

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Viện BVTV 1997. Phương pháp nghiên cứu BVTV. Nxb Nông nghiệp Hà Nội.
2. QCVN 01- 38:2010/BNNPTNT về phương pháp điều tra sinh vật hại cây trồng.
3. PGS.TS. Trần Văn Hai, Ths. Trần Thị Ba, Khoa Nông Nghiệp & Sinh học ứng dụng, Trường ĐHCT. "Cây dưa hấu". <http://www.ctu.edu.vn/colleges/agri/gtrinh/bvtv/rau%20sach/ source/kyThuat/ duaHau.htm>
4. University of Florida. "Bactrocera

cucurbitae(Coquillett) Potentially serious fruit fly threat to the southern US and Mexico". <http://www.pestalert.org/viewArchPestAlert.cfm?rid=56>

5. Ronald F.L. Mau và Jayma L. Matin Kessing, Department of Entomology Honolulu, Hawaii. "Bactrocera cucurbitae(Coquillett)" http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/bactro_c.htm

Ngày nhận bài: 1.3.2012

Phản biện: TS. Đinh Văn Đức

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG NẤM ĐỐI KHÁNG *TRICHODERMA ASPERELLUM* TRONG PHÒNG TRỪ NẤM *PHYTOPHTHORA* SPP. GÂY BỆNH TRÊN CÂY CAO SU

Study on *Trichoderma* Antagonistic Fungi Control *Phytophthora* spp. Caused Diseases on Rubber

Phạm Ngọc Dung, Hà Việt Cường, Lê Đình Thao, Hà Giang, Trần Thị Như Hoa, Nguyễn Hồng Tuyên, Nguyễn Thúy Hạnh

Viện Bảo vệ thực vật

Abstract

Various regions in Viet Nam also provide an ideal climate for *Phytophthora* species to flourish, and the genus *Phytophthora* is responsible for extensive economic damage in a wide range of different crops, including rubber. Biological control involves the use of the beneficial organisms, their genes, and/or products, such as metabolites, that reduce the negative effects of plant pathogens and promote positive responses by the plant. Antagonist belong to the genus *Trichoderma* are among the most commonly isolate soil fungi. Due to their ability to protect plants and contain pathogen populations under different soil condition, these fungi have been widely studies and commercially marketed as biopesticides, bio-fertilizers and soil amendments *Trichoderma* spp. also produce numerous biologically active compounds, including cell wall degrading enzyme, and secondary metabolites. We focus our attention on the biological, ecological aspects of *Trichoderma asperellum* in this topic.

Keywords: identify, biological, ecological of *Trichoderma asperellum*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sản lượng của nhiều loại cây trồng đã bị giảm đáng kể do hàng loạt bệnh *Phytophthora* gây hại ở hầu hết các vùng nhiệt đới ẩm. Ở Việt Nam, nấm *Phytophthora* gây hại rất nhiều loại cây trồng có giá trị kinh tế cao như: sầu riêng, ca cao, cao su, hồ tiêu, dưa... Trên cây cao su các bệnh do

nấm *Phytophthora* spp. gây hại như: loét sọc miệng cạo, bệnh rụng lá mùa mưa, bệnh xì mủ làm giảm đáng kể năng suất và sản lượng mủ cao su. Đặc biệt là các vườn cao su tiểu điền, nơi mà người trồng có các kỹ thuật về canh tác, khai thác và phòng trừ sâu bệnh còn yếu kém, có những vườn tỷ lệ cây không cho mủ chiếm 35 - 40%.

Cho đến nay, biện pháp chủ yếu trong phòng trừ bệnh hại cây trồng vẫn là sử dụng thuốc hóa học. Việc sử dụng quá nhiều thuốc hóa học đã gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến biến đổi khí hậu, đến sức khỏe con người. Các chế phẩm sinh học có khả năng hạn chế được bệnh hại, không gây hại đến môi trường sống ngày càng được khuyến khích sử dụng. Tuyển chọn các vi sinh vật đối kháng có các đặc tính sinh học tốt, có khả năng đối kháng cao với tác nhân gây bệnh, để làm nguyên liệu sản xuất các chế phẩm sinh học là vô cùng cần thiết.

Hiện nay, nhiều loài nấm *Trichoderma* đã được rất nhiều nhà khoa học trong và ngoài nước tiến hành nghiên cứu để phòng trừ nhiều loại bệnh gây hại cây trồng. Tuy nhiên, việc phân lập và tuyển chọn các nguồn nấm *Trichoderma* ở các vùng sinh thái và cây trồng cụ thể cũng góp phần cho nấm đối kháng này dễ thích ứng, sinh trưởng và phát triển tốt, khả năng nhân mật độ trong đất lớn, nâng cao hiệu quả phòng trừ bệnh.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Một số vật liệu để nấu môi trường: cà rốt (20g), khoai tây (20g), agar (15g), các hoá chất: Pimaricin (10µg/ml), Rifampicin (50µg/ml), Hymexazol (50µg/ml)...

- Các loại hóa chất chạy PCR: DH₂O, 10X PCR buffer, MgCl₂ (50mM), dNTP mix (25mM), primer ITS4 (10mM), primer ITS5 (10mM), Taq DNA polymerase, DNA ; primer ITS4/ITS5...

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp thu thập và phân lập nấm *Trichoderma*

Phân lập nấm *Trichoderma* theo phương pháp của Samuels (2004).

Các mẫu rễ và đất vùng rễ của cao su, ca cao và hồ tiêu thu thập trên đồng ruộng. Mẫu rễ được rửa sạch dưới vòi nước và khử trùng bề mặt bằng cồn 95° trong 30 giây sau đó rửa bằng cồn 75° trong 2 phút, cuối cùng rửa sạch lại 3 lần bằng nước cất khử trùng và cấy vào môi trường WA và PDA. Mẫu đất được pha loãng và cấy trên môi trường TME và PDA. Các mẫu cấy được ủ ở 28 °C sau đó được tách thuần trên môi trường PDA.

Địa điểm thu thập mẫu: mẫu đất thu thập

quanh vùng rễ của các cây lâu năm: cao su, cà phê, hồ tiêu, ca cao thu thập từ các vùng trồng khác nhau của 3 tỉnh Bình Phước, Đắk Lắk và Quảng Trị,

2.2. Khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma asperellum* đối với nấm *Phytophthora* gây bệnh trên cao su

Khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma asperellum* với nấm *Phytophthora* sp. được đánh giá theo phương pháp của Viện Bảo vệ thực vật.

Môi trường thí nghiệm: PDA

- Phương pháp tiến hành: cấy đối xứng hai bên

2.3. Nghiên cứu một số đặc điểm hình thái, sinh học và sinh thái của nấm *Trichoderma asperellum*

- Môi trường nuôi cấy nấm PDA, đặt điều kiện nhiệt độ: 28°C

Mỗi công thức thí nghiệm nhắc lại 3 lần, mỗi lần 3 hộp petri.

Chỉ tiêu theo dõi: theo dõi tốc độ phát triển của nấm ở các ngày thứ 1, 2, 3 sau khi cấy bằng cách đo đường kính tản nấm.

2.4. Phương pháp định tính hoạt độ enzym chitinase, β-glucanase và cellulase của nấm *Trichoderma*

Hoạt độ các enzym chitinase, β-glucanase và cellulase của nấm *Trichoderma* được định tính bằng phương pháp đo đường kính vòng phân giải trên môi trường cảm ứng tổng hợp của từng loại enzym (Đánh giá theo phương pháp trong tuyển tập vi sinh vật học của Nguyễn Đức Lượng, 2004).

2.5. Định danh nấm đối kháng cao với loài nấm *Phytophthora* gây mất mùa cao su bằng ứng dụng công nghệ sinh học phân tử

Tăng sinh khối nấm, thu nhận sinh khối và nghiền

Tách chiết ADN của nấm *Trichoderma*

Thực hiện quy trình ly trích theo Lee và Taylor (1990) có cải tiến.

- Thực hiện phản ứng PCR khuếch đại vùng ITS-Ribosome ADN các mẫu nấm *Trichoderma*

- Sử dụng effendorf 0,2 ml trộn phản ứng theo thứ tự và thể tích như sau:

Các hoá chất được sử dụng: DH₂O, 10X PCR buffer, MgCl₂ (50mM), dNTP mix (25mM), primer ITS4 (10mM), primer ITS5 (10mM), Taq DNA polymerase, DNA ; Tổng thể tích : 25 µl.

- Điện di, quan sát và phân tích kết quả.

Đọc trình tự vùng ITS-Ribosome ADN với cặp primer ITS4/ITS5.

Kết quả giải trình tự sẽ được xử lý bằng phần mềm ClustalX, Phylip 3.64, Chromas và TreeView. Kết quả xử lý sẽ được so sánh với dữ liệu của NCBI.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thu thập và phân lập nấm đối kháng *Trichoderma* sp.

Trong tổng số 80 mẫu đất thu thập quanh vùng rễ của các cây lâu năm: cao su, cà phê, hồ tiêu, ca cao thu thập từ các vùng trồng khác nhau của 3 tỉnh Bình Phước, Đắk Lắk và Quảng Trị, đã phân lập được 18 nguồn *Trichoderma* sp., trong đó có 8 nguồn có triển vọng (Bảng 1), các nguồn này có sợi nấm phát triển rất tốt trên môi trường PDA, màu sắc sợi nấm khác nhau: từ xanh đậm, xanh nhạt đến màu xanh lá mạ...

Bảng 1. Nguồn *Trichoderma* có triển vọng đã thu thập được (tại Bình Phước, Đắk Lắk và Quảng Trị)

Stt	Ký hiệu mẫu	Ký hiệu nguồn	Tên nguồn nấm	Xuất xứ nguồn nấm
1	DKĐLCS 2	TrBC-CS 2	<i>Trichoderma</i> sp.	Đất trồng cao su (CưMgar - Đắk Lắk)
2	DKĐLCC 23	TrBC-CC 23	<i>Trichoderma</i> sp.	Đất trồng ca cao(Viện KHKTNLNTây Nguyên)
3	DKĐLCP 29	TrBC-CP 29	<i>Trichoderma</i> sp.	Đất trồng Cà phê (EaHleo - Đắk Lak)
4	DKĐLCS 8	TrBC-CS 8	<i>Trichoderma</i> sp.	Đất trồng cao su (Krongbuk - Đắk Lắk)
5	DKQTHT 19	TrBC-HT 19	<i>Trichoderma</i> sp.	Đất trồng hồ tiêu (Vinh Linh - Quảng Trị)
6	DKQTCS 8	TrBC-CS 6	<i>Trichoderma</i> sp.	Đất trồng cao su (Cam Lộ - Quảng Trị)
7	DKBPCS 11	TrBC-CS11	<i>Trichoderma</i> sp.	Đất trồng cao su (Bù gia mật - Bình Phước)
8	DKBPHT 20	TrBC-HT 8	<i>Trichoderma</i> sp.	Đất trồng hồ tiêu (Phước Long - Bình Phước)

2. Khả năng đối kháng của 8 nguồn nấm *Trichoderma* sp. đối với nấm *Phytophthora* gây bệnh trên cao su

2.1. Khả năng ký sinh của nấm *Trichoderma*

Cơ chế ký sinh: Theo R.Weindling mô tả từ năm 1932 (Adams, 1990; Snyder *et al.*, 1976), tác giả gọi đó là hiện tượng "giao thoa sợi nấm" Trước tiên sợi nấm *Trichoderma* vây xung quanh sợi nấm *Phytophthora*, sau đó các sợi nấm *Trichoderma* thắt chặt lấy các sợi nấm, cuối cùng mới thấy nấm *Trichoderma* xuyên qua sợi nấm *Phytophthora* làm thủng màng ngoài của chúng, gây nên sự phân huỷ các chất nguyên sinh trong sợi nấm bệnh.

Những nghiên cứu chi tiết gần đây bằng kính hiển vi điện tử về vùng "giao thoa sợi nấm" cho thấy cơ chế chính của hiện tượng ký sinh ở nấm *Trichoderma* trên nấm gây bệnh là sự xoắn của sợi nấm *Trichoderma* quanh sợi nấm vật chủ, sau đó xảy ra hiện tượng thủy phân thành sợi

nấm vật chủ, nhờ đó mà nấm *Trichoderma* xâm nhập vào bên trong sợi nấm vật chủ. Điều này dẫn đến hiện tượng chất nguyên sinh ở sợi nấm vật chủ bị phá rối từng phần hoặc hoàn toàn. Cuối cùng, nguyên sinh chất bị mất đi và sợi nấm vật chủ bị phá vỡ, giải phóng các sợi nấm đang sinh sản của nấm *Trichoderma*. Hiện tượng tan rã Kitin có ở vùng xung quanh nơi xâm nhập của nấm *Trichoderma* (Dubey, 1995; Inbar *et al.*, 1996; Mikala-Doukaga *et al.*, 1979; Rousseau *et al.*, 1996).

Một điều quan trọng cho sự ký sinh của nấm *Trichoderma* trên nấm gây bệnh cây là các conidi của nấm *Trichoderma* sau khi nảy mầm tạo thành sợi nấm phải tiếp xúc được với nấm vật chủ và phải hình thành được thể giác bám. Thể giác bám này sẽ bám chắc và xâm nhập vào trong thành tế bào của nấm vật chủ. Tỷ lệ ký sinh sẽ tăng lên khi tăng sự tiếp xúc trực tiếp của nấm *Trichoderma* với nấm vật chủ (Inbar *et al.*, 1996; Pereverzeva *et al.*, 1995).

Nghiên cứu khả năng ký sinh của 8 dòng *Trichoderma* (bảng 2) đã phân lập được đối với nấm *Phytophthora* gây mất mù cao su. Qua theo dõi quá trình phát triển cho thấy sau 2 ngày cấy truyền cả 2 loại nấm *Trichoderma* và *Phytophthora* đều phát triển và lan nhanh trên môi trường, giữa vùng nấm gây bệnh và nấm *Trichoderma* hình thành một đường ranh giới rõ, gọi là viền đối kháng. Từ ngày thứ 4 sau khi cấy trở đi, nấm *Trichoderma* ký sinh sợi nấm

Phytophthora làm cho nấm này teo dần và chết hoàn toàn. Kết quả ở bảng chỉ ra sau 8 ngày vùng nấm bệnh có đường kính là 0,0 - 2,4 cm, ở công thức đối chứng (không có nấm *Trichoderma*) nấm *P. botryosa* sinh trưởng và phát triển tốt sau 8 ngày đã đạt đường kính tối đa. Hiệu quả ức chế của các dòng nấm *Trichoderma* đối với nấm *P. botryosa* và *P. citrophthora* gây bệnh trên cao su từ 72,7 - 100 %.

Bảng 2. Khả năng ký sinh của các dòng nấm đối kháng *Trichoderma* sp. đối với nấm *P. botryosa* và *P. citrophthora* gây mất mù cao su

Nguồn <i>Trichoderma</i>	<i>P. botryosa</i>			<i>P. citrophthora</i>		
	Đường kính tán nấm (cm) sau cấy 8 ngày		Hiệu quả ức chế (%)	Đường kính tán nấm (cm) sau cấy 8 ngày		Hiệu quả ức chế (%)
	Đối kháng	Đối chứng		Đối kháng	Đối chứng	
TrBC-CS 2	0,0	8,8	100,0	0,0	8,8	100,0
TrBC-CC 23	0,6	8,8	92,7	1,7	8,8	80,7
TrBC-CP 29	2,0	8,8	77,4	2,0	8,8	77,3
TrBC-CS 8	0,8	8,8	91,4	2,4	8,8	72,7
TrBC-HT 19	0,7	8,8	91,8	1,0	8,8	88,6
TrBC-CS 6	0,5	8,8	93,9	1,8	8,8	79,5
TrBC-CS11	2,4	8,8	72,7	2,3	8,8	73,9
TrBC-HT 8	0,0	8,8	100,0	0,0	8,8	100,0

2.2. Khả năng sinh kháng sinh bay hơi của nấm *Trichoderma*

Chúng tôi sử dụng 5 dòng nấm (bảng 3) có khả năng đối kháng bằng ký sinh sợi cao nhất để thử khả năng sinh chất kháng sinh, dùng 2 hộp petri có đường kính bằng nhau chứa môi trường PDA, một hộp cấy nấm *Trichoderma*, một hộp cấy nấm *Phytophthora* spp. gây hại cao su, sau đó úp 2 hộp lên nhau, dùng parafin cuốn mép

hộp lại cho khít. Đối chứng là cặp petri chỉ cấy nấm *Phytophthora* spp.

Nguồn TrBC-CS 2 và TrBC-HT 8 có khả năng sinh chất kháng sinh ức chế được nấm *Phytophthora* cao nhất, hiệu quả đạt 92,8% 93,4% đối với nấm *P. botryosa* và hiệu quả đạt 90,4% 91,8% đối với nấm *P. citrophthora*. Các nguồn khác có khả năng ức chế nhưng với hiệu quả thấp hơn (70,3 - 85,9).

Bảng 3. Khả năng ức chế nấm *P. botryosa* và *P. citrophthora* bằng chất kháng sinh bay hơi của các dòng nấm *Trichoderma* sp. (Viện Bảo vệ thực vật, 2010)

Nguồn <i>Trichoderma</i>	<i>P. botryosa</i>			<i>P. citrophthora</i>		
	Đường kính tán nấm (cm) sau cấy 8 ngày		Hiệu quả ức chế (%)	Đường kính tán nấm (cm) sau cấy 8 ngày		Hiệu quả ức chế (%)
	Đối kháng	Đối chứng		Đối kháng	Đối chứng	
TrBC-CS 2	0,6 a	8,8	93,4	0,8 a	8,8	90,4
TrBC-HT 19	2,6 b	8,8	70,3	2,1 c	8,8	76,3
TrBC-CS 6	1,2 ab	8,8	85,9	1,6 bc	8,8	81,3
TrBC-HT 8	0,6 a	8,8	92,8	0,7 a	8,8	91,8
TrBC-CC 23	1,3 ab	8,8	84,8	1,4 b	8,8	83,7
CV(%)	1,9			1,6		

3. Định danh nấm đối kháng cao với loài nấm *Phytophthora* gây mất mùa cao su bằng ứng dụng công nghệ sinh học phân tử

3.1. Giải trình tự

Hai nguồn nấm được phân lập từ vùng đất trồng cao su và hồ tiêu của Tây Nguyên là *Trichoderma* TrBC-CS 2 và TrBC-HT 8 có khả năng đối kháng cao nhất với các loài nấm *Phytophthora* spp. gây hại cao su được định danh bằng công nghệ sinh học phân tử.

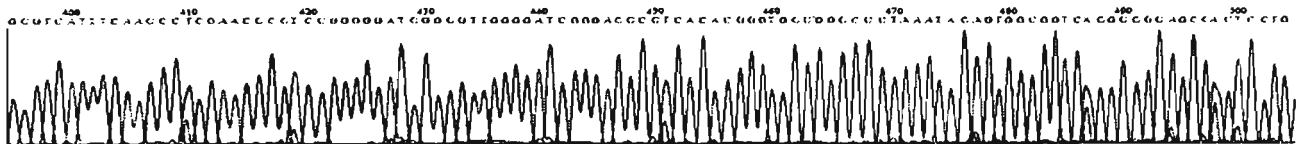
Tách chiết ADN và thực hiện phản ứng PCR khuếch đại vùng ITS-Ribosome ADN các mẫu nấm *Trichoderma*. Vùng ITS của 2 mẫu nấm này đã được nhân dòng thành công bằng PCR dùng cặp

mồi ITS4 và ITS5. Sản phẩm PCR của cả 2 mẫu đã được tinh chiết từ gel agarose dùng kit tinh chiết PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). Sau khi đã làm tinh sạch sản phẩm, chúng tôi tiến hành giải trình tự đoạn ITS của nấm.

Kết quả giải trình tự được tập hợp ở bảng 4, hình 1,2,3,4, 5, 6. Bốn sản phẩm giải trình tự thu được của 2 mẫu nấm có chất lượng tốt. Đồ thị trình tự rõ, không nhiễu. Sau khi lắp ráp 4 trình tự và loại bỏ các phần nhiễu ở 2 đầu của mỗi sản phẩm giải trình tự dùng phần mềm SeqEdit (DNASar), chúng tôi thu được trình tự đoạn ITS của 2 mẫu với kích thước 586 bp (mẫu TrBC-CS 2) và 598 bp (mẫu TrBC-HT 8)

Bảng 4. Kết quả giải trình tự vùng ITS của 2 mẫu nấm *Trichoderma*

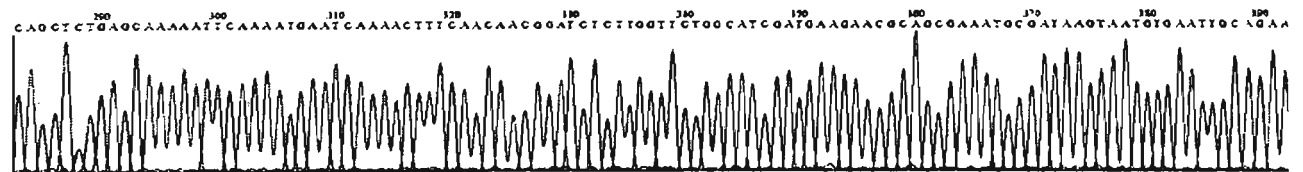
Mẫu	Mã trình tự	PCR	Mồi sequencing	Chất lượng trình tự	Đoạn đọc được (bp)
TrBC-CS 2	CH335	ITS4-ITS5	ITS4	Tốt	586
	CH336	ITS4-ITS5	ITS5	Tốt	
TrBC-HT 8	CH338	ITS4-ITS5	ITS4	Tốt	598
	CH339	ITS4-ITS5	ITS5	Tốt	



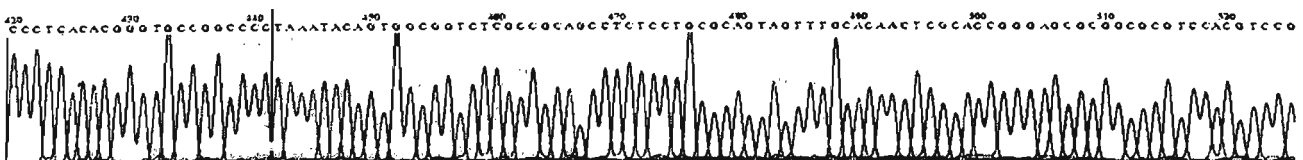
Hình 1. Minh họa một đoạn đồ thị trình tự sản phẩm giải trình tự CH335 của mẫu TrBC-CS 2



Hình 2. Minh họa một đoạn đồ thị trình tự sản phẩm giải trình tự CH336 của mẫu TrBC-CS 2



Hình 3. Minh họa một đoạn trình tự sản phẩm giải trình tự CH338 của mẫu TrBC-HT 8



Hình 4. Minh họa một đoạn đồ thị trình tự sản phẩm giải trình tự CH339 của mẫu TrBC-HT 8

```
CGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAA
CTGTTGCCTCGGCGGGGTACGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCGGAGGAA
CCAACCAAACCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAATG
AATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGC
GGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGG/
GCGCTCAGACGGGTGCCGGCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCGAGCCTCTCCGCGCAGTAGT
TGACAACCTCGCACCGGGAGCGCGGCGGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACCTTTCTGAAATGTTGAC
CTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATA
```

Hình 5. Trình tự đoạn ITS của mẫu nấm TrBC-CS 2 tổng hợp từ 2 trình tự CH335 và CH336.

Đoạn bôi đậm hàng trên là đoạn tương ứng minh họa đồ thị của sản phẩm CH336 (hình 2).

Đoạn bôi đậm hàng dưới là đoạn tương ứng minh họa đồ thị của sản phẩm CH335 (Hình 1).

```
AACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGA
ACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTACGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCC
CGCCGGAGGAACCAACCAAACCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAA
AAATTCAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGC
CAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGATCGGCGTT
GGGGATCGGGACCCCTCAGACGGGTGCCGGCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCGAGCCTCTCT/
GCGCAGTAGTTTGACAACCTCGCACCGGGAGCGCGGCGGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACCTTTCT
GAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT
```

Hình 6. Trình tự đoạn ITS của mẫu nấm TrBC-HT 8 tổng hợp từ 2 trình tự CH338 và CH339.

Đoạn bôi đậm hàng trên là đoạn tương ứng minh họa đồ thị của sản phẩm CH338 (Hình 3).

Đoạn bôi đậm hàng dưới là đoạn tương ứng minh họa đồ thị của sản phẩm CH339 (Hình 4).

4.2. Xác định trình tự tương đồng trên Ngân hàng gen (Genbank)

Dựa trên trình tự thu được của 2 mẫu, chúng tôi đã tiến hành tìm kiếm chuỗi tương ứng trên GenBank bằng phần mềm trực tuyến Blast tại NCBI.

Kết quả tìm kiếm cho thấy cả 2 mẫu TrBC-CS 2 và TrBC-HT 8 đều trùng khớp với đoạn ITS của nấm *Trichoderma asperellum* với mức đồng nhất trình tự 100% và phần trăm đoạn so sánh bằng 100% cho cả 2 mẫu.

Trichoderma asperellum là một trong vài loài *Trichoderma* có hoạt tính đối kháng mạnh với nhiều loài nấm đất gây bệnh cây như *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Sclerotinia* spp., *Sclerotium* spp., *Thielaviopsis basicola*, *Rhizoctonia* spp., *Verticillium* spp. Mức độ an toàn của chúng thuộc nhóm 1, không gây độc cho người và gia súc, không gây ô nhiễm môi trường. Nấm *T. asperellum* có cơ chế đối kháng gồm ký sinh trực tiếp, tiết

enzyme phân hủy vách tế bào nấm gây bệnh, cải thiện chất lượng đất và hình thành một số hợp chất có khả năng cảm ứng tạo tính kháng tập nhiễm hệ thống của cây. Một số chủng *T. asperellum* có hoạt tính đối kháng rất mạnh đã được công bố như chủng T-34, T-203, ICC 012. Các chế phẩm sinh học dựa trên các chủng này đã được thương mại hóa [5] - [11]

4. Định tính hoạt độ enzym chitinase, β -glucanase và cellulase của nấm *Trichoderma asperellum*

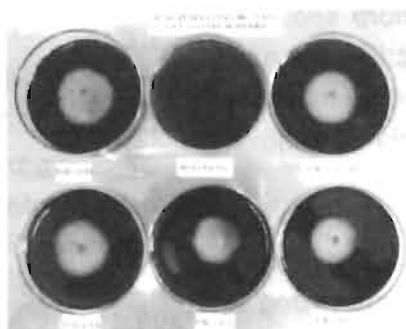
Định tính hoạt độ của một số enzyme có khả năng phân giải các vi sinh vật gây bệnh. Kết quả (bảng 5) cho thấy cả 2 nguồn nấm *Trichoderma asperellum* (TrBC-HT 8 và TrBC-CS 2) đều cho vòng phân giải cao khi định tính các enzyme Cellulase, Chitinase, β -Glucanase trên môi trường, đường kính vòng phân giải đạt: 4,6 - 4,8 cm.

Bảng 5. Định tính hoạt độ enzyme của nấm đối kháng *Trichoderma asperellum*

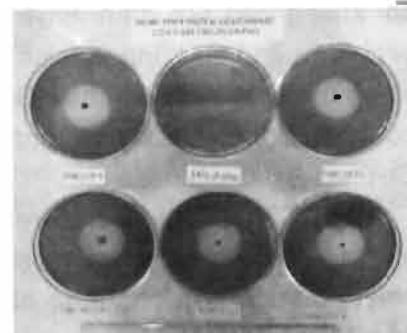
Ký hiệu mẫu	Ký hiệu nguồn	Đường kính vòng phân giải (cm)		
		Cellulase	Chitinase	β -Glucanase
DKĐLCS 2	TrBC-CS 2	4,8 d	4,6 c	4,8 d
DKBPHT 20	TrBC-HT 8	4,8 d	4,7 c	4,7 d
-	Đối chứng	0,0 a	0,0 a	0,0 a
	CV(%)	2,0	1,5	2,3



Hình A. Định tính enzyme Cellulase của nấm *Trichoderma asperellum*



Hình B. Định tính enzyme Chitinase của nấm *Trichoderma asperellum*



Hình C. Định tính enzyme β -Glucanase của nấm *Trichoderma asperellum*

5. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học, sinh thái của nấm *Trichoderma asperellum*

5.1. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng

Môi trường PDA thích hợp nhất cho sự phát triển của sợi nấm sau 3 ngày đường kính đạt kích thước cao nhất (8,0 – 8,3 cm), đồng thời môi trường này cũng cho lượng bào tử cao nhất ($50,1 \times 10^8$ – $59,2 \times 10^8$ bào tử/ml). Môi trường Czapek cũng khá thích hợp cho sự phát triển của nấm *Trichoderma*, sau 3 ngày đường kính tản nấm đạt 7,5 – 7,7 cm, lượng bào tử sinh ra từ $31,8 \times 10^8$ – $39,2 \times 10^8$ bào tử/ml. Môi trường CMA không thích hợp cho sự phát triển của nấm *Trichoderma*, sau 3 ngày nuôi cấy kích thước đường kính tản nấm chỉ đạt 6,4 – 6,8 cm, bào tử sản sinh với mật độ thấp nhất ($8,1 \times 10^8$ – $9,2 \times 10^8$ bào tử/ml).

5.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nấm *Trichoderma asperellum* sinh trưởng, phát triển trong phạm vi nhiệt độ tương đối rộng

từ 15 - 35°C. Tuy nhiên ở nhiệt độ thấp (15 20°C) nấm *Trichoderma* sinh trưởng, phát triển chậm và hình thành bào tử ít. Tốc độ sinh trưởng chỉ đạt 1,4 – 2,0 cm/ngày đêm, sau 5- 6 ngày cấy nấm mới có bào tử xuất hiện. Nhiệt độ từ 25 - 30°C thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của nấm *Trichoderma*, tốc độ tăng trưởng nấm nhanh đạt 2,3 – 2,9 cm/ngày đêm; sau 3 ngày đường kính tản nấm đạt 7,4 – 8,5 cm. Lượng bào tử sinh ra với mật độ cao nhất ($3,4 \times 10^9$ - $4,8 \times 10^9$ bào tử/ml), sau 2 – 3 ngày đã xuất hiện bào tử. Nhiệt độ 35°C nấm sinh trưởng và phát triển chậm hơn.

5.3. Ảnh hưởng của độ pH

Nấm *Trichoderma asperellum* phát triển ở phạm vi độ pH rộng, ở độ pH 5 và 6 thích hợp nhất cho sự phát triển của nấm, tốc độ sinh trưởng sợi nấm đạt 2,6 – 2,9cm/ngày đêm, lượng bào tử từ 2,4 – $3,6 \times 10^9$ /ml. Các mức pH khác quá thấp (pH=4) hoặc quá cao (pH=8) nấm phát triển kém hơn.

KẾT LUẬN

Từ mẫu đất thu thập quanh vùng rễ của các cây lâu năm: cao su, cà phê, hồ tiêu, ca cao thu thập từ các vùng trồng khác nhau của 3 tỉnh Bình Phước, Đắk Lắk và Quảng Trị, đã phân lập được 18 nguồn *Trichoderma* sp, trong đó có sự hiện diện của nấm *Trichoderma asperellum*.

Nấm *Trichoderma asperellum* có khả năng đối kháng cao với nấm *Phytophthora* spp. gây bệnh trên cao su bằng kỹ sinh trực tiếp sợi nấm và chất kháng sinh bay hơi. Đồng thời nấm này có hoạt độ các enzyme phân giải Cellulase, Chitinase, β -Glucanase cao.

Nấm *Trichoderma asperellum* có khả năng phát triển trong phạm vi nhiệt độ và pH rộng, nhiệt độ thích hợp nhất cho nấm sinh trưởng là 25 - 30°C, pH từ 5 - 6.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Ngọc Dung, Lê Đình Thao, Nguyễn Hồng Tuyên, Đoàn Thị Thanh, Nguyễn Văn Liêm, Nguyễn Thúy Hạnh, 2011. Cải tiến môi trường phân lập nấm *Phytophthora* spp. gây bệnh trên cây cao su. *Tạp chí Bảo vệ thực vật* 2:19 - 26

2. Trần Kim Loang, Lê Đình Đôn, Tạ Thanh Nam, Ngô Thị Xuân Thịnh, Nguyễn Thị Tiến Sĩ, Trần Thị Xê, 2008. Phòng trừ bệnh do nấm *Phytophthora* trên cây hồ tiêu bằng chế phẩm sinh học *Trichoderma* (Tricô-VTN) tại Tây nguyên. *Kết quả nghiên cứu khoa học năm 2008, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, tr 307 - 315.

3. EPA,2010. *Trichoderma asperellum* strain ICC 012. *Biopesticides Registration Action Document* (BRAD).

4. Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2, 43-56.

5. Kolombet, L. V., Zhigletsova, S. K., Kosareva, N. I., Bystrova, E. V., Derbyshev, V.

V., Krasnova, S. P. & Schisler, D. (2008). Development of an extended shelf-life, liquid formulation of the biofungicide *Trichoderma asperellum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 123-131.

6. Ngô Vĩnh Viễn, Phạm Ngọc Dung, Nguyễn Thị Ly, Lê Thu Hiền và CTV, 2007. Phương pháp phân lập nấm *Phytophthora* từ đất, rễ và bộ phận cây bị bệnh. *Tuyển tập kết quả Khoa học và Công nghệ nông nghiệp 2006 - 2007*, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Nxb Nông nghiệp, p. 236 - 249.

7. Sanz, L., Montero, M., Redondo, J., Llobell, A. & Monte, E., 2005. Expression of an glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. *FEBS Journal* 272, 493-499.

8. Segarra, G., Casanova, E., Bellido, D., Odena, M. A., Oliveira, E. & Trillas, I., 2007. Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics* 7, 3943-3952.

9. Shores, M., Yedidia, I. & Chet, I., 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95, 76-84.

10. Van Beneden, S., Leenknecht, I., FranÅsa, S. C. & Hofte, M., 2010. Improved control of lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum* using Contans combined with lignin or a reduced fungicide application. *Crop Protection* 29, 168-174.

11. Viterbo, A. D. A. & Chet, I., 2006. TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Molecular plant pathology* 7, 249-258.

Ngày nhận bài: 12.3.2012

Phản biện: TS. Ngô Vĩnh Viễn