

SÀNG LỌC MỘT SỐ CHỦNG TRICHODERMA SP. ĐỐI KHÁNG VỚI COLLETOTRICHUM SP. GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN CÂY ỚT TRỒNG Ở BÌNH DƯƠNG

Trần Ngọc Hùng, Phan Trọng Nhân, Ngô Thị Lành,
Nguyễn Thị Minh Thanh, Hoàng Thị Xuân

Trường Đại học Thủ Dầu Một

TÓM TẮT

Bệnh thán thư là nguyên nhân gây thiệt hại lớn trên ớt cay (*Capsicum frutescens*). Trong xu hướng nông nghiệp hữu cơ, kiểm soát bệnh thán thư bằng *Trichoderma* là giải pháp đang nhận được nhiều sự quan tâm. Kết quả phân lập từ 5 mẫu ớt trồng ở tỉnh Bình Dương bị bệnh thán thư cho thấy *Colletotrichum truncatum* và *Colletotrichum acutatum* là các tác nhân gây bệnh phổ biến. Trong số 16 chủng *Trichoderma sp.* phân lập được từ các khu vực trồng rau màu tại Bình Dương, các chủng *Trichoderma koningii* T2.2, T4 và T5.1 có khả năng đối kháng đạt hiệu quả 100% với 5 chủng *Colletotrichum sp.* phân lập được sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường PGA. Kết quả này cũng cho thấy *Trichoderma koningii* hiện diện phổ biến và phù hợp với các điều kiện tự nhiên của Bình Dương.

Từ khóa: *Colletotrichum truncatum*, *Colletotrichum acutatum*,
đối kháng, nấm bệnh thán thư

*

1. Đặt vấn đề

Ớt cay không chỉ là loại cây gia vị rất phổ biến trong cuộc sống hằng ngày, gần đây, chúng còn được sử dụng trong công nghiệp chế biến thực phẩm và dược liệu. Chính vì thế, nhu cầu và diện tích trồng ớt ở nhiều nước có chiều hướng gia tăng. Diện tích trồng ớt tại Việt Nam khoảng 5.000 ha, được trồng chủ yếu tại 18 tỉnh thành trải dài từ bắc vào nam. Ở Bình Dương, ớt được trồng chủ yếu tại hai huyện Tân Uyên và Bến Cát với diện tích vào khoảng 15 ha^[7]. Cũng như nhiều loại cây trồng khác, chất lượng và sản lượng ớt bị đe dọa nghiêm trọng bởi các loại dịch bệnh như bệnh thán thư, bệnh đốm trắng lá, bệnh héo xanh, bệnh héo rũ, bệnh thối đọt non... Nguy

hiễm nhất trong số đó phải kể đến bệnh thán thư hay còn gọi là bệnh nở trái. Bệnh do nấm *Colletotrichum* gây ra. Chủng nấm này rất đa dạng và gây hại trên hầu hết các loại cây trồng^[3,4,6]. Trên ớt, bệnh xuất hiện trên cả thân, lá, và đặc biệt là trên trái, gây thiệt hại rất lớn cho các hộ trồng ớt, sản lượng có thể giảm từ 70-80%. 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. Sử dụng các chủng nấm *Trichoderma* để kiểm soát các loại nấm bệnh thực vật là một biện pháp an toàn và hiệu quả. Từ thực tế trên, chúng tôi đã nghiên cứu đề tài: *Sàng lọc một số chủng*

Trichoderma đối kháng với *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên cây ớt (*Capsicum frutescens*) tại Bình Dương.

Trong đề tài này, một mặt chúng tôi phân lập các chủng *Trichoderma* từ các khu vực trồng rau màu trên bàn tỉnh Bình Dương. Mặt khác, chúng tôi phân lập các chủng *Colletotrichum* gây bệnh thán thư từ các mẫu ớt, thu thập từ các chợ và nhà vườn trồng ớt trên địa bàn tỉnh Bình Dương. Mục tiêu của đề tài nhằm xác định các chủng *Trichoderma* có khả năng đối kháng tốt với các chủng *Colletotrichum* phân lập được bằng phương pháp nuôi cấy trên đĩa petri có chứa môi trường PGA.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

– Môi trường TSM: glucose (3g/l); MgSO₄.7H₂O (0,2g/l); KH₂PO₄ (0,9g/l); KCl (0,15 g/l); NH₄NO₃ (1g/l); chloramphenicol (0,25g/l); rose Bengal (0,15g/l); agar (20g/l)

– Môi trường PGA: khoai tây (200g/l); D-glucose (30g/l); agar (20g/l)

– Môi trường WA: agar (20g/l)

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập nấm bệnh^[2,6]

Thu nhận mẫu ớt bệnh tại các chợ và các nhà vườn. Nhẹ nhàng rửa đất khỏi mẫu bệnh. Kiểm tra và ghi lại các triệu chứng. Khử trùng bề mặt mẫu bệnh. Cắt mẫu bệnh thành những lát nhỏ và đặt lên môi trường thạch nước cất. Ủ ở nhiệt độ phòng (30-32°C) cho tới khi các khuẩn lạc xuất hiện. Làm thuần các mẫu nấm bệnh trên môi trường PGA.

2.2.2. Phương pháp lây bệnh nhân tạo^[2]

Gây vết thương trên trái ớt đang phát triển hoặc trái ớt đã thu hoạch. Dùng kim

nhọn cây một ít tơ nấm *Colletotrichum* vào vết thương. Mẫu đối chứng cũng được gây vết thương nhưng không chủng nấm bệnh. So sánh triệu chứng bệnh trên mẫu ớt được chủng nấm với mẫu đối chứng và triệu chứng thực tế thu nhận từ các chợ hoặc trên đồng ruộng.

2.2.3. Phương pháp phân lập *Trichoderma*^[1]

Mẫu đất được thu thập tại các khu vực nông nghiệp và pha loãng bằng nước cất vô trùng trong dãy nồng độ 10⁻¹; 10⁻²; 10⁻³. Hút 0,1ml ở mỗi nồng độ trải đều lên các đĩa petri có chứa môi trường TSM. Ủ ở nhiệt độ phòng (30-32°C). Sau 3-4 ngày, chọn những khuẩn lạc rời, đặc trưng cho nấm *Trichoderma* cấy qua môi trường TSA. Các chủng nấm *Trichoderma* sau khi làm thuần được cấy vào các ống thạch nghiêng chứa môi trường PGA.

2.2.4. Phương pháp xác định hiệu quả đối kháng của *Trichoderma* với nấm bệnh trên môi trường PGA^[5,6]

Cắt những miếng thạch có diện tích bằng nhau (0,5x0,5cm) có chứa nấm bệnh và *Trichoderma* trên các đĩa giống trung gian. Đặt các khối thạch lên đĩa petri có chứa môi trường PGA để tiến hành đối kháng. Hằng ngày, xác định hiệu quả đối kháng *Colletotrichum* của các chủng *Trichoderma*. Hiệu quả đối kháng được tính theo công thức: $H = (Dđc - Dtt) / Dđc \times 100 (\%)$. Với Dđc là bán kính khuẩn lạc nấm bệnh trên đĩa đối chứng; Dtt là bán kính khuẩn lạc nấm bệnh trên đĩa thử thật.

2.2.5. Phương pháp định danh *Trichoderma* sp. và *Colletotrichum* sp.

Giải trình tự rRNA 28S các chủng bằng kỹ thuật PCR. So sánh trình tự rRNA 28S trên cơ sở dữ liệu BLAST SEARCH.

3. Kết quả

3.1. Phân lập và làm thuần nấm bệnh *Colletotrichum*

Phân lập và làm thuần

Từ 5 mẫu ớt bệnh thu nhận được từ các chợ bán lẻ và nhà vườn (bảng 1), chúng tôi ghi nhận triệu chứng của các mẫu bệnh và tiến hành phân lập nấm bệnh trên môi trường PGA và môi trường thạch nước cất. Kết quả phân lập được 5 chủng nấm có đặc điểm tương tự *Colletotrichum*.

Nhìn chung, các chủng *Colletotrichum* sp. phân lập được có đặc điểm khá đa dạng, bán kính vòng tăng trưởng trên môi trường PGA đạt 1,2 – 4,1 cm sau 5 ngày nuôi cấy.

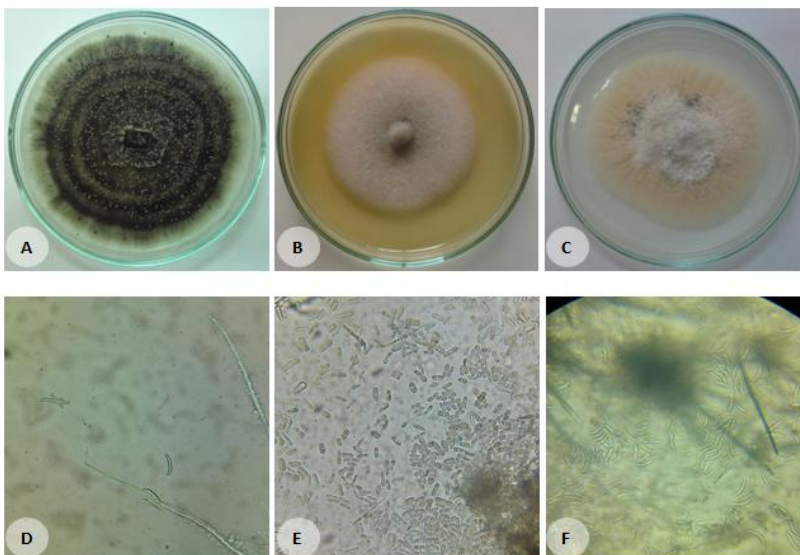
Chủng C1 và CH2 có hình thái tương tự nhau, khuẩn lạc màu xám đậm, tơ dạng bông xốp, phát triển đều từ tâm sau 3 ngày nuôi cấy. Từ ngày thứ 5 trở đi, bề mặt khuẩn xuất hiện những chấm nhỏ mọc nhô cao lên khỏi

mặt thạch, có màu đen (chủng C1) hoặc màu trắng đục (chủng CH2). Các chấm này là các đĩa cảnh tập trung một số lượng lớn bào tử của nấm. Quan sát dưới kính hiển vi, bào tử các chủng C1 và CH2 có dạng hình cong lưỡi liềm, không có vách ngăn, bên trong chứa nhiều giọt dầu (hình 2). Khuẩn ty màu trắng, lớn, không có vách ngăn.

Khuẩn lạc chủng C2 có màu cam nhạt, trong khi các chủng C4 và C5 có màu trắng sau 3 ngày nuôi cấy. Khuẩn lạc mọc tròn đều, trong một số trường hợp, chủng C5 mọc không đều, mép khuẩn lạc lượn sóng (hình 1). Từ ngày thứ 8 trở đi, bề mặt khuẩn lạc chủng C2 xuất hiện những chấm tròn màu đen, càng để lâu, khuẩn lạc chuyển dần sang màu hồng xám. Bào tử các chủng C2, C4 và C5 có dạng hình que dài, thuôn hai đầu, không có vách ngăn, bên trong chứa nhiều giọt dầu. Khuẩn ty màu trắng và không có vách ngăn (hình 2).

Bảng 1: Địa điểm thu mẫu ớt bệnh và kí hiệu các chủng *Colletotrichum* sp. phân lập

Mẫu bệnh	Địa điểm thu mẫu	Kí hiệu chủng phân lập
Trái ớt chỉ thiên chín	Chợ Vinh Sơn, đường Trần Văn Ơn, Thủ Dầu Một	C1
Trái ớt chỉ thiên chín	Chợ Hàng Bông, đường Phú Lợi, Thủ Dầu Một	CH2
Trái ớt chỉ thiên chín	Chợ Khiết Tâm, đường Lê Thị Hoa, Dĩ An	C2
Trái ớt sừng trâu chín	Chợ Đồng An 2, Thuận An	C4
Trái ớt chỉ thiên xanh	Nhà vườn tại Khánh Bình, Tân Uyên	C5



Hình 1. Khuẩn lạc và bào tử các chủng *Colletotrichum* sp. trên môi trường PGA sau 5 ngày nuôi cấy. A) khuẩn lạc *Colletotrichum* C1; B) khuẩn lạc *Colletotrichum* C4; C) khuẩn lạc *Colletotrichum* C5; D) bào tử chủng C1 hình cong lưỡi liềm, không có vách ngăn; E) bào tử chủng C2 có hình que ngắn, thuôn hai đầu, không có vách ngăn; F) bào tử chủng CH2 có hình cong lưỡi liềm, không có vách ngăn, các đĩa cảnh với tơ cứng màu đen.

Gây bệnh nhân tạo

Tất cả các chủng *Colletotrichum* sp. phân lập được đều có khả năng gây bệnh cho trái ớt sau thu hoạch và trái ớt đang phát triển với 100% số ớt gây nhiễm đều bị bệnh. Thời gian xuất hiện triệu chứng bệnh đồng tiền sau 1 – 4 ngày. Hầu hết vết bệnh có màu đậm ở chính giữa, xung quanh lõm xuống (hình 2). Càng về sau, vết bệnh thối nhũn, bề mặt vết bệnh xuất hiện những hạt nhỏ li ti màu đen hoặc màu cam, đó là các đĩa cảnh của nấm

Colletotrichum sp. So với triệu chứng của các mẫu bệnh trước khi phân lập, vết bệnh gây nhiễm không có sự khác biệt.

Kết quả phân tích trình tự rRNA 28S và tra cứu trên BLAST SEARCH một số chủng *Colletotrichum* phân lập được cho thấy chủng C1 và CH2 thuộc loài *Colletotrichum truncatum* với mức độ tương đồng 99%. Chủng C4 thuộc loài *Colletotrichum acutatum* với mức độ tương đồng 99%.

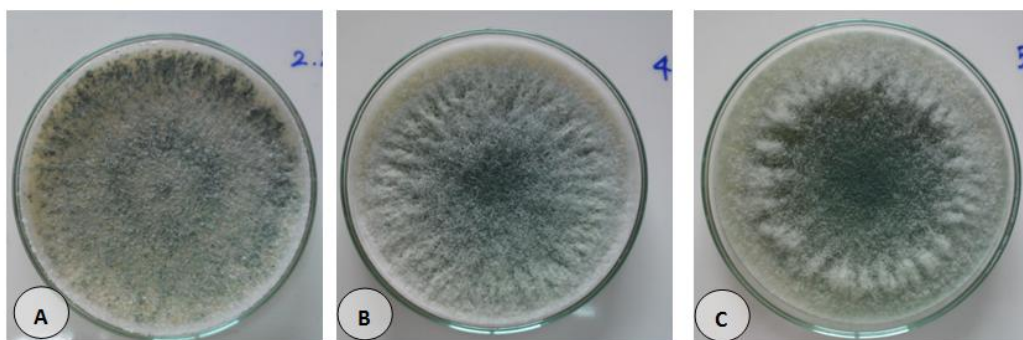


Hình 2. Gây bệnh nhân tạo các chủng *Colletotrichum* sp. trên cây thực tế. A) chủng C1 gây bệnh trên trái ớt xanh; B) chủng C2 gây bệnh trên trái ớt xanh; C) chủng C5 gây bệnh trên trái ớt chín.

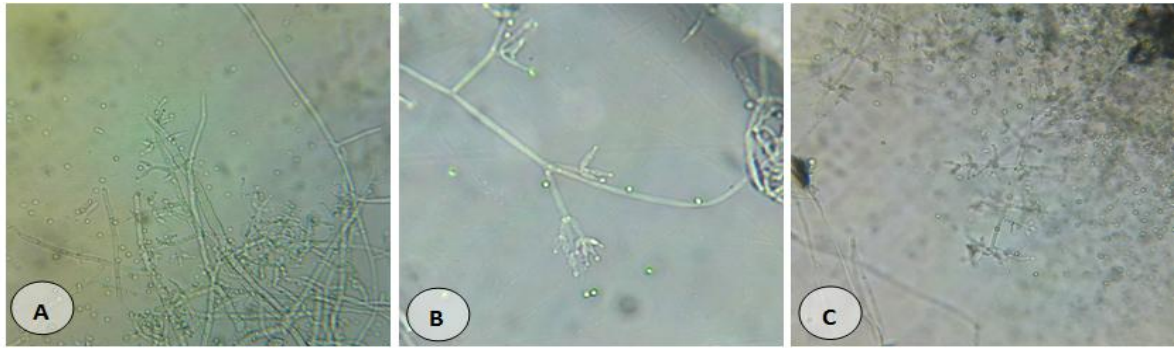
3.2. Phân lập và làm thuần nấm *Trichoderma*

Từ 11 mẫu đất thu nhận tại các khu vực trồng rau màu trên địa bàn tỉnh Bình Dương, chúng tôi phân lập được 16 chủng *Trichoderma* sp.. Trong mỗi mẫu đất có từ 1- 2 chủng. Nhìn chung, *Trichoderma* có mặt trong nhiều loại đất khác nhau với pH trong khoảng 6,8 – 7,5, độ ẩm 18 – 25%. Mật độ *Trichoderma* khoảng 10^2 – 10^3 CFU/g, chiếm khoảng 10 – 20% so với tổng số nấm sợi có trong đất.

Hầu hết các chủng *Trichoderma* sp. có tốc độ phát triển nhanh, đường kính vòng tăng trưởng đạt 8 – 10 cm sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường PGA. Bào tử hình thành sau 3 – 4 ngày nuôi cấy, một số chủng hình thành bào tử sau 2 ngày nuôi cấy (chủng T5.1, T6.2 và T7.1). Màu sắc bào tử thay đổi từ xanh nhạt (chủng T6.1 và T12) cho đến xanh oliu đậm (hình 3). Cấu trúc cuống sinh bào tử của các chủng không có sự khác biệt đáng kể, có thể quan sát thấy rõ các thể bình đặc trưng của chi *Trichoderma* (hình 4).



Hình 3. Khuân lác các chủng *Trichoderma* sp. trên môi trường PGA. A) chủng T2.2; B) chủng T4; C) chủng T5.1



Hình 4. Bào tử các chủng *Trichoderma* sp. trên môi trường PGA.

A) chủng T2.1; B) chủng T3.2; C) chủng T5.1

3.3. Chọn lọc các chủng *Trichoderma* có khả năng đối kháng tốt với các chủng *Colletotrichum* trên môi trường PGA

Các chủng nấm bệnh trước từ 2 – 3 ngày, tương ứng với đường kính vòng

tăng trưởng khoảng 2 cm. Sau đó cấy các chủng *Trichoderma* sp. và ghi nhận khả năng đối kháng sau 5 ngày nuôi cấy.

Bảng 2. Hiệu quả đối kháng (%) của các chủng *Trichoderma* sp. với *Colletotrichum* sp. sau 5 ngày trên môi trường PGA

Chủng <i>Trichoderma</i> sp.	Hiệu quả đối kháng với các chủng <i>Colletotrichum</i> sp. (%)				
	Chủng C1	Chủng C2	Chủng CH2	Chủng C4	Chủng C5
T2.1	63,0 ± 8,0	75,9 ± 3,5	61,1 ± 3,9	89,8 ± 2,6	84,3 ± 3,5
T2.2	60,2 ± 4,7	100,0 ± 0,0	93,5 ± 6,6	100,0 ± 0,0	85,2 ± 4,7
T3.2	52,8 ± 2,3	87,0 ± 5,7	50,9 ± 1,3	96,3 ± 5,2	100,0 ± 0,0
T4	91,7 ± 6,0	100,0 ± 0,0	84,3 ± 2,6	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
T5.1	95,4 ± 6,5	100,0 ± 0,0	78,7 ± 3,5	96,3 ± 5,2	97,2 ± 3,9
T5.2	68,5 ± 4,7	98,1 ± 2,6	53,7 ± 2,6	79,6 ± 8,6	100,0 ± 0,0
T6.1	100,0 ± 0,0	75,9 ± 2,6	77,8 ± 0,0	100,0 ± 0,0	81,5 ± 2,6
T6.2	83,3 ± 6,8	100,0 ± 0,0	75,0 ± 6,0	75,0 ± 3,9	78,7 ± 1,3
T7.1	53,7 ± 3,5	66,7 ± 0,0	58,3 ± 4,5	90,7 ± 6,9	97,2 ± 3,9
T7.2	46,3 ± 2,6	63,9 ± 2,3	74,1 ± 3,5	65,7 ± 5,7	76,9 ± 1,3
T8.1	50,0 ± 2,3	70,4 ± 2,6	100,0 ± 0,0	62,0 ± 5,2	74,1 ± 1,3
T8.2	46,3 ± 2,6	100,0 ± 0,0	95,4 ± 6,5	77,8 ± 3,9	100,0 ± 0,0
T9	82,4 ± 3,5	76,9 ± 3,5	100,0 ± 0,0	88,9 ± 8,2	100,0 ± 0,0
T10	57,4 ± 1,3	74,1 ± 3,5	55,6 ± 0,0	64,8 ± 2,6	75,9 ± 1,3
T11	57,4 ± 1,3	75,9 ± 3,5	62,0 ± 9,2	64,8 ± 1,3	75,9 ± 3,5
T12	34,5 ± 4,5	65,7 ± 1,3	58,3 ± 2,3	65,7 ± 1,3	68,5 ± 1,3

Tất cả các chủng *Trichoderma* phân lập được đều có khả năng đối kháng với các chủng *Colletotrichum* ở các mức độ khác nhau (hình 5). Các chủng *Trichoderma* T7.1, T8.1, T10 và T11 có khả năng đối kháng *Colletotrichum* theo cơ chế cạnh

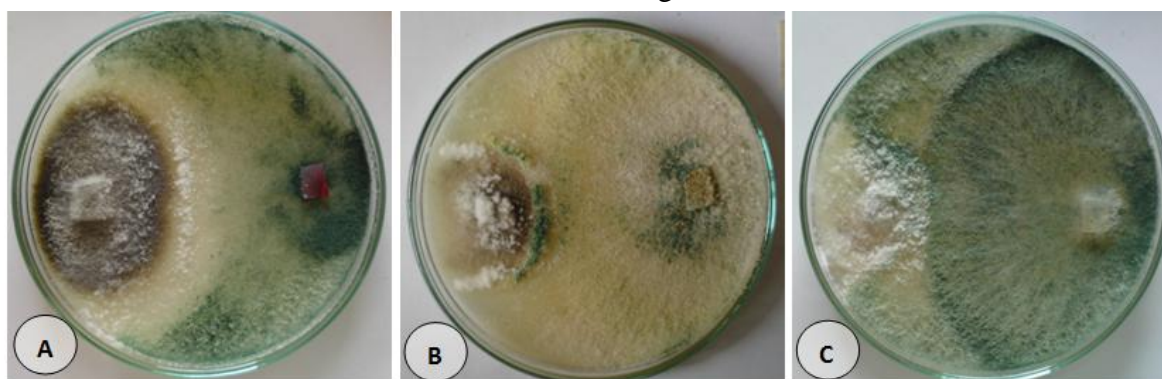
tranh dinh dưỡng và không gian sống, nhờ vào tốc độ phát triển nhanh. Bên cạnh tốc độ phát triển nhanh, các chủng *Trichoderma* còn lại còn có khả năng kí sinh trên khuẩn ty nấm bệnh. Khuẩn ty *Trichoderma* áp sát và quấn chặt lấy khuẩn

ty *Colletotrichum*, hoặc tiết enzyme và ăn sâu vào bên trong khuẩn ty nấm bệnh (hình 6). Trong một số trường hợp, rất có thể *Trichoderma* hút các chất dinh dưỡng từ khuẩn ty nấm bệnh và phát triển rất mạnh, tạo nhiều bào tử hơn so với khi phát triển trên môi trường PGA (T2.2 và T8.2).

Trong số 16 chủng *Trichoderma* sp. khảo sát, chủng T4 và T5.1 có khả năng đối kháng đạt hiệu quả tối đa với 4 chủng *Colletotrichum* (C1, C2, C4 và C5), chủng

Trichoderma T2.2 đối kháng đạt hiệu quả 100% với 3 chủng *Colletotrichum* C2, CH2 và C4. Các chủng còn lại có khả năng đối kháng tốt với 1 hoặc 2 chủng *Colletotrichum*.

Kết quả phân tích trình tự rRNA 28S và tra cứu trên BLAST SEARCH cho thấy cả 3 chủng *Trichoderma* T2.2, T4 và T5.1 đều thuộc loài *Trichoderma koningii* (*Hypocera koningii*) với mức độ tương đồng 98%.



Hình 5. Đối kháng giữa các chủng *Trichoderma koningii* và *Colletotrichum* sp. trên môi trường PGA.
A) *Trichoderma* T5.1 và *Colletotrichum* C1; B) *Trichoderma* T2.2 và *Colletotrichum* C2;
C) *Trichoderma* T4 và *Colletotrichum* C4



Hình 6. Khuẩn ty của nấm *Trichoderma* sp. quấn chặt lấy khuẩn ty của *Colletotrichum* sp.
A) khuẩn ty *Trichoderma* T5.1 và *Colletotrichum* C1; B, C) khuẩn ty *Trichoderma* T4 và khuẩn ty *Colletotrichum* C4

4. Kết luận

Chúng tôi đã phân lập được 5 chủng *Colletotrichum* sp. từ các mẫu ớt bị bệnh thán thư tại Bình Dương. *Colletotrichum truncatum* có khuẩn lạc màu trắng đến xám, có các cấu trúc đĩa cạnh và tơ cứng,

khuẩn lạc hình thuyền cong, không có vách ngăn. *Colletotrichum acutatum* có màu sắc khuẩn lạc từ hồng đến cam, bào tử hình que, hai đầu tròn và không có vách ngăn. Các chủng *Colletotrichum* phân lập được có khả năng gây bệnh thán thư rất nhanh

trên cả trái đã thu hoạch và trái đang phát triển. Thời gian trái biểu hiện bệnh thán thư trong khoảng 2 - 5 ngày. Kết quả này cũng cho thấy *C. truncatum* và *C. acatatum* là tác nhân gây bệnh thán thư phổ biến trên cây ớt trồng tại Bình Dương.

Trong số 16 chủng *Trichoderma* sp. phân lập được từ các khu vực trồng rau màu tại Bình Dương, chúng tôi nhận thấy chủng *Trichoderma* T2.2, T4 và T5.1 có khả năng đối kháng đạt hiệu quả 100% với

5 chủng *Colletotrichum* sp. phân lập được sau 5 ngày nuôi cấy. Phân tích trình tự rRNA 28S và tra cứu trên BLAST SEARCH 4 chủng điển hình là *Trichoderma* T2.2, T4, T5.1 và T6.1 đều cho kết quả thuộc loài *Trichoderma koningii* (*Hypocera koningii*). Kết quả này cũng cho thấy *Trichoderma koningii* hiện diện phổ biến và phù hợp với các điều kiện tự nhiên của Bình Dương.

SCREENING SOME STRAINS OF *TRICHODERMA* SP. ANTAGONISTIC TO *COLLETOTRICHUM* SP. CAUSING ANTHRACNOSE IN CHILI PEPPER IN BINH DUONG

**Tran Ngoc Hung, Phan Trong Nhan, Ngo Thi Lanh,
Nguyen Thi Minh Thanh, Hoang Thi Xuan**

Thu Dau Mot University

ABSTRACT

Anthracnose causes great damage on chili pepper (Capsicum frutescens). In the trend of organic agriculture, anthracnose control by Trichoderma is the solution receiving much attention. Isolated results of 5 chili pepper samples grown in Binh Duong Province with anthracnose showed that Colletotrichum truncatum and Colletotrichum acatatum are common pathogens. Among 16 strains of Trichoderma sp. isolated from vegetable growing areas in Binh Duong, the strains of Trichoderma koningii T2.2, T4 and T5.1 are able to countervail with 100% efficiency to the 5 strains of isolated Colletotrichum sp. after 5 days of culturing on a PGA environment. The results also showed that Trichoderma koningii are commonly present and consistent with the natural conditions of Binh Duong.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Lâm Dũng chủ biên (2012), *Vi sinh vật học, phần 1: thế giới vi sinh vật*, NXB Khoa học và Kỹ thuật.
- [2] Lester W. Bugar, Timothy E. Knight, Len Tesoriero, Phan Thuy Hien (2009), *Cẩm nang chuẩn đoán cây bệnh ở Việt Nam*, Australian Centre for International Agricultural Research.
- [3] Damm, U., Woudenberg, J.H.C., Cannon, P.F. and Crous, P.W. (2009), *Colletotrichum species with curved conidia from herbaceous hosts*. Fungal Diversity 39: 45-87.
- [4] Hyde, K.D., Cai. (2009). *Colletotrichum – names in current use*, Fungal Diversity 39, page 147-182.
- [5] Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. (2009), *Characterization of Colletotrichum species associated with coffee berries in northern Thailand*, Fungal Diversity 39, page 89-109.
- [6] Vinod Tasiwal (2008), *Study on anthracnose – a postharvest disease papaya, Derpartment plant pathology*, College of Agriculture, Dharwad, University of Agricultural Science.
- [7] Lê Hoàng Vũ, *Trồng ớt chỉ thiên lai F1 Capri 45 lai cao*, truy cập ngày 18 tháng 5 năm 2012, <<http://nongnghiep.vn/nongnghiepvvn/72/2/2/94861/Trong-ot-chi-thien-lai-F1-Capri-45-lai-cao.aspx>>