh hưởng tới môi trường sinh thái. Khác với thuốc hóa học, chế phẩm sinh học có các ưu điểm như không gây ảnh hưởng tiêu cực đến sức khỏe con người, không gây ô nhiễm môi trường, có khả năng phân hủy, chuyển hóa các chất hữu cơ, phế thải, góp phần làm sạch môi trường mà lại có tác dụng tiêu diệt nấm bệnh gây hại nên các nhà khoa học

HOẠT ĐỘNG KH-CN

trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng đều đang tập trung nghiên cứu. Chính vì lý do đó, chúng tôi tiến hành đề tài nghiên cứu “*Phân lập và tuyển chọn một số chủng nấm đối kháng Trichoderma và Chaetonium có khả năng ức chế sự phát triển của nấm gây bệnh trên cây cam*”.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

- Nấm bệnh: *Fusarium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*.

- Nấm đối kháng: *Trichoderma*, *Chaetonium*

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phân lập các chủng nấm đối kháng và nấm bệnh

Sử dụng phương pháp phân lập đối với các chủng nấm *Trichoderma*, *Chaetonium*, nấm gây bệnh nứt gốc chảy mủ, vàng lá, thối rễ (*Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*)

2.3. Xác định, đánh giá hiệu lực kháng nấm bệnh của nấm đối kháng

- Môi trường thí nghiệm: Môi trường PDA.

- Phương pháp tiến hành: Cây đối xứng hai bên.

- Thí nghiệm gồm các 11 công thức, được nhắc lại 3 lần, mỗi lần 5 mẫu:

Công thức 1: (Đối chứng) Nấm *Fusarium* (Fu).

Công thức 2: (Đối chứng) Nấm *R. Solani* (Rs).

Công thức 3: (Đối chứng) Nấm *Phytophthora* (Phy).

Công thức 4: Tr + Fu.

Công thức 5: Tr + Rs.

Công thức 6: Tr + Phy.

Công thức 7: Ch + Fu.

Công thức 8: Ch + Rs.

Công thức 9: Ch + Phy.

Công thức 10: Tr + Cha + Rs + Phy + Fu.

Kẻ một đường ở giữa đĩa petri (phần đáy). Cây nấm đối kháng và nấm bệnh trên 2 điểm đối xứng nhau trên đường vừa kẻ.

- Ủ ở nhiệt độ phòng và theo dõi:

+ Chỉ tiêu theo dõi: Hiệu quả ức chế trong phòng thí nghiệm (PIRG).

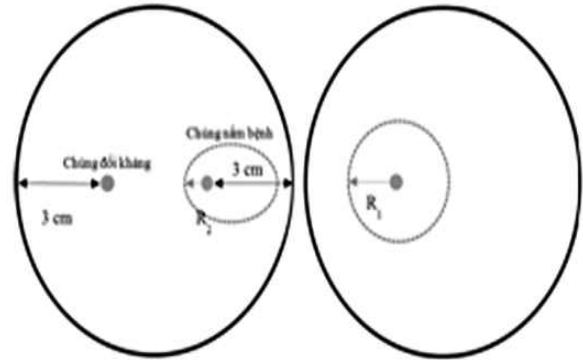
PIRG (percent Inhibition of Radical Growth) = $(R1 - R2) / R1 \times 100$.

Trong đó:

PIRG: Hiệu quả ức chế.

R1: là đường kính phát triển tản nấm của nấm gây bệnh cây đối chứng.

R2: là đường kính phát triển của tản nấm gây bệnh khi cây với đối kháng.



- Hoạt tính đối kháng quy ước như sau:

4: Hoạt tính rất cao (PIRG > 75%);

3: Hoạt tính đối kháng cao (PIRG: 61-75%);

2: Hoạt tính đối kháng trung bình (PIRG: 50-60%);

1: Hoạt tính đối kháng kém (PIRG < 50%).

2.4. Định danh các chủng nấm đối kháng

- Dựa vào hình thái: Quan sát đặc điểm hình thái của vi nấm được quan sát và căn cứ theo mô tả khóa phân loại của Bùi Xuân Đồng (2000) để định danh các nấm *Trichoderma* và Soyong và cộng sự (1989) để định danh nấm *Chaetonium*.

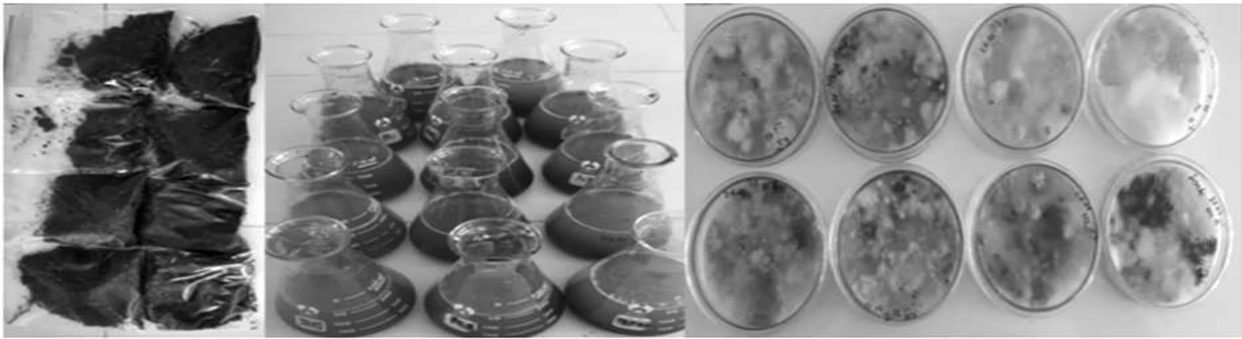
- Bằng phương pháp PCR: Tách chiết DNA tổng số của nấm mốc theo protocol của Sambrook và Russell (2001).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập nấm đối kháng

a) Phân lập nấm *Trichoderma*

Mẫu đất được thu thập từ các vùng trồng cam tỉnh Nghệ An (thị xã Thái Hòa, Quỳnh Hợp). Mẫu sau khi thu thập được pha loãng thành các dãy nồng độ 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} . Hút 0,1ml ở mỗi nồng độ trải đều lên các đĩa petri có chứa môi trường PDA và ủ ở nhiệt độ 28°C . Sự phát triển của nấm *Trichoderma* được theo dõi trong 7 ngày và kiểm tra trên kính hiển vi (Hình 1).



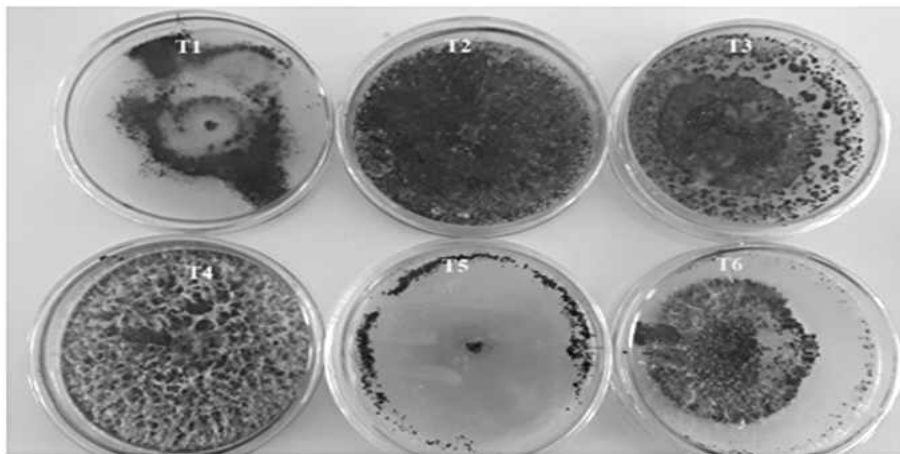
Hình 1: Phân lập nấm *Trichoderma*

Kết quả, trong tổng số 200 mẫu đất và rễ cây quanh vùng rễ cây cam, có 6 nguồn *Trichoderma* có triển vọng. Các nguồn này đều có sợi nấm phát triển tốt trên môi trường PDA, màu sắc sợi nấm khác nhau từ xanh

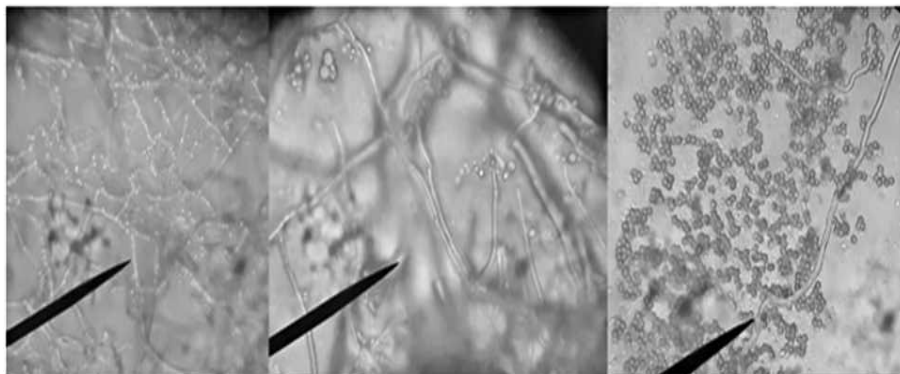
nhạt, xanh đậm và xanh lá mạ. Dựa vào khóa phân loại của Bùi Xuân Đồng và cộng sự (2000) trên sự khác nhau của các mẫu phân lập, các nguồn nấm được đặt tên Tr1, Tr2, Tr3, Tr4, Tr5, Tr6 (Hình 2). Đặc điểm hình thái các chủng được mô tả tại Bảng 1:

Bảng 1. Đặc điểm hình thái các chủng *Trichoderma*

Tên nấm	Đặc điểm
Tr1	Mọc sau 2 ngày nuôi cấy trên môi trường PGA, sau 7 ngày lan toàn bộ bề mặt đĩa nuôi cấy. Sợi nấm ban đầu màu trắng, khi phát sinh bào tử có màu xanh đậm, phát triển tạo thành các vòng tròn đồng tâm, sát kề nhau. Tơ nấm ở rìa khuẩn lạc, bề mặt khuẩn lạc hơi gồ ghề, không có giọt tiết, khuẩn lạc không mùi, không tiết sắc tố ra môi trường.
Tr2	Mọc sau 1 ngày nuôi cấy trên môi trường PGA, sau 7 ngày lan toàn bộ bề mặt đĩa nuôi cấy. Sợi nấm ban đầu màu trắng, khi phát sinh bào tử có màu xanh lục đậm, phát triển đều trên bề mặt đĩa thạch. Tơ sợi nấm ngay trên bề mặt khuẩn lạc. Bề mặt khuẩn lạc hơi gồ ghề, không có giọt tiết, khuẩn lạc không mùi, không tiết sắc tố ra môi trường.
Tr3	Mọc sau 1 ngày nuôi cấy trên môi trường PGA, sau 7 ngày lan toàn bộ bề mặt đĩa nuôi cấy. Sợi nấm ban đầu màu trắng, khi phát sinh bào tử có màu xanh lá mạ, phát triển đều trên bề mặt đĩa thạch. Tơ sợi nấm ngay trên bề mặt khuẩn lạc. Bề mặt khuẩn lạc hơi gồ ghề, không có giọt tiết, khuẩn lạc không mùi, không tiết sắc tố ra môi trường.
Tr4	Mọc sau 2 ngày nuôi cấy trên môi trường PGA, sau 7 ngày lan toàn bộ bề mặt đĩa nuôi cấy. Sợi nấm ban đầu màu trắng, khi phát sinh bào tử có màu xanh đậm, phát triển đều trên đĩa thạch. Tơ sợi nấm ngay trên bề mặt khuẩn lạc. Bề mặt khuẩn lạc mịn, không có giọt tiết, khuẩn lạc không mùi, không tiết sắc tố ra môi trường.
Tr5	Mọc sau 2 ngày nuôi cấy trên môi trường PGA, sau 7 ngày lan toàn bộ bề mặt đĩa nuôi cấy. Sợi nấm ban đầu màu trắng, khi phát sinh bào tử có màu xanh đậm, tạo vòng tròn đồng tâm, cách xa nhau. Tơ nấm ở rìa khuẩn lạc, bề mặt khuẩn lạc hơi mịn, tiết giọt loang nhót màu đục trên bề mặt đĩa thạch, khuẩn lạc không mùi, không tiết sắc tố ra môi trường.
Tr6	Mọc sau 2 ngày nuôi cấy trên môi trường PGA, sau 7 ngày lan toàn bộ bề mặt đĩa nuôi cấy. Sợi nấm ban đầu màu trắng, khi phát sinh bào tử có màu xanh đậm, phát triển đều trên đĩa thạch. Tơ nấm ở rìa khuẩn lạc, bề mặt khuẩn lạc mịn, không có giọt tiết, khuẩn lạc không mùi, không tiết sắc tố ra môi trường.



Hình 2: Các mẫu *Trichoderma* phân lập được



Hình 3: Sợi nấm và bào tử nấm *Trichoderma*

Quan sát sợi tơ và bào tử nấm dưới kính hiển vi quang học ở vật kính x 40 cả 6 chủng nấm đều có các đặc điểm như sợi nấm có vách ngăn ngang, giá sinh bào tử trần, không có đỉnh phồng to. Bào tử đính hình thành từ những cụm trên những cuống bào tử đính, bào tử đính có dạng hình cầu, không có túi bao bọc (Hình 3). Dựa vào đặc điểm của khuẩn lạc, đặc điểm vi học và dựa vào khóa phân

loại Bùi Xuân Đồng (2000) có thể phân loại các chủng nấm này đều thuộc chủng *Trichoderma*.

b) Phân lập nấm *Chaetomium*

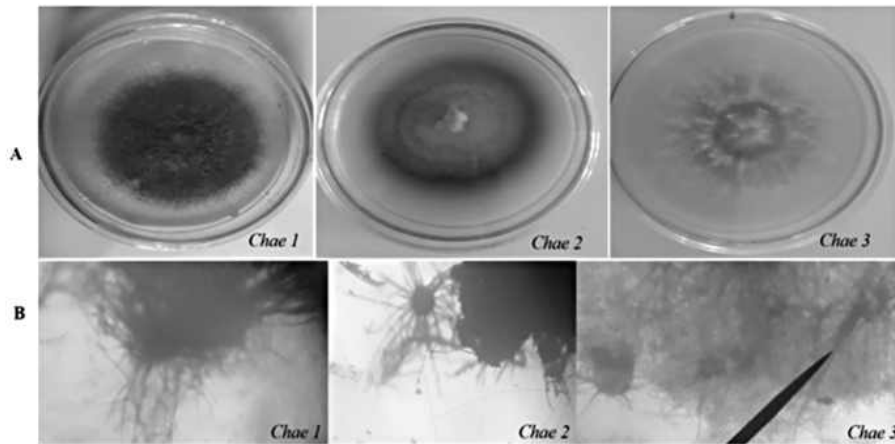
Các mẫu đất thu thập được làm nhỏ, cho vào đĩa petri, đặt các mẫu giấy lọc 1x1cm lên trên, sau đó phun ẩm, đặt ở điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm. Sau 15-20 ngày, những quả thể nấm *Chaetomium* xuất hiện với đặc điểm có các sợi lông đặc trưng để nhận biết của nấm *Chaetomium* (Hình 4).



Hình 4: Bầy nấm *Chaetomium*

Sau khi cấy thuần, quan sát đặc điểm trên đĩa cấy và dưới kính hiển vi, dựa trên khóa phân loại của Soyong và cộng sự (1989),

chúng tôi phát hiện thấy 3 nguồn Chae có đặc điểm hình thái khác nhau, được đặt tên là *Chae 1*, *Chae 2*, *Chae 3* (Hình 5).



Hình 5: A) Các chủng nấm *Chaetonium*. B) Bào tử nấm

Đặc điểm hình thái các chủng nấm *Chaetonium* bao gồm đặc điểm đại thể và đặc điểm vi thể được mô tả ở Bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm nấm *Chaetonium*

Mô hình chuỗi giá trị	Sản xuất đại trà
- Giống mới, chất lượng giống đạt tiêu chuẩn theo quy định; chủ động nguồn giống;	- Giống không đảm bảo chất lượng, giống không rõ nguồn gốc, không chủ động nguồn giống;
- Tiến bộ kỹ thuật mới, quy trình canh tác tiên bộ, chất lượng nông sản cao;	- Tiến bộ kỹ thuật cũ, quy trình canh tác lạc hậu, chất lượng nông sản kém;
- Chủ động vật tư, phân bón, thuốc BVTV, đúng chủng loại;	- Không chủ động vật tư, phân bón, thuốc BVTV, không đúng chủng loại.
- Tổ chức sản xuất chặt chẽ, đồng bộ, hạn chế rủi ro trong sản xuất và tiêu thụ;	- Tự phát, thiếu đồng bộ trong sản xuất, rủi ro cao trong quá trình sản xuất và tiêu thụ;
- Sản phẩm sản xuất ra được Hợp tác xã thu gom, cung cấp cho Công ty, không bị ép giá, giá cả ổn định, chủ động trong khâu sản xuất và tiêu thụ.	- Sản phẩm sản xuất ra thường bị tư thương ép giá, giá cả không ổn định, thiếu chủ động trong sản xuất và tiêu thụ.

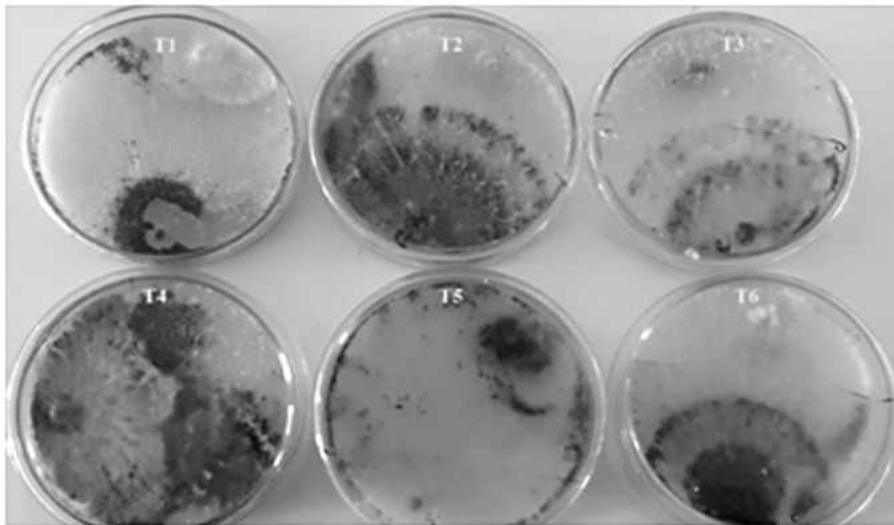
3. Đánh giá hoạt tính kháng nấm *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* của các chủng nấm đối kháng

3.1. Nấm *Trichoderma*

Tiến hành cấy đối xứng nấm Tr1-Tr6 với *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* theo từng cặp trên môi trường PDA ở điều kiện nhiệt độ 28°C, trong điều kiện tối hoàn toàn. Theo dõi sự phát triển của tản nấm sau 3 ngày nuôi cấy.

a) Đối kháng nấm *Phytophthora*

Kết quả cấy đối kháng các chủng nấm *Trichoderma* đã phân lập được với *Phytophthora* cụ thể như sau: Các chủng T1, T2, T3, T4, T5, T6, phát triển rất nhanh, ức chế sự phát triển của nấm *Phytophthora* ngay sau 3 ngày nuôi cấy. Chủng T2 phát triển chậm hơn, tản nấm bệnh *Phytophthora* phát triển có bán kính 0,6cm. Tuy nhiên, sau 5 ngày nuôi cấy nấm *Trichoderma* phát triển, sợi nấm phủ kín bề mặt và ức chế hoàn toàn nấm bệnh.

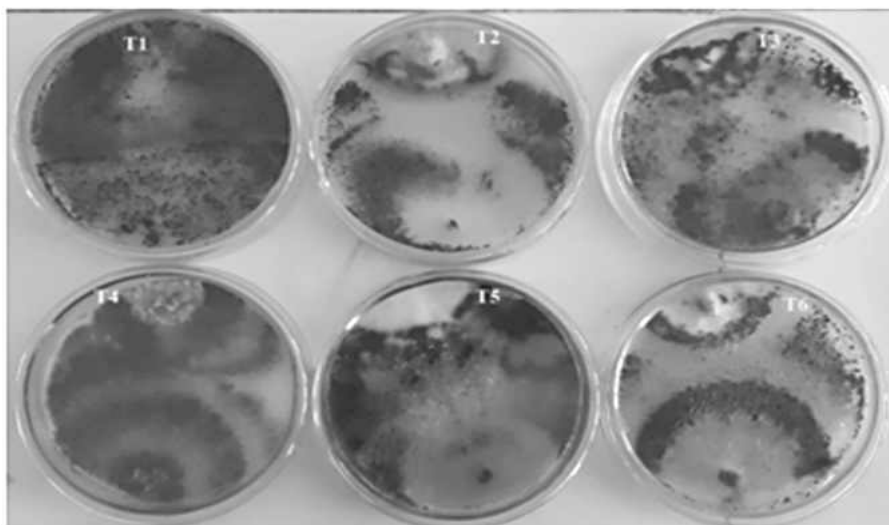


Hình 6: Các chủng nấm *Trichoderma* ức chế sự phát triển của *Phytophthora* khi nuôi cấy trên đĩa thạch PDA sau 7 ngày nuôi cấy

b) Đối kháng nấm *Fusarium*

Sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường thạch PDA, ở 28°C và điều kiện tối hoàn toàn, chủng T1 ức chế hoàn toàn nấm bệnh *Fusarium*. Chủng T3 ức chế hoàn toàn nấm bệnh sau 5

ngày nuôi cấy. Kết quả cây đối kháng ở các chủng còn lại (T2, T4, T5, T6) cho thấy nấm bệnh phát triển rất chậm với đường kính nấm bệnh lần lượt là 0,7cm; 0,4cm; 0,6cm; và 0,5cm tương ứng với tỷ lệ đối kháng rất cao 92,2%; 95,5%; 93,3% và 94,4%.

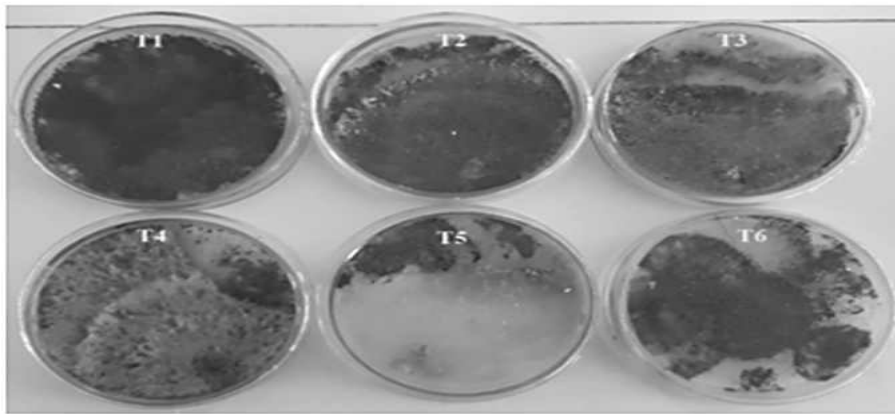


Hình 7: Các chủng nấm *Trichoderma* ức chế sự phát triển của *Fusarium* trên đĩa thạch PDA sau 7 ngày nuôi cấy

c) Đối kháng nấm *Rhizoctonia*

Sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường thạch PDA, ở 28°C và điều kiện tối hoàn toàn, các chủng T1, T6 có khả năng ức chế hoàn toàn nấm *Rhizoctonia*. Đối với chủng T4, T5, T2, T3

nấm bệnh *Rhizoctonia* phát triển chậm, có đường kính lần lượt là 0,5cm; 0,7cm; 0,4cm và 0,6cm. Tuy nhiên, sau 5 ngày nuôi cấy, nấm *Trichoderma* phát triển lan trên bề mặt và ức chế nấm bệnh. Sau 7 ngày nuôi cấy, nấm bệnh bị ức chế hoàn toàn.



Hình 8: Các chủng nấm *Trichoderma* ức chế sự phát triển của *Rhizoctonia* trên đĩa thạch PDA sau 7 ngày nuôi cấy

3.2. Nấm *Chaetoniium*

Tiến hành cấy đối xứng nấm Chae1, Chae2, Chae3 với *Phytophthora Fusarium* theo từng cặp trên môi trường PDA ở điều kiện nhiệt độ 28°C, trong điều kiện tối hoàn toàn. Theo dõi sự phát triển của tản nấm sau 7 ngày nuôi cấy.

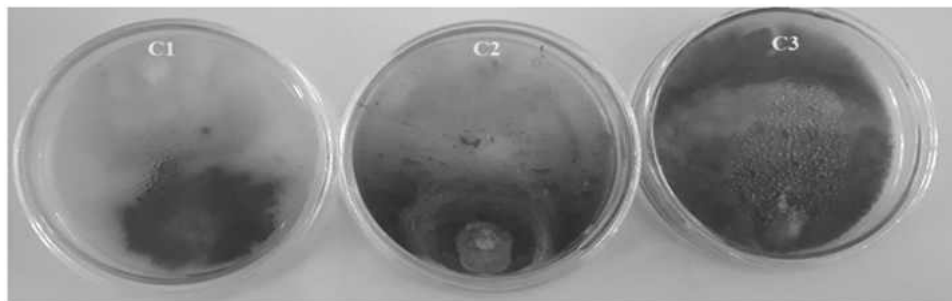
a) Đối kháng nấm *Phytophthora*

Kết quả cấy đối kháng các chủng nấm Chae1-Chae3 với nấm *Phytophthora* thể hiện

ở Bảng 3. Nấm Chae3 có khả năng ức chế nấm bệnh tốt nhất với hiệu quả ức chế 78,8%. Sau 5 ngày nuôi cấy, nấm *Phytophthora* phát triển có đường kính tản nấm là 4,0cm. Tuy nhiên, nấm Chae3 phát triển mạnh, lấn át và ức chế sự phát triển của nấm bệnh. Đường kính phần nấm bệnh không bị tấn công của nấm đối kháng sau 9 ngày nuôi cấy là 1,9cm. Đường kính nấm bệnh khi cấy đối kháng với nấm Chae1 và Chae2 là 4,3cm và 5,2cm, tương ứng với hiệu quả ức chế là 52,2% và 42,2%.

Bảng 3: Kết quả cấy đối kháng các chủng nấm Chae1-Chae3 với nấm *Phytophthora*

Công thức	Đường kính tản nấm <i>Phytophthora</i>		Hiệu quả ức chế
	ĐC (cm)	ĐK (cm)	(%)
Chae1-P	9	4,3	52,2
Chae2-P	9	5,2	42,2
Chae2-P	9	1,9	78,8



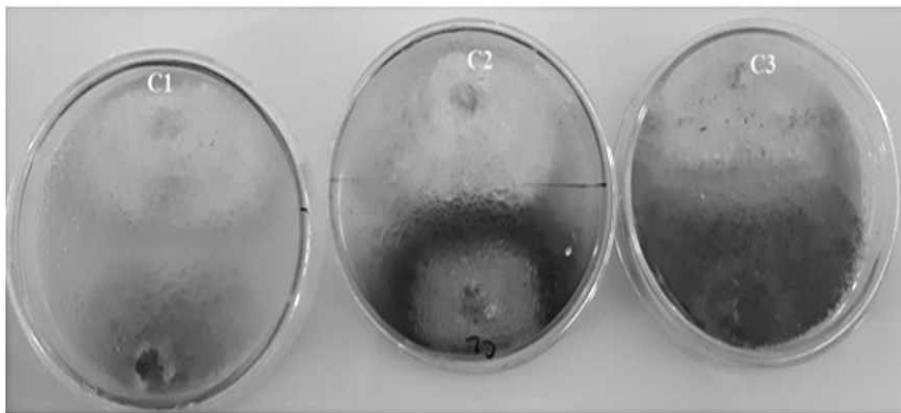
Hình 9: Các chủng nấm *Chaetoniium* ức chế sự phát triển của *Phytophthora* trên đĩa thạch PDA sau 9 ngày nuôi cấy

HOẠT ĐỘNG KH-CN

b) Đối kháng nấm *Fusarium*

Bảng 4. Kết quả cấy đối kháng các chủng nấm Chae1-Chae3 với nấm *Fusarium*

Công thức	Đường kính tản nấm <i>Fusarium</i>		Hiệu quả ức chế (%)
	ĐC (cm)	ĐK (cm)	
Chae1-F	9	4,4	51,1
Chae2-F	9	4,8	46,7
Chae3-F	9	3,0	67,7

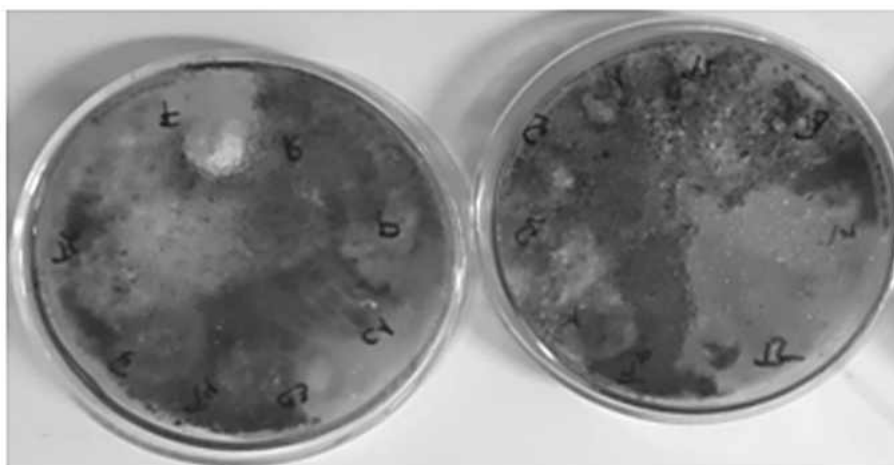


Hình 10: Các chủng nấm *Chaetomium* ức chế sự phát triển của *Fusarium* trên đĩa thạch PDA sau 9 ngày nuôi cấy

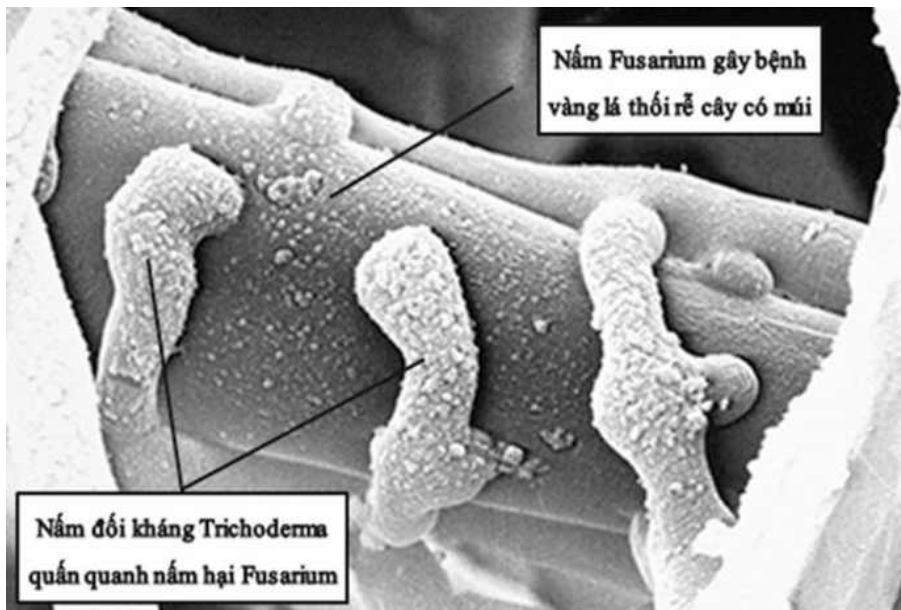
3.3. Đối kháng nấm *Trichoderma*, *Chaetomium* và *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*

Tiến hành cấy tất cả các chủng *Trichoderma* và *Chaetomium* đã phân lập được với cả 3 chủng nấm bệnh *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*.

Sau 4 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C, điều kiện tối hoàn toàn, các chủng nấm đối kháng ức chế hoàn toàn các chủng nấm bệnh. Các chủng nấm đối kháng phát triển không cạnh tranh nhau trên đĩa thạch.



Hình 11: Các chủng nấm *Trichoderma* và *Chaetomium* ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* sau 4 ngày nuôi cấy



Nấm Trichoderma bao vây và tiêu diệt mầm bệnh trong đất

4. Định danh các chủng nấm đối kháng bằng phương pháp PCR

Để xác định chính xác đến loài 6 chủng *Trichoderma* và 3 chủng *Chaetomium* phân lập được, mẫu được gửi tới Viện Công nghệ Sinh học để định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 28S rRNA. So sánh kết quả giải trình tự với trình tự rRNA KF732005.1 trên Genbank có thể kết luận như sau:

- Các chủng T1, T2, T3, T4, T5 và T6 phân lập được thuộc loài *Trichoderma asperellum* với tỷ lệ tương đồng 99%.

- Chủng C1 phân lập được thuộc loài *Chaetomium globosum* với tỷ lệ tương đồng 99%.

- Chủng C2, C3 phân lập được thuộc loài *Chaetomium cochliodes* với tỷ lệ tương đồng 99%.

IV. KẾT LUẬN

- Đã phân lập được 6 chủng *Trichoderma* có khả năng ức chế hoàn toàn nấm *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*.

- Đã phân lập được 3 chủng *Chaetomium* có khả năng ức chế cao với nấm *Phytophthora*, *Fusarium*.

- Tổ hợp các chủng nấm *Trichoderma* và *Chaetomium* phát triển không cạnh tranh trên môi trường nuôi cấy PDA và ức chế hoàn toàn sự phát triển của cả ba nấm bệnh *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* sau 4 ngày nuôi cấy trên môi trường thạch PDA.

- Kết quả định danh cho thấy 6 chủng *Trichoderma* phân lập được thuộc loài *Trichoderma asperellum* và 3 chủng *Chaetomium* thuộc 2 loài *Chaetomium globosum* và *Chaetomium cochliodes*./.

Tài liệu tham khảo:

1. Bùi Xuân Đồng, Nguyễn Huy Văn, 2000, *Vi nấm dung trong công nghệ sinh học*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Trang 148-153.
2. Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Gott KP, Backhouse D (1994), "Laboratory manual for-Fusariumresearch" (Fusarium ResearchLaboratory, The University of Sydney and The Royal Botanic Gardens:Sydney
3. Granke LL, Quesada-Ocampo LM, Hausbeck MK, *Variation in Phenotypic Characteristics of Phytophthora capsici Isolates from a Worldwide Collection*, Plant Dis. 2011 Sep;95(9):1080-1088. doi: 10.1094/PDIS-03-11-0190. PMID: 30732066.
4. Sneh, Baruch & Jabaji, Suha & Neate, Stephen & Dijst, G. (1998), *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*, 10.1007/978-94-017-2901-7.
5. Soyton, K. and Quimio, T.H.(1989), "Antagonism of *Chaetomium globosum* to the rice blast pathogen, *Pyricularia oryzae*", Kasetsart Journal (NaturalScience) 23: 198-203.