

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG CỦA NẤM *TRICHODERMA* VỚI *FUSARIUM OXYSPORIUM*, *CLADOSPORIUM HERBARUM* GÂY HẠI TRÊN CÂY TRỒNG – THỬ NGHIỆM NHÂN SINH KHỐI NẤM *TRICHODERMA*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Fusarium, *Cladosporium* là những nấm sợi gây bệnh thối rễ, đốm lá trên nhiều loại cây trồng ở nước ta và các nước trong khu vực, vì chúng thích nghi tốt với điều kiện khí hậu nóng ẩm. Nấm *Fusarium oxysporium* có nguồn gốc từ đất, xâm nhiễm cả những rễ cây không phải kí chủ, tồn tại dưới dạng bào tử hậu trong đất trong thời gian dài, có sức chống chịu cao. Bào tử vô tính này mầm trên tàn dư cây bệnh hay trong đất. Chúng xâm nhiễm vào rễ non hoặc rễ cây bị thương do tuyến trùng gây ra, khi tấn công vào rễ cây hệ sợi nấm phân tán mạnh mẽ lan dần vào các mạch xylem. Ngoài *Fusarium* còn có nấm *Cladosporium* tồn tại nhiều trong tàn dư thực vật, phân tán theo nhiều tác nhân. Hiện nay, việc phòng trừ nấm bệnh chủ yếu bằng thuốc bảo vệ thực vật. Tuy nhiên phương pháp này gây ảnh hưởng nghiêm trọng sức khỏe con người và môi trường tự nhiên. Do đó, sử dụng các tác nhân sinh học để đối kháng nấm bệnh trên cây trồng là một vấn đề quan trọng đang được nhiều nhà khoa học ở các nước trong khu vực quan tâm. Trong nghiên cứu này chúng tôi tập trung thử nghiệm khả năng ức chế nấm *Fusarium* và *Cladosporium* từ

các chủng *Trichoderma* được phân lập từ nhiều mẫu đất khác nhau trong tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu và tìm ra các thông số thích hợp để nhân sinh khối nấm *Trichoderma* trong quy mô phòng thí nghiệm để tiến tới thử nghiệm trên cây trồng và chuyển giao.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Nguồn phân lập nấm *Trichoderma* các mẫu đất thu nhận từ xã Bông Trang, Xuyên Mộc, Châu Đức, Vũng Tàu; các chủng nấm bệnh *Fusarium* và *Cladosporium* từ phòng vi sinh, Trường Đại học Bà Rịa - Vũng Tàu. Môi trường phân lập: PGA, WA, M1; môi trường nuôi: PGA, M1, cám gạo, trấu, bã cà phê đã khử trùng.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phân lập nấm *Trichoderma*

- Phân lập nấm *Trichoderma* từ 20 mẫu đất (Bảng 1) trên môi trường M1; thử nghiệm khả năng đối kháng nấm bằng phương pháp *in vitro* [3,4,5,6]; xác định bào tử nấm bằng buồng đếm hồng cầu [1]; nhận diện *Trichoderma* theo tiêu chuẩn cơ sở TCCS 39:2012/BVTV. Thí nghiệm được bố trí với 3 lần lặp

|| ThS. Trần Thị Duyên

|| KS. Nguyễn Văn Tới

Khoa HH&CN Thực phẩm

Trường Đại học Bà Rịa - Vũng Tàu

lại. Số liệu được xử lý thống kê với phần mềm thống kê Statgraphics 15.2.

2.2.2. Thử nghiệm đánh giá hoạt tính đối kháng của nấm *Trichoderma* với nấm bệnh theo phương pháp *in vitro*

Nấm bệnh *Fusarium*, *Cladosporium* và nấm *Trichoderma* được cấy đối xứng nhau trên môi trường PGA. Mỗi nghiệm thức được thực hiện với ba lần lặp lại, mỗi đĩa petri là một nghiệm thức, phần trăm ức chế được tính theo công thức [1,2,4,5,6]:

$$PIMG = \left(1 - \frac{R_1}{R_2}\right) * 100$$

Trong đó: PIMG: phần trăm ức chế; R_1 : đường kính nấm bệnh cây chung với nấm *Trichoderma*;

R_2 : đường kính nấm bệnh cây độc lập.

2.2.3. Đánh giá ảnh hưởng của thành phần môi trường nuôi cấy và pH đến khả năng sinh bào tử của *Trichoderma*

Chúng tôi bố trí thí nghiệm ngẫu

nhien với 6 tỷ lệ khác nhau của cám, trâu và bã cà phê tại các giá trị pH=3;4;5;6;7;8. Kết quả được xác định dựa trên số lượng bào tử được hình thành trong thời gian 10 ngày[1].

2.2.4. Ảnh hưởng của ánh sáng đến sản lượng bào tử *Trichoderma*

Kiểm tra khả năng tạo bào tử của nấm *Trichoderma* ở ba điều kiện chiếu sáng khác nhau: CT1: *sáng tối xen kẽ*; CT2: *tối liên tục*; CT3: *sáng liên tục*. Với môi trường nuôi cấy và pH thích hợp nhất từ thí nghiệm 2.2.3.

2.2.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sản lượng bào tử

Kiểm tra khả năng tạo bào tử của nấm *Trichoderma* ở ba khoảng nhiệt độ 25°C, 30°C, 35°C. Với các yếu tố: thành phần môi trường, pH, điều kiện chiếu sáng thích hợp đã được khảo sát từ những thí nghiệm 2.2.3 và 2.2.4.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.2. Kết quả phân lập nấm *Trichoderma*

Kết quả phân lập nấm *Trichoderma* được trình bày trong Bảng 1. Từ Bảng 1 cho thấy, *Trichoderma* phân bố khá phổ biến trong các loại đất canh tác nông nghiệp và đất rừng trong tự nhiên. Điều này phù hợp với kết quả điều tra sự phân bố *Trichoderma* tại TP. HCM và các tỉnh Đông Nam Bộ của PGS.TS. Phạm Thị Ánh Hồng và Th.S Đinh Minh Hiệp 2005.

3.2. Đánh giá khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma* với nấm gây bệnh cây trồng

Sau khi tiến hành xác định khả năng đối kháng của 20 chủng *Trichoderma* với nấm *Fusarium oxysporium* và *Cladosporium herbarum* chúng tôi thu được kết quả về mức độ đối kháng được thể hiện qua Bảng 2.

Qua Bảng 2, cho thấy, tất cả các chủng *Trichoderma* đều có khả năng đối kháng với nấm *F.oxysporium*

và *C.herbarum*. Tuy nhiên, mức độ đối kháng khác nhau giữa các chủng nấm *Trichoderma*. Với *Foxysporium* chủng T₃ có khả năng đối kháng rất cao ở mức độ 4 với hoạt tính đối kháng lên đến 88,61%; 4 chủng T₁, T₂, T₄, T₅ có mức độ đối kháng cao, mức độ đối kháng dao động từ 63,74 - 73,17%, 5 chủng T₉, T₁₁, T₁₄, T₁₆, T₁₉ có mức độ đối kháng trung bình với hoạt tính đối kháng dao động từ 51,59 - 60,95%. Đối với *C.herbarum* thì tất cả các chủng *Trichoderma* đều có khả năng đối kháng 100%. Qua quan sát nhận thấy bình thường *Fusarium* và *Cladosporium* có khả năng cạnh tranh dinh dưỡng rất tốt, tuy nhiên tiếp xúc với *Trichoderma* thì khuẩn lạc nấm *Fusarium* và *Cladosporium* không phát triển nữa và teo dần. Nguyên nhân có thể do *Trichoderma* đã tiết ra chất kháng nấm ức chế *Fusarium* và *Cladosporium* không thể phát triển (Agrowcal và ctv, 1979; Michrina, 1996) [7]. Từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 7 màu xanh đặc trưng của nấm *Trichoderma* xuất hiện tại tâm khuẩn lạc và lan dần lên khuẩn lạc nấm bệnh, đến ngày thứ 10 nấm *Fusarium* và *Cladosporium* chết hoàn toàn. Điều này có thể do quá trình giao thoa sợi nấm, sợi nấm *Trichoderma* len lỏi vào khuẩn lạc nấm bệnh, vây quanh sau đó thắt chặt các sợi nấm bệnh, làm thủng lớp tế bào của nấm gây bệnh làm cho chất nguyên sinh của chúng bị phân hủy (Cnyder, 1976; weinding 1932).

3.3. Thử nghiệm đánh giá ảnh hưởng của pH và môi trường nhân tạo đến sản lượng bào tử của *Trichoderma*

Kết quả sau 10 ngày thử nghiệm đánh giá ảnh hưởng của pH và thành phần môi trường nuôi cấy đến sản lượng bào tử của cả 3 chủng T₁ (A.15.11), T₂ (B.15.11), T₃ (CDVS), chúng tôi nhận thấy sản lượng bào tử (SLBT) của 3 chủng *Trichoderma* ở các giá trị pH khác nhau luôn cho

SLBT khác nhau. Khoảng pH thích hợp cho việc hình thành bào tử của hầu hết các loại nấm *Trichoderma* là từ 5-6, tùy vào mức pH khác nhau mà nấm có thể tạo ra nhiều hay ít bào tử. Ở pH=5 cả 3 chủng đều cho SLBT tương đối cao, SLBT đạt cao nhất tại giá trị pH=6 (T₁= 8.7x10⁹/g; T₂=9.67x10⁹/g; T₃=11.37x10⁹/g), điều này hoàn toàn phù hợp với khoảng pH=5-6 là khoảng pH tối thích cho *Trichoderma* theo nghiên cứu của Dasrupta, 1991 [6]. Khi pH=7-8 sản lượng bào tử giảm đột ngột (T₁= 4.53x10⁹/g; T₂=5.67x10⁹/g; T₃=6.33x10⁹/g), điều này phù hợp với nhận định của Papavizas về sự phân bố và thích nghi của nấm *Trichoderma* tại vùng có tính axit tốt hơn so với môi trường mang trung tính hoặc kiềm [3].

Trong CT6, cả 3 chủng *Trichoderma* đều cho sản lượng bào tử cao hơn các CT khác. Điều này có thể được giải thích là do trong thành phần môi trường nuôi cấy này, chúng tôi có bổ sung thêm bã cà phê. Trong bã cà phê chứa lượng lớn polysaccharide không hòa tan, đường khử còn sót lại trong bã, các protein, acid amin ở dạng liên kết với các polysaccharide này, ngoài ra trong bã cà phê chứa nhiều vi khoáng chất như phospho, calcium, kali..., cần thiết cho hoạt động trao đổi chất và sinh năng lượng cho các chủng nấm.

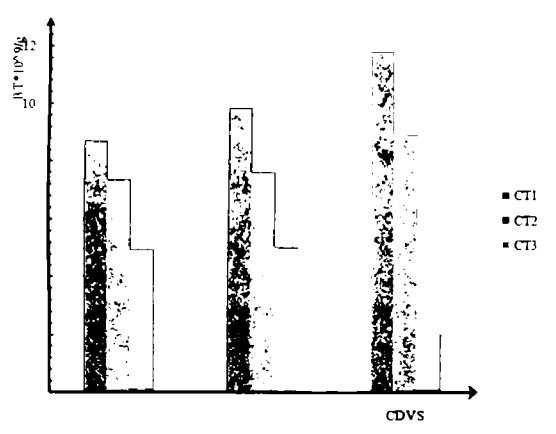
3.4. Ảnh hưởng của ánh sáng đến sản lượng bào tử *Tri*

Sau 10 ngày nuôi cấy *Trichoderma* dưới điều kiện ánh sáng khác nhau: CT1: *sáng tối xen kẽ*; CT2: *tối liên tục* và CT3: *chiếu sáng liên tục*, chúng tôi thu được kết quả về số lượng bào tử được trình bày trong Hình 1; 2.

Kết quả khảo sát cho thấy, ở điều kiện ánh sáng xen kẽ nhau các chủng *Trichoderma* đều cho lượng bào tử cao nhất, lượng bào tử sinh ra thấp nhất ở điều kiện ánh sáng

Bảng 1. Kết quả phân lập nấm *Trichoderma*

STT	Kí hiệu	Mã chủng	Nguồn phân lập	Địa điểm lấy mẫu	Trichoderma
1	A.15.11	T ₁	Đất trồng đu đủ	Bông Trang, Xuyên Mộc	+
2	B.15.11	T ₂	Đất trồng tiêu	Xuyên Mộc, Xuyên Mộc	+
3	CDVS	T ₃	Đất hoang ven suối	Bông Trang, Xuyên Mộc	+
4	M.15.11	T ₄	Đất trồng Cacao	Xà Bang, Châu Đức	+
5	XM.TAP	T ₅	Đất trồng xen canh cây ăn trái-hoa màu	Bông Trang, Xuyên Mộc	+
6	Cacao.TD	T ₆	Cty Thành Đạt, Châu Đức	Xà Bang, Châu Đức	+
7	PLVT	T ₇	Đất trồng rau	Tp. Vũng Tàu	+
8	VDP	T ₈	Đất trồng lạc	Bông Trang, Xuyên Mộc	+
9	NHAN	T ₉	Đất trồng nhân da bò - đất thịt	Bông Trang, Xuyên Mộc	+
10	TV	T ₁₀	Đất trồng thanh long	Bưng Riếng, Xuyên Mộc	+
11	VTKU	T ₁₁	Đất trồng ngô - thuộc đất đỏ	Lâm trường rừng Dầu, ấp Trang nghiêm, xã Bông Trang, Xuyên Mộc	+
12	DMBM	T ₁₂	Đất rừng dưới tán cây mục	Rừng cấm, xã Bưng Riếng, Xuyên Mộc, BRVT	+
13	DL	T ₁₃	Đất mọc tre rừng - Đất thịt	Núi Hồng Nhung, Xuyên Mộc, BRVT	+
14	LA	T ₁₄	Đất trồng lúa	Huyện Đất đỏ, BRVT	+
15	TRAM.DD	T ₁₅	Đất Tràm, xen trong rừng Dầu	Bông Trang, Xuyên Mộc	+
16	T4	T ₁₅	Đất trồng tiêu	Bàu Lâm, Xuyên Mộc	+
17	DR	T ₁₇	Đất rừng	Rừng cấm Bình Châu - Phước Bửu BRVT	+
18	T.SAN	T ₁₈	Đất trồng sắn	Bưng riếng, Xuyên Mộc	+
19	N.22.11	T ₁₉	Đất trồng ngô	Cầu sông Hòa, Xuyên Mộc	+
20	DN1	T ₂₀	Đất đỉnh núi - Rừng tạp	Núi thuộc xã Bình Châu, Xuyên Mộc	+



Hình 1. Ảnh hưởng của ánh sáng đến sản lượng bào tử *Trichoderma*



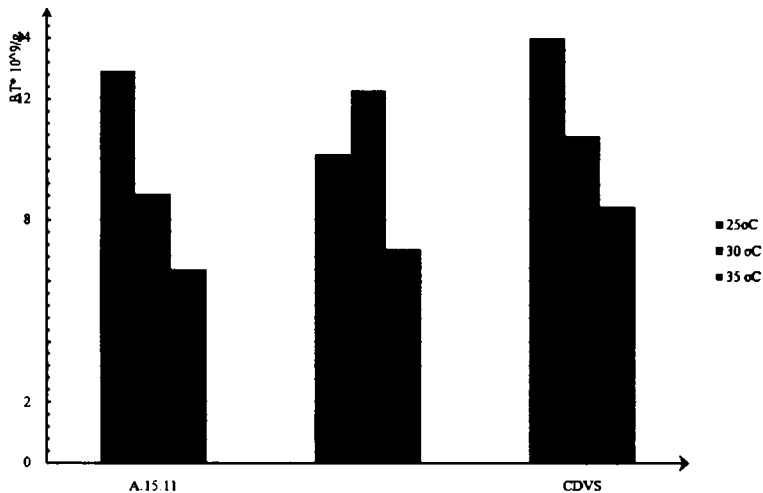
Hình 2. Khuẩn lạc T₃ và T₂ ở ba điều kiện ánh sáng khác nhau

Bảng 2. Đánh giá tính đối kháng của *Trichoderma* với *F.oxysporium* và *C.herbarum*

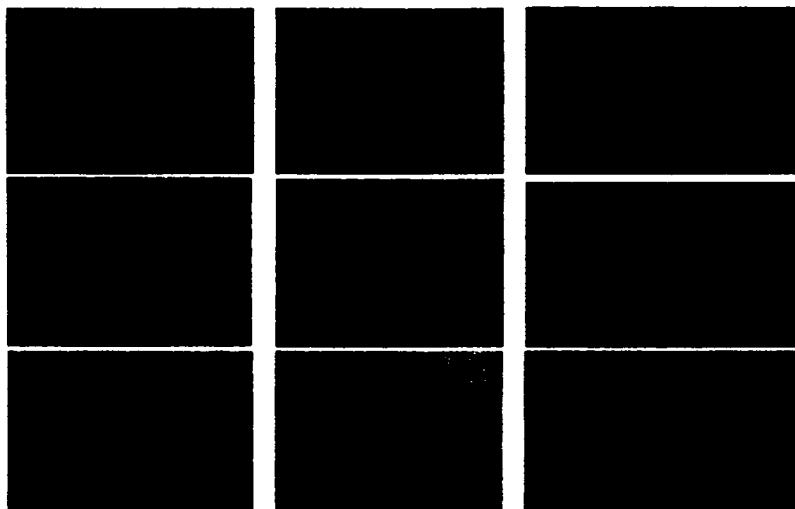
STT	Kí hiệu chủng	Fusarium oxysporium - cm		Đối kháng		Cladosporium herbarum - cm		Đối kháng	
		$\left(\frac{R_1}{r}\right)/2$	Ch - 1.5	PIMG %	Hoạt tính	$\left(\frac{R_1}{r}\right)/2$	Ch - 1.5	PIMG %	Hoạt tính
1	A.15.11	4.16	1.37	67.07	3	3.7	-	100	4
2	B.15.11	4.33	1.57	63.74	3	3.67	-	100	4
3	M.15.11	4.1	1.1	73.17	3	3.67	-	100	4
4	XM.TAP	4.43	1.6	63.88	3	3.83	-	100	4
5	CDVS	4.17	0.55	86.81	4	3.73	-	100	4
6	CC.TD	4.03	2.23	44.67	2	3.9	-	100	4
7	PLVT	4.13	2.37	42.62	2	3.63	-	100	4
8	VDP	4.4	2.27	48.41	2	3.77	-	100	4
9	NHAN	4.33	2.1	51.5	2	3.77	-	100	4
10	TV	4.17	2.27	45.56	2	3.83	-	100	4
11	VTKU	4.23	2.03	52.01	2	3.73	-	100	4
12	DMBM	4.2	2.4	42.86	2	3.77	-	100	4
13	DL	4.4	2.37	46.14	2	3.77	-	100	4
14	LA	4.4	2.13	51.59	2	3.7	-	100	4
15	TRAM.Dd	4.37	2.23	48.97	2	3.7	-	100	4
16	T4	4.3	1.93	55.12	2	3.83	-	100	4
17	DR	4.33	2.4	44.57	2	3.77	-	100	4
18	T.SAN	4.17	2.4	42.45	2	3.7	-	100	4
19	N.22.11	4.43	1.73	60.95	2	3.57	-	100	4
20	DN1	4.33	2.2	49.19	2	3.9	-	100	4

Ghi chú: Khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma* được đánh giá như sau:

- 4. PIMG $\geq 75\%$: đối kháng rất cao;
- 2. PIMG thuộc khoảng (50;61): đối kháng trung bình;
- 3. PIMG thuộc khoảng (61;75): đối kháng cao;
- 1. PIMG < 50: đối kháng kém.



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sản lượng bào tử của nấm *Trichoderma*



Hình 4. Sự phát triển bào tử của 3 chủng *Trichoderma*

được chiếu sáng liên tục. Điều này phù hợp với quá trình thực nghiệm lấy mẫu phân lập của chúng tôi, đa phần những mẫu đất sử dụng để phân lập đều nằm trên mặt đất, chịu ảnh hưởng của việc xen kẽ ánh sáng từ thiên nhiên. Tuy nhiên, sự khác biệt số lượng bào tử trong CT1 đối với nghiệm thức ủ tối liên tục CT2 cũng không quá lớn. Vì vậy, tùy thuộc vào điều kiện sản xuất mà chúng ta có thể lựa chọn phương án chiếu sáng xen kẽ hay tối liên tục thì số lượng bào tử thu được đều đạt trên 5×10^9 bào tử/gam.

3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sản lượng bào tử

Kết quả sau 10 ngày khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả

năng sinh bào tử *Trichoderma* ở 3 điều kiện nhiệt độ khác nhau: 25°C; 30°C; 35°C được trình bày trong Hình 3.

Từ Hình 3 chúng ta thấy ở nhiệt độ từ 25-30°C cả 3 chủng đều cho sản lượng bào tử tương đối cao. Trong đó, sản lượng bào tử cao nhất đối với chủng T_1 và T_3 ở 25°C, ở 30°C chủng T_2 cho sản lượng bào tử cao nhất. Khi tăng nhiệt độ lên 35°C sản lượng bào tử của cả 3 chủng đều giảm. Theo nghiên cứu của Klein và Evenleigh, 1998 [3]; Lê Văn Ê, 2003 thì nhiệt độ là yếu tố sinh thái rất quan trọng trong quá trình sinh trưởng, sản sinh bào tử của *Trichoderma*. Nhiệt độ tối thích đối với từng loài *Trichoderma* là

khác nhau. Tuy nhiên, thường chỉ dao động khoảng 25-30°C thì hầu hết các loài nấm *Trichoderma* đều thích nghi tốt. Kredict và ctv, 2003 đã một lần nữa khẳng định, xác thực nghiên cứu của Klein và Evenleigh về ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ mọc mầm của bào tử, sự tăng dài của ống mầm và sự phát triển của nấm *Trichoderma* trong quá trình sản xuất sinh khối *Trichoderma* thích hợp trong khoảng 25-30°C tùy loài. Theo Kredict, 2003 thì kết quả đạt được trong nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với yếu tố thích nghi nhiệt độ của mỗi chủng nấm *Trichoderma* [3].

IV. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy trong 20 chủng *Trichoderma* phân lập từ 20 mẫu đất thu nhận từ 20 khu vực khác nhau trong tỉnh Bà Rịa-Vũng Tàu có 1 chủng đối kháng rất cao, 4 chủng đối kháng cao, 5 chủng đối kháng trung bình, 10 chủng đối kháng yếu với *Fusarium*. Cả 20 chủng này đều đối kháng rất cao với *Cladosporium*. Chọn lọc được 5 chủng có khả năng phát triển và đối kháng tương đối tốt với *Fusarium oxysporium* và *Cladosporium*. Sinh khối *Trichoderma* thu được cao nhất là ở pH=6, trong môi trường gồm 50% cám, 25% trấu, 25% bã cà phê, điều kiện sáng tối xen kẽ và nhiệt độ trong khoảng 25-30°C.

T.T.D, N.V.T

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Trần Thị Thu Hà, Phạm Thanh Hòa (2012), *Khả năng đối kháng của nấm Trichoderma với nấm bệnh hại cây trồng Sclerotium rolfsii sacc trong điều kiện in vitro*, Tạp chí Khoa học, Đại Học Huế, Tập 75a, Số 6, 49-55.
- [2]. Kredics L, Antal Z, Doczi I, Manczinger L, Kevei F, Nagy E. *Clinical importance of the genus Trichoderma. A review. Acta Microbiol Immunol Hung.* 2003;50:105-117.
- [3]. Klein D, Eveleigh DE. *Ecology of Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE, editors. *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. London: Taylor and Francis Ltd.; 1998. pp. 57-74.
- [4]. Papavizas (1985), *Trichoderma and Gliocladium: Biology, ecology, and potential for biocontrol*. Ann. Rev. Phytopath, 23: 23-54.
- [5]. Michrina, J., A. Michalikova., T. Rohacik and R. Kulichova. (1995). *Antibiosis as a possible mechanism of antagonistic action Trichoderma harzianum against Fusarium culmorum*, Ochrana Rostlin, 31:177-184
- [6]. Maiti D, Dasgupta B, Sen C. 1991. *Antagonism of Trichoderma harzianum and Gliocladium virens isolates to Sclerotium rolfsii and biological control of stem rot of groundnut and betel vine*. Journal of Biological Control 5, 105-109.