

MIÊU TẢ LOÀI *Trichoderma atroviride* Karst. ỨNG DỤNG TRONG PHÒNG TRỪ SINH HỌC NẤM MỐC *Aspergillus flavus* HẠI NÔNG SẢN

TRẦN NGỌC LÂN, NGUYỄN THỊ THU

Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng

NGUYỄN THỊ THANH, HỒ THỊ NHUNG, NGUYỄN THỊ THUYẾT,
ĐÀO THỊ THANH XUÂN, THÁI THỊ NGỌC LAM, PHAN THỊ GIANG

Trường Đại học Vinh

Trichoderma sp. là một trong những loài nấm đứng đầu của hệ vi sinh vật đất, nó có tính đối kháng cao và đã được nghiên cứu rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới [6]. Trong tự nhiên nấm *Trichoderma* spp. là một loại vi sinh vật có lợi cho cây trồng. Chúng có khả năng phân giải các chất hữu cơ cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng và còn là một tác nhân sinh học đối kháng lại các loại nấm gây bệnh cho cây trồng tồn tại trong đất như *Rhizoctonia solani*, *Fusarium*, *Sclerotium rolfsii*, *Verticillium*, *Botrytis*... [2].

Cho đến nay, ở Việt Nam nấm *Trichoderma* xác định có ít nhất 33 loài, nhưng hướng ứng dụng nấm đối kháng *Trichoderma* trong kiểm soát sinh học nấm mốc *Aspergillus flavus* sinh độc tố aflatoxin trong nông sản chưa được quan tâm nghiên cứu. Hiện nay ở Việt Nam nghiên cứu sử dụng nấm đối kháng *Trichoderma* mới chỉ tập trung theo hướng phòng trừ nấm gây bệnh hại rễ cây trồng, phân hữu cơ vi sinh (ví dụ như BIMA, phân hữu cơ vi sinh TRICHOMIX,...).

Vùng Bắc Trung Bộ, nơi có khí hậu nhiệt đới nóng và ẩm, là 1 trong 2 vùng chính sản xuất cây có dầu (lạc, vừng) ở Việt Nam. Đây cũng là vùng mà sự phát triển của nấm mốc *Aspergillus flavus* và sự sản sinh độc tố aflatoxin của nấm mốc ở mức nghiêm trọng. Mặt khác, đây cũng là vùng có nhiều tiềm năng về nguồn lợi nấm đối kháng *Trichoderma*, vì sự khắc nghiệt của tự nhiên đã chọn tạo nên nhiều loài sinh vật đặc thù.

Kết quả điều tra thu thập nấm đối kháng *Trichoderma* trên đất trồng lạc ở 3 tỉnh của Bắc Trung Bộ là Nghệ An, Thanh Hoá, Hà Tĩnh từ năm 2011-2012 bước đầu đã xác định được 13 loài thuộc giống *Trichoderma* thuộc 3 section là (I) *Trichoderma* section *Trichoderma* (5 loài) (II) *Trichoderma* section *Pachybasium* (5 loài) (III) *Trichoderma* section *Longibrachiatum* (3 loài). Loài phổ biến nhất là *Trichoderma hamatum* (Bonord.) Bainier, *Trichoderma atroviride* Karst., *Trichoderma harzianum* Rifai.

Trong phạm vi bài viết này, chúng tôi mô tả một trong ba loài phổ biến đó là *Trichoderma atroviride* Karst. về vị trí phân loại, đặc điểm hình thái, khả năng đối kháng với nấm mốc *A. flavus* hại nông sản (lạc) và khả năng ứng dụng trong phân huỷ cellulose qua phân tích khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Phương pháp nghiên cứu phân lập, định loại, mô tả hình thái các loài *Trichoderma* dựa theo các tài liệu chuyên khảo nghiên cứu về vi sinh vật và nấm *Trichoderma* được công bố trên thế giới của các tác giả như Christan P. Kubicek and Gary E. Harman (2002), Nguyễn Lan Dũng (2006), B. Joshi, R. P. Bhatt, D. Bahukhandi (2010), G. J. Samuels *et al.* (2010).

- Đánh giá khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma* đối với nấm mốc *A. flavus* theo Ahmed Imtiaj, Tae-sô Lê (2008): $PIMG = (R1-R2)/R1 \times 100\%$

Trong đó: R1: Đường kính khuẩn lạc của *A. flavus* ở công thức đối chứng.

R2: Đường kính khuẩn lạc của *A. flavus* ở công thức xử lý *Trichoderma*.

PIMG (Percent Inhibition of Mycelial Growth): Chỉ số đối kháng của *Trichoderma*.

- Xác định hoạt độ cellulase: Một đơn vị hoạt tính (đvht) của enzyme cellulase được định nghĩa là số lượng enzyme cần thiết để giải phóng tương ứng với 1 μ mol glucose trên 1ml trong thời gian thủy phân 1 phút.

$$\text{Hoạt tính cellulase [IU = } \mu\text{mol/ml/phút]} = \frac{B \times 10^3}{180 \times 30}$$

Trong đó: B: Hàm lượng đường khử tính theo phương trình đường chuẩn glucose.

10³: Hệ số chuyển đổi; 180: Phân tử lượng của glucose; 30: Thời gian phản ứng.

Phương pháp xác định đường khử bằng Dinitro salicylic acid (DNS): Phương pháp này dựa trên phản ứng tạo màu giữa đường khử với thuốc thử DNS (3,5 Dinitrosalicylic acid). Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỷ lệ thuận với nồng độ đường khử trong một phạm vi nhất định. Dựa theo đồ thị đường chuẩn của glucose tinh khiết với thuốc thử DNS (3,5 Dinitrosalicylic acid) sẽ tính được hàm lượng đường khử của mẫu nghiên cứu.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Vị trí phân loại và đặc điểm hình thái, giải phẫu loài *Trichoderma atroviride* Karst.

1.1. Vị trí phân loại

- Giới (Kingdom): Nấm
- Ngành (Division): Ascomycota
- Ngành phụ (Suddivision): Pezizomycotina
- Lớp (Class): Sordariomycetes
- Bộ (Order): Hypocreales
- Họ (Family): Hypocreaceae
- Giống (Genus): *Trichoderma*
- Loài (Species): *Trichoderma atroviride* (Karst.) (1982)
- Dạng sinh sản hữu tính: *Hypocrea atroviridis* Dodd, Lieckfeldt et Samuels, Mycologia 95: 36. 003.

1.2. Đặc điểm hình thái và giải phẫu

Loài nấm *Trichoderma atroviride* được thu thập trên đất trồng lạc tại các tỉnh Thanh Hóa, Nghệ An, Hà Tĩnh.

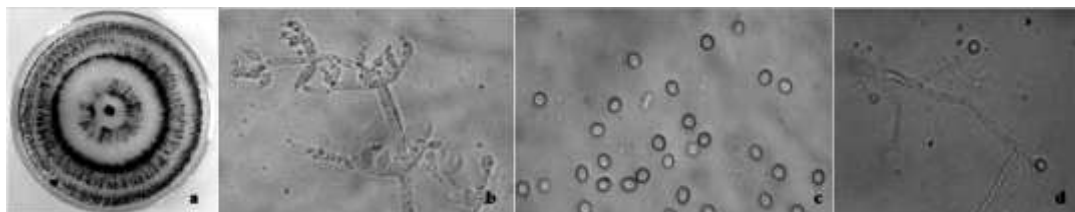
Bào tử (conidia) thường hình thành dày đặc, tạo lớp bông màu xanh. Bào tử màu xanh lá cây, hình gần cầu (subglobos) đến hình trứng (ovoidal), mịn, trơn nhẵn, kích thước 3,0-3,8 \times 2,8-3,5 μ m, tỷ lệ dài/rộng 1,0-1,3, khô.

Cuống đính bào tử (conidiophores) có thể mọc đơn nhưng phổ biến mọc thành cặp. Các nhánh phát sinh vuông góc hoặc gần vuông góc với trục chính. Sự phân nhánh thành cặp đối xứng là khá phổ biến.

Thể bình (Phialides) dài 6,0-9,7 μ m, tỷ lệ dài/rộng 2,5-3,5, điểm rộng nhất là ở phần gốc 1,7-2,5 μ m, tế bào hỗ trợ hình thành thể bình (supporting cell) kích thước 2,3-3,3 μ m; tỷ lệ chiều/chiều rộng tế bào hỗ trợ là 1,8-3,5, thẳng hoặc uốn lượn, đôi khi nổi; tạo 2-4 vòng xoắn, thường mọc đơn; phần cuối thể bình (terminal phialide) dạng vòng và đơn, thường hình trụ và hẹp tạo thành cổ hẹp; thể bình hình thành rộng phần giữa, hẹp phần đỉnh, nhỏ, mảnh ở phần gốc; các tế bào hỗ trợ tạo thể bình hầu hết rộng hơn so với phần gốc của thể bình. Thể bình mọc đôi/xen vào giữa (**Intercalary phialides**) không hình thành.

Bào tử hậu (Chlamydo spores) hình thành nhiều, sau khoảng 7 ngày, hình gần cầu (subglobose), đường kính 8,5-12,0 μ m.

Khuẩn lạc (Colony) phát triển nhanh trên môi trường PDA sau 72 giờ ở 25°C bán kính đạt 42,8-60,5mm, ở 35°C đạt 1,7-6,0mm. Nhiệt độ tối ưu khi nuôi cấy trên PDA là 25-30°C, sau 96 giờ ở 30°C trong bóng tối thì trên PDA khuẩn lạc phát triển nhanh chóng, bào tử nấm phát triển bao phủ gần như hoàn toàn bề mặt các đĩa petri đường kính 9cm, bào tử hình thành có mật độ khá dày đặc, tạo những vòng tròn đồng tâm hướng hướng ra ngoài mép đĩa. Bào tử màu xanh lá cây thường xuất hiện trong vòng (57-66) giờ trên PDA ở 30°C trong bóng tối.



Hình 1. Hình thái nấm *Trichoderma atroviride*

- a. Khuẩn lạc trên PDA; b. Cuống bào tử đỉnh (Conidiophores) và thể bình (Phialides);
c. Bào tử (conidia), d. Bào tử hậu (Chlamyospores).

Trên thế giới dạng sinh sản hữu tính (Teleomorph) là *Hypocrea atroviridis* được tìm thấy trên cây phong mục nát, phân bố được biết đến ở Hoa Kỳ, Trung Mỹ và Châu Âu. Dạng sinh sản vô tính (Anamorph) là loài nấm đất phổ biến *Trichoderma atroviride*, phổ biến trên toàn thế giới.

2. Đánh giá khả năng đối kháng của loài *Trichoderma atroviride* đối với *Aspergillus flavus* bằng phương pháp nuôi kép (chỉ số PIMG)

Bảng 1

Khả năng đối kháng của loài *T. atroviride* đối với *A. flavus* sau 7 ngày

TT	Tỉnh	Chủng	Tỷ lệ đối kháng (%)	Cấp độ đối kháng
1	Thanh Hoá	<i>Tri.020</i> (2).NC	100,00	++++
2		<i>Tri.011</i> (1).NC	100,00	++++
3		<i>Tri.009</i> (1).NC	83,40	++++
4		<i>Tri.077</i> (1).QX	70,37	+++
5		<i>Tri.012</i> (1).NC	61,61	+++
6	Nghệ An	<i>Tri.005</i> (2).NĐ	89,31	++++
7		<i>Tri.041</i> (1).NĐ	85,98	++++
8		<i>Tri.011</i> (1).NĐ	65,60	+++
9		<i>Tri.062</i> (2).NĐ	45,21	+
10		<i>Tri.008</i> (1).NĐ	44,91	+
11		<i>Tri.008</i> (2).NĐ	42,46	+
12		<i>Tri.010</i> (1).NĐ	42,42	+
13		<i>Tri.023</i> (3).NP	5,00	+
14	Hà Tĩnh	<i>Tri.005</i> (1).NX	91,01	++++
15		<i>Tri.008</i> (1).NT	78,00	++++
16		<i>Tri.038</i> (2).NX	75,22	++++
17		<i>Tri.032</i> (1).NX	48,61	+
18		<i>Tri.023</i> (3).NP	5,00	+

Ghi chú: Đối kháng rất cao (++++); Đối kháng cao (+++); Đối kháng trung bình (++); Đối kháng thấp (+).

Trong số 18 chủng nấm *T. atroviride* thu trên đất lạc của 3 tỉnh Thanh Hóa, Nghệ An, Hà Tĩnh thử nghiệm đối kháng với nấm mốc *A. flavus*, kết quả bảng 1 cho thấy: Cấp độ đối kháng rất cao có 8 chủng (chiếm 61,11%), đối kháng cao có 3 chủng (chiếm 16,67%) và 7 chủng đối kháng thấp (chiếm 38,89%). Không có chủng đối kháng trung bình. Số lượng chủng đối kháng rất cao và cao chiếm 61,11% tổng số chủng thử nghiệm.

Có 2 chủng trong số 18 chủng có tỷ lệ đối kháng đạt 100% là chủng *Tri.020* (2).NC và chủng *Tri.011* (1).NC. Thấp nhất là chủng *Tri.023* (3).NP có tỷ lệ đối kháng là 5,00%.

Trong 18 chủng nấm *T. atroviride* có 5 chủng thu trên đất lạc tỉnh Thanh Hóa trong đó 3 chủng cấp độ đối kháng rất cao (chiếm 60,00%), 2 chủng có cấp độ đối kháng cao (chiếm 40,00%). Có 8 chủng nấm *T. atroviride* thu thập tại đất lạc của tỉnh Nghệ An có 2 chủng có cấp độ đối kháng rất cao (chiếm 25,00%), 1 chủng có cấp độ đối kháng cao (chiếm 12,50%), 5 chủng có cấp độ đối kháng thấp (chiếm 62,5%). Có 5 chủng thu trên đất lạc tỉnh Hà Tĩnh, trong đó 3 chủng có cấp độ đối kháng rất cao (chiếm 60,00%), 2 chủng có cấp độ đối kháng thấp (chiếm 40%).

3. Khả năng sinh tổng hợp cellulase của *Trichoderma atroviride*

Các chủng *Trichoderma* được nuôi cấy trong môi trường sinh tổng hợp có cmC là cơ chất kích thích quá trình sinh tổng hợp cellulase, ở nhiệt độ phòng, lắc trên máy lắc với tốc độ 180 v/p, lấy mẫu ở các thời điểm 3, 4, 5 và 6 ngày.

Những chủng được xác định là có hoạt tính khi trong môi trường nuôi cấy có sản phẩm glucose. Dịch nuôi cấy được xác định hoạt độ cellulase theo phương pháp định lượng đường khử bằng Dinitrosalicylic acid (DNS).

Bảng 2

Khả năng sinh tổng hợp cellulase của các chủng *Trichoderma*

Chủng	Hoạt tính cellulase (IU = $\mu\text{mol/ml/phút}$)			
	Ngày thứ 3	Ngày thứ 4	Ngày thứ 5	Ngày thứ 6
<i>T. atroviride</i> (Tri.020 (2).NC)	0,102	0,121	0,11	1,109
<i>T. reesci</i> (Tri.069 (2).QX)	0,096	0,096	0,087	0,084
<i>T. reesci</i> (Tri.007 (1).NB)	0,096	0,104	0,102	0,098
<i>T. harzianum</i> (Tri.011 (1).NL)	0,09	0,091	0,079	0,073

Kết quả xác định hoạt độ của tập hợp gồm 4 chủng *Trichoderma* đại diện cho 3 loài: *T. atroviride*, *T. reesci*, *T. harzianum* cho thấy hầu hết các chủng đều có hoạt tính cellulase. Hoạt tính cellulase đạt cao nhất vào ngày lấy mẫu thứ 4. Khả năng sinh tổng hợp cellulase ở mỗi chủng là không giống nhau.

Chủng *Tri.020* (2).NC đại diện cho loài *T. atroviride* có hoạt tính cellulase đạt cao nhất so với các chủng cùng tham gia thí nghiệm đạt 0,121 $\mu\text{mol/ml/phút}$. Với hoạt tính cellulase cao nên chủng *Tri.020* (2).NC của loài *T. atroviride* có tiềm năng ứng dụng vào sản xuất chế phẩm sinh học phân hủy các loại chất xơ, xác bã thực vật.

III. KẾT LUẬN

Mô tả được vị trí phân loại và đặc điểm hình thái của loài *Trichoderma atroviride* được thu thập trên đất trồng lạc tại các tỉnh Thanh Hóa, Nghệ An, Hà Tĩnh.

Tổng số 18 chủng nấm *T. atroviride* thu trên đất lạc của 3 tỉnh Thanh Hóa, Nghệ An, Hà Tĩnh thử nghiệm đối kháng với nấm mốc *A. flavus*: Cấp độ đối kháng rất cao có 8 chủng (chiếm 44,44%), đối kháng cao có 3 chủng (chiếm 16,67%).

Chủng *Tri.020* (2).NC đại diện cho loài *T. atroviride* có hoạt tính cellulase đạt cao nhất so với các chủng cùng tham gia thí nghiệm (đạt 0,121 μ mol/ml/phút), có tiềm năng ứng dụng vào sản xuất chế phẩm sinh học phân huỷ các loại chất xơ, xác bã thực vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Ahmed Imtiaj, Tae Soo Le**, 2008. World Journal of Agricultural Sciences, 4 (1): 13-14.
2. **Nguyễn Đăng Diệp, Võ Màu**, 2006. Lợi ích của nấm *Trichoderma*, Trung tâm Công nghệ sinh học thành phố Hồ Chí Minh. <http://www.khuyennongtphcm.com/index.php?id=263 & mnu=3 & s=600012>.
3. **Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Liên Hoa, Lê Hoàng Yến, Đào Thị Lương**, 2006. Vi nấm (Microfungi). Chương trình Vi sinh vật Vietsciences.
4. **Joshi B., R. P. Bhatt, D. Bahukhandi**, 2010. Antagonistic and plant growth activity of *Trichoderma* isolates of Western Himalayas.
5. **Kubicek, Christan P. and Gary E. Harman**, 2002. Basic biology, taxonomy and genetics, *Trichoderma* and Gliocladium, Vol. 1, 293 pp.
6. **Martin S. B., Abavi, H. C. Hoch**, 1985. Biological control of soilborne pathogens with antagonists, In the Biological control in agriculture IPM system, Acad Press, New York, p.: 433-454.
7. **Samuels G. J., P. Chaverri, D. F. Farr, E. B. McCray**, 2002. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved December 1, from/taxadescriptions/keys/*Trichoderma*Index.cfm.

DESCRIPTION OF *Trichoderma atroviride* Karst. APPLICATIONS IN BIOLOGICAL CONTROL *Aspergillus flavus*

TRAN NGOC LAN, NGUYEN THI THU, NGUYEN THI THANH, HO THI NHUNG,
NGUYEN THI THUY, DAO THI THANH XUAN, THAI THI NGOC LAM, PHAN THI GIANG

SUMMARY

We provide the description of classification position and morphological characteristics of *Trichoderma atroviride*, which was collected on peanut-growing soil in the the three provinces Thanh Hoa, Nghe An and Ha Tinh. Evaluation of antagonistic ability of 18 strains of *Trichoderma atroviride* collected from three provinces of Nghe An, Thanh Hoa, Ha Tinh against *Aspergillus flavus* show that: 8 strains are very high antagonistic (44.44%) and 3 strains are high antagonistic (16.67%). The cellulose activity of strains of *Tri.020* (2)NC representing *Trichoderma atroviride* is 0.121 μ mol/ml/min, which is the highest among the strains involved in the evaluation, thus has high potential application in the production of bio-cellulose degradation.