

TUYỂN CHỌN NẤM *Trichoderma* spp. CÓ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG VỚI TÁC NHÂN GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN CÂY XOÀI

Phạm Thị Lý Thu^{1*}, Lê Trung Thành¹, Lưu Thị Mỹ Dung¹,
Hà Viết Cường², Nguyễn Đức Thành¹, Nguyễn Thị Hồng Hải¹

¹*Viện Di truyền Nông nghiệp*
²*Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

*Tác giả liên hệ: phamthilythu@yahoo.com

Ngày nhận bài: 12.07.2021

Ngày chấp nhận đăng: 29.10.2021

TÓM TẮT

Xoài là loại cây trồng chủ lực và mang lại hiệu quả kinh tế cao cho vùng Đồng bằng sông Cửu Long, nhưng bệnh thán thư làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng của xoài. *Trichoderma* spp. là loại nấm phổ biến trong đất và có hoạt tính đối kháng với nhiều loại nấm gây hại cây trồng, trong đó có nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên cây xoài. Với mục tiêu tuyển chọn được nấm *Trichoderma* spp. có hoạt tính đối kháng cao với nấm gây bệnh thán thư, đã thu thập 17 mẫu đất dưới tán cây xoài ở các vườn trồng xoài ở một số tỉnh thuộc Đồng bằng sông Cửu Long. Dựa vào các đặc điểm hình thái, đã phân lập được 56 chủng nấm *Trichoderma* spp. và tuyển chọn được 14 chủng nấm *Trichoderma* spp. có hoạt tính đối kháng cao với nấm gây bệnh thán thư. Trong đó, 6 chủng Tr.X1, Tr.X2, Tr.X3, Tr.X4, T1, M2 có hoạt tính đối kháng cao nhất từ 77,76-86,25% ở điều kiện *in vitro* và 2 chủng Tr.X2, Tr.X3 có hoạt tính cao nhất ở điều kiện nhà lưới (75,3% và 72,01% so với đối chứng). Kết quả phân tích trình tự vùng ITS, chủng Tr.X2 được xác thuộc loài *Trichoderma harzianum* và chủng Tr.X3 thuộc loài *Trichoderma asperellum*, đây là 2 chủng nấm đối kháng có tiềm năng trong kiểm soát sinh học bệnh thán thư gây hại trên cây xoài.

Từ khóa: Thán thư, đối kháng, *Colletotrichum asianum*, *Trichoderma* spp.

Isolation and Selection of *Trichoderma* spp. Antagonists against Pathogens Causing Anthracnose in Mango

ABSTRACT

Mango is a key crop and provides high economic efficiency in the Mekong Delta. However, its yield and quality are seriously affected by anthracnose disease. In order to select *Trichoderma* spp. with high antagonistic activity against disease fungi, 17 soil samples were collected from healthy plots in Hau Giang and other provinces in the Mekong Delta. A total of 56 strains of *Trichoderma* spp. were isolated and 14 strains were selected for high antagonistic activity against fungi causing anthracnose. Among those, strains Tr.X1, Tr.X2, Tr.X3, Tr.X4, T1, M2 and Tr.X2, Tr.X3 exhibited the most antagonistic activity from 77.76-86.25% in *in vitro*, and 75.3-72.01% in the net house. The strains were identified as *Trichoderma harzianum* (Tr.X2) and *Trichoderma asperellum* (Tr.X3) and they have potential of biological control to anthracnose in mango.

Keyword: Anthracnose, antagonistic, *Colletotrichum asianum*, *Trichoderma* spp.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, xoài được trồng từ Nam chí Bắc, vùng trồng xoài tập trung từ Bình Định trở vào và được trồng nhiều nhất ở các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Hiện tại, bộ giống

xoài rất đa dạng với 46 giống loài, sản lượng năm 2019 đạt 31.276 tấn đã giúp Việt Nam đứng thứ 13 về sản xuất xoài trên thế giới (Cục Trồng trọt, 2019). Với tiềm năng xuất khẩu các loại trái cây chủ lực của Việt Nam, việc đảm bảo chất lượng cần được ưu tiên hàng đầu.

Chính vì thế việc chăm sóc phòng trừ bệnh hại đối với các cây ăn quả là điều phải quan tâm. Một trong những bệnh thường gặp ở cây ăn quả gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến chất lượng quả là bệnh thán thư.

Bệnh thán thư là một trong những bệnh hại nguy hiểm đối với cây ăn quả và phổ biến ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, do nấm *Colletotrichum* spp. gây ra. Loài nấm bệnh này gây hại trên nhiều loại cây trồng khác, làm giảm giá trị kinh tế, gây thiệt hại nặng nề cho người nông dân. Trong đó, xoài là cây ăn quả bị bệnh thán thư gây hại phổ biến và nặng nề nhất (Kumari & Singh, 2017). Bệnh làm cho lá rụng hàng loạt, hầu hết các chùm hoa đều bị rụng, quả non cũng bị rụng, quả lớn bị thối (Arauz, 2000). Theo Hoàng Thị Lệ Thủy & cs. (2009), bệnh thán thư có thể gây hư hại 100% hoa xoài trong những điều kiện ẩm ướt kéo dài và làm thất thu hoàn toàn năng suất. Bệnh thán thư cũng gây hại 181,2ha, chiếm khoảng 30% diện tích trồng xoài bị bệnh tại tỉnh Hậu Giang năm 2018. Để hạn chế bệnh hại, người dân thường dùng các loại thuốc hóa học, điều này gây ra ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến sức khỏe của con người. Vì vậy, các biện pháp kiểm soát sinh học đang được sử dụng rộng rãi ở Việt Nam và trên thế giới để hướng tới nền nông nghiệp sạch và an toàn.

Trong số các tác nhân sinh học thì nấm *Trichoderma* spp. được sử dụng nhiều để kiểm soát bệnh hại cây trồng, trong đó có bệnh thán thư. Nấm đối kháng *Trichoderma* spp. có nhiều trong đất và được biết rõ đến hiệu quả trong việc kiểm soát các nấm gây bệnh như *Corynespora cassiicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*. Cơ chế trực tiếp liên quan đến hiệu quả đối kháng là sự cạnh tranh, sinh kháng sinh và ký sinh (Chaverri & cs., 2003). Nấm *Trichoderma asperellum* tiết ra chitinase, glucanase, protease, có thể làm phá hủy vách tế bào của nấm và ký sinh trong sợi nấm bệnh (Wu & cs., 2017). Nấm *T. asperellum* T8a có tốc độ phát triển nhanh, hình thành bào tử phân sinh lớn và hoạt tính đối kháng cao với nấm *C. gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên xoài

(Santos & cs., 2013). Admasu & cs. (2014) cũng đã đánh giá mức độ phổ biến của *Trichoderma* spp. và tiềm năng đối kháng nấm *C. gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên cây xoài ở Ethiopia. Kết quả cho thấy nấm *Trichoderma* spp. có tác dụng ức chế cao, đạt hiệu suất 67,5% đối với nấm *C. gloeosporioides*. Tại Việt Nam, cũng có nhiều nghiên cứu về hoạt lực đối kháng của nấm *Trichoderma* với các loại nấm gây bệnh có trong đất, nhưng chưa có nhiều nghiên cứu với nấm gây bệnh thán thư. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm phân lập nấm *Trichoderma* spp. từ các mẫu đất vùng trồng xoài ở Đồng bằng sông Cửu Long dựa vào các đặc điểm hình thái kết hợp với giải trình tự gen vùng rDNA-ITS và tuyển chọn thông qua đánh giá hoạt tính đối kháng với tác nhân gây bệnh thán thư (*C. gloeosporioides*) trên cây xoài trong điều kiện *in vitro* và nhà lưới.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các mẫu đất khỏe tại các vườn trồng cây xoài lâu năm ở tỉnh Hậu Giang và một số tỉnh thuộc Đồng bằng sông Cửu Long.

Chủng nấm *Colletotrichum asianum* TT.03, *Colletotrichum asianum* TT.02 gây bệnh thán thư trên cây xoài do bộ môn Công nghệ Vi sinh, Viện Di truyền Nông nghiệp cung cấp.

Cây xoài có 4-5 tầng lá thật, giống cát Hòa Lộc (cao từ 50-70cm).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập nấm *Trichoderma* spp.

Nấm *Trichoderma* spp. được phân lập từ đất theo phương pháp của Kumar & cs. (2012). Các mẫu đất được pha loãng 5 lần trong nước cất vô trùng. Lấy 0,5ml dung dịch đã pha loãng nhỏ lên đĩa Peptri có chứa môi trường TSM (*Trichoderma* Specific Medium). Ủ ở nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 96 giờ. Chọn những tản nấm rời, có hình thái đặc trưng của nấm *Trichoderma* cấy chuyển sang môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) và để làm thuần bằng kỹ thuật

cây đơn bào tử. Nấm *Trichoderma* spp. được giám định sơ bộ dựa vào các đặc điểm hình thái. Các chủng nấm *Trichoderma* spp. được làm thuần và bảo quản ở 4°C.

2.2.2. Đánh giá khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma* spp. với nấm gây bệnh thán thư trên cây xoài trong điều kiện in vitro

Nấm bệnh và nấm *Trichoderma* spp. được cắt thành những khoanh tròn đều nhau rồi đặt đối xứng nhau trên đĩa thạch PDA để xác định hiệu lực đối kháng (theo phương pháp của Seiketov, 1982; Bradshaw-Smith & cs., 1991). Theo dõi sự phát triển của nấm bệnh, nấm *Trichoderma* spp. sau 5-7 ngày ở nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Hiệu lực ức chế của nấm đối kháng đối với nấm gây bệnh được tính theo công thức:

$$\text{HLUC (\%)} = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

Trong đó:

HLUC: Hiệu lực ức chế (tính theo %);

R_1 : Đường kính nấm gây bệnh thán thư ở công thức đối chứng;

R_2 : Đường kính nấm gây bệnh thán thư ở công thức thí nghiệm.

2.2.3. Đánh giá khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma* spp. với nấm gây bệnh thán thư trên cây xoài trong điều kiện nhà lưới

Cây thí nghiệm được lựa chọn là cây xoài cát Hòa Lộc cao khoảng 60cm, không bị bệnh và côn trùng gây hại, không phun thuốc hóa học trước ngày lây bệnh nhân tạo khoảng 10 ngày, có cùng độ tuổi cây. Trồng 1 cây/túi bầu. Thí nghiệm được chia là 3 công thức:

CT1: Đối chứng âm (ĐC-): Chỉ tưới nước sạch, không phun nấm bệnh và nấm *Trichoderma*.

CT2: Đối chứng dương (ĐC+): Chỉ tưới và phun nấm gây bệnh *Colletotrichum asianum* TT.03 với mật độ 10^6 bào tử/ml.

CT3: Công thức thí nghiệm: Nấm đối kháng *Trichoderma* được tưới vào gốc và phun ướt đều toàn bộ thân, lá cây xoài (mật độ 10^8 bào tử/ml).

Sau 2 ngày, tiến hành gây nhiễm bằng cách tạo vết thương trên lá và thân xoài rồi phun huyền phù bào tử nấm *Colletotrichum asianum* TT.03 với mật độ 10^6 bào tử/ml.

Mỗi công thức thực hiện trên 5 cây và lặp lại 3 lần. Chăm sóc hàng ngày và theo dõi tỉ lệ bệnh, chỉ số hại trên lá và thân cây xoài. Khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma* spp. với nấm gây bệnh thán thư trên cây xoài trong điều kiện nhà lưới được xác định theo tiêu chuẩn ngành: 10 TCN 516:2002 và tham khảo Quy chuẩn Quốc gia: QCVN 01-16: 2014/BNNPTNT.

Tỉ lệ bệnh (TLB) được tính: $\text{TLB (\%)} = \frac{\text{Số lá bị bệnh}}{\text{Tổng số lá thí nghiệm}} \times 100$

Chỉ số hại (CSB) được tính:

$$\text{CSB (\%)} = \frac{5n_5 + 4n_4 + 3n_3 + 2n_2 + n_1}{5N} \times 100$$

Trong đó:

N: Tổng số lá thí nghiệm;

n_1 : số lá bị hại cấp 1: < 5% diện tích lá bị bệnh;

n_2 : số lá bị hại cấp 3: 5-10% diện tích lá bị bệnh;

n_3 : số lá bị hại cấp 5: > 10-20% diện tích lá bị hại;

n_4 : số lá bị hại cấp 7: > 20-30% diện tích lá bị hại;

n_5 : số lá bị hại cấp 9: > 30% diện tích lá bị hại.

2.3.4. Định danh nấm *Trichoderma* spp. bằng giải trình tự gen vùng rDNA-ITS

Vùng gen barcode RNA ribosome được sử dụng để định danh. Phản ứng PCR đối với mẫu nấm được thực hiện với 2 môi ITS4 và ITS5 (White & cs., 1990). PCR được thực hiện với MyTaq™ HS Mix (Bioline). Sản phẩm PCR được tinh chiết từ gel agarose bằng kit tinh chiết AccuPrep Gel Purification Kit (Bioneer). Dùng môi để giải trình tự của sản phẩm PCR. Dựa trên các trình tự thu được, việc tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu Genbank bằng phần mềm BLAST tại NCBI (the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)). Phân tích trình tự và các

mối quan hệ phát sinh loài được thực hiện bằng các phần mềm ClustalX và MEGAX.

2.3.5. Xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần và các giá trị được xử lý thống kê dưới dạng giá trị trung bình cộng trừ độ lệch chuẩn bằng phép phân tích biến một chiều ANOVA Với hậu kiểm Newman-Keuls. Giá trị $P < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập nấm *Trichoderma* spp.

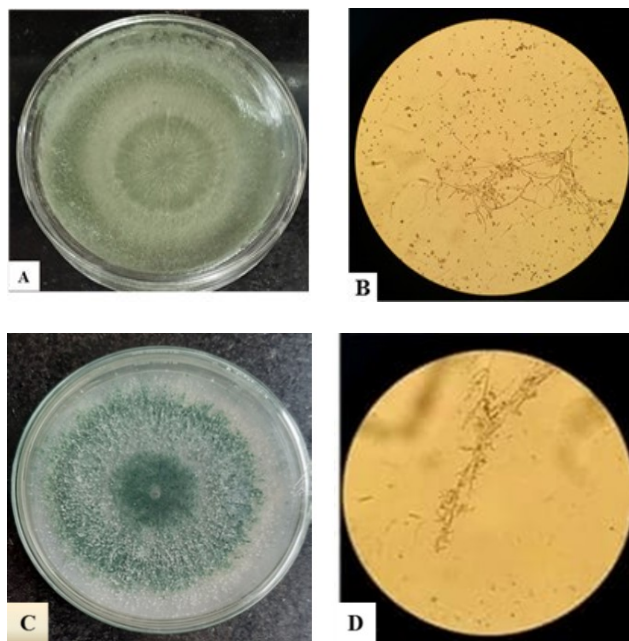
Trichoderma spp. là một loại nấm sinh sản vô tính (Rifai, 1969), phổ biến trong đất và có hoạt tính đối kháng với nhiều loại nấm gây hại cây trồng (Bruce & cs., 1984). *T. harzianum* phá hủy sự tổng hợp thành tế bào nhờ sản sinh chitinase và glucanase cũng như các chất trao đổi có hoạt tính kháng nấm khác (Noronha & Ulhoa, 1996) và đây là đặc điểm quan trọng trong quá trình ký sinh nấm dị dưỡng (Dennis & Webster, 1971). Chính những đặc tính này đã được khai thác trong ngành nông nghiệp, sử dụng các chế phẩm của *T. harzianum* để phòng trừ sinh học các loại bệnh nấm khác nhau gây

hại cây trồng (Papavizas, 1985). Để phân lập được *Trichoderma* spp. từ đất thì các mẫu đất sau khi thu thập về được phơi khô, nghiền mịn và phân lập theo phương pháp của Kumar & cs. (2012). Kết quả từ 17 mẫu đất được thu thập dưới tán cây xoài khỏe tỉnh Đồng Tháp, Hậu Giang và một số tỉnh ĐBSCL, đã phân lập được 56 chủng nấm *Trichoderma* spp. và đánh giá khả năng đối kháng của chúng với nấm *Colletotrichum asianum* gây bệnh thán thư hại xoài. Kết quả tìm được 14 chủng nấm *Trichoderma* spp. có khả năng đối kháng với các hình thái điển hình như sợi màu trắng, đôi khi có màu vàng nhạt, hơi xốp sau chuyển sang màu xanh.

Quan sát các mẫu nấm *Trichoderma* spp. trên môi trường PDA cho thấy, lúc đầu tản nấm có màu trắng, hơi xốp và hình thành cạnh bào tử phân sinh. Sau 2 ngày nuôi cấy, tản nấm chuyển dần sang màu xanh, hình thành nhiều cạnh bào tử phân sinh. Bào tử phân sinh của nấm có dạng hình cầu hoặc hình trứng, bề mặt nhẵn. Thể bình có dạng hình trụ. Đa số các mẫu thu thập được hình thành nhiều bào tử phân sinh, sau 3 ngày nuôi cấy và đến ngày thứ 4 và thứ 5 thì nấm mọc kín đĩa và chuyển màu xanh hoàn toàn.

Bảng 1. Nguồn gốc và hình thái nấm *Trichoderma* spp. phân lập được

Nguồn gốc	Ký hiệu chủng	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc
Xoài cát Hòa Lộc, Đồng Tháp	T1	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh
Xoài cát Hòa Lộc, Đồng Tháp	T2	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh
Xoài Đài Loan, Đồng Tháp	T3	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh
Xoài Đài Loan, Đồng Tháp	T4	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh
Xoài cát Hòa Lộc, Đồng Tháp	Tr.X1	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh
Xoài Đài Loan, Đồng Tháp	Tr.X2	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh
Xoài Đài Loan, Hậu Giang	Tr.X3	Bào tử màu xanh, phát triển thành các lớp
Xoài cát Hòa Lộc, Hậu Giang	Tr.X4	Sợi ngắn, bào tử màu xanh, sinh trưởng theo hình tròn đặc trưng
Xoài cát Hòa Lộc, Hậu Giang	M1	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh
Xoài Đài Loan, Hậu Giang	M2	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh
Xoài cát Hòa Lộc, Hậu Giang	M3	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh
Xoài cát Hòa Lộc, Hậu Giang	M4	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh
Xoài cát Hòa Lộc, Cần Thơ	N1	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh
Xoài Đài Loan, Cần Thơ	N2	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh



Chú thích: A, C: Tảo nấm *Trichoderma* spp. trên môi trường PDA sau 5 ngày nuôi cấy; B, D: Cành bào tử và bào tử phân sinh nấm *Trichoderma* spp.

Hình 1. Đặc điểm hình thái và bào tử nấm *Trichoderma* spp.

Bảng 2. Hoạt lực đối kháng của *Trichoderma* spp. phân lập được với nấm *Colletotrichum asianum* gây bệnh thán thư

Chủng nấm <i>Trichoderma</i> spp.	Hoạt lực đối kháng với nấm gây bệnh thán thư (%)	
	<i>Colletotrichum asianum</i> TT.03	<i>Colletotrichum asianum</i> TT.02
T1	79,42 ± 2,5	77,76 ± 3,8
T2	82,35 ± 1,6	73,53 ± 4,5
T3	55,32 ± 3,4	51,69 ± 6,9
T4	72,35 ± 1,7	79,95 ± 0,2
Tr.X1	80,41 ± 5,6	78,72 ± 1,3
Tr.X2	85,34 ± 3,8	86,25 ± 1,7
Tr.X3	82,31 ± 2,1	82,95 ± 6,7
Tr.X4	81,35 ± 0,2	83,55 ± 2,8
M1	69,94 ± 6,4	71,82 ± 3,5
M2	74,35 ± 8,1	77,95 ± 3,5
M3	68,21 ± 1,5	68,24 ± 2,1
M4	75,45 ± 2,1	71,76 ± 7,9
N1	66,47 ± 3,9	67,35 ± 5,2
N2	69,11 ± 0,1	62,32 ± 2,7

Ngoài ra, khi quan sát đặc điểm phát triển của nấm trên môi trường PDA, mẫu Tr.X2 và mẫu Tr.X3 có đặc điểm phát triển và cành bào tử phân sinh của 02 mẫu nấm này khác so với các mẫu nấm còn lại. Tảo nấm phát triển mịn

và thưa hơn so với 06 mẫu còn lại (Hình 1C). Thể bình hình thành trên cành bào tử phân sinh và thường đối xứng nhau (Hình 1D). Trong khi các mẫu còn lại như M4, T2, Tr.X1, Tr.X4 thể bình cũng hình thành trên cành bào tử phân sinh

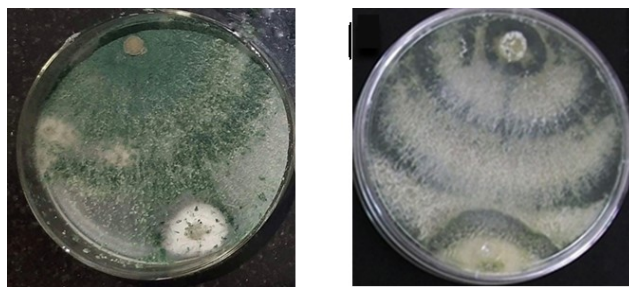
nhưng mọc thành chùm 2-3 cái (Hình 1B). Dựa vào các đặc điểm hình thái ban đầu này (theo như mô tả của Chaverri & cs., 2003), có thể khẳng định 14 mẫu này đều thuộc chi *Trichoderma*. Tuy nhiên, vẫn thấy có sự khác nhau về tản nấm, hình thái bào tử, thể bình. Để xác định chính xác tên loài, tiếp theo cần phải sử dụng kỹ thuật giải trình tự dựa trên vùng gen ITS của chúng.

3.2. Đánh giá hoạt lực đối kháng giữa nấm *Trichoderma* spp. và nấm gây bệnh thán thư *Colletotrichum asianum*

Sau khi phân lập và làm thuần các chủng nấm *Trichoderma* spp. tiến hành thử hoạt tính đối kháng với nấm gây bệnh thán thư *Colletotrichum asianum*. Kết quả cho thấy 14 chủng nấm *Trichoderma* spp. đều cho hiệu lực đối kháng với nấm gây bệnh thán thư ở mức trung bình đến rất cao (51,69-86,24%). Các chủng nấm Tr.X1, Tr.X2, Tr.X3, Tr.X4, T1, M2 có hoạt lực đối kháng ở mức rất cao từ 77,76% - 86,25%, trong đó 3 chủng Tr.X2, Tr.X3, Tr.X4 có hoạt lực cao nhất với cả 2 chủng nấm gây bệnh thán thư trên cây xoài (Bảng 2). Hoạt lực đối kháng của 4 chủng nấm *Trichoderma* spp. trong nghiên cứu này cũng tương tự như báo cáo của Santos-Villalobos & cs. (2013) khi đánh giá hoạt lực của chủng nấm *T. asperellum* T8a với nấm gây bệnh thán thư *Colletotrichum gloeosporioides* trong điều kiện cùng nuôi cấy là 80% và nghiên cứu của Trần Ngọc Hùng & cs. (2016) là 79,6-89,8% khi đánh giá hoạt lực của nấm đối kháng *T. koningii* với nấm gây bệnh *Colletotrichum acutatum*. Các chủng N1, N2, M3 và T3, tuy có hoạt lực thấp hơn, nhưng cũng đạt ở mức trung bình với tỉ lệ từ 51,69- 68,24%.

Theo nghiên cứu của Landero & cs. (2015), cho thấy hoạt lực ức chế nấm gây bệnh thán thư *Colletotrichum gloeosporioides* của 2 chủng nấm đối kháng *Trichoderma longibranchiatum* và *Trichoderma harzianum* tương ứng là 55,82% và 53,26%. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả hoạt lực của các chủng N1, N2, M3 và T3 trong nghiên cứu này với tỉ lệ đối kháng với nấm gây bệnh thán thư từ 51,69-68,24%

Khi đồng nuôi cấy nấm đối kháng *Trichoderma* với nấm gây bệnh thán thư *Colletotrichum* trên môi trường thạch đĩa cho thấy nấm gây bệnh gần như không phát triển được và bị nấm đối kháng *Trichoderma* mọc trùm hoặc bao phủ lên nấm gây bệnh. Tuy nhiên, độ bao phủ của *Trichoderma* lên nấm gây bệnh *Colletotrichum* khác nhau đối với từng chủng nấm đối kháng. Điều này có thể do mỗi chủng *Trichoderma* spp. tiết ra các hợp chất như kháng sinh, chất bay hơi... khác nhau vào môi trường nuôi cấy làm cho nấm gây bệnh không phát triển bình thường được (Hình 2). Ngoài ra, *Trichoderma* có thể tiết enzyme (cellulases, chitinases) phá hủy vách tế bào sợi nấm *Colletotrichum* hoặc cũng có thể ký sinh trực tiếp và giết chết sợi nấm *Colletotrichum*. Nấm *Trichoderma* khi ký sinh nấm gây bệnh sẽ tiết ra hệ enzyme phân hủy chitin của vách tế bào nấm gây bệnh bao gồm 6 enzyme: 2 enzyme β -1,4-N-acetylglucosaminidase và 4 enzyme endochitinase (Jollès & Muzzarelli, 1999). Reynaldo & cs. (2018) đã nghiên cứu và tách chiết được 20,1 U/g chitinases từ chủng *Trichoderma asperellum* (T2-31) và 2,5 U/g exoglucanase từ *Trichoderma harzianum*. Các enzyme có hoạt lực đối kháng với nấm gây bệnh thán thư *Colletotrichum* spp. từ 85-98%.



Hình 2. Khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma* spp. với nấm gây bệnh thán thư *Colletotrichum asianum*

Để đánh giá kỹ hơn về hiệu quả đối kháng của nấm *Trichoderma* spp. với nấm gây bệnh thán thư *Colletotrichum asianum*, đã chọn 01 chủng nấm *Trichoderma* spp. có hoạt tính cao nhất để thử nghiệm với 3 công thức (CT): CT1: Nấm đối kháng (Tr.X2) và nấm gây bệnh (TT.03; TT.02) được cấy cùng nhau ở 2 điểm sát thành đĩa và đối xứng; CT2: Nấm đối kháng (Tr.X2) được cấy trước nấm gây bệnh (TT.03; TT.02) 24 giờ; CT3: Nấm đối kháng (Tr.X2) được cấy sau nấm gây bệnh (TT.03; TT.02) 24 giờ; Đối chứng nấm đối kháng *Trichoderma* (Tr.X2) và nấm gây bệnh (TT.03; TT.02) được cấy riêng rẽ.

Toàn bộ thí nghiệm được tiến hành trên đĩa Petri đường kính 8,5cm chứa môi trường PDA và giữ ở nhiệt độ 28°C trong 5-7 ngày. Sự phát triển của nấm gây bệnh được xác định bằng cách đo đường kính tản nấm hàng ngày ở cả công thức thí nghiệm và đối chứng. Hiệu lực ức chế được tính theo công thức như mô tả ở mục 2.2.2. Kết quả bảng 3 cho thấy nấm *Trichoderma* spp. Tr.X2 cấy trước nấm *Colletotrichum asianum* 24 giờ có hiệu quả đối kháng cao nhất 98,8% đối với chủng nấm gây

bệnh *Colletotrichum asianum* TT.03 và 98,2% với chủng nấm gây bệnh TT.02 sau 7 ngày nuôi cấy. Nấm *Trichoderma* vẫn phát triển bình thường không có bất kỳ thay đổi nào về hình thái và lẫn át sang cả nấm *Colletotrichum* (Hình 3). Ở công thức nấm *Trichoderma* cấy sau nấm bệnh *Colletotrichum* 24 giờ, tuy hiệu quả đối kháng có kém hơn công thức nấm *Trichoderma* cấy trước nhưng hoạt tính đối kháng vẫn ở mức cao từ 74,7-76,5% sau 7 ngày nuôi cấy.

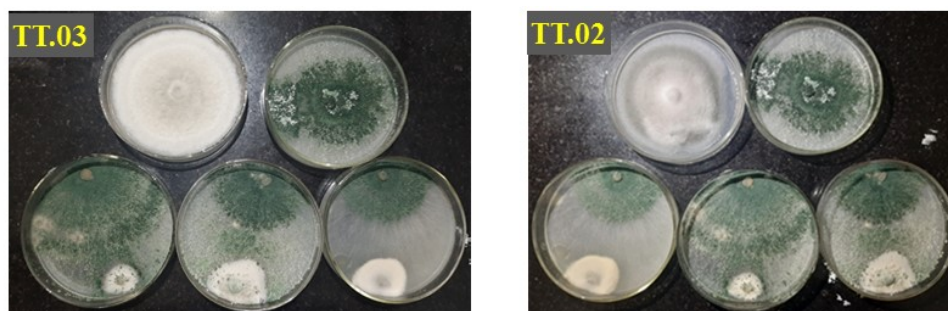
Các chủng nấm *Trichoderma* spp. có hoạt tính đối kháng cao sẽ được tuyển chọn để sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng trong kiểm soát bệnh thán thư ngoài đồng ruộng. Kết quả của nghiên cứu này sẽ là tiền đề cho việc ứng dụng trong thực tế sản xuất. Khi xử lý chế phẩm có chủng nấm *Trichoderma* spp. ngoài đồng ruộng thì nên xử lý hoặc bón vào đất trước khi gieo hạt/trồng cây 2-3 ngày hoặc phun lên tán lá khi chưa hoặc vừa có dấu hiệu bệnh. Nấm *Trichoderma* sẽ phát triển và ngăn chặn nấm gây bệnh khi hạt được gieo, cây được trồng vào đất hoặc lá vừa chớm bệnh sẽ cho hiệu quả phòng trừ bệnh cao hơn.

Bảng 3. Hoạt lực đối kháng của nấm *Trichoderma* spp. với nấm gây bệnh *Colletotrichum asianum*

Nấm bệnh	Ngày theo dõi	Đường kính tản nấm (cm)										
		ĐC		CT1		CT2			CT3			
		Tr.X2	NB	Tr.X2	NB	HTĐK	Tr.X2	NB	HTĐK	Tr.X2	NB	HTĐK
TT.03	1	2,0	1,1	2,0	0,9	18,2	2	0	100	0,0	1,1	0,0
	2	5,9	1,9	5,3	1,2	36,8	5,8	0,5	72,2	1,0	1,6	15,8
	3	8,0	3,8	7,9	1,4	63,2	7,9	0,4	90,3	5,7	2,5	34,2
	4	8,5	5,5	8,5	1,5	72,7	8,5	0,3	95,5	8,1	2,3	58,2
	5	8,5	8,3	8,5	1,6	80,7	8,5	0,2	97,6	8,5	2,1	74,7
	7	8,5	8,5	8,5	1,5	82,4	8,5	0,1	98,8	8,5	2,0	76,5
	TT.02	1	2,0	1,2	2,0	0,8	33,3	2,0	0,0	100,0	0,0	1,2
2		5,9	1,8	3,2	1,1	38,9	5,8	0,6	68,4	1,0	1,5	16,7
3		8,0	3,6	5,5	1,6	55,6	7,8	0,5	86,8	5,8	2,4	33,3
4		8,5	5,6	5,5	1,7	69,6	8,5	0,3	94,5	8,2	2,5	55,4
5		8,5	8,2	6,1	1,5	81,7	8,5	0,2	97,6	8,5	2,2	73,2
7		8,5	8,5	6,4	1,4	83,5	8,5	0,2	98,2	8,5	2,2	74,7

Chú thích: ĐC: công thức đối chứng; CT: công thức thí nghiệm; NB: nấm bệnh; HTĐK: hoạt tính đối kháng.

Tuyển chọn nấm *Trichoderma* spp. có khả năng đối kháng với tác nhân gây bệnh thán thư trên cây xoài



Chú thích: Từ trên xuống dưới, từ trái qua phải: A đối chứng nấm *Colletotrichum* (TT.03 và TT.02), đối chứng nấm *Trichoderma* (Tr.X2), nấm *Trichoderma* cấy trước nấm *Colletotrichum* 24 giờ, nấm *Trichoderma* cấy cùng nấm *Colletotrichum*, nấm *Trichoderma* cấy sau nấm *Colletotrichum* 24 giờ.

Hình 3. Hoạt tính đối kháng của nấm *Trichoderma* Tr.X2 với nấm gây bệnh thán thư *Colletotrichum asianum* TT.03 và TT.02 ở các thời gian nuôi cấy khác nhau

3.3. Đánh giá hiệu quả đối kháng giữa nấm *Trichoderma* spp. và nấm gây bệnh thán thư *Colletotrichum asianum* trên cây xoài trong điều kiện nhà lưới

Nấm *Trichoderma* spp. có nhiều trong đất tự nhiên, trong đó nhiều loài như *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, *T. aperellum*... có khả năng đối kháng lại các tác nhân gây bệnh hại cây trồng như nấm *Colletotrichum* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Pythium* sp., *Phytophthora nicotiana*.

Để có thể sử dụng các chủng nấm có hoạt tính đối kháng cao với nấm gây bệnh như một biện pháp phòng trừ sinh học thì chúng phải thể hiện hiệu lực đối kháng và hiệu quả phòng bệnh cao trên cây trồng. Theo một số nghiên cứu cho thấy, một số chủng nấm *Trichoderma* spp. đối kháng với nấm gây bệnh *Colletotrichum* spp. trên đĩa thạch rất tốt, nhưng lại không thể hiện được hoạt lực đối kháng hoặc thể hiện rất yếu trên cây chủ. Vì vậy, các chủng đối kháng này cần được kiểm tra trên các loại cây trồng khác nhau và trong một số điều kiện khác nhau để chọn ra chủng tốt nhất nhằm sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng trong thực tế sản xuất.

Các bước thực hiện thí nghiệm đánh giá hoạt lực đối kháng với nấm *Colletotrichum*

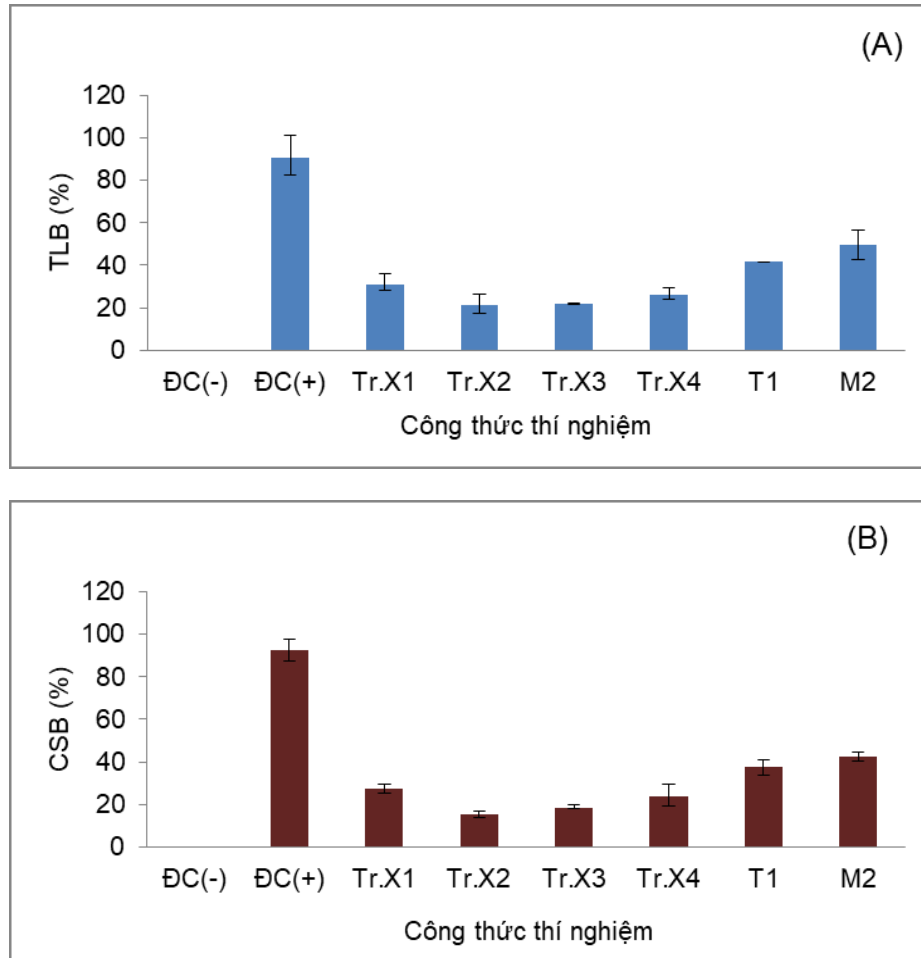
asianum gây bệnh thán thư trên cây xoài được thực hiện như mục 2.2.3 và lặp lại 3 lần. Kết quả thu được ở hình 4.

Kết quả cho thấy ở tất cả các công thức thí nghiệm chủng *Trichoderma* spp. đều có khả năng kháng bệnh vượt trội cho với công thức đối chứng. Trong 06 công thức chủng đối kháng thì công thức có xử lý chủng *Trichoderma* Tr.X2 có khả năng hạn chế bệnh tốt nhất với chỉ số bệnh là 15,32%, trong khi lô đối chứng lên tới 90,62%, chủng *Trichoderma* Tr.X3 cũng có hoạt lực đối kháng gần tương tự như chủng mạnh nhất. Cụ thể chủng *Trichoderma* Tr.X3 có khả năng hạn chế bệnh tương ứng với chỉ số bệnh là 18,61%. Công thức chủng có xử lý *Trichoderma* M2, tuy có hoạt tính đối kháng thấp nhất trong 6 chủng nhưng vẫn có khả năng hạn chế bệnh ở ngưỡng đối kháng trên trung bình với chỉ số bệnh là 49,52%. Điều này có thể được giải thích là do khi bổ sung các chủng *Trichoderma* spp. đối kháng vào các công thức thí nghiệm, các chủng đối kháng này đã sinh ra chất kháng sinh hoặc nấm *Trichoderma* spp. đã ký sinh vào nấm *Colletotrichum asianum* làm cho sợi và bào tử nấm gây bệnh biến dạng và chết (Chaverri & cs., 2015).

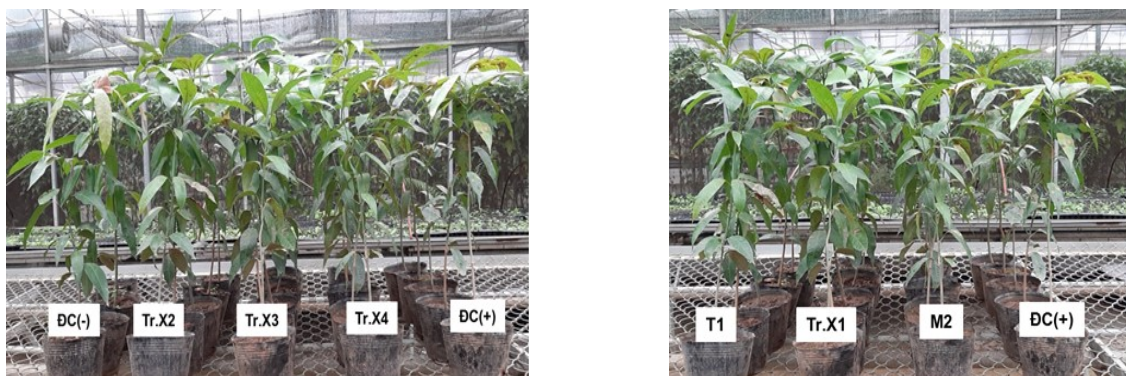
Bên cạnh đó, kết quả trên hình 4B, khi xử lý các chủng *Trichoderma* spp. đối kháng ở tất cả các công thức thí nghiệm đều có khả năng hạn chế bệnh trên 50% chỉ số bệnh. Công thức có xử

lý chủng Tr.X2 cũng có chỉ số bệnh thấp nhất (21,08%), điều này có nghĩa chủng Tr.X2 có hoạt tính kháng bệnh thân thư trên cây xoài trong điều kiện nhà lưới tốt nhất. Vì vậy, chủng

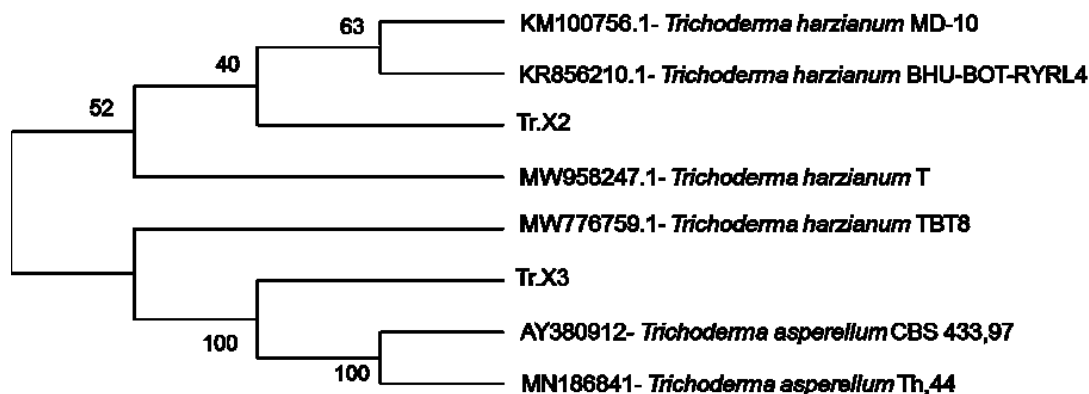
Trichoderma Tr.X2 sẽ được nghiên cứu kỹ hơn về các đặc tính sinh học để sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng trong kiểm soát bệnh thối thư trên cây xoài.



Hình 4. Tỷ lệ lá bị nhiễm bệnh (A) và chỉ số bệnh (B) trên cây xoài sau khi xử lý các chủng *Trichoderma* spp. đối kháng



Hình 5. Hoạt tính đối kháng của các chủng *Trichoderma* spp. với nấm *Colletotrichum asianum* TT.03 gây bệnh thân thư trên xoài trong điều kiện nhà lưới



Hình 6. Cây phân loại dựa trên trình tự vùng ITS của các mẫu nấm

3.4. Định danh nấm đối kháng *Trichoderma* spp. tiềm năng

Sau khi phân lập và thử hoạt tính đối kháng của các chủng nấm *Trichoderma* spp. với nấm *Colletotrichum asianum* gây bệnh thán thư trên cây xoài trong điều kiện *in vitro* và nhà lưới, đã tuyển chọn được 2 chủng *Trichoderma* spp. tiềm năng (có hoạt tính đối kháng cao nhất). Để hiểu rõ hơn các đặc tính của các chủng này, đã tiến hành định danh để xác định chính xác tên loài dựa vào giải trình tự vùng ITS. Kết quả cho thấy 2 mẫu nấm đều có chất lượng trình tự tốt, rõ nét và trình tự đọc được khoảng 520-560 nucleotides.

Khi so sánh các trình tự này với các chuỗi tương đồng trên ngân hàng gen (Genbank) bằng cách sử dụng phần mềm BLAST của NCBI. Kết quả cho thấy mẫu nấm Tr.X2 thuộc loài *Trichoderma harzianum* và Tr.X3 thuộc loài *Trichoderma asperellum* với độ tương đồng từ 99-100%.

4. KẾT LUẬN

Đã phân lập và tuyển chọn được 14 chủng nấm *Trichoderma* spp. phân bố chủ yếu ở Đồng bằng sông Cửu Long, có khả năng đối kháng cao với nấm gây bệnh thán thư, trong đó có 6 chủng Tr.X1, Tr.X2, Tr.X3, Tr.X4, T1, M2 có hoạt tính cao nhất từ 77,76-86,25% trong điều kiện *in vitro* và 41,1-75,3% trong điều kiện nhà lưới. Khi nuôi cấy nấm *Trichoderma* spp. trước nấm bệnh *Colletotrichum asianum* 24 giờ cho hiệu quả đối

kháng cao hơn so với cấy cùng và cấy sau. Nấm *Trichoderma* Tr.X2 và Tr.X3 có khả năng ức chế tốt nấm gây bệnh thán thư *Colletotrichum asianum* trên cây xoài (hiệu quả đối kháng với nấm gây bệnh là 75,3% và 72,01%). Hai chủng nấm đối kháng tiềm năng *Trichoderma* Tr.X2 thuộc loài *Trichoderma harzianum* và Tr.X3 thuộc loài *Trichoderma asperellum*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Admasu W., Tadesse K., Yemenu F. & Abdulkadir B. (2014). Markov chain analysis of dry, wet weeks and statistical analysis of weekly rainfall for agricultural planning at Dhera, Central Rift Valley Region of Ethiopia. Academic Journals. 9(29): 2205-2213.
- Asad S.A., Ali N., Hameed A., Khan S.A., Ahmad R., Bilal M., Shahzad M. & Tabassum A. (2014). Biocontrol efficacy of different isolates of *Trichoderma* against soil borne pathogen *Rhizoctonia solani*. Pol. J. Microbiol., 63(1): 95-1.
- Arauz L.F. (2000). Mango Anthracnose: Economic Impact and Current Options for Integrated Management. American Journal of Plant Sciences, United States.
- Bruce A., Austin W.J. & King B. (1984). Control of growth of *Lentinus lepideus* by volatiles from *Trichoderma*. Transactions of the British Mycological Society 82: 423-428.
- Chaverri P. & Samuels G.J. (2003). Hypocrea/Trichoderma (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. Studies in Mycology. 48: 1-116.
- Chaverri P., Jaklitsch M.W., Rocha B.F. & Gazis R. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the reidentification of

- commercial biocontrol strains. *Mycologia*. 107(3): 558-590.
- Cruz-Quiroz L.R., Roussos S., Rodríguez-Herrera.R., Hernandez-Castillo D. & Cristóbal N.A. (2018). Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains. *Karbala International Journal of Modern Science*. 4(2): 237-243.
- Cục trồng trọt (2019). Thống kê của Cục Trồng trọt năm 2019. Cục trồng trọt - Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Hà Nội.
- Dennis C. & Webster J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*. 57: 25-39.
- Kamle M., Kumar P., Gupta V.K., Tiwari A.K., Misra A.K. & Pandey B.K. (2013). Identification and phylogenetic correlation among *Colletotrichum gloeosporioides* pathogen of anthracnose for mango. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2(3): 285-287.
- Kumar K., Amareesan N., Bhagat S., Madhuri K. & Srivastava R.C. (2012). Isolation and for Characterization of *Trichoderma* spp. for Antagonistic Activity Against Root Rot and Foliar Pathogens. *Indian J. Microbiol.* 52(2): 137-144.
- Kumari P.R. & Singh R. (2017). Anthracnose of mango incited by *Colletotrichum gloeosporioides*: A comprehensive review. *Int. J. Pure App. Biosci.* 5(1): 48-56.
- Landero Valenzuela. N., Angel D.N., Ortiz. D.T., Alatorre Rosas R., Ortiz García C. & Santos. M.O (2015). Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. *Biological Control*. 91: 88-93.
- Lê Hoàng Lê Thủy & Phạm Văn Kim (2008). Phân loài nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên xoài và sầu riêng tại Đồng bằng sông Cửu Long và thử hiệu lực của sáu loại thuốc đối với các loài nấm này. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*. 10.
- Lopes F.A., Steindorff A.S., Geraldine A.M., Brandão R.S., Monteiro V.N., Lobo M. Jr., Coelho A.S., Ulhoa C.J. & Silva R.N. (2012). Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biol.* 116(7): 15-24.
- Noronha E.F. & Ulhoa C.J. (1996). Purification and characteriz-ation of an endo-b-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*.. *Can. J. Microbiol*, 42, 1039-1044.
- Rifai M.A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*. 116: 1-56.
- Reynaldo De la Cruz-Quiroz, Roussos S., Rodríguez-Herrera R., Hernanades-Castilo D. & Aguilar CN. (2018). Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strain. *Karbala Int J Mod Sci*. 4: 237-243.
- Santos-Villalobos S., Guzmán-Ortiz D.A., Gomez-Lim M.A., Délano-Frier J.P., de Folter S., SánchezGarcía P. & Peña-Cabriales J.J. (2013). Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). *Biol. Control*. 64: 37-44.
- Trần Ngọc Hùng & Nguyễn Thị Liên Thương (2016). Nghiên cứu tạo chế phẩm *Trichoderma* sp. kiểm soát bệnh thán thư do *Colletotrichum* spp. gây ra trên cây ớt (*Capsicum frutescens*). *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*. 45: 86-92.
- Wu Q., Sun R., Ni M., Yu J., Li Y., Yu C., Dou K., Ren J. & Chen J. (2017). Identification of a novel fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy. *PLoS One*. 12(6): e0179957.