

KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG CỦA NẤM TRICHODERMA VỚI NẤM CORTICIUM SALMONICOLOR GÂY BỆNH NẤM HỒNG TRÊN CÂY CAO SU

Nguyễn Anh Dũng

Trường Đại học Thủ Dầu Một

TÓM TẮT

Trên môi trường PGA, khảo sát khả năng đối kháng của 14 chủng nấm *Trichoderma* được phân lập tại những vùng nông nghiệp tỉnh Bình Dương với nấm *Corticium salmonicolor* gây bệnh nấm hồng trên cây cao su. Kết quả thí nghiệm cho thấy khả năng đối kháng mạnh của các chủng nấm *Trichoderma* với nấm *C. salmonicolor* khi hiệu suất đối kháng đạt 100% chỉ sau 7 ngày nuôi cấy. Chủng Tr12 sự phong phú trong cơ chế đối kháng nấm bệnh đã được chọn để định danh bằng phương pháp sinh học phân tử. Kết quả là chủng Tr12 có trình tự 28S rRNA tương đồng với trình tự 28S rRNA của chủng *Trichoderma harzianum* CKP01 là 99%.

Từ khóa: đối kháng, phân lập, nấm hồng, cao su

1. MỞ ĐẦU

Bệnh nấm hồng (Pink disease) trên cây cao su (*Hevea brasiliensis*) do nấm *Corticium salmonicolor* gây ra là bệnh rất nguy hại. Bệnh làm lá khô, rụng, làm cụt ngọn, nhẹ thì giảm lượng mủ 20 – 30%, còn nặng thì 60 – 70%, thậm chí gây chết cây. Cách phòng trừ bệnh thường dùng là thuốc có nguồn gốc hóa học có thể gây lờn thuốc, độc hại với con người và môi trường. Việc sử dụng các loại thuốc hóa học tràn lan không chỉ gây ảnh hưởng xấu tới môi trường sống, sức khỏe của người tiêu dùng mà còn là nguyên nhân tạo ra các chủng nấm bệnh kháng thuốc [16].

Sử dụng các chủng nấm *Trichoderma* để kiểm soát các loại nấm bệnh thực vật là một biện pháp an toàn và hiệu quả. *Trichoderma* là tác nhân kiểm soát sinh học đối với nhiều loại nấm gây bệnh trên cây trồng cũng như cây cao su như *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Colletotrichum*, *Corticium*... 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. [4][10][12][14]

Bài báo cung cấp kết quả nghiên cứu khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma* với nấm *C. salmonicolor* gây bệnh nấm hồng trên cây cao su tại Bình Dương trong điều kiện phòng thí nghiệm.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

– 14 chủng nấm *Trichoderma* được phân lập tại Bình Dương.

– Nấm *Corticium salmonicolor* gây bệnh nấm hồng trên cây cao su do Trường Đại học Thủ Dầu Một cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân lập nấm Trichoderma:

– Phân lập nấm *Trichoderma* spp. bằng cách thu các mẫu thân, lá cành mục cùng

với các mẫu đất mặt tại các vùng nông nghiệp ở tỉnh Bình Dương. Cân, pha loãng rồi cấy mẫu lên môi trường TSM [5][6][7][9][10].

– Các mẫu nấm nghi ngờ là nấm *Trichoderma* được tuyển chọn và tiến hành định danh đến chi bằng phương pháp cấy khối thạch và đối chiếu với khóa phân loại nấm thuộc chi *Trichoderma* của Bùi Xuân Đồng (2004) và Nguyễn Đức Lượng (2006) [1][2][3][6][14].

Phương pháp khảo sát khả năng đối kháng của nấm Trichoderma với nấm Corticium salmonicolor:

– Chuẩn bị các đĩa nấm *Trichoderma* trung gian bằng cấy 0,1ml dung dịch chứa bào tử nấm với nồng độ 10^8 /ml lên đĩa petri có môi trường PGA, dùng que cấy trải trang đều, ủ ở nhiệt độ phòng 3 ngày cho nấm mọc tốt.

– Chuẩn bị các đĩa nấm *C. salmonicolor* bằng cách dùng que cấy vuông lấy một ít sợi nấm từ ống giống, cấy vào tâm đĩa petri có môi trường PGA, ủ ở nhiệt độ phòng 5 ngày.

– Tiến hành khảo sát khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma* với nấm *C. salmonicolor* trên môi trường PGA bằng cách cắt những miếng thạch có diện tích bằng nhau có chứa nấm *C. salmonicolor* (nấm *C. salmonicolor* được lấy trên cùng 1 đĩa petri) và *Trichoderma* trên các đĩa petri trung gian đã chuẩn bị trước. Đặt hai khối thạch vừa cắt lên đĩa petri có chứa môi trường PGA để tiến hành quá trình đối

kháng. Vị trí đặt thạch cách mép đĩa khoảng 1,5cm và 2 khối thạch phải đối xứng nhau qua tâm đĩa [14].

– Cách xác định hiệu quả đối kháng của *Trichoderma* đối với nấm *Corticium salmonicolor* bằng công thức tính hiệu quả ức chế:

$$H = \frac{(D_{đc} - D_{tt})}{D_{đc}} \times 100$$

Trong đó, H: hiệu quả ức chế (%), $D_{đc}$: bán kính khuẩn lạc nấm bệnh trên đĩa đối chứng (cm), D_{tt} : bán kính khuẩn lạc nấm bệnh trên đĩa thử thật (cm). Với quy ước: đối kháng cao (+++): $H \geq 60\%$, đối kháng trung bình (++) : $40\% \leq H \leq 59\%$, đối kháng yếu (+): $20\% \leq H \leq 39\%$, không đối kháng (-): $H \leq 19\%$.

Định danh bằng phương pháp sinh học phân tử: Mẫu nấm *Trichoderma* có khả năng đối kháng mạnh được gửi định danh bằng sinh học phân tử bằng phương pháp giải trình tự gen 28S rRNA và tra cứu trên BLAST SEARCH.

2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được phân tích và xử lý bằng phần mềm Microsoft excel 2010 và phần mềm thống kê Statgraphics centurion XV.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả phân lập nấm *Trichoderma*

Từ các mẫu đất, lá mục, cành mục đã phân lập được 14 chủng nấm *Trichoderma* (bảng 1).

Bảng 1. Thống kê các chủng *Trichoderma* phân lập tại Bình Dương

Stt	Kí hiệu chủng	Nguồn phân lập	Địa điểm lấy mẫu	Số chủng
1	Tr1, Tr3	Thân cao su mục	Tân Bình, Tân Uyên	2
2	Tr2, Tr11	Lá cao su mục	Tân Bình, Tân Uyên	2
3	Tr4	Đất trồng cao su	Tân Bình, Tân Uyên	1
4	Tr5	Đống ủ phân	An Điền, Bến Cát	1
5	Tr8, Tr12	Đất trồng cao su	An Điền, Bến Cát	2

6	Tr9	Đất trồng ớt	An Điền, Bến Cát	1
7	Tr6, Tr14	Đất trồng tiêu	An Linh, Phú Giáo	2
8	Tr7, Tr10	Đất trồng cao su	An Linh, Phú Giáo	2
9	Tr13	Đất trồng mía	An Linh, Phú Giáo	1

3.2. Khảo sát khả năng đối kháng của *Trichoderma* đã phân lập được với nấm *C. salmonicolor*

– Bố trí thí nghiệm như mục 2.2.2. trên đối tượng là nấm *C. salmonicolor*.

– Quan sát và ghi nhận lại bán kính khuẩn lạc nấm gây bệnh ở các nghiệm

thức và tính toán hiệu suất đối kháng của nấm *Trichoderma* với *C. salmonicolor* tại các thời điểm 3 ngày, 5 ngày, 7 ngày... và nghiệm thức đạt hiệu suất đối kháng 100% khi nấm *Trichoderma* mọc trùm lên nấm *C. salmonicolor* trong nghiệm thức.

Bảng 2. Khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma* với nấm *C. salmonicolor*

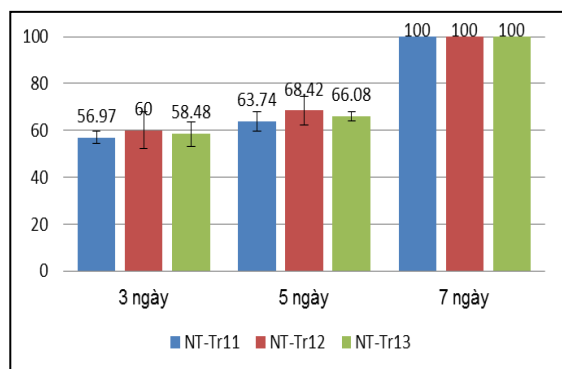
Nghiệm thức	Thời gian					
	3 ngày		5 ngày		7 ngày	
	Dtt (Tb, cm)	H (Tb, %)	Dtt (Tb, cm)	H% (Tb, %)	Dtt (Tb, cm)	H% (Tb, %)
NT-Tr1	1.38 ± 0.28 ^{cde}	38.03 ± 12.52 ^{bcd}	1.5 ± 0.26 ^{cde}	47.37 ± 9.28 ^{cde}	0 ^a	100 ^c
NT-Tr2	1.48 ± 0.13 ^{de}	33.49 ± 5.72 ^b	1.59 ± 0.13 ^e	44.21 ± 4.48 ^c	0 ^a	100 ^c
NT-Tr3	1.5 ± 0.1 ^e	32.73 ± 4.55 ^b	1.84 ± 0.06 ^f	35.55 ± 1.93 ^b	2.13 ± 0.15 ^b	57.27 ± 3.2 ^b
NT-Tr4	1.1 ± 0.1 ^{ab}	50.91 ± 4.55 ^{ef}	1.23 ± 0.06 ^b	56.72 ± 2.02 ^f	0 ^a	100 ^c
NT-Tr5	1.25 ± 0.09 ^{bcd}	44.09 ± 3.93 ^{cde}	1.38 ± 0.08 ^{bcd}	51.46 ± 2.68 ^{def}	0 ^a	100 ^c
NT-Tr6	1.21 ± 0.2 ^{bc}	45.76 ± 9.15 ^{de}	1.33 ± 0.15 ^{bc}	53.22 ± 5.36 ^{ef}	0 ^a	100 ^c
NT-Tr7	1.42 ± 0.1 ^{cde}	36.52 ± 4.73 ^{bcd}	1.47 ± 0.06 ^{cde}	48.42 ± 2.13 ^{cde}	0 ^a	100 ^c
NT-Tr8	1.28 ± 0.14 ^{bcd}	42.88 ± 6.21 ^{bcde}	1.4 ± 0.1 ^{bcde}	50.88 ± 3.51 ^{cdef}	0 ^a	100 ^c
NT-Tr9	1.39 ± 0.08 ^{cde}	37.88 ± 3.53 ^{bcd}	1.45 ± 0.05 ^{cde}	49.12 ± 1.76 ^{cde}	0 ^a	100 ^c
NT-Tr10	1.47 ± 0.16 ^{de}	33.94 ± 7.06 ^{bc}	1.57 ± 0.15 ^{de}	45.03 ± 5.36 ^{cd}	0 ^a	100 ^c
NT-Tr11	0.97 ± 0.06 ^a	56.97 ± 2.63 ^f	1.03 ± 0.11 ^a	63.74 ± 4.05 ^g	0 ^a	100 ^c
NT-Tr12	0.9 ± 0.17 ^a	60 ± 7.88 ^f	0.9 ± 0.17 ^a	68.42 ± 6.07 ^g	0 ^a	100 ^c
NT-Tr13	0.93 ± 0.12 ^a	58.48 ± 5.25 ^f	0.97 ± 0.06 ^a	66.08 ± 2.03 ^g	0 ^a	100 ^c
NT-Tr14	1.37 ± 0.15 ^{cde}	38.64 ± 6.99 ^{bcd}	1.53 ± 0.06 ^{de}	46.2 ± 2.03 ^{cd}	0 ^a	100 ^c
Dđc	2.22 ± 0.13 ^f	0.00 ^a	2.85 ± 0.05 ^g	0.00 ^a	4.77 ± 0.25 ^c	0.00 ^a

* Các chữ cái trong cùng 1 cột cho thấy sự khác nhau giữa các nghiệm thức thí nghiệm với độ tin cậy 95%.

Kết quả khảo sát đối kháng (bảng 2) cho thấy khả năng đối kháng mạnh của tất cả các chủng *Trichoderma* với nấm *C. salmonicolor* với hiệu suất đối kháng tăng dần theo thời gian. Tại thời điểm 3 ngày có 7/14 chủng có khả năng đối kháng yếu (chiếm 50% tổng số chủng), 6 chủng có khả năng đối kháng trung bình (chiếm 42,85%) và chỉ có 1 chủng có khả năng đối kháng mạnh. Tuy nhiên tại thời điểm 5 ngày của thí nghiệm khả năng đối kháng của các chủng tăng rõ rệt với 10/14 chủng có khả năng đối kháng trung bình, 3 chủng có khả năng đối kháng mạnh và 1 chủng có khả năng đối kháng yếu. Và tại thời điểm 7

ngày của quá trình thí nghiệm thì 13/14 chủng *Trichoderma* đã cho hiệu suất đối kháng đạt 100% khi mọc trùm lên khuẩn lạc nấm *C. salmonicolor* trên đĩa thạch. Khi tiếp tục quan sát đến 15 ngày thì khả năng đối kháng nấm *C. salmonicolor* của nấm *Trichoderma* vẫn được duy trì.

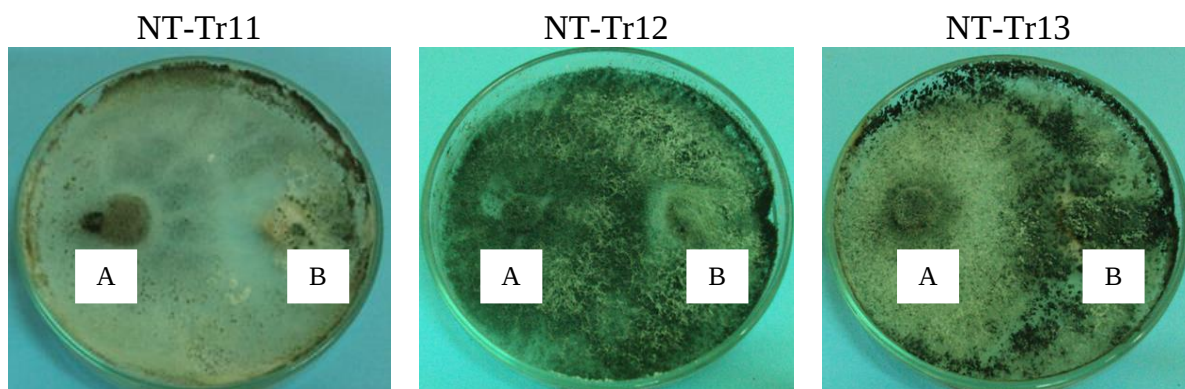
Đặc biệt 3 chủng Tr11, Tr12, Tr13 là những chủng có khả năng đối kháng mạnh và nhanh hơn so với những chủng còn lại khi tại thời điểm 5 ngày thì cả 3 chủng này đã cho hiệu suất đối kháng mạnh với H > 60% và tại thời điểm 7 ngày của thí nghiệm thì đã đạt hiệu suất đối kháng 100% (Hình 3.1).



Hình 1. Khả năng đối kháng mạnh với nấm *C. salmonicolor* của 3 chủng Tr11, Tr12 và Tr13

Nếu so về hiệu suất đối kháng thì cả ba chủng Tr11, Tr12 và Tr13 có hiệu suất khá tương đồng nhau. Tuy nhiên, so sánh Dtt tại thời điểm 3 ngày và 5 ngày của nấm *C. salmonicolor* của các nghiệm thức NT-Tr11, NT-Tr12, NT-Tr13 ta thấy chỉ có ở

ng nghiệm thức NT-Tr12 là Dtt không thay đổi (bảng 2). Nguyên nhân có thể là do chủng Tr12 bên cạnh khả năng đối kháng nấm bệnh bằng cơ chế cạnh tranh dinh dưỡng như các chủng khác còn có khả năng tiết ra chất đối kháng nào đó. Chính hoạt chất đối kháng này ở chủng Tr12 đã làm cho khuẩn lạc nấm *C. salmonicolor* không thể phát triển trước khi tiếp tục thực hiện đối kháng bằng cơ chế cạnh tranh dinh dưỡng. Kết quả này cũng phù hợp với công bố Cheng và cs khi tìm thấy một loại protein ngoại bào có tên là Th-L-AAO có khả năng làm phân hủy sợi nấm của chủng *Trichoderma harzianum* ETS 323 khi nghiên cứu khả năng đối kháng của chủng này với nấm *Botrytis cinerea* trong điều kiện in vitro.



Hình 2. Khả năng đối kháng của ba chủng Tr11, Tr12 và Tr13 với nấm *C. salmonicolor* sau 7 ngày. A: Vị trí đặt nấm *Trichoderma*; B: vị trí đặt nấm *C. salmonicolor*

3.3. Định danh chủng nấm Tr12 bằng phương pháp sinh học phân tử

Với những đặc điểm vượt trội về hiệu quả trong cơ chế đối kháng với nấm *C. salmonicolor* so với 2 chủng Tr11 và Tr13 nên chủng Tr12 được lựa chọn để định danh bằng sinh học phân tử. Kết quả giải trình tự 28s rRNA của chủng Tr12:

GTCCCGTTCCAGGGAACCTCGGGCGGCACCT
CACCAAAAGCATCCTCTACAAATTACAACCTCGGGC
CCTAGGGACCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTGCCG
CTTCACTCGCCGTTACTGGGGCAATCCCTGTTGG
TTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCA

GCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACATTTTC
AGAAGTTGGGTGTTTAACGGCTGTGGACGCGCCG
CGCTCCCAGATGCGAGTGTGCAAACTACTGCGCAG
GAGAGGCTGCGGCGAGACCGCCACTGTATTTTCG
GAGACGGCCACCGCCAAGGCAGGGCCGATCCCC
AACGCCGACCCCCCGAGGGGTTTCGAGGGTTGA
AATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGCCAGAATAC
TGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGA
TTCATCTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAT
TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGA
GATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTCGAAAC
GCCTACGAGAGGCGCCGAGAAGGCTCAGATTATA
AAAAAACCCGCGAGGGGGTATACAATAAGAGTTTT

GGTTGGTCCTCCGGCGGGCGCCTTGGTCCGGGG
 TCGACGCACCCGGGGCAGAGATCCCGCCGAGG
 CAACAGTTTGGTAACGTTACATGGGGTTTGGGA
 GTTGTAACCTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCA
 CCAACGGAGACCTTGTACGACTTTTACTTCCTCT
 AAATGACCGAGTTTGGAGAGCTTCCGGCCCTGA
 GTGGTAGTTGCCACCTC

Kết quả tra cứu trên BLAST SEARCH thì chủng Tr12 có trình tự 28S rRNA tương đồng tới 99% với trình tự 28S rRNA của chủng *Trichoderma harzia-num* CKP01.

4. KẾT LUẬN

– Phân lập được 14 chủng *Trichoderma* từ các vùng nông nghiệp thuộc các huyện Bắc Tân Uyên, Bàu Bàng, Phú Giáo (Bình Dương).

– Khảo sát khả năng đối kháng của 14 chủng nấm *Trichoderma* với nấm *C. salmonicolor* gây bệnh nấm hồng trên cây cao su (*Hevea brasiliensis*) với kết quả là 13/14 chủng có khả năng đối kháng mạnh khi đạt hiệu suất đối kháng 100% chỉ sau 7 ngày thí nghiệm. Trong đó chủng Tr12 có khả năng đối kháng tốt nhất so với các chủng còn lại.

– Gửi chủng Tr12 định danh bằng sinh học phân tử với kết quả tra cứu trên BLAST SEARCH là trình tự 28S rRNA của chủng Tr12 tương đồng tới 99% so với trình tự 28S rRNA của chủng *Trichoderma harzianum* CKP01.

ANTAGONISM OF TRICHODERMA SPP. AGAINST CORTICIUM SALMONICOLOR OF PINK DISEASE IN RUBBER TREE

Nguyen Anh Dung

ABSTRACT

On the PGA culture medium, the research investigated the antagonism of 14 Trichoderma strains, isolated in agricultural lands of Binh Duong province, against Corticium salmonicolor of pink disease in rubber tree. The in-vitro essays indicated that almost Trichoderma strains, especially Tr12 (the 28S rRNA sequence is similar to Trichoderma harzianum CKP01 at 99%) with various of antagonistic mechanisms, had strongly antagonised Corticium salmonicolor with 100% of antagonistic efficiency after 7 days of incubation.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] 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, thế giới vi sinh vật*, NXB Khoa học và Kỹ thuật.
- [2] 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.
- [3] Bùi Xuân Đồng, Nguyễn Huy Văn (2000), *Vi nấm dùng trong công nghệ sinh học*, NXB Giáo dục.
- [4] Nguyễn Văn Đình và cs (2007), *Giáo trình biện pháp sinh học bảo vệ thực vật*, NXB Nông Nghiệp.
- [5] Trần Thu Hà, 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.
- [6] Nguyễn Đức Lượng, Phan Thị Huyền, Nguyễn Ánh Tuyết (2003), *Thí nghiệm công nghệ sinh học (tập 2) – Thí nghiệm vi sinh vật học*, NXB Đại học Quốc gia TP.HCM.

- [7] Lương Đức Phẩm (2011), *Sản xuất và sử dụng chế phẩm sinh học trong nông nghiệp*, NXB Giáo dục Việt Nam.
- [8] Trần Thanh Thủy (1999), *Hướng dẫn thực hành vi sinh vật*, NXB Giáo dục.
- [9] Trần Linh Thuộc (2006), *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*, NXB Giáo dục.
- [10] Anna-Elisabeth Jansen (2005), *Recommendations for the Common Code for the Coffee Community-Initiative Final Version*, trang 55 – 60.
- [11] Chen CH et al (2012), *Antagonism of Trichoderma harzianum ETS 323 on Botrytis cinerea mycelium in culture conditions*, The American phytopathological society vol 102, Pages 1054 – 1063.
- [12] Lester W. Burgess, Timothy E. Knight, Len Tesoriero, Phan Thuy Hien (2009), *Cẩm nang chuẩn đoán cây bệnh ở Việt Nam*, Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia.
- [13] Ram Ved, Sharma I. M. (2010), *Isolation, identification and evaluation of potential biocontrol agents against major cankers in apple*.
- [14] Robert A. Samson et al (2004), *Introduction Food – Borne Fungi*, CBS, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.
- [15] Jacques Avelino, G. Martijn ten Hoopen and Fabrice A. J. DeClerck (2011), *Ecological Mechanisms for Pest and Disease Control in Coffee and Cacao Agroecosystems of the Neotropics*. Trang 91 - 118
- [16] <http://nongnghiep.vn/nongnghiepvvn/72/45/45/111376/Benh-nam-hong-hai-cay-cao-su-va-cach-phong-tri.aspx>

- Ngày nhận ngày 8/01/2016
- Chấp nhận đăng: 15/02/2016