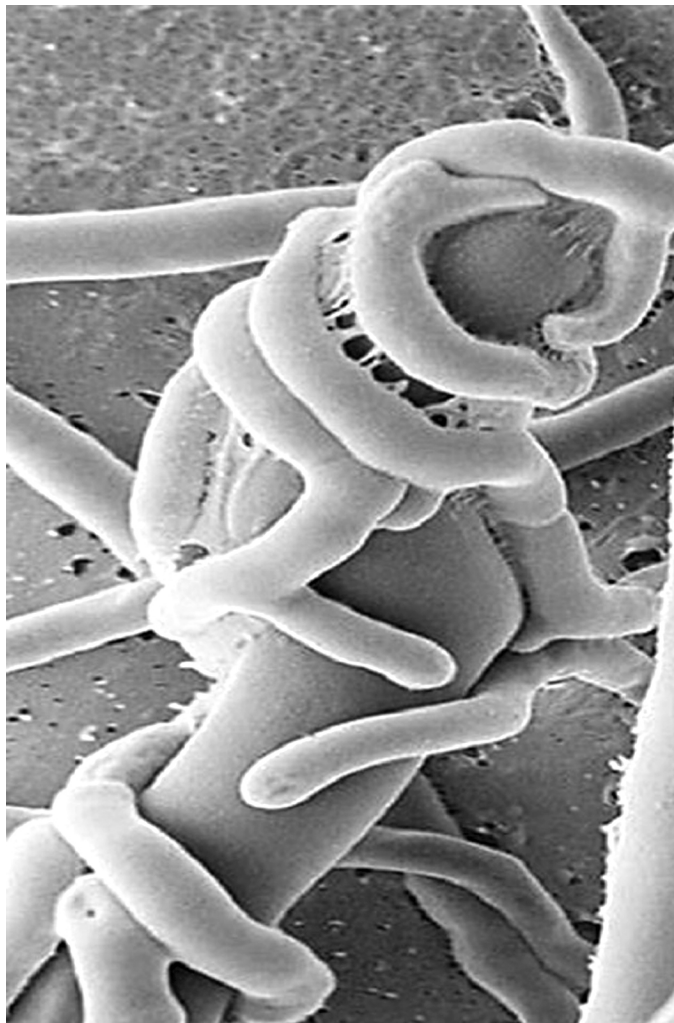


XÁC ĐỊNH ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐẾN SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN CỦA CHỦNG NẤM ĐỐI KHÁNG *TRICHODERMA*

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



Nấm *Trichoderma*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nghệ An là một trong những tỉnh có diện tích trồng cam lớn nhất của cả nước. Cây cam được xem là cây chủ lực của một số vùng đồi núi ở các huyện phía Tây Nghệ An như Nghĩa Đàn, Quỳnh Hợp, Tân Kỳ. Tuy nhiên những năm gần đây, diện tích và năng suất cam ở đây có xu hướng giảm rõ rệt. Nguyên nhân là do bệnh tật, già nua, chăm sóc kém... Bên cạnh đó, việc sử dụng các loại thuốc bảo vệ thực vật để phòng trị bệnh thối rễ lại rất tốn kém, cho hiệu quả thấp và còn gây ô nhiễm môi trường, thoái hóa đất. Do đó, việc sử dụng các tác nhân sinh học, trong đó có nấm *Trichoderma*, để phòng trừ các loại nấm bệnh trong đất là một chiến lược kinh tế và lâu dài [8]. Qua nghiên cứu trong những năm gần đây thì nấm *Trichoderma* tiêu diệt nấm bệnh theo 3 cơ chế: kí sinh, tiết kháng sinh, cạnh tranh dinh dưỡng và không gian sống [3].

Trong quá trình sinh trưởng, các loài nấm *Trichoderma* spp. 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,

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

pH, nhiệt độ, ánh sáng) lên sự sinh trưởng và phát triển của các chủng nấm *Trichoderma* 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 cao hiệu quả sử dụng nấm *Trichoderma* 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 *Trichoderma asperellum* đã được phân lập, tuyển chọn và bảo quản tại phòng thí nghiệm - Trại Nghiên cứu thực nghiệm và Dịch vụ Khoa học và Công nghệ, Trung tâm Ứng dụng Tiến bộ Khoa học và Công nghệ Nghệ An.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. 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.

2.2. 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.

2.3. 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).

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

2.4. 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.

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

2.5. 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 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 *Trichoderma asperellum*.

Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng tới sự phát triển của nấm *Trichoderma* được thể hiện thông qua đường kính tản nấm và số lượng bào tử. Do nấm *Trichoderma* phát triển nhanh nên chúng tôi tiến hành theo dõi tại 3 thời điểm 2, 3, 5 ngày sau cấy. Kết quả thể hiện ở Bảng 1.

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

Thời gian sau cấy	Đường kính tản nấm (cm)			LSD _{0.05}	CV%
	PDB	PDA	CMA		
2 ngày	5.9 ^c	5.6 ^b	4.8 ^a	0.15	1.2
3 ngày	7.7 ^c	7.0 ^b	6.7 ^a	0.56	3.5
5 ngày	8.9 ^b	8.8 ^b	8.0 ^a	0.27	1.4
Thời gian hình thành bào tử	3	3	3	-	-
Số lượng bào tử	5.2x10 ⁹	5.0x10 ⁹	4.2x10 ⁹	-	-

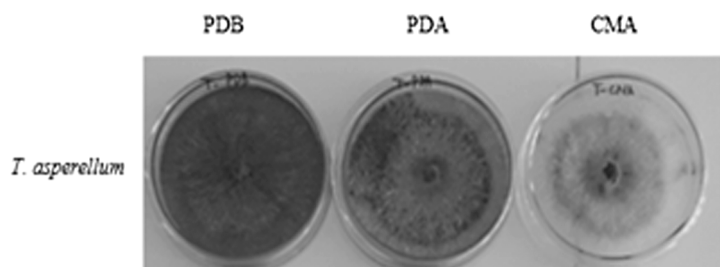
Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một hàng chỉ sự sai khác có ý nghĩa với $P \leq 0,05$

Môi trường có ảnh hưởng đến sự phát triển của nấm *Trichoderma*, trong 3 loại môi trường thí nghiệm, môi trường PDB thích hợp nhất cho sự phát triển của sợi nấm sau 5 ngày đường kính đạt kích thước cao nhất (8,8-9.0cm), đồng thời môi trường này cũng cho lượng bào tử cao nhất (5.2x10⁹ bào tử/ml). Trên môi trường PDA, đường kính của nấm đạt giá trị trung bình 8.8cm tại thời điểm 5 ngày sau cấy, số lượng bào tử là 5.0x10⁹ bào tử/ml. Nấm *Trichoderma* phát triển chậm trên môi trường CMA đường kính tản nấm sau 3 ngày nuôi cấy dao động từ 7.8-8.1 cm, số lượng bào tử sản sinh đạt 4.2x10⁹ bào tử/ml). Kết quả thí nghiệm là đáng tin cậy do sai số thấp CV%, đồng thời sự sai khác giữa các thí nghiệm có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất 95%.

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 *Trichoderma asperellum* 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 *T. asperellum* được trình bày tại Bảng 2.



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

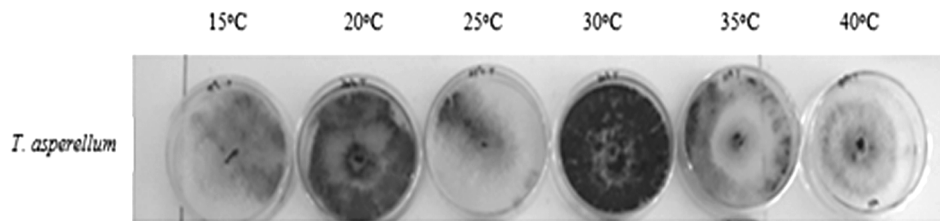
Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự phát triển nấm *T.asperellum*

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		
2 ngày	3.4 ^a	3.5 ^a	3.8 ^b	4.3 ^c	3.9 ^d	3.7 ^e	0.2	2.9
3 ngày	5.8 ^a	6.0 ^a	6.3 ^b	6.9 ^c	6.4 ^d	6.0 ^e	0.28	2.4
5 ngày	7.6 ^a	7.9 ^b	8.3 ^c	8.9 ^d	8.5 ^e	8.1 ^f	0.19	1.2
Thời gian hình thành bào tử	4	4	3	3	3	3	-	-
Số lượng bào tử	1.3x10 ⁹	2.1x10 ⁹	4.5x10 ⁹	5.1x10 ⁹	4.2x10 ⁹	1.6x10 ⁸	-	-

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

Nấm *T.asperellum* có thể sinh trưởng trong dải nhiệt độ 15-40°C, trên môi trường PDA. Tuy nhiên, sau 5 ngày nuôi cấy, ở ngưỡng nhiệt từ 25-35°C, nấm phát triển mạnh với đường kính tản nấm từ 8,3-9,0cm trong đó, tại nhiệt độ 30°C, đường kính tản nấm đạt giá trị lớn nhất (8,9cm). Thời gian xuất hiện bào tử là 3 ngày sau nuôi cấy. Ở mức 40°C và 15-20°C

nấm phát triển chậm, đường kính tản nấm và số lượng bào tử giảm xuống. Ở mức nhiệt độ 15-20°C, thời gian xuất hiện bào tử cũng chậm hơn (4 ngày sau nuôi cấy), số lượng bào tử giảm chỉ còn khoảng 25-41%. Kết quả xử lý số liệu thống kê cho thấy, CV% dao động ở mức thấp, chỉ số LSD ở các công thức thí nghiệm có độ sai khác có ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa P là 95%.



Hình 2: Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự phát triển của các chủng nấm *Trichoderma asperellum*

3. Ảnh hưởng của ánh sáng

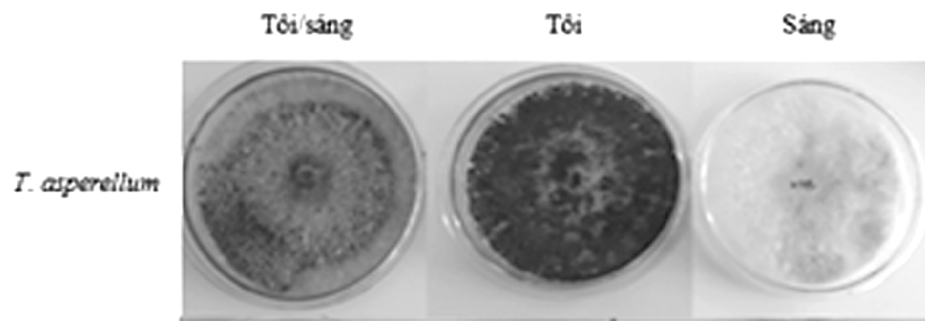
Ánh sáng là yếu tố sinh thái có vai trò quan trọng với sự sinh trưởng và phát triển của nấm nói riêng và vi sinh vật nói chung. Tuy nhiên, đối với nấm hoại sinh, quá trình sinh trưởng và phát triển không hoàn toàn cần đến ánh sáng. Ánh sáng chỉ đóng vai trò quan trọng trong một số giai đoạn nhất định, ví dụ: hình thành bào tử, quả thể, đĩa cảnh. 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 *Trichoderma* là 5 ngày sau cấy. Kết quả thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của ánh sáng nuôi cấy đến sự phát triển của chủng nấm *Trichoderma asperellum*

Ánh sáng	<i>T. asperellum</i>
Sáng hoàn toàn	7.9 ^a
Tối hoàn toàn	8.8 ^c
Sáng tối xen kẽ	8.9 ^b
LSD _{0.05}	0.28
CV%	1.5

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

Số liệu bảng 3 cho thấy, ánh sáng có ảnh hưởng tới tốc độ tăng trưởng của nấm. Ở công thức sáng xen tối (12 tiếng sáng + 12 tiếng tối), sau 5 ngày cấy, nấm đã có sợi nấm hình thành nhiều với mật độ dày, đường kính vùng sợi nấm lan rộng, nhiều hơn so với sáng liên tục và tối liên tục. Ở công thức chiếu sáng liên tục, sợi nấm phát triển chiều dài nhưng mật độ sợi nấm lại thưa và số lượng bào tử ít hơn so với điều kiện tối xen sáng. Ở công thức tối liên tục, sợi nấm lan chậm, sợi mọc tới đâu bào tử hình thành từng đọt rất rõ. 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 chủng nấm *Trichoderma asperellum* 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.



Hình 3: Ảnh hưởng của ánh sáng đến sự phát triển các chủng nấm *Trichoderma asperellum*

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 *T. asperellum* thể hiện ở Bảng 4.

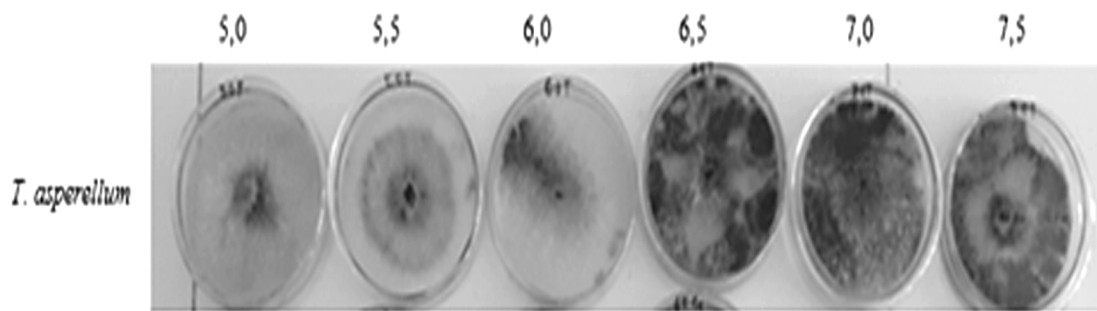
Bảng 4. Ảnh hưởng của pH đến sự phát triển của nấm *T. asperellum*

Thời gian sau cấy	Đường kính tản nấm (cm)						LSD _{0,05}	CV%
	5	5.5	6	6.5	7	7.5		
2 ngày	4.2 ^a	4.2 ^a	4.7 ^c	4.6 ^b	4.8 ^c	4.5 ^b	0.18	3.1
3 ngày	5.7 ^a	5.9 ^b	6.3 ^c	7.0 ^e	6.9 ^e	6.7 ^d	0.16	2
5 ngày	7.0 ^a	7.5 ^b	7.8 ^c	8.9 ^e	9.0 ^e	8.4 ^d	0.17	1.7
Thời gian xuất hiện bào tử	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	-	-
Số lượng bào tử	1.6x10 ⁸	2.3x10 ⁹	3.1x10 ⁹	5.2x10 ⁹	4.9x10 ⁹	3.6x10 ⁹	-	-

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

Nấm *T. asperellum* có thể phát triển ở cả 6 mức pH, tuy nhiên tốc độ phát triển ở từng giá trị có sự sai khác. Ở mức pH thấp (pH=5,0) nấm sinh trưởng và phát triển rất kém, tốc độ tăng trưởng của nấm chỉ đạt 1,3cm/ngày đêm, số lượng bào tử thấp nhất (1,6x10⁹). Ở pH=5,5 và 6, tốc độ sinh trưởng sợi nấm tăng lên, số lượng bào tử cũng tăng theo 2,3-3,1x10⁹ bào tử/ml. Tại

ngưỡng pH=7,0, sự phát triển của nấm *T. asperellum* đạt giá trị tối ưu. Cụ thể, đường kính tản nấm đạt giá trị lớn nhất (9,0cm), số lượng bào tử nấm cao nhất (5,2x10⁹). Bên cạnh đó, đường kính nấm và số lượng bào tử ở giá trị pH=6,5 không có sự sai khác nhiều so với pH=7,0 (đường kính nấm 8,9cm, số lượng bào tử: 4,9x10⁹). Ở giá trị pH≤6,0, quá trình sinh trưởng và phát triển của nấm *T. asperellum* giảm xuống dần.



Hình 4. Ảnh hưởng của pH đến sự phát triển của các chủng nấm *Trichoderma asperellum*

IV. KẾT LUẬN

Môi trường PDA được lựa chọn để nuôi cấy cấp 1 các nấm *Trichoderma asperellum*.

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=7.0 hoặc 6.5 thích hợp cho sự phát triển chủng nấm *Trichoderma asperellum*./.

Tài liệu tham khảo:

1. Akrofi AY, Amoako-Atta I, Assuah M, Kumi-Asare E, 2014, Pink Disease Caused by *Erythricium salmonicolor* (Berk. & Broome) Burdsall: An Epidemiological Assessment of its Potential Effect on Cocoa Production in Ghana, *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 5: 215.
2. Anna-Elisabeth Jansen, 2005, Recommendations for the Common Code for the Coffee Community-Initiative Final Version, *Recommendations Agrochemicals*, trang 55-60.
3. Begoude BAD, Lahlali R, Friel D, Tondje PR, Jijakli MH, 2007, Response surface methodology study of the combined effects of temperature, pH, and aw on the growth rate of *Trichoderma asperellum*, *Journal of Apply Microbiology*, Vol.103, trang 845-854.
4. Berkeley, M.J.; Broome, C.E., 1874, Enumeration of the fungi of Ceylon Part II, *Botanical Journal of the Linnean Society* 14:29-141, trang 71.
5. Chen CH. et al, 2012, *Antagonism of Trichoderma harzianum ETS 323 on Botrytis cinerea mycelium in culture conditions*, *the american phytopathological society*, Vol.102, trang 1054-1063.
6. Clipson N., Landy E., Otte M., 2001, European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification, *Collection Patrimoines Naturels*, Vol. 50, trang 15-19.
7. Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Văn Ty, Dương Văn Hợp, Nguyễn Liên Hoa, Đinh Thúy Hằng, Đào Thị Lương, Nguyễn Thị Hoài Hà, Lê Hoàng Yên, Nguyễn Kim Nữ Thảo, Nguyễn Văn Bắc, Hoàng Văn Vinh, 2012, *Vi sinh vật học*, phần 1, thể giới vi sinh vật, NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
8. Nguyễn Lâm Dũng và các tác giả, 1979, *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh* tập 2,3, NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
9. Dennis C, Webster J., 1971, *Antagonistic properties of species-group of Trichoderma*. III. Hyphal Interactions, *Trans Br Mycol Soc*, Vol. 57, trang 363-369.
10. Nguyễn Văn Đĩnh và cs, 2007, *Giáo trình biện pháp sinh học bảo vệ thực vật*, Nxb. Nông Nghiệp Hà Nội.
11. Bùi Xuân Đồng, Nguyễn Huy Văn, 2000, *Vi nấm dùng trong công nghệ sinh học*, NXB Giáo dục.
12. Eastburn DM, Butler EE., 1991, *Effect of soil moisture and temperature on the saprophytic ability of Trichoderma harzianum*, *Mycologia*, Vol. 83(3), trang 257-263.
13. Trần Thu Hà và Phạm Thị Thanh Hoài, 2012, Khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma* với nấm bệnh hại cây trồng *Sclerotium rolfsii* trong điều kiện Invitro, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, tập 75A, số 6, trang 49-55.