

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG PHÒNG, TRỊ MỘT SỐ NẤM BỆNH Ở THANH LONG BẰNG TRICHODERMA

Trương Minh Tường⁽¹⁾, Trần Ngọc Hùng⁽²⁾

(1) Trường Đại học Nông Lâm TP. HCM, (2) Trường Đại học Thủ Dầu Một

TÓM TẮT

Sử dụng phương pháp phân lập và thử đối kháng đồng thời của *Trichoderma* với các chủng nấm bệnh trên môi trường PGA, chúng tôi nghiên cứu khả năng đối kháng của các chủng *Trichoderma* với một số nấm bệnh ở cây thanh long. Kết quả nghiên cứu cho thấy các chủng *Trichoderma* T10, T14, T24 có khả năng đối kháng tốt với nấm bệnh NBT01, NBT03 và NBT04 được phân lập từ các mẫu thanh long bị bệnh thối trái, héo dây và đồng tiền. Bào tử của các chủng *Trichoderma* này không chỉ thể hiện khả năng đối kháng với nấm bệnh trên môi trường PGA mà còn đối kháng tốt trên mô thanh long trong cả hai trường hợp: gây nhiễm nấm bệnh đồng thời và mô thanh long đã có biểu hiện phát bệnh.

Từ khóa: nấm bệnh, khả năng đối kháng, chủng *Trichoderma*

*

1. Đặt vấn đề

Thanh long là một trong những loại trái cây xuất khẩu có giá trị kinh tế cao. Theo số liệu thống kê đầu năm 2011, ước tính diện tích trồng thanh long trong cả nước vào khoảng 21.000 ha; trong đó, riêng tỉnh Bình Thuận chiếm khoảng 72%, số còn lại được trồng ở một số tỉnh miền Tây Nam Bộ như Long An, Tiền Giang...

Cách phòng, trị các loại nấm bệnh ở thanh long hiện nay chủ yếu là sử dụng thuốc hóa học. Biện pháp này không chỉ ảnh hưởng đến sức khỏe người sử dụng do dư lượng thuốc tồn dư trong quả mà còn làm giảm giá trị của trái thanh long. Đặc biệt là khi chúng ta đang có chủ trương mở rộng xuất khẩu sang các thị trường khó tính như Nhật, Mỹ và châu Âu. Sản xuất thanh long theo tiêu chuẩn VietGap và GlobalGap đang được áp dụng rộng rãi ở

nhều nơi. Trong đó, liệu pháp đặc trị bệnh trên thanh long bằng phương pháp sinh học đang là hướng được các nhà nghiên cứu quan tâm.

Trichoderma có khả năng đối kháng rất tốt với nhiều loại nấm bệnh thực vật. Việc sử dụng *Trichoderma* để phòng trừ bệnh trên cây trồng đang là hướng nghiên cứu được các nhà khoa học quan tâm trong việc tìm giải pháp thay thế thuốc hóa học. Trong bài báo này, chúng tôi sử dụng phương pháp phân lập và thử đối kháng đồng thời của *Trichoderma* với các chủng nấm bệnh trên môi trường PGA để nghiên cứu khả năng đối kháng của các chủng *Trichoderma* với một số nấm bệnh ở cây thanh long.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Giống *Trichoderma* sp. do phòng thí nghiệm chi nhánh Công ty TNHH Gia

Tường tỉnh Bình Dương cung cấp; gồm 13 chủng, được ký hiệu T05, T06, T07, T08, T09, T10, T14, T16, T18, T19, T20, T24, T25.

Thanh long sạch bệnh và thanh long bị bệnh đồng tiền, thối trái xanh và bệnh héo dây thu nhận tại xã Quơn Long huyện Chợ Gạo, tỉnh Tiền Giang.

Môi trường PGA: khoai tây (200g), glucose (20g), agar (20g), nước cất vừa đủ (1 lít).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phân lập và kiểm tra khả năng gây bệnh của các chủng nấm bệnh.

Phân lập nấm bệnh:

– Chọn mô thực vật mới bị bệnh để phân lập. Không sử dụng các mô đã bị bệnh lâu vì trên bề mặt các mô bệnh này thường có rất nhiều nấm và vi khuẩn hoại sinh phát triển.

– Rửa mẫu quả hoặc thân trong nước để loại bỏ đất bụi và các tạp chất khác. Khử trùng bề mặt quả hoặc thân bằng cồn etyl 70%.

– Dùng dụng cụ được khử trùng cắt những miếng cấy nhỏ (khoảng 2×2 mm) từ phần ranh giới giữa mô khỏe và mô bệnh, sau đó cấy lên môi trường PGA, đặt những miếng cấy gần mép đĩa.

– Kiểm tra đĩa cấy hàng ngày, khi các tản nấm phát triển từ những mẫu thực vật nhiễm bệnh, cấy truyền chúng sang môi trường như PGA.

Kiểm tra khả năng gây bệnh:

– Phun hoặc quét bào tử nấm bệnh lên những cây thanh long sạch bệnh. Tiến hành đồng thời trên mô lành và mô đã bị gây vết thương.

– Che chắn, bao gói cẩn thận để bào tử không lây lan sang những cây khác nhằm

tránh hiện tượng nhiễm chéo và phát tán mầm bệnh đi khắp nơi.

– Quan sát hàng ngày đánh giá biểu hiện bệnh trên các cây được gây bệnh và so sánh với đặc điểm của bệnh trong tự nhiên.

2.2.2. Khảo sát khả năng đối kháng đồng thời của *Trichoderma* với các chủng nấm bệnh trên môi trường PGA.

– Cấy nấm bệnh và chủng nấm *Trichoderma* trên 2 điểm đối xứng nhau qua tâm đĩa petri, các điểm cấy cách mép đĩa 1,5cm. Đĩa đối chứng là đĩa chỉ được cấy riêng nấm bệnh. Ủ ở nhiệt độ phòng, quan sát từng ngày và ghi nhận kết quả.

– Sau khi tiến hành thử đối kháng, theo dõi các đĩa đã cấy cho đến khi hai vòng tròn đối kháng của *Trichoderma* và nấm bệnh tiếp xúc nhau.

– Công thức tính hiệu quả ức chế theo Soyong (1988): $H = (D_{dc} - D) / D_{dc} \times 100$.

[H: Hiệu quả ức chế (%)]

D: Đường kính khuẩn lạc nấm bệnh trung bình trên đĩa đối kháng (cm)

D_{dc} : Đường kính khuẩn lạc nấm bệnh trung bình trên đĩa đối chứng (cm).

2.2.3. Các phương pháp khác

– Khảo sát khả năng đối kháng của *Trichoderma* khi các chủng nấm bệnh đã phát triển trước trên môi trường PGA.

– Khảo sát khả năng đối kháng của *Trichoderma* với các chủng nấm bệnh trên mô thanh long.

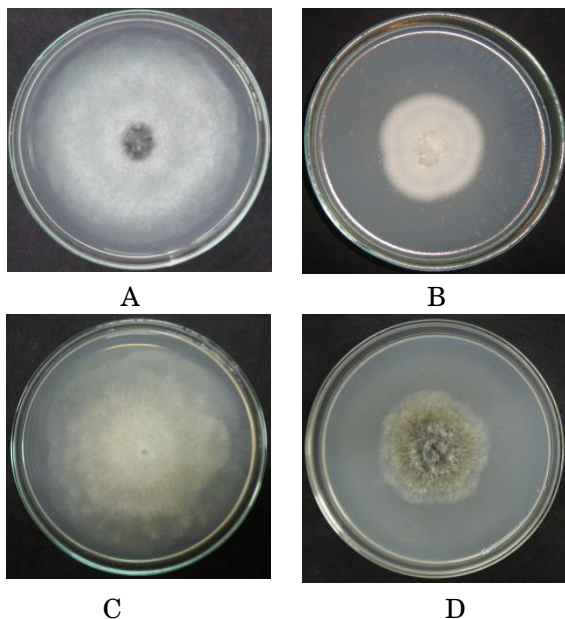
3. Kết quả

3.1. Phân lập nấm bệnh

3.1.1. Phân lập, làm thuần

Chúng tôi lấy mẫu trên các cây thanh long khác nhau ở nhiều khu vườn khác nhau. Trên cơ sở các mẫu bệnh lấy từ quả, thân bị

bệnh của cây thanh long. Chúng tôi tiến hành phân lập trên môi trường chọn lọc có bổ sung kháng sinh, nuôi cấy ở nhiệt độ phòng. Các chủng sau khi phân lập được làm thuần trên môi trường PGA. Kết quả thu được 4 chủng nấm bệnh, được ký hiệu: mẫu nấm bệnh thối trái xanh phân lập được nấm bệnh NBT01, bệnh vàng héo dây là NBT03 và bệnh đồng tiền là NBT02, NBT04.



Hình 1: Các loại nấm bệnh phân lập được
(A) NBT01; (B) NBT02; (C) NBT03; (D) NBT04

NBT01: Khuẩn lạc hình tròn. Khuẩn ty hình sợi, mọc thành từng lớp. Màu trắng. Bào tử có dạng túi, màu đen. Sau 24 giờ nuôi cấy, khuẩn lạc có đường kính 8,6 cm.

NBT02: Khuẩn lạc hình tròn không đều, có nhiều vân như gỗ. Khuẩn ty mọc sát mặt thạch, màu trắng kem. Bào tử màu trắng. Khuẩn lạc có đường kính 2,2 cm sau 24 giờ nuôi cấy.

NBT03: Khuẩn lạc hình hoa, chia thành nhiều thùy. Khuẩn ty dạng sợi, mọc thành từng lớp, nhô cao, màu trắng ngà.

Bào tử có màu xám, nằm trong xen lẫn với khuẩn ty. Khuẩn lạc có đường kính 9,0 cm sau 24 giờ nuôi cấy.

NBT04: Khuẩn lạc hình tròn. Khuẩn ty dạng tơ, mọc thành từng lớp chồng lên nhau, màu trắng xám. Không thấy bào tử rõ ràng. Khuẩn lạc có đường kính 2,3 cm sau 24 giờ nuôi cấy.

Bước đầu ta có thể dự đoán được tác nhân gây ra bệnh thối trái xanh là do NBT01, bệnh vàng héo dây là do NBT03 và bệnh đồng tiền do NBT02 hoặc NBT04 gây ra.

3.1.2. Kiểm tra khả năng gây bệnh của các giống nấm bệnh được phân lập

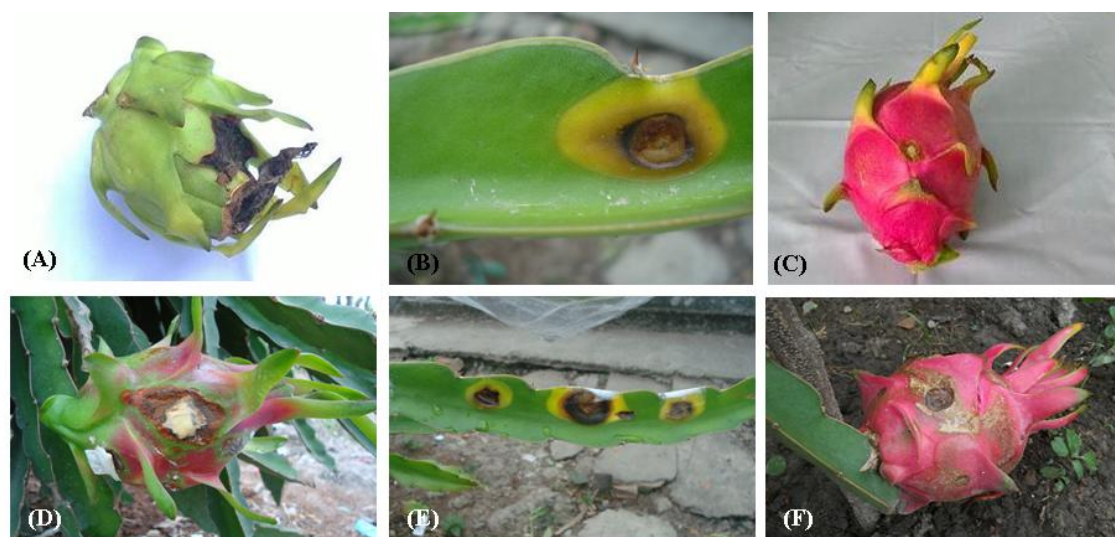
Tiến hành gây bệnh trực tiếp lên trái và nhánh thanh long bằng bào tử nấm bệnh thu được khi nuôi cấy trên môi trường PGA. Sau 5 ngày, thu được kết quả:

- NBT01: vùng bệnh bị thối, màu xám đen, vùng mô xung quanh mô thối có màu vàng, lan rộng ra các vùng mô khác, có bào tử màu đen.

- NBT03: vết thương phồng lên, quang vết thương xì mủ màu vàng.

- NBT04: vùng bệnh thối rộng hình mắt cua, xung quanh có màu vàng, ở giữa có màu đen.

Các chủng nấm bệnh NBT01, NBT03 và NBT04 có khả năng gây bệnh lại trên cây thanh long và có triệu chứng tương tự với mẫu dùng để phân lập ban đầu. Điều này chứng tỏ NBT01, NBT03 và NBT04 là tác nhân gây ra các bệnh trên thanh long. NBT02 không gây bệnh trên cả mẫu dây và trái thanh long. Đây có thể là do tạp nhiễm trong quá trình phân lập hoặc là một loại nấm hoại sinh nên chúng tôi không lựa chọn loài nấm này trong quá trình nghiên cứu.



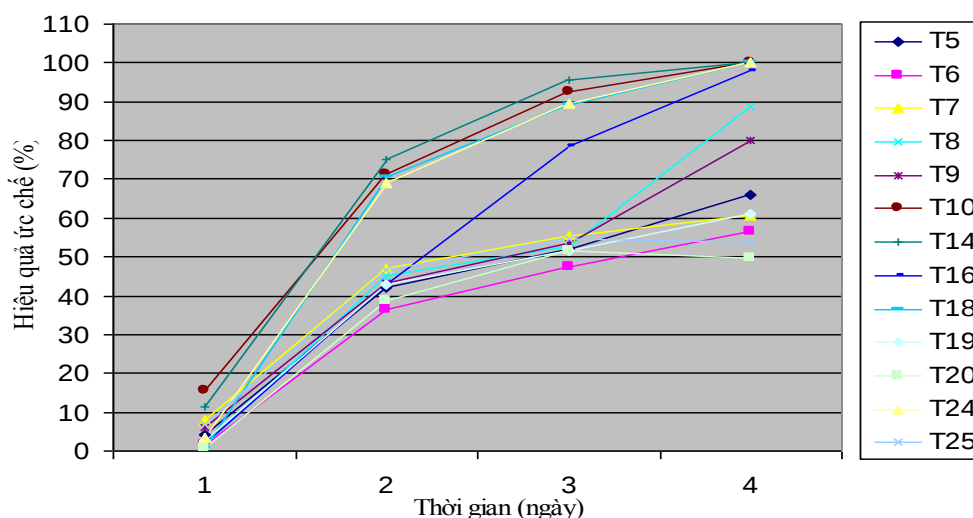
Hình 2: Mẫu bệnh tự nhiên dùng để phân lập. (A) bệnh thối trái xanh. (B) bệnh thối vàng dây. (C) bệnh đồng tiền; thanh long được gây bệnh nhân tạo. (D) NBT01 gây bệnh thối trái xanh. (E) NBT03 gây bệnh thối vàng dây. (F) NBT04 gây bệnh đồng tiền.

3.2. Khảo sát hiệu quả đối kháng của các chủng *Trichoderma* với các chủng nấm bệnh trên môi trường PGA

3.2.1. Đối kháng đồng thời

Dùng 13 chủng *Trichoderma* do Chi nhánh công ty TNHH Gia Tường cung cấp để thử nghiệm tính đối kháng với 3 chủng nấm

bệnh: NBT01, NBT03 và NBT04 có khả năng gây bệnh trên thanh long cây đồng thời nấm bệnh và *Trichoderma* lên cùng một đĩa petri, ủ ở nhiệt độ phòng. Theo dõi từng ngày và quan sát sự đối kháng của *Trichoderma* với từng loại nấm bệnh. Kết quả được thể hiện trong các hình 3, 4, 5.



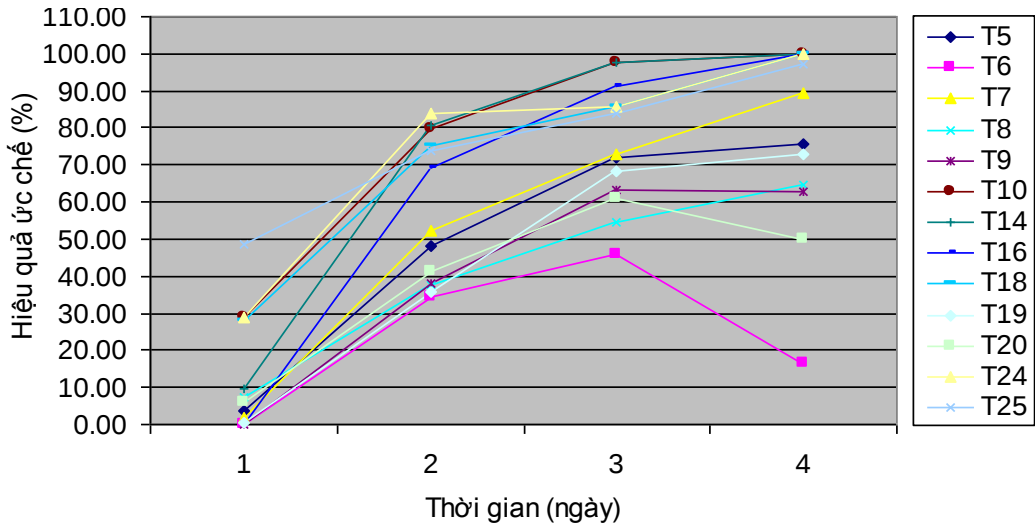
Hình 3: Biểu đồ hiệu quả ức chế của các chủng *Trichoderma* với chủng NBT01

Biểu đồ hình 3 cho thấy, phần lớn các chủng *Trichoderma* đều thể hiện tính đối kháng rõ ràng sau 2 ngày. Ở ngày thứ 3,

ngoại trừ T06, các chủng *Trichoderma* còn lại đều có hiệu suất ức chế trên 50%. Ở ngày thứ 4 chủng T20 có hiện tượng bị nấm bệnh

đối kháng ngược lại (hiệu quả đối kháng giảm). Tuy nhiên, chúng tôi nhận thấy vào ngày thứ 2 các chủng T10, T14, T18, T24 đều có hiệu suất ức chế trên 50% và thể hiện tính đối kháng rõ ràng, nổi trội hơn so với

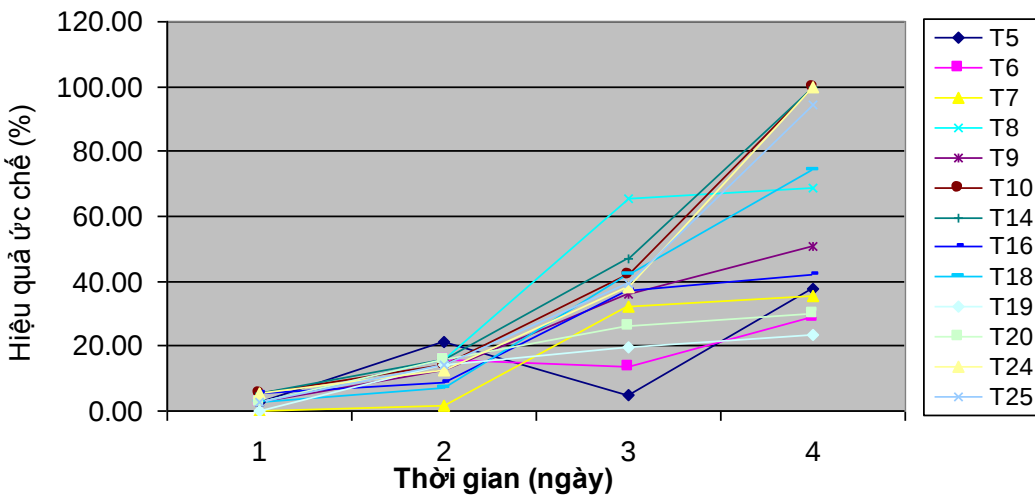
các chủng còn lại. Dựa vào khả năng đối kháng mạnh trong thời gian ngắn nhất, chúng tôi nhận thấy các chủng T10, T14, T18 và T24 có khả năng ứng dụng vào sản xuất.



Hình 4: Biểu đồ hiệu quả ức chế của các chủng *Trichoderma* với chủng NBT03

Biểu đồ hình 4 cho thấy, phần lớn các chủng *Trichoderma* đều thể hiện tính đối kháng rõ ràng sau 2 ngày. Ở ngày thứ 3, ngoại trừ T06, các chủng *Trichoderma* còn lại đều có hiệu suất ức chế trên 50%. Ở ngày thứ 4, chủng T06, T20 và T09 có hiện tượng bị nấm bệnh đối kháng ngược (hiệu quả đối kháng giảm). Vào ngày thứ 2 các

chủng T10, T14, T16, T18, T24 và T25 đều có hiệu suất ức chế trên 50% và thể hiện tính đối kháng rõ ràng, nổi trội hơn so với các chủng còn lại. Dựa vào khả năng đối kháng mạnh trong thời gian ngắn nhất, chúng tôi nhận thấy các chủng này có khả năng ứng dụng vào sản xuất.



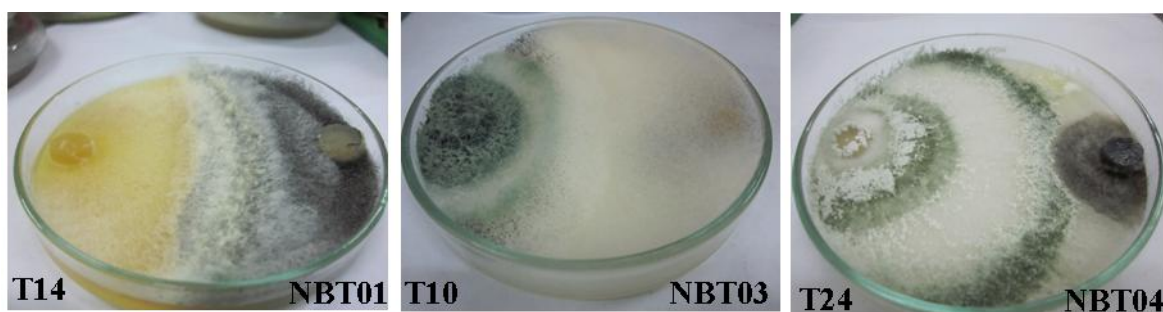
Hình 5: Biểu đồ hiệu quả ức chế của các chủng *Trichoderma* với chủng NBT04

Biểu đồ hình 5 cho thấy, phần lớn các chủng *Trichoderma* chưa thể hiện tính đối kháng rõ ràng ở 2 ngày, 3 ngày. Ở ngày thứ 4, chủng T10, T14, T24 và T25 có hiệu suất ức chế trên 100% và thể hiện tính đối kháng rõ ràng, nổi trội hơn so với các chủng còn lại. Trên cơ sở dựa vào khả năng đối kháng mạnh trong thời gian ngắn nhất, chúng tôi nhận thấy các chủng T10, T14, T24 và T25 có khả năng ứng dụng vào sản xuất.

Khi so sánh giữa các chủng *Trichoderma* với nhau, chúng tôi nhận thấy rằng phần lớn chúng đều đối kháng được tất cả các chủng nấm bệnh ở mức độ đối kháng khác nhau. Có chủng không đối kháng với NBT03 (T06), kháng yếu với NBT01 và NBT04 (T05 và T08). Trong số các chủng *Trichoderma* có khả năng đối kháng, T10, T14 và T24 có tính đối kháng mạnh hơn các chủng khác với hiệu quả ức chế phần lớn đạt từ 70 -

100% và kháng được với cả 3 chủng nấm bệnh. Đây cũng chính là điều kiện để lựa chọn những dòng cụ thể để tiếp tục sử dụng cho việc nghiên cứu. Điều này nói lên tính chuyên biệt của nấm *Trichoderma* trong việc đối kháng với từng loại nấm bệnh cụ thể. Một dòng nấm có khả năng đối kháng cao với một loại nấm bệnh, một loại cây trồng hay một vùng sinh thái này chưa hẳn đã có hiệu quả khi sử dụng cho điều kiện khác (Lavell và Spain, 2001). Đây là một hạn chế của việc sử dụng sản phẩm sinh học so với các sản phẩm thuốc hóa học. Vì vậy để nâng cao hiệu quả kiểm soát sinh học của chế phẩm *Trichoderma* cần phải phối trộn nhiều chủng *Trichoderma* khác nhau.

Qua kết quả thu được, chúng tôi chọn các chủng *Trichoderma* T10, T14 và T24 có khả năng đối kháng mạnh với 3 loại nấm bệnh để tiếp tục các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 6: Đối kháng của các chủng *Trichoderma* với nấm bệnh trên môi trường PGA

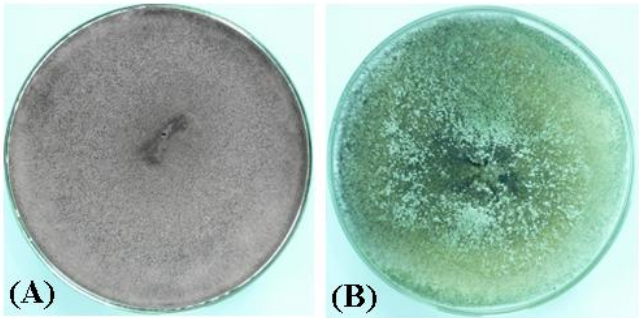
3.2.2. Đối kháng bào tử *Trichoderma* với nấm bệnh sau khi đã phát triển

Sau khi nuôi cấy nấm bệnh ta tiến hành phun dịch bào tử trực tiếp lên bề mặt khuẩn lạc nấm bệnh. Kết quả thu được thể hiện trong bảng 1.

Nấm bệnh	<i>Trichoderma</i>	Khả năng đối kháng	Thời gian (ngày)	Đặc điểm
NBT01	T10	+	4	<i>Trichoderma</i> mọc chen vào nấm bệnh, từ từ giết chết nấm bệnh.
	T14	+	4	
	T24	+	5	
NBT03	T10	+	4	Tơ nấm bị lõm sâu và dần dần xẹp xuống, <i>Trichoderma</i> mọc xen vào giết chết nấm bệnh.
	T14	+	4	
	T24	+	5	

NBT04	T10	+	5	<i>Trichoderma</i> mọc lên trên nấm bệnh, từ từ giết chết nấm bệnh.
	T14	+	5	
	T24	+	6	

Nhận xét: Các chủng *Trichoderma* T10, T14 và T24 có khả năng đối kháng được với nấm bệnh NBT01, NBT03, NBT04 ngay khi các nấm bệnh này đã phát triển.



Hình 7: Đối kháng của *Trichoderma* khi nấm bệnh NBT03 đã phát triển.

(A) Đối chứng; (B) Có xử lí *Trichoderma*

3.3. Kết quả thử nghiệm đối kháng của bào tử *Trichoderma* với nấm bệnh trên mô thanh long

Tiến hành thử nghiệm khả năng đối kháng của bào tử của các chủng *Trichoderma* với nấm bệnh trên mô thanh

long trong hai trường hợp: *Trichoderma* và nấm bệnh được gây nhiễm đồng thời; xử lí *Trichoderma* sau khi mô thanh long đã có biểu hiện của bệnh. Sau 5 ngày quan sát, kết quả thu được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2: Khả năng đối kháng đồng thời của bào tử *Trichoderma* với nấm bệnh

Nấm bệnh	Đặc điểm lô đối chứng	Xử lý <i>Trichoderma</i> đồng thời	Xử lý <i>Trichoderma</i> khi có biểu hiện bệnh
NBT01	- Trên thân: Vết thương lan rộng, mô xung quanh bị thối. - Trên trái: Vết thương lan rộng, quả bị thối thành đốm lớn.	- Trên thân: Vết thương lành lại, mô xung quanh vẫn bình thường. - Trên trái: Vết thương lành lại, tạo sẹo nhỏ trên quả.	- Trên thân: Vết thối không lan ra và sau một thời gian thì khô lại. - Trên trái: Vết bệnh ngừng phát triển và khô lại
NBT03	- Trên thân: Vết thương xung phù và lan rộng. - Trên trái: Vết thương xung phù, quả bị ghè đốm.	- Trên thân: Vết thương lành lại và tạo sẹo. - Trên trái: Vết thương lành lại.	- Trên thân: Vết thương ít xung phù và tạo sẹo. - Trên trái: Vết thương ít xung phù và khô đi
NBT04	- Trên thân: Vết thương lan rộng có hình mắt cua, ở giữa thối đen, xung quanh bị vàng. - Trên trái: bị thối giống như đồng tiền	- Trên thân: Vết thương lành lại, tạo sẹo nhỏ. - Trên trái: Vết thương lành lại, tạo sẹo nhỏ trên quả.	- Trên thân: Vết thương khô lại, mô xung quanh hơi vàng. - Trên trái: Vết thương khô lại, tạo sẹo trên quả.

Nhận xét: Kết quả cho thấy bào tử các chủng *Trichoderma* này có khả năng đối kháng và ức chế tốt với các nấm bệnh không chỉ trên thạch PGA mà còn trên cả mô thanh long. Khi được xử lí đồng thời, *Trichoderma* phát triển và ức chế không cho nấm bệnh phát triển, mô thanh long không

có biểu hiện bệnh. Đối với những mô thanh long đã có biểu hiện bệnh, chúng tôi nhận thấy, sau khi xử lí với chế phẩm *Trichoderma*, các vết bệnh ngừng lây lan và dần khô lại. *Trichoderma* đã kí sinh và giết chết nấm bệnh, ngăn không cho nấm bệnh tiếp tục phát triển. Hiện tượng vết thương

khô lại cho thấy rằng ngoài tác dụng đối kháng và giết chết nấm bệnh, *Trichoderma* còn có tác dụng kích thích làm lành vết thương. Bào tử của các chủng *Trichoderma* này có tiềm năng trong sản xuất tạo chế phẩm sinh học phòng trừ nấm bệnh.

4. Kết luận

– Nấm bệnh NBT01, NBT03, NBT04 lần lượt là các tác nhân gây ra các bệnh thối quả xanh, vàng héo dây và bệnh đồng tiền.

– Hầu hết các chủng *Trichoderma* nghiên cứu đều có khả năng đối kháng với nấm bệnh trên môi trường thạch PGA. Trong đó, chủng T10, T14 và T24 đối kháng mạnh nhất (100% sau 4 ngày).

– Các chủng *Trichoderma* này có khả năng đối kháng với nấm bệnh trên mô thanh long nên có thể ứng dụng để phòng trị nấm bệnh trên thanh long.

*

RESEARCH OF PREVENTION AND TREATMENT OF SOME FUNGAL PATHOGENS IN DRAGON FRUIT BY USING TRICHODERMA

Truong Minh Tuong⁽¹⁾, Tran Ngoc Hung⁽²⁾

(1) Nong Lam University, (2) Thu Dau Mot University

ABSTRACT

Using the method of isolating and testing the simultaneous resistance of Trichoderma to fungal strains in PGA environment, we studied the resistance capability of Trichoderma strains to some fungal pathogens of dragon fruit. Research results showed that Trichoderma strains T10, T14, T24 have good resistance to fungal pathogens NBT01, NBT03 and NBT04 which were isolated from diseased samples of rotten dragon fruit, withered stem and brown spots. Spores of these Trichoderma strains not only demonstrate the resistance to fungal pathogens in PGA environment but also on the fruit's tissue in both cases: simultaneous fungal diseases and the fruit's tissue has shown syndrome.

Keywords: fungal disease, resistance capability, *Trichoderma* strains

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Lester W. Burgess, Len Tesoriero, Timothy E. Knight và Phan Thúy Hiền (2009), *Cẩm nang chuẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam*, Australian Centre for International Agricultural Research.
- [2]. Abou-Zeid A.M., Altalhi A.D. and Abd El-Fattah R.I. (2008), *Fungal control of pathogenic fungi isolated from some wild plants in Taif Governorate, Saudi Arabia*, Mal. J. Microbiol., Vol. 4: 30-39.
- [3]. Antal, Z., L., Manczinger, G. Szakaacs, R.P. Tengerdy and L. Ferenczy (2000), *Colony growth, in vitro antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of Trichoderma species*, Mycol. Res., 104: 545-549.
- [4]. A. Sivan, Y. elad and Amal A. Al-Mousa (2008), *Evaluation of antifungal activity of vitavax and Trichoderma viride against two wheat root rot pathogens*, Journal of applied Biosciences, Vol. 6: 140-149

- [5]. Emma W. Gachomo and Simeon O. Kotchoni (2008), *The use of Trichoderma harzianum and T. viride as potential biocontrol agents against peanut microflora and their effectiveness reducing aflatoxin contamination of infected kernels*, Biotechnology, Vol. 7:439-447.
- [6]. Enrique Monte (2001), *Understanding Trichoderma: between biotechnology and Microbial ecology*, Int. Microbiol, Vol. 4: 1-4.
- [7]. Kullnig-Gradinger, C.M., G. Szakacs and C.P. Kubicek (2002), *Phylogeny and evolution of the fungal genus Trichoderma-a multigene approach*, Mycol. Res., 106: 757-767.
- [8]. Robert E. paull, Dragon Fruit, *Department of Tropical plant and soil sciences*, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, HI.
- [9]. Ronghua Cao, Xiaoguang liu, Kexiang Gao, Kurt Mendgen, zhensheng kang, Jainfeng Gao, Yang Dai and Xue Wang (2009), *Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed and soilborne Phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro*, Curr Microbiol, Springer Science.