

## **KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM *Penicillium digitatum* GÂY THỐI CAM CỦA DỊCH NUÔI NẤM *Trichoderma***

**Vũ Xuân Tạo<sup>1\*</sup>, Trần Bảo Trâm<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hiền<sup>1</sup>, Nguyễn Xuân Cảnh<sup>2</sup>, Thái Hạnh Dung<sup>3</sup>,  
Hoàng Phương Thảo<sup>3</sup>, Nguyễn Nhật Tân<sup>3</sup>, Nguyễn Trần Hà Anh<sup>3</sup>, Trần Văn Tuấn<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ KH&CN*

<sup>2</sup>*Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

<sup>3</sup>*Phòng Genomic, Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzyme và Protein,  
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội*

\*Tác giả liên hệ: taovx.tsa@gmail.com

Ngày nhận bài: 23.06.2020

Ngày chấp nhận đăng: 29.09.2020

### TÓM TẮT

Nấm *Trichoderma* được đánh giá là chi nấm có tiềm năng trong việc tạo chế phẩm sinh học do chúng an toàn và có khả năng đối kháng mạnh với nhiều loài nấm bệnh. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá khả năng kháng nấm *P. digitatum* của dịch nuôi nấm *Trichoderma* nhằm tìm kiếm các chủng nấm có tiềm năng ứng dụng vào sản xuất chế phẩm sinh học kháng nấm *P. digitatum* gây thối quả cam. Trong nghiên cứu này, 20 mẫu nấm *Trichoderma* (Tr.HG1 - Tr.HG20) đã được phân lập từ đất trồng cam tại tỉnh Hà Giang, trong đó có 2 mẫu nấm là Tr.HG6 và Tr.HG11 được đánh giá là có khả năng kháng mạnh với nấm *P. digitatum* gây thối quả cam (đường kính vòng kháng nấm tương ứng là  $64,0 \pm 1,0$  và  $45,3 \pm 1,5$ mm). Dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS của rDNA, 2 mẫu nấm Tr.HG6 và Tr.HG11 được xác định thuộc loài *Trichoderma asperellum*. Trên môi trường PDB, sau 72 giờ nuôi cấy ở 30°C, dịch nuôi cấy 2 chủng *T. asperellum* Tr.HG6 và Tr.HG11 thể hiện hoạt tính kháng *P. digitatum* mạnh nhất (đường kính vòng kháng nấm tương ứng là 64,0 và 45,3mm). Dịch nuôi cấy chủng *T. asperellum* Tr.HG6 có đặc tính bền nhiệt, giữ được hoạt tính cao ở 50°C. Đồng thời, dịch nuôi cấy chủng Tr.HG6 thể hiện hoạt tính ức chế khả năng gây bệnh của nấm *P. digitatum* trên cam. Nghiên cứu này đã tuyển chọn được 2 chủng nấm *T. asperellum* Tr.HG6 và Tr.HG11 có khả năng kháng nấm *P. digitatum* mạnh và có tiềm năng ứng dụng trong việc sản xuất chế phẩm sinh học.

Từ khóa: Bệnh thối cam, kháng nấm, *Penicillium digitatum*, *Trichoderma asperellum*.

### **Resistance to Orange-Rot Fungus *Penicillium digitatum* of Culture Solutions from *Trichoderma***

### ABSTRACT

*Trichoderma* is a genus of fungus potential for probiotic preparation because it is safe and has strong resistance against many fungal species. The objective of this study was to evaluate the *P. digitatum* antifungal ability of *Trichoderma* culture in order to find the potential fungal strains for the production of *P. digitatum* antifungal probiotics that cause orange rot. In this study, twenty *Trichoderma* samples (Tr.HG1 - Tr.HG20) were isolated from orange-growing soil in Ha Giang province, of which Tr.HG6 and Tr.HG11 samples were assessed as being highly resistant to *P. digitatum* causing orange rot (The diameters of the resistant zones were  $64,0 \pm 1,0$  and  $45,3 \pm 1,5$  mm, respectively). Based on the morphological characteristics and sequence of ITS region of rDNA, Tr.HG6 and Tr.HG11 samples were identified as *Trichoderma asperellum*. On PDB media, after 72 h of incubation at 30°C, cultures of two strains of *T. asperellum* Tr.HG6 and Tr.HG11 showed the strongest *P. digitatum* resistance (The diameters of the resistant zones were 64.0 and 45.3 mm, respectively). The culture solution of *T. asperellum* Tr.HG6 showed high thermal stability and had ability to keep its high activity at 50°C. Simultaneously, the culture solution of Tr.HG6 showed the inhibitory activity of *P. digitatum* on orange. This study was able to select two *T. asperellum* fungal strains, viz. Tr.HG6 and Tr.HG11, that had strong ability to resist fungi with great potential for applying into probiotic preparation.

Keywords: Orange-rot, antifungal activity, *Penicillium digitatum*, *Trichoderma asperellum*.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

*Penicillium* là chi nấm phổ biến và có mặt ở hầu hết các môi trường sống. Trong đó, nấm *P. digitatum* được coi là tác nhân nghiêm trọng nhất gây bệnh thối mốc xanh trên quả có múi (Vu & cs., 2018). Nhiều bằng chứng đã cho thấy rằng, các chất dễ bay hơi tiết ra từ mô tế bào quả có múi đóng vai trò quan trọng trong quá trình gây bệnh trên quả của nấm *P. digitatum* (Droby & cs., 2008). Nấm *P. digitatum* chỉ xâm nhiễm qua vết xước của quả có múi, các vết xước này có thể do côn trùng hoặc tác nhân vật lý gây ra. Nếu nấm nhiễm vào quả ở giai đoạn trước khi thu hoạch sẽ gây hiện tượng thối và rụng quả (Bautista-Baños, 2014). Bên cạnh việc tấn công làm hỏng quả, gây tổn thất về kinh tế, các sản phẩm trao đổi chất bậc hai do nấm sinh ra có thể gây ảnh hưởng tiêu cực đối với sức khỏe người tiêu dùng.

Hiện nay, phương pháp phổ biến để diệt các loại nấm bệnh trên cây trồng vẫn là sử dụng các loại thuốc hóa học diệt nấm. Mặc dù, việc sử dụng thuốc hóa học để diệt nấm gây bệnh trên cây trồng có ưu điểm là phổ rộng, hiệu quả và tác dụng nhanh. Tuy nhiên, sử dụng thuốc hóa học ngày càng bộc lộ rõ nhược điểm như hiệu quả phòng trừ thấp đối với các loại nấm bệnh trong đất, gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người, xuất hiện các chủng nấm bệnh kháng thuốc (Sharma & cs., 2009). Áp dụng biện pháp kiểm soát sinh học bằng cách sử dụng phân hữu cơ vi sinh, các chế phẩm vi sinh, chứa các chủng vi sinh vật hoặc các hoạt chất từ vi sinh vật có khả năng kháng các nấm gây bệnh là một trong những ưu tiên hàng đầu trong sản xuất các sản phẩm nông nghiệp sạch và an toàn (Palou & cs., 2008). Vi nấm *Trichoderma* được đánh giá là một chi nấm có khả năng kiểm soát sinh học tốt thông qua khả năng kháng lại một số nấm gây bệnh cây trồng nhờ các cơ chế kháng sinh, ký sinh và cạnh tranh (Verma & cs., 2007). Tại Việt Nam, nhiều nghiên cứu về nấm *Trichoderma* cho thấy tiềm năng của loài nấm này trong kiểm soát các loài nấm gây bệnh thực vật (Vũ Xuân Tạo & Trần Văn Tuấn, 2020; Nguyễn Đức Huy & cs.,

2017). Các chế phẩm chứa các chủng vi sinh vật cần một khoảng thời gian nhất định để đạt hiệu quả, do các chủng vi sinh vật này cần thời gian để sinh trưởng, sinh hoạt chất kháng nấm (Palou & cs., 2008). Do vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá khả năng kháng nấm *P. digitatum* của dịch nuôi nấm *Trichoderma* làm cơ sở khoa học cho việc tách chiết các hoạt chất kháng nấm *P. digitatum* từ dịch nuôi nấm *Trichoderma* hướng tới việc tạo chế phẩm có hiệu quả ức chế nấm *P. digitatum* ngay sau khi sử dụng.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Mẫu đất được thu thập tại các vườn trồng cam của huyện Bắc Quang, tỉnh Hà Giang dùng cho phân lập nấm *Trichoderma*.

Chủng nấm gây thối quả cam *P. digitatum* được cung cấp bởi Phòng Genomic, Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzyme và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Thu mẫu đất

Mẫu đất được thu tại khu vực vùng rẫy của các cây cam phát triển tốt, năng suất quả cao. Mỗi điểm thu đào xuống từ mặt đất 20-30cm và lấy khoảng 100g đất xung quanh vùng rẫy của cây. Mẫu được đựng trong túi polyetylen riêng biệt, ghi thời gian và địa điểm thu mẫu. Mẫu được bảo quản mát và được sử dụng để phân lập nấm *Trichoderma*.

#### 2.2.2. Phân lập và xác định đặc điểm hình thái của các mẫu nấm *Trichoderma*

Các mẫu đất sử dụng để phân lập các mẫu nấm *Trichoderma* được pha loãng bằng nước cất vô trùng đến các nồng độ khác nhau từ  $10^{-1}$  đến  $10^{-6}$ . Cây trải mẫu ở các nồng độ này trên môi trường PDA có bổ sung kháng sinh chloramphenicol (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Kháng sinh chloramphenicol có tác dụng kháng khuẩn, ngăn không cho vi khuẩn sinh trưởng. Các đĩa

được ủ ở 28°C cho đến khi thu nhận các khuẩn lạc nấm riêng rẽ. Các khuẩn lạc có sợi trắng, bào tử xanh hoặc xanh vàng được tách riêng, làm thuần và giữ trong ống nghiệm để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Các mẫu nấm sau thuần khiết được nuôi cấy trực tiếp trên tiêu bản hiển vi vô trùng có chứa môi trường PDA. Tiêu bản được giữ trong hộp nhựa vô trùng có bổ sung giấy thấm nước vô trùng để duy trì độ ẩm. Mẫu được ủ ở 28°C trong 2-3 ngày và hình thái của hệ sợi nấm và cuống sinh bào tử được quan sát dưới kính hiển vi (Vu & cs., 2018).

### 2.2.3. Thu bào tử nấm

Các mẫu nấm *Trichoderma* sp. đã phân lập được nuôi cấy trên môi trường PDA trong 5 ngày ở 28°C. Đĩa nuôi nấm được bổ sung nước cất vô trùng lên bề mặt đĩa, dùng que gạt vô trùng gạt tách bào tử ra khỏi hệ sợi nấm. Phần dịch được lọc bằng màng lọc Miracloth (Calbiochem, Đức) và thu vào ống falcon 50ml, sau đó ly tâm ở tốc độ 4.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút, đổ bỏ dịch rồi bổ sung nước cất vô trùng vào ống. Dịch bào tử nấm được tiến hành xác định nồng độ bằng buồng đếm Thoma, sau đó pha loãng đến nồng độ thích hợp để sử dụng. Dịch bào tử được bảo quản ở 4°C để sử dụng trong thời gian ngắn hoặc trong glycerol 20% ở -30°C trong thời gian dài (Vu & cs., 2018).

### 2.2.4. Đánh giá khả năng kháng nấm *P. digitatum* của dịch nuôi các mẫu nấm *Trichoderma*

Đánh giá kháng nấm *P. digitatum* của dịch nuôi các mẫu nấm *Trichoderma* được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (Balcázar & cs., 2006). 500µl dịch bào tử ( $10^6$  bào tử/ml) mỗi mẫu nấm *Trichoderma* được nuôi trong 50ml môi trường PDB lỏng, lắc 200 vòng/phút ở 30°C trong 72 giờ. Dịch nuôi các mẫu nấm được ly tâm 12.000 vòng/phút trong thời gian 30 phút ở 4°C để loại bỏ bào tử và hệ sợi nấm. Bổ sung 50 µl dịch nuôi cấy mỗi mẫu nấm *Trichoderma* vào mỗi lỗ trên đĩa thạch PDA đã được cấy trải 50µl dịch bào tử nấm *P. digitatum* ( $10^6$  bào tử/ml), ủ ở 4°C trong 4 giờ để dịch nuôi khuếch tán vào môi trường, sau đó đĩa

được giữ ở 25°C. Đường kính vòng kháng nấm được xác định sau 4-5 ngày. Dịch nuôi mỗi mẫu nấm *Trichoderma* được thử khả năng kháng nấm *P. digitatum* trên 10 đĩa petri và thí nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập.

### 2.2.5. Định danh nấm *Trichoderma* dựa trên trình tự vùng ITS rDNA

DNA hệ gen của các mẫu nấm *Trichoderma* tuyển chọn được tách chiết theo quy trình của nhóm nghiên cứu đã công bố (Tran & cs., 2017). Vùng ITS của rDNA được khuếch đại từ DNA hệ gen bằng PCR sử dụng cặp mồi đa năng đặc hiệu cho phổ rộng các loài nấm gồm: mồi xuôi ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) và mồi ngược ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATAT GC) (White & cs., 1990). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR như sau: 94°C (3 phút); 35 chu kỳ của 94°C (30 giây), 58°C (30 giây), 72°C (30 giây); 72°C (10 phút). Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0,7% và tinh sạch bằng kit tinh sạch của hãng Promega (Mỹ). Mẫu DNA tinh sạch được giải trình tự bởi công ty 1st BASE (Singapore) và trình tự ITS được phân tích so sánh với cơ sở dữ liệu của GenBank. Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA6.

### 2.2.6. Đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy nấm *Trichoderma* tới hoạt tính kháng *P. digitatum*

500µl dịch bào tử ( $10^6$  bào tử/ml) mỗi chủng nấm *Trichoderma* được nuôi trong 50ml môi trường PDB lỏng, lắc 200 vòng/phút ở 30°C sau 24, 48, 72 và 96 giờ. Hoạt tính kháng nấm của dịch nuôi các chủng nấm được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (Balcázar & cs., 2006).

### 2.2.7. Đánh giá độ bền nhiệt của dịch nuôi nấm *Trichoderma*

Dịch nuôi mỗi chủng nấm *Trichoderma* được tiến hành xử lý nhiệt ở 30, 40, 50 và 60°C trong thời gian 30 phút. Độ bền nhiệt của dịch nuôi mỗi chủng nấm *Trichoderma* được đánh giá thông qua khả năng kháng nấm *P. digitatum*.

Hoạt tính kháng nấm được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (Balcázar & cs., 2006).

### 2.2.8. Đánh giá khả năng kháng nấm *P. digitatum* trên cam của dịch nuôi nấm *Trichoderma*

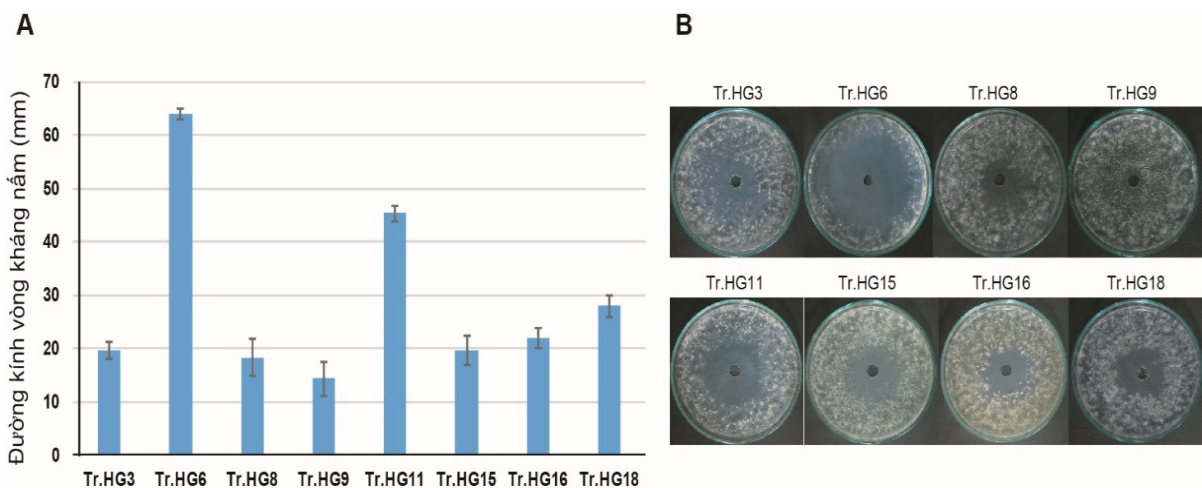
Quả cam được làm sạch bằng nước cất vô trùng và ethanol 70%, sau đó tạo vết thương xâm nhiễm bằng tăm vô trùng. Quả cam được ngâm trong dịch nuôi nấm *Trichoderma* 1 giờ và để khô tự nhiên. Tiến hành lây nhiễm 10µl dịch bào tử nấm *P. digitatum* (nồng độ  $10^6$  bào tử/ml) trên cam. Phương pháp lây nhiễm nấm *P. digitatum* trên quả cam được tiến hành theo quy trình nhóm nghiên cứu đã công bố (Vu & cs., 2018). Mẫu quả cam đối chứng được ngâm trong nước cất vô trùng. Quả cam sau lây nhiễm được giữ trong hộp kín vô trùng ở 25°C và quan sát sau 3-5 ngày.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Phân lập và tuyển chọn nấm *Trichoderma* kháng nấm *P. digitatum*

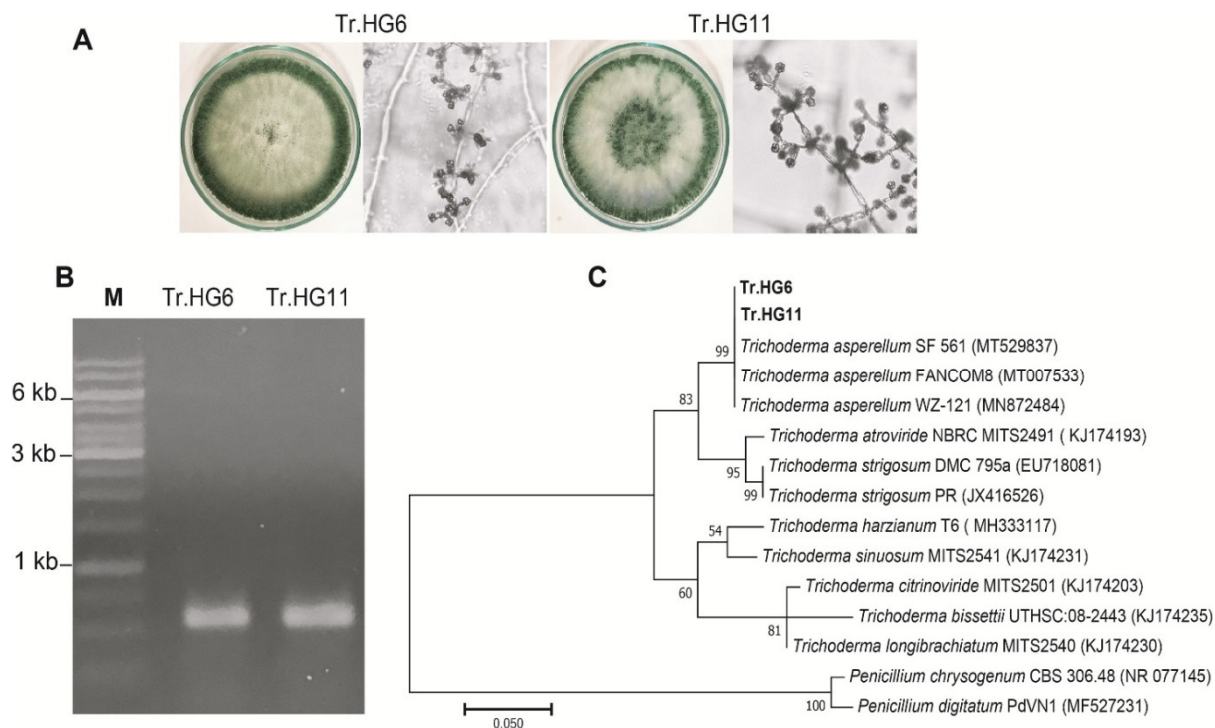
Từ các mẫu đất thu tại vùng rễ các cây cam phát triển mạnh, chúng tôi đã được phân lập được 20 mẫu nấm có đặc điểm giống với *Trichoderma*. Sau 3-5 ngày nuôi cấy trên môi

trường PDA ở 28°C, các mẫu nấm đã phân lập hình thành hệ sợi màu trắng, trên hệ sợi hình thành bào tử màu xanh nhạt tới đậm hoặc màu vàng nhạt lan phủ toàn bộ bề mặt đĩa thạch tạo thành các vòng tròn đồng tâm. Các đặc điểm này là đặc điểm đặc trưng của nấm *Trichoderma* (Kubicek & Harman, 1998). Dịch nuôi 20 mẫu nấm này được đánh giá khả năng kháng nấm gây thối cam *P. digitatum* bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Kết quả nghiên cứu cho thấy, có 8 mẫu nấm có hoạt tính kháng nấm *P. digitatum* bao gồm các mẫu nấm Tr.HG3, Tr.HG6, Tr.HG8, Tr.HG9, Tr.HG11, Tr.HG15, Tr.HG16 và Tr.HG18 (Hình 1). Trong số 8 mẫu này, dịch nuôi 2 mẫu Tr.HG6 và Tr.HG11 thể hiện hoạt tính kháng nấm *P. digitatum* mạnh nhất với đường kính vòng kháng nấm tương ứng là  $64,0 \pm 1,0$  và  $45,3 \pm 1,5$ mm, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ). Ngoài cơ chế ký sinh và cạnh tranh giúp cho nấm *Trichoderma* có khả năng kháng lại một số nấm gây bệnh trên cây trồng thì việc các loài nấm *Trichoderma* có khả năng tiết các chất kháng sinh, enzyme, chất chống nấm cũng bước đầu được nghiên cứu (Verma & cs., 2007). Như vậy rất có thể, dịch nuôi 2 mẫu Tr.HG6 và Tr.HG11 chứa các chất kháng nấm tiềm năng cho việc kiểm soát vi nấm *P. digitatum* gây thối và rụng quả có múi.



Ghi chú: (A) Kích thước vòng kháng nấm *P. digitatum*; (B) Hình ảnh kháng nấm *P. digitatum* trên đĩa.

**Hình 1.** Khả năng kháng nấm *P. digitatum* của dịch nuôi 8 mẫu nấm *Trichoderma*



Ghi chú: (A) Hình thái chủng nấm trên đĩa và dưới kính hiển vi; (B) Kết quả PCR vùng ITS của rDNA; (C) Cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng ITS của rDNA; M: 1 kb DNA marker.

## Hình 2. Định danh chủng nấm Tr.HG6 và Tr.HG11 dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS của rDNA

### 3.2. Định danh chủng nấm Tr.HG6 và Tr.HG11

Để đảm bảo độ tin cậy của 2 mẫu nấm Tr.HG6 và Tr.HG11 dùng cho nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh kiểm soát nấm *P. digitatum* gây bệnh trên cam, chúng tôi tiến hành định danh 2 mẫu nấm trên dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS của rDNA. So với các gen 18S rRNA và 28S rRNA của rDNA, vùng ITS (gồm ITS1; 5,8S rRNA; ITS2) ở nấm có mức độ biến đổi cao hơn giữa các loài gần gũi. Do đó, vùng trình tự này được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu phân loại nấm (Curran & cs., 1994). Trên môi trường PDA, 2 mẫu nấm Tr.HG6 và Tr.HG11 đều hình thành bào tử màu xanh và hệ sợi nấm sinh trưởng tạo thành các vòng tròn đồng tâm. Khi quan sát dưới kính hiển vi với mức độ phóng đại 400 lần cho thấy hình dạng sợi nấm, cuống sinh bào tử có cấu trúc phân nhánh và có hình chai mang đặc trưng của nấm

*Trichoderma* (Kubicek & Harman, 1998) (Hình 2A). Đồng thời, 2 mẫu nấm được tiến hành tách chiết DNA hệ gen dùng cho phản ứng PCR khuếch đại vùng ITS với cặp mồi ITS1/ITS4. Kết quả khuếch đại vùng ITS với cặp mồi đa năng cho nấm là ITS1/ITS4 trên gel agarose chỉ ra 1 băng DNA duy nhất, có kích thước khoảng hơn 500bp (Hình 2B). Sản phẩm PCR vùng ITS được tinh sạch bằng kit tinh sạch của hãng Promega và được giải trình tự bởi Công ty Sinh hóa Phù Sa (Việt Nam). Trình tự ITS được so sánh với dữ liệu trong Ngân hàng Gen Quốc tế (GenBank) sử dụng chương trình BLAST. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp Neighbor-joining với độ tin cậy sử dụng mô hình sao chép mẫu (bootstrap) 1.000 lần. Hình cây phân loại được hoàn thiện với phần mềm xử lý ảnh Adobe Illustrator CS6. Kết quả phân tích cho thấy 2 mẫu nấm Tr.HG6 và Tr.HG11 thuộc loài *Trichoderma asperellum* với độ tương đồng về trình tự ITS là 100% (Hình 2C).

### 3.3. Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy nấm *Trichoderma* tới hoạt tính kháng nấm *P. digitatum*

Trong nghiên cứu này, hoạt tính kháng nấm *P. digitatum* gây thối cam của dịch nuôi 2 chủng nấm *T. asperellum* Tr.HG6 và Tr.HG11 được xác định ở các điều kiện thời gian nuôi cấy khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy, dịch nuôi cả 2 chủng nấm Tr.HG6 và Tr.HG11 đều đạt hoạt tính kháng *P. digitatum* mạnh sau khoảng thời gian nuôi cấy 72 giờ (đường kính vòng kháng nấm tương ứng là  $64,0 \pm 1,0$  và  $45,3 \pm 1,5$ mm), sau 96 giờ nuôi cấy, hoạt tính kháng nấm gần như không thay đổi (đường kính vòng kháng nấm tương ứng là  $64,0 \pm 3,4$  và  $45,3 \pm 2,5$ mm) (Hình 3). Thời gian thích hợp để 2 chủng nấm *T. asperellum* Tr.HG6 và Tr.HG11 sinh tổng hợp các hoạt chất kháng nấm là 72-96 giờ nuôi cấy. *Trichoderma* có khả năng sinh các chất chuyển hóa như: chất bay hơi, enzyme ngoại bào và các chất kháng sinh. Các chất này có tác dụng phá vỡ màng lipid, tham gia vào hoạt động đối kháng và cảm ứng kháng các tác nhân gây bệnh cây trồng (Saba & cs., 2012). Thời gian nuôi cấy là một trong những thông số chính của quá trình sản xuất chế phẩm vi sinh vì nó liên quan trực tiếp tới hoạt tính của vi sinh vật và quá trình vận hành máy móc thiết bị (Bajagai & cs., 2016). Việc rút ngắn thời gian nuôi cấy có ý nghĩa rất lớn trong sản xuất, giúp tiết kiệm chi phí, hạ giá thành sản phẩm. Như vậy, với kết quả nghiên cứu đạt được, thời gian thích hợp nhất để thu dịch nuôi 2 chủng nấm Tr.HG6 và Tr.HG11 là sau 72 giờ nuôi cấy

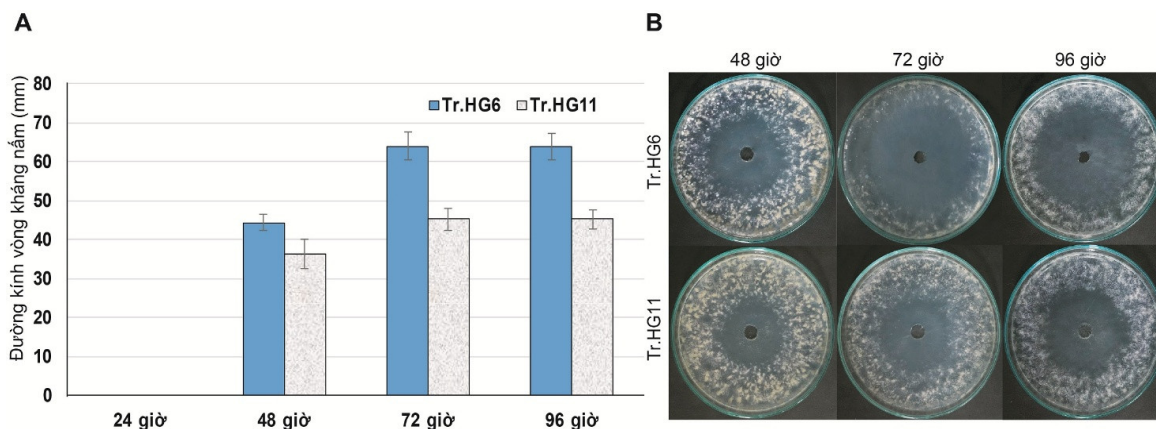
### 3.4. Độ bền nhiệt của dịch nuôi nấm *Trichoderma*

Kết quả nghiên cứu cho thấy, dịch nuôi chủng nấm Tr.HG6 khá bền nhiệt trong dải nhiệt độ từ 30-50°C, trong khi chủng Tr.HG11 mất hoàn toàn hoạt tính kháng nấm ở 50°C (Hình 4). Ở 30°C, đường kính vòng kháng nấm của dịch nuôi 2 chủng Tr.HG6 và Tr.HG11 tương ứng là  $64,0 \pm 1,0$  và  $45,3 \pm 1,5$ mm. Ở 40°C, đường kính vòng kháng nấm tương ứng là  $63,3 \pm 2,8$  và  $35,3 \pm 2,1$ mm và khi được xử lý nhiệt ở 50°C, kích thước vòng kháng nấm của chủng Tr.HG6 đạt

$33,6 \pm 1,1$ mm, chủng Tr.HG11 mất hoàn toàn hoạt tính kháng nấm sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ). Khả năng giữ được hoạt tính ở nhiệt độ cao là căn cứ quan trọng trong việc sử dụng dịch nuôi chủng nấm Tr.HG6 trong việc kiểm soát nấm *P. digitatum* gây bệnh ở cây cam trồng ngoài thực tế.

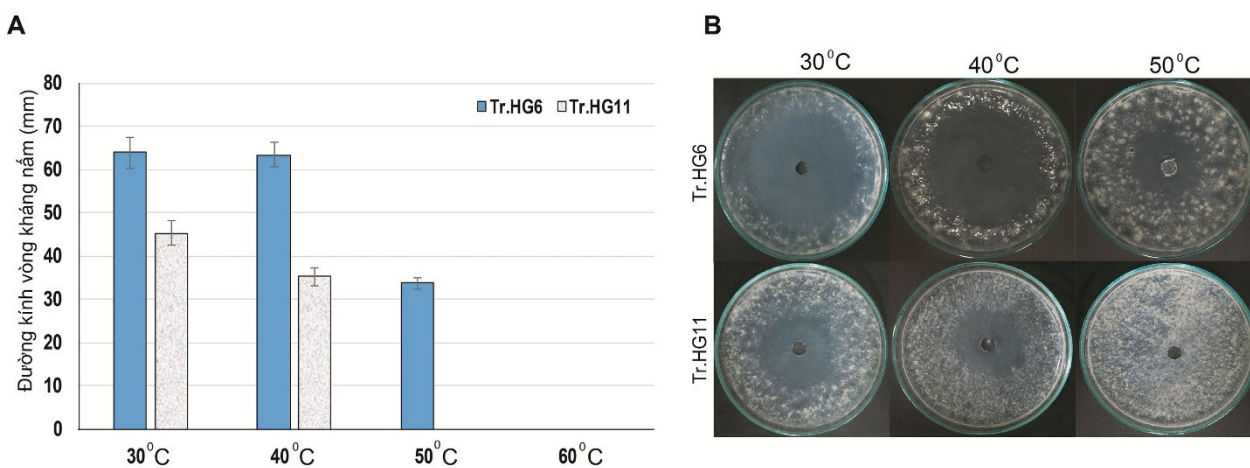
### 3.5. Khả năng kháng nấm *P. digitatum* trên cam của dịch nuôi chủng Tr.HG6

Dịch nuôi chủng *T. asperellum* Tr.HG6 được xác định có khả năng kháng mạnh nấm *P. digitatum* trên đĩa thạch, tuy nhiên khả năng kháng nấm trên cam là kết quả quan trọng nhằm định hướng ứng dụng dịch nuôi chủng nấm này vào thực tế sản xuất chế phẩm sinh học. Kết quả nghiên cứu sau 3-5 ngày cho thấy, trên các mẫu cam được xử lý với nước cất và dịch nuôi chủng Tr.HG6 không lây nhiễm bào tử nấm *P. digitatum* không có hiện tượng bất thường, chúng tỏ nước cất và dịch nuôi chủng Tr.HG6 không làm ảnh hưởng tới cam. Trên mẫu cam được xử lý với nước cất và lây nhiễm bào tử nấm *P. digitatum*, cam đã bắt đầu xuất hiện hiện tượng thối hỏng sau 3 ngày và sau 5 ngày cam đã bị thối 50% bề mặt quả, tuy nhiên trên mẫu cam xử lý với dịch nuôi chủng Tr.HG6 không thấy xuất hiện hiện tượng này (Hình 5). Như vậy, có thể thấy, dịch nuôi chủng Tr.HG6 không chỉ kháng nấm *P. digitatum* trên đĩa thạch mà còn kháng mạnh khi thử nghiệm trên cam. Khả năng kháng nấm *P. digitatum* của dịch nuôi chủng Tr.HG6 có thể là do chủng nấm này có khả năng sinh tổng hợp nhiều hoạt chất kháng nấm. Nấm *Trichoderma* có khả năng sinh một số chất như các chất bay hơi, enzyme ( $\beta$ -1,4-N-acetylglucosaminidase và endochitinase) và kháng sinh tham gia vào việc phá vỡ các cấu trúc tế bào của nấm bệnh và cảm ứng kháng các tác nhân gây bệnh của cây trồng (Saba & cs., 2012). Hiện nay ở Việt Nam, các nghiên cứu sử dụng vi sinh vật để kiểm soát nấm *P. digitatum* gây bệnh trên cam chưa có nhiều. Trong khi đó, cam là một trong những cây trồng phổ biến và diện tích trồng ngày càng mở rộng tại Việt Nam. Dịch nuôi chủng Tr.HG6 có thể sử dụng cho sản xuất chế phẩm vi sinh kháng nấm *P. digitatum* gây bệnh trên cam.



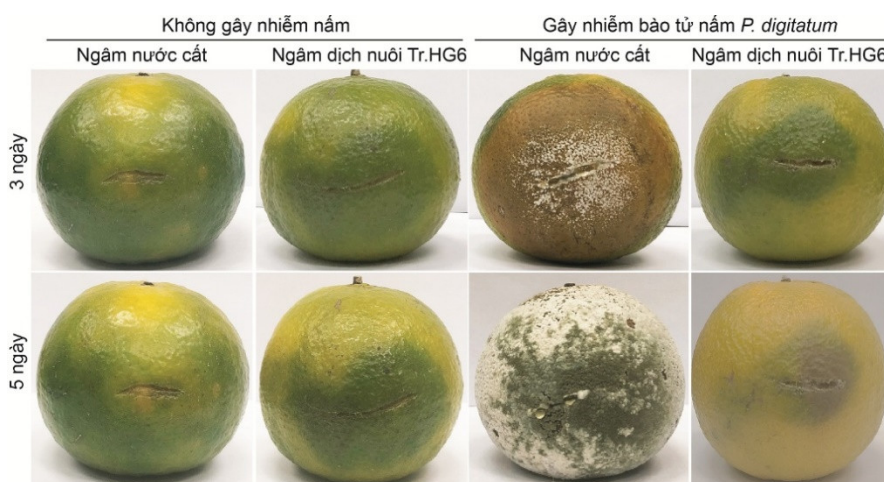
Ghi chú: (A) Kích thước vòng kháng nấm *P. digitatum*; (B) Hình ảnh kháng nấm *P. digitatum* trên đĩa.

**Hình 3. Hoạt tính kháng nấm *P. digitatum* của dịch nuôi các chủng nấm *Trichoderma* ở các khoảng thời gian nuôi cấy khác nhau**



Ghi chú: (A) Kích thước vòng kháng *P. digitatum* của dịch nuôi chủng *Tr.HG6* và *Tr.HG11* sau khi được xử lý nhiệt; (B) Hình ảnh kháng nấm trên đĩa thạch.

**Hình 4. Độ bền nhiệt của dịch nuôi các chủng nấm *Trichoderma***



**Hình 5. Khả năng kháng nấm *P. digitatum* trên cam của dịch nuôi chủng *Tr.HG6***

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã tuyển chọn được 2 mẫu nấm *Trichoderma* Tr.HG6 và Tr.HG11 có hoạt tính kháng nấm *P. digitatum* mạnh từ 20 mẫu nấm *Trichoderma* phân lập từ đất trồng cam tại tỉnh Hà Giang. Dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS của rDNA, 2 mẫu nấm *Trichoderma* Tr.HG6 và Tr.HG11 được xác định thuộc loài *Trichoderma asperellum*. Trên môi trường PDB, sau 72 giờ nuôi cấy ở 30°C, dịch nuôi cấy 2 chủng *T. asperellum* Tr.HG6 và Tr.HG11 thể hiện hoạt tính kháng *P. digitatum* mạnh nhất. Dịch nuôi cấy chủng *T. asperellum* Tr.HG6 có đặc tính bền nhiệt, giữ được hoạt tính cao ở 50°C. Đồng thời, dịch nuôi cấy chủng Tr.HG6 thể hiện hoạt tính ức chế khả năng gây bệnh của nấm *P. digitatum* trên quả cam. Chủng nấm *T. asperellum* Tr.HG6 có tiềm năng ứng dụng trong việc sản xuất chế phẩm sinh học dùng cho kiểm soát vi nấm *P. digitatum*.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ nhiệm vụ KH&CN cấp Bộ của Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ KH&CN. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bajagai Y., Klieve A., Dart P. & Bryden W. (2016) Probiotics in animal nutrition: Production, impact and regulation. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Balcázar J.L., De Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Cunningham D., Vendrell D. & Muzquiz J.L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol.* 114(3-4): 173-186.
- Bautista-Baños S. (2014). *Postharvest Decay, Control Strategies.* Elsevier.
- Curran J., Driver F., Ballard J.W.O. & Milner R.J. (1994). Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycological Research.* 98(5): 547-552.
- Droby S., Eick A., Macarasin D., Cohen L., Rafael G., Stange R., McColum G., Dudai N., Nasser A. & Wisniewski M. (2008). Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Postharvest Biology and Technology.* 49(3): 386-396.
- Kubicek C.P. & Harman G.E. (1998). *Trichoderma and Gliocladium.* Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor and Francis Ltd.
- Nguyễn Đức Huy, Phạm Quang Nguyên, Nguyễn Thị Thanh Hồng, Hà Giang, Nguyễn Văn Viên & Nguyễn Tất Cảnh (2017). Phân lập và đánh giá khả năng đối kháng của *Trichoderma asperellum* đối với tác nhân gây bệnh cây có nguồn gốc trong đất. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.* 15(12): 1593-1604.
- Palou L., Smilanick J.L. & Droby S. (2008). Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. *Stewart Postharvest Review.* 2(2): 1-16.
- Saba H., Vibhash D., Manisha M., Prashant K.S., Farhan H. & Tauseef A. (2012). *Trichoderma* - a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. *Mycosphere.* 3(4): 524-531.
- Sharma R., Singh D. & Singh R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control.* 50(3): 205-221.
- Tran V.T., Do T.B.X., Nguyen T.K., Vu X.T., Dao B.N. & Nguyen H.H. (2017). A simple, efficient and universal method for the extraction of genomic DNA from bacteria, yeasts, molds and microalgae suitable for PCR-based applications. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering.* 59(4): 66-74.
- Verma M., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. & Valero J.R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal.* 37(1): 1-20.
- Vu X.T., Ngo T.T., Mai T.D.L., Bui T.T., Le H.D., Bui T.V.H., Nguyen Q.H., Ngo X.B. & Tran V.T. (2018). A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using *DsRed* and *GFP* to visualize citrus host colonization. *Journal of Microbiological Methods.* 144: 134-144.
- Vũ Xuân Tạo & Trần Văn Tuấn (2020). Phân lập và tuyển chọn các chủng *Trichoderma* có khả năng đối kháng vi nấm gây bệnh trên cây cam. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ.* 36(3): 98-104.
- White T.J., Bruns T.D., Lee S.B. & Taylor J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* 18(1): 315.