

## Isolation and selection of actinomycetes for rice straw decomposition in Hanoi city

Nguyen Ngoc Quynh, Luong Huu Thanh, Vu Thuy Nga, Dam Trong Anh, Vu Tien Duc, Dam Thi Huyen, Nguyen Van Thiet

### Abstract

Isolation results from 60 rice soil samples in peri-urban communes of Hanoi showed that actinomycetes strains ML7-2, TL3-4 and DT9-1 all had strong cellulose-degrading activity with degradation zones diameter of 31.2 mm, 30.2 mm, and 29.1 mm, respectively. The results of the survey on the ability to use natural cellulose source (rice straw) of the strains showed that all three strains had good ability to decompose rice straw in flooded conditions with the straw decomposition rate of TL3-4 (48.33%), TL9-1 (40.00%), and ML7-2 (33.33%), respectively. In particular, when combining all three actinomycetes, the ability to decompose rice straw was up to 55.67% higher than that of using only single strains. This opens up a prospect in research to produce bio-products to treat rice straw directly in the field. Therefore, this work may provide for further study on bio-products production to treat rice straw directly from the field.

**Keywords:** Actinomycetes, cellulose-degrading, rice straw decomposition

Ngày nhận bài: 04/6/2022

Ngày phản biện: 12/6/2022

Người phản biện: TS. Phan Thị Hồng Thảo

Ngày duyệt đăng: 30/6/2022

## PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH NẤM *TRICHODERMA* ĐỐI KHÁNG VỚI TÁC NHÂN GÂY BỆNH VÀNG LÁ, THỐI RỄ TRÊN CÂY CÓ MÚI TẠI MỘT SỐ TỈNH ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Phạm Thị Lý Thu<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hồng Minh<sup>1</sup>, Nguyễn Đức Anh<sup>1</sup>,  
Đào Thị Thu Hằng<sup>1</sup>, Nguyễn Đức Thành<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Bích Ngọc<sup>2</sup>,  
Lưu Thị Mỹ Dung<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hồng Hải<sup>1</sup>, Nguyễn Thế Quyết<sup>1</sup>,  
Chu Đức Hà<sup>3</sup>, Lê Thị Minh Thành<sup>4</sup>

### TÓM TẮT

Vàng lá, thối rễ gây ra bởi *Fusarium solani*, *Phytophthora helicoides* và *Phytophthora citrophthora* là một trong những bệnh phổ biến tại các vùng trồng cây ăn quả có múi tại các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. Trong nghiên cứu này, tổng số 7 chủng nấm mang đặc điểm hình thái đặc trưng của *Trichoderma* đã được phân lập từ mẫu đất ở vùng trồng cây ăn quả có múi tại tỉnh Hậu Giang và Đồng Tháp. Trong đó, 4 trên tổng số 7 chủng nấm *Trichoderma* spp. đã thể hiện hoạt tính đối kháng cao với tác nhân gây bệnh vàng lá thối rễ. Dựa trên phân tích trình tự ITS, nghiên cứu đã chứng minh rằng 4 chủng này đều thuộc loài *Trichoderma asperellum*. Tiếp tục thử nghiệm trong điều kiện nhà lưới cho thấy, chủng *T. asperellum* Tr.V1 có hiệu quả phòng trừ bệnh cao nhất, đạt 79,31%. Kết quả này đã cung cấp những căn cứ quan trọng cho nghiên cứu tuyển chọn các chủng nấm *Trichoderma* để sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng trong kiểm soát bệnh vàng lá, thối rễ trên cây ăn quả có múi tại đồng bằng sông Cửu Long.

**Từ khóa:** Cây có múi, vàng lá, thối rễ, *Trichoderma*, định danh

<sup>1</sup> Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.

<sup>2</sup> Viện Bảo vệ Thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.

<sup>3</sup> Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội.

<sup>4</sup> Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

\* Tác giả liên hệ, e-mail: phamthilythu@yahoo.com

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây có múi được xem là một trong những nhóm cây ăn quả chủ lực, có giá trị kinh tế cao và đang được ưu tiên phát triển tại Việt Nam, diện tích trồng cây có múi đang được mở rộng trong những năm gần đây. Hiện nay, diện tích trồng cây có múi ở Việt Nam ước tính đạt khoảng 256.860 ha (tương đương 24,07% tổng diện tích cây ăn quả của cả nước), được ghi nhận là nhóm cây ăn quả có diện tích và sản lượng lớn nhất (Cục Trồng trọt, 2020). Tuy nhiên, cây ăn quả có múi tại Việt Nam thường xuyên chịu ảnh hưởng bởi sâu, bệnh hại, điển hình như bệnh Greening, vàng lá, thối rễ và sâu đục quả làm ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển của cây, giảm năng suất và chất lượng của quả. Tại các vùng sản xuất cây ăn quả có múi tập trung ở đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), đặc biệt là tại tỉnh Hậu Giang và Đồng Tháp, bệnh vàng lá, thối rễ được cảnh báo là bệnh hại nghiêm trọng, gây ảnh hưởng tối thiểu 30% diện tích canh tác trên toàn tỉnh (Nguyễn Ngọc Thanh và *ctv.*, 2018). Do đó, phòng trừ bệnh vàng lá, thối rễ trên cây ăn quả có múi được xem là một trong những mục tiêu trọng điểm của các địa phương này.

Bệnh vàng lá, thối rễ gây ra bởi nhiều tác nhân gây bệnh, chủ yếu là các chủng nấm *Fusarium*, *Alternaria* và *Phytophthora* spp. (Rivera *et al.*, 2020). Ngoài ra, *Phytophthora* spp. cũng được xem là một trong tác nhân chính gây bệnh thối rễ ở cây trồng (Hu and Rueda, 2022). Tại các vùng trồng cây ăn quả có múi ở đồng bằng sông Cửu Long, *Fusarium*, *Phytophthora* và *Phytophthora* spp. sơ bộ được xác định là tác nhân chính gây ra bệnh vàng lá, thối rễ ở các cây có múi (Nguyễn Ngọc Thanh và *ctv.*, 2018). Hơn nữa, với điều kiện canh tác tại ĐBSCL, nấm bệnh dễ dàng phát tán trong đất, từ đó gây khó khăn trong việc phòng trừ (dẫn theo Nguyễn Ngọc Thanh và *ctv.*, 2018). Hiện nay, nhiều giải pháp đã được áp dụng nhằm kiểm soát sự lây lan của bệnh vàng lá, thối rễ ở các vùng sản xuất tập trung (Suksiri *et al.*, 2018). Trong đó, chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh vàng lá, thối rễ, chủ yếu là nấm *Trichoderma* spp. đối kháng với tác nhân gây bệnh (Belete *et al.*, 2015; Mirian *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2012) được xem là một trong những biện pháp sinh học được sử dụng phổ biến hiện nay.

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm phân lập và tuyển chọn các chủng nấm *Trichoderma* spp. đối

kháng với tác nhân gây bệnh vàng lá, thối rễ trên cây ăn quả có múi ở các vùng sản xuất tại ĐBSCL. Trước hết, các chủng nấm *Trichoderma* spp. được phân lập từ mẫu đất thu thập tại vườn trồng cây ăn quả có múi tại tỉnh Hậu Giang và Đồng Tháp. Sau đó, khả năng đối kháng của các chủng này được sàng lọc với *Phytophthora*, *Fusarium* và *Phytophthora* spp. để xác định các chủng *Trichoderma* spp. có tiềm năng ứng dụng trong nghiên cứu tiếp theo.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng *F. solani*, *P. citrophthora* và *P. helicoides* gây bệnh vàng lá, thối rễ trên cây có múi được cung cấp bởi Bộ môn Công nghệ vi sinh, Viện Di truyền Nông nghiệp.

Các mẫu đất, rễ cây được thu thập tại vùng gốc những cây sinh trưởng tốt, chỉ số nhiễm bệnh vàng lá, thối rễ thấp, trong vườn trồng cây có múi bị nhiễm bệnh tại hai tỉnh Hậu Giang và Đồng Tháp để phân lập nấm đối kháng *Trichoderma* spp.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp phân lập nấm đối kháng: Nấm *Trichoderma* spp. được phân lập từ đất theo phương pháp của Kumar cộng tác viên (2012). Theo đó, mẫu đất pha loãng được cấy trên môi trường TSM (*Trichoderma* specific medium) (Askew and Laing, 1993) và ủ ở điều kiện nhiệt độ  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  trong 96 giờ (Kumar *et al.*, 2012). Tàn nấm khác nhau về hình thái được cấy chuyển sang môi trường PDA (Kumar *et al.*, 2012).

- Phương pháp đánh giá khả năng đối kháng trong điều kiện *in vitro*: Nấm đối kháng và tác nhân gây bệnh được cấy đối xứng hai bên trên môi trường PDA theo mô tả trong nghiên cứu trước đây (Belete *et al.*, 2015). Hiệu lực ức chế của nấm đối kháng đối với nấm gây bệnh được tính theo công thức:

$$\text{HLUC (\%)} = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

Trong đó:

HLUC: Hiệu lực ức chế (%);

$R_1$ : Đường kính nấm gây bệnh ở công thức đối chứng;

$R_2$ : Đường kính nấm gây bệnh ở công thức thí nghiệm.

- Phương pháp định danh phân tử nấm đối kháng: Vùng gen barcode RNA ribosome được sử dụng để định danh. DNA tổng số được tách chiết từ các mẫu nấm đã làm thuần theo phương pháp CTAB (Umesha *et al.*, 2016). Cặp mỗi ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTTGATATGC-3') và ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') được sử dụng để nhân vùng ITS bằng kỹ thuật PCR (2,5  $\mu$ L đệm PCR; 0,5  $\mu$ L ADN tổng số; 0,5  $\mu$ L dNTP; 1  $\mu$ L mỗi loại mỗi và 0,2  $\mu$ L Taq polymerase) (Martin and Rygiewicz, 2005). Chu kỳ phản ứng PCR bao gồm 94°C/4 phút, (94°C/35s, 50°C/35s, 72°C/1 phút)  $\times$  35 chu kỳ, 72°C/5 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Hoa Kỳ) để tiến hành giải trình tự trực tiếp 2 chiều (Macrogen, Hàn Quốc). Đoạn trình tự vùng gen ITS của chủng nấm mục tiêu đã giải trình tự được sử dụng để xây dựng cây phân loại bằng công cụ MEGA bằng thuật toán Maximum-Likelihood (Raja *et al.*, 2017). Theo đó, thông tin về chủng nấm mục tiêu được đối chiếu vào cơ sở dữ liệu GenBank trên NCBI.

- Phương pháp đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh trong điều kiện nhà lưới: Cây thí nghiệm được lựa chọn là cây cam sành (5 - 6 tháng tuổi sau ghép), cao 50 - 60 cm, không bị bệnh và còn trùng gây hại, không phun thuốc hóa học trước khi lây bệnh nhân tạo khoảng 10 ngày. Trồng 1 cây/bầu, 10 cây/1 lần nhắc. Nguồn nấm bệnh được nuôi cấy trên đĩa Petri chứa môi trường PDA sau thời gian 7 ngày, pha loãng với nước cất vô trùng, kiểm tra mật độ bào tử bằng buồng đếm hồng cầu đạt mật độ  $10^8$  CFU/mL, tưới 50 mL dịch nấm bệnh/bầu đất. Sau 2 ngày lây nhiễm, chuẩn bị nguồn nấm đối kháng *Trichoderma* spp. ( $10^8$  CFU/g đất) để bổ sung vào đất. Hiệu quả phòng trừ bệnh vàng lá, thối rễ trên cây cam sành trong điều kiện nhà lưới được tính theo công thức Abbott (Abbott, 1925):

$$HQPT (\%) = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Trong đó:

C: Chỉ số bệnh ở công thức đối chứng;

T: Chỉ số bệnh ở công thức có xử lý nấm đối kháng.

- Phương pháp xử lý số liệu: Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Số liệu được xử lý theo chương trình thống kê IRRISTAT 5.0.

### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu này được thực hiện từ tháng 9/2020 đến tháng 01/2022. Mẫu được thu thập ở các vùng trồng cây có múi tại tỉnh Hậu Giang và Đồng Tháp, sau đó phân tích tại Viện Di truyền Nông nghiệp.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Phân lập nấm *Trichoderma* spp. từ vùng canh tác tập trung cây ăn quả có múi tại đồng bằng sông Cửu Long

Để phân lập nấm *Trichoderma* đối kháng với tác nhân gây bệnh vàng lá, thối rễ, 15 mẫu đất đã được thu thập tại các vườn trồng cây có múi lâu năm ở tỉnh Hậu Giang và Đồng Tháp. Kết quả đã phân lập được tổng số 7 chủng nấm với hình thái điển hình của *Trichoderma* spp. (tán nấm có màu trắng, xốp, hình thành cảnh bào tử phân sinh có hình elip/hình cầu, bề mặt nhẵn). Sau 2 ngày nuôi cấy, tán nấm chuyển dần sang màu xanh, hình thành nhiều cảnh bào tử phân sinh, thể bình có dạng hình trụ.

### 3.2. Đánh giá hiệu lực đối kháng giữa nấm *Trichoderma* spp. và nấm gây bệnh vàng lá, thối rễ trên cây có múi trong điều kiện *in vitro*

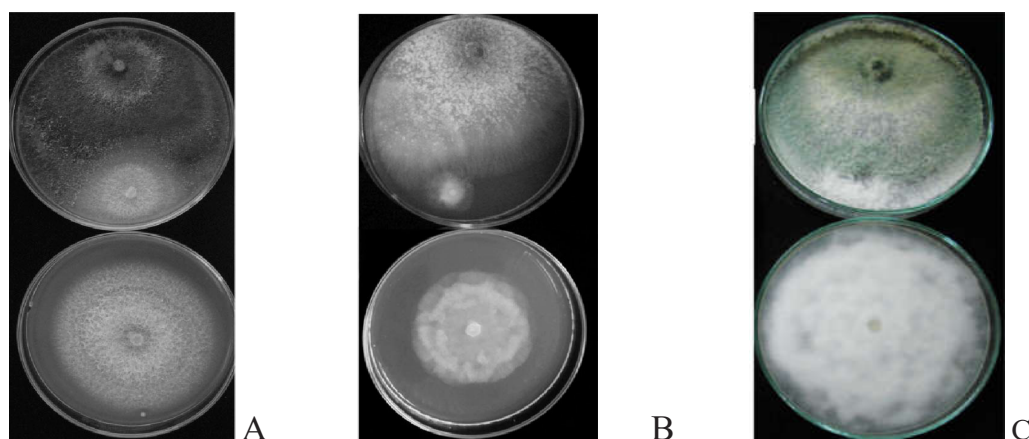
Tiếp theo, với mục đích đánh giá khả năng đối kháng với *F. solani*, *P. citrophthora* và *P. helioides*, 7 chủng nấm *Trichoderma* spp. đã phân lập lần lượt được nuôi cấy đối xứng hai bên trên môi trường PDA. Kết quả cho thấy 7 chủng *Trichoderma* spp. đều thể hiện khả năng đối kháng với cả 3 tác nhân gây bệnh chính, hiệu lực ở mức cao, đạt từ 70,45 - 87,5% (Bảng 2). Trong đó, 4 chủng nấm *Trichoderma* spp., bao gồm Tr.V1, Tr.V2, Tr.V3 và Tr.V4 có hiệu lực đối kháng mạnh nhất với cả *F. solani*, *P. citrophthora* và *P. helioides* gây bệnh vàng lá, thối rễ, với hiệu lực ức chế từ 77,27 - 87,5%, hiệu quả nhất với *P. citrophthora* (Bảng 1).

**Bảng 1.** Nguồn gốc và hình thái nấm *Trichoderma* spp. phân lập trong nghiên cứu

STT	Nguồn gốc	Ký hiệu chủng	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc
1	Cam sành Hậu Giang	Tr.V1	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh
2	Bưởi Da xanh Hậu Giang	Tr.V2	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh
3	Bưởi Da xanh Hậu Giang	Tr.V3	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh
4	Cam sành Đồng Tháp	Tr.V4	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh
5	Cam xoàn Đồng Tháp	Tr.V5	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh
6	Cam sành Đồng Tháp	Tr.V6	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh
7	Cam xoàn Đồng Tháp	Tr.V7	Sợi trắng, phân nhánh, bào tử xanh

**Bảng 2.** Đánh giá hiệu lực đối kháng của nấm *Trichoderma* spp. với tác nhân gây bệnh vàng lá, thối rễ trong điều kiện *in vitro*

STT	Nấm đối kháng	Đường kính tản nấm bệnh sau 6 ngày theo dõi (cm)					
		Nấm <i>Fusarium</i>	Hiệu lực ức chế (%)	Nấm <i>Pythium</i>	Hiệu lực ức chế (%)	Nấm <i>Phytophthora</i>	Hiệu lực ức chế (%)
1	ĐC	9,0	-	8,8	-	8,8	-
2	Tr.V1	1,4	84,44	1,5	82,95	1,1	87,50
3	Tr.V2	1,5	83,33	1,6	81,82	1,6	81,82
4	Tr.V3	1,7	81,11	1,8	79,55	1,9	78,41
5	Tr.V4	1,8	80,00	2,0	77,27	2,0	77,27
6	Tr.V5	2,2	75,56	2,5	71,59	2,6	70,45
7	Tr.V6	2,3	74,44	2,3	73,86	2,5	71,59
8	Tr.V7	2,1	76,67	2,2	75,00	2,4	72,73



**Hình 1.** Khả năng đối kháng của chủng TrV1 với nấm *F. solani* (A), *P. citrophthora* (B) và *P. helicoides* (C) gây bệnh vàng lá, thối rễ

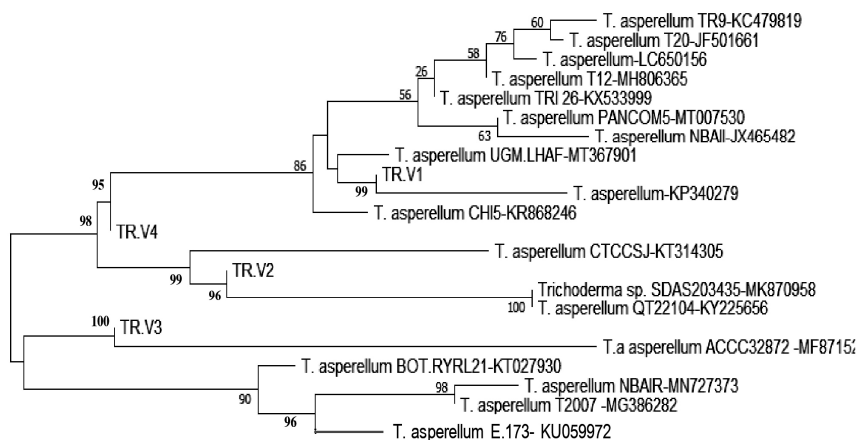
Trong các nghiên cứu trước đây, *Trichoderma* spp. đã được ghi nhận có khả năng ức chế tốt với các tác nhân gây bệnh thối rễ ở cây trồng. Ví dụ, *Trichoderma* spp. phân lập từ đất vùng rễ của đậu răng ngựa (*Vicia fabae*) có khả năng ức chế tốt với

*F. solani* gây bệnh thối rễ tại các vùng canh tác *V. fabae* tại khu vực Đông Bắc Ethiopia. Đánh giá trong điều kiện *in vitro* cho thấy hiệu lực ức chế sinh trưởng *F. solani* của *Trichoderma* spp. dao động từ 33,9 - 67,0% (Belete *et al.*, 2015). Tương tự,

*F. virguliforme* gây hội chứng đột tử (sudden death syndrome) ở đậu tương (*Glycine max*) có thể bị ức chế đến 92% trong điều kiện *in vitro* bởi các chủng *Trichoderma*, đặc biệt là *T. harzianum* (Mirian *et al.*, 2020). Trước đó, 20 chủng *Trichoderma* spp., chủ yếu là *T. viride* và *T. harzianum* phân lập từ phía Nam Andaman có hoạt tính ức chế tốt với tác nhân gây bệnh như *Sclerotium rolfisii*, *Colletotrichum gloeosporioides* và *C. capsici* (Kumar *et al.*, 2012). Trong nghiên cứu này, 4 chủng nấm *Trichoderma* spp. đã được lựa chọn để định danh khoa học nhằm để xuất chủng tiềm năng.

### 3.3. Định danh nấm *Trichoderma* spp. đối kháng với tác nhân gây bệnh vàng lá, thối rễ ở cây ăn quả có múi

Để định danh phân tử nấm *Trichoderma* spp., nghiên cứu này đã giải trình tự vùng ITS (Martin and Rygiewicz, 2005) của các chủng nấm và xây dựng cây phân loại với dữ liệu đã biết về các loài *Trichoderma* trên cơ sở dữ liệu GeneBank (Raja *et al.*, 2017). Kết quả cho thấy, cả 4 chủng Tr.V1, Tr.V2, Tr.V3 và Tr.V4 đều thuộc loài *T. asperellum*, với mức độ tương đồng về trình tự ITS đạt 99%, 100%, 100% và 99,8%, tương ứng.



Hình 2. Cây phân loại dựa trên trình tự vùng ITS của các mẫu nấm

Trước đây, hai loài *T. rivide* và *T. harzianum* đối kháng *Sclerotium rolfisii*, *Colletotrichum gloeosporioides* và *C. capsici* gây bệnh thối rễ và thối lá đã được định danh (Kumar *et al.*, 2012). Gần đây, 48 chủng *Trichoderma* spp., chủ yếu thuộc 3 loài, *T. harzianum*, *T. brevicompactum* và *T. velutinum*, đã được xác định có khả năng đối kháng với nấm bệnh *F. oxysporum*, *A. alternata* và *Helminthosporium rostratum* (Alwadai *et al.*, 2022). Đáng chú ý, các nghiên cứu đều đồng thuận rằng khả năng đối kháng với tác nhân gây bệnh của *Trichoderma* spp. được giải thích do đặc tính sinh cellulase, protease và chitinase ngoại sinh nhằm phá hủy vách tế bào của nấm gây bệnh (Ghasemi *et al.*, 2020).

### 3.4. Đánh giá khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma* spp. với tác nhân gây bệnh vàng lá, thối rễ ở cây cam sành trong điều kiện nhà lưới

Để thử nghiệm khả năng đối kháng của 4 chủng *T. asperellum* phân lập được trong nghiên cứu này,

thí nghiệm đánh giá trong điều kiện nhà lưới đã được thực hiện.

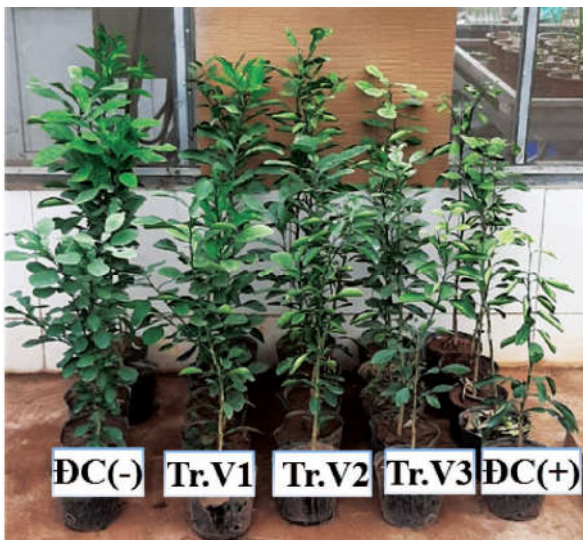
Bảng 3. Đánh giá hiệu quả phòng trừ của nấm *T. asperellum* đối với bệnh vàng lá, thối rễ trong điều kiện nhà lưới

Công thức thí nghiệm	Chỉ số bệnh (%)	Hiệu quả phòng trừ (%)
ĐC	95,31 <sup>a</sup>	0
Tr.V1	19,72 <sup>e</sup>	79,31
Tr.V2	23,34 <sup>d</sup>	75,51
Tr.V3	40,77 <sup>b</sup>	57,22
Tr.V4	33,04 <sup>c</sup>	65,33
CV (%)	3,9	
LSD <sub>0,05</sub>	1,752	

Ghi chú: Giá trị trung bình trong cùng một cột mang chữ cái khác nhau thì sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa  $\alpha = 0,05$ .

Kết quả bảng 3 cho thấy, các chủng *T. asperellum* chọn lọc đều có hiệu quả phòng trừ cao đến rất cao với tác nhân gây bệnh vàng lá, thối rễ trong điều kiện nhà lưới. Trong đó, chủng Tr.V1 có hiệu quả phòng trừ cao nhất, đạt 79,31% so với đối chứng, sau đó là công thức có bổ sung chủng Tr.V2 (hiệu quả phòng trừ là 75,51%). Chủng có hiệu quả phòng trừ với nấm gây bệnh vàng lá, thối rễ thấp nhất là Tr.V3, nhưng vẫn đạt mức trên trung bình (57,22%).

Cụ thể, lây nhiễm nấm gây bệnh làm cây có biểu hiện đặc trưng của bệnh vàng lá, thối rễ, lá cây có biểu hiện vàng hoặc xoắn lại, cây còi cọc sau khoảng 10 - 20 ngày ở công thức đối chứng bệnh. Ở các công thức có bổ sung nấm *Trichoderma* spp. lá cây ít bị vàng, xoắn hơn và cây cũng xanh tốt hơn so với đối chứng bệnh. Trong đó, bổ sung chủng Tr.V1 giúp lá và cây xanh tốt, cây phát triển tương đương công thức đối chứng âm (chỉ có tưới nước và chăm sóc bình thường).



**Hình 3.** Khả năng đối kháng của các chủng *Trichoderma* spp. với tác nhân gây bệnh vàng lá, thối rễ trên cây cam sành trong điều kiện nhà lưới

Trong nghiên cứu trước đây, xử lý bằng *Trichoderma* spp. đã cho hiệu quả kháng *F. solani* gây bệnh thối đen rễ ở cây *Vicia faba* đạt từ 64,4 - 74,6% so với công thức đối chứng (Yue *et al.*, 2018). Dựa trên các kết quả này cho thấy chủng *Trichoderma* spp. Tr.V1 có nhiều triển vọng để sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng trong kiểm soát bệnh vàng lá, thối rễ trên cây ăn quả có múi trong thực tế sản xuất.

## IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1. Kết luận

Từ 15 mẫu đất thu thập ở vùng trồng cây ăn quả có múi tập trung tại tỉnh Hậu Giang và Đồng Tháp, nghiên cứu đã phân lập được 7 chủng nấm *Trichoderma* spp. Trong điều kiện *in vitro*, 4 trên 7 chủng *Trichoderma* spp. thể hiện tính đối kháng với nấm *F. solani*, *P. citrophthora* và *P. helicoides* gây bệnh vàng lá, thối rễ ở cây có múi đạt từ 77,27 - 87,5%. Dựa vào các đặc điểm hình thái và giải trình tự vùng ITS đã xác định được 4 chủng *Trichoderma* Tr.V1, Tr.V2, Tr.V3 và Tr.V4 đều thuộc loài *T. asperellum*. Trong điều kiện nhà lưới, chủng *Trichoderma* Tr.V1 thể hiện hiệu quả phòng trừ đạt 79,31%.

### 4.2. Đề nghị

Nghiên cứu sẽ được tiếp tục thực hiện nhằm thử nghiệm hiệu quả sử dụng chủng *T. asperellum* Tr.V1 để sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng trong kiểm soát bệnh vàng lá, thối rễ trên cây ăn quả có múi trong thực tế sản xuất.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cục Trồng trọt, 2020. Hiện trạng và giải pháp phát triển cây ăn quả có múi ở các tỉnh phía Bắc, 15 trang.
- QCVN 01-38:2010/BNNPTNT. Quy chuẩn Kỹ thuật Quốc gia về Phương pháp điều tra phát hiện dịch hại cây trồng.
- Nguyễn Ngọc Thanh, Tất Anh Thu, Mai Thị Cẩm Trinh, Dương Minh Viễn, Võ Thị Gương, 2018. Đánh giá một số đặc tính lý hóa học và sinh học đất trên vườn cam sành (*Citrus nobilis*) bị bệnh vàng lá thối rễ tại huyện Tam Bình, tỉnh Vĩnh Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54 (6B): 72-81.
- Abbott, W.S., 1925. A method of computing effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 256-267.
- Alwadai, A.S., Perveen, K., & Alwahaibi, M., 2022. The isolation and characterization of antagonist *Trichoderma* spp. from the soil of Abha, Saudi Arabia. *Molecules*, 27 (8): 2525.
- Askew, D.J. and Laing, M.D., 1993. An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species. *Plant Pathology*, 42: 686-690.
- Belete, E., Amare, A., Seid, A., 2015. Evaluation of local isolates of *Trichoderma* spp. against black root rot (*Fusarium solani*) on faba bean. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 6 (6): 1000279.

- Ghasemi, S., Safaie, N., Shahbazi, S., Shams-Bakhsh, M., Askari, H., 2020. The Role of cell wall degrading enzymes in antagonistic traits of *Trichoderma virens* against *Rhizoctonia solani*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 18 (4): e2333.
- Hu, J. and Rueda, A., 2022. First report of *Phytophthora parsiana* causing crown and root rot on guayule in the United States. *Plant Disease*, 106 (5): 1535.
- Kumar, K., Amaresan, N., Bhagat, S., Madhuri, K., & Srivastava, R.C., 2012. Isolation and characterization of *Trichoderma* spp. for antagonistic activity against root rot and foliar pathogens. *Indian Journal of Microbiology*, 52 (2): 137-144.
- Martin, K.J. and Rygielwicz, P.T., 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, 5: 28.
- Mirian, F., Erika, A., Amanda, J., Arjun, S., Leonardo, F., Ali, S., Jason, P., Ahmad, M., 2020. *Trichoderma* isolates inhibit *Fusarium virguliforme* growth, reduce root rot, and induce defense-related genes on soybean seedlings. *Plant Disease*, 104 (7): 1949-1959.
- Raja, H.A., Miller, A.N., Pearce, C.J., Oberlies, N.H., 2017. Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *Journal of Natural Products*, 80 (3): 756-770.
- Rivera, J., Natali, S., Rodriguez, G., Victorya, E., 2020. Isolation and identification of pathogens causing stem rot of the fig tree (*Ficus carica*). *Mexican Journal of Phytopathology*, 38 (2): 269-279.
- Suksiri, S., Laipas, P., Soyong, K., Poem, S., 2018. Isolation and identification of *Phytophthora* sp. and *Pythium* sp. from durian orchard in Chumphon province, Thailand. *International Journal of Agricultural Technology*, 14 (3): 389-402.
- Umesh, S., Manukumar, H.M., Raghava, S., 2016. A rapid method for isolation of genomic DNA from food-borne fungal pathogens. *3 Biotech*, 6 (2): 123.
- Yue, H.M., Wang, M., Gong, W.F., Zhang, L.Q., 2018. The screening and identification of the biological control fungi *Chaetomium* spp. against wheat common root rot. *FEMS Microbiology Letters*, 365 (22): fny242.

## Isolation and molecular authentication of antagonistic *Trichoderma* fungi for controlling citrus leaf yellowing, root rot in provinces from the Mekong River Delta

Pham Thi Ly Thu, Nguyen Thi Hong Minh, Nguyen Duc Anh, Dao Thi Thu Hang, Nguyen Duc Thanh, Nguyen Thi Bich Ngoc, Luu Thi My Dung, Nguyen Thi Hong Hai, Nguyen The Quyet, Chu Duc Ha, Le Thi Minh Thanh

### Abstract

Leaf yellowing and root rot caused by *Fusarium solani*, *Phytophthora helicoides* and *Phytophthora citrophthora* has been reported as one of the most dangerous diseases in the citrus production areas in the Mekong River Delta. In this study, a total of seven fungal strains similar to *Trichoderma* genus were isolated from soil samples collected in the citrus growing areas in Hau Giang and Dong Thap Provinces. Four out of seven *Trichoderma* spp. exhibited a high antagonistic efficacy against pathogens causing leaf yellowing - root rot disease on citrus. By sequencing the internal transcribed spacer regions, four strains were molecularly characterized to belong to *T. asperellum*. Evaluation under the nethouse condition demonstrated that *T. asperellum* Tr.V1 still showed the highest antagonistic efficiency, reaching 79.31%. Taken together, this study could provide an important evidence for further production of *T. asperellum*-based products in controlling leaf yellowing and root rot on citrus in the Mekong River Delta.

**Keywords:** Citrus, leaf yellowing, root rot, *Trichoderma*, authentication

Ngày nhận bài: 02/5/2022  
Ngày phản biện: 20/5/2022

Người phản biện: TS. Phạm Hồng Hiến  
Ngày duyệt đăng: 30/5/2022

## NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH NẤM *Phomopsis durionis* VÀ *Lasiodiplodia theobromae* GÂY BỆNH CHÁY LÁ TRÊN SẦU RIÊNG

Đặng Thị Kim Uyên<sup>1</sup>, Lê Thị Tường<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Hòa<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Kết quả thu thập mẫu bệnh với những triệu chứng gây bệnh cháy lá trên sầu riêng tại tỉnh Tiền Giang từ tháng 3 đến tháng 12 năm 2019 thì 30 mẫu phân lập ra nấm *Lasiodiplodia* sp.; *Phomopsis* sp.; *Colletotrichum* sp. và *Rhizoctonia* sp. Trong đó nấm *Lasiodiplodia* sp.; *Phomopsis* sp. chiếm tỷ lệ cao 75 - 95% trong tất cả mẫu phân lập. Dựa trên đặc điểm hình thái như màu sắc của khuẩn lạc, khuẩn ty, hình dạng bào tử cũng như dùng sinh học phân tử (ITS) gồm điện di sản phẩm PCR cho sản phẩm khuếch đại vùng trình tự vùng ITS-rDNA; giải trình tự vùng ITS-rDNA và so sánh tương đồng bằng công cụ BLAST trên GeneBank, cho thấy hai mẫu nấm có trình tự vùng ITS tương đồng cao (98 - 100%) với loài *Lasiodiplodia theobromae* và *Phomopsis durionis* là tác nhân gây bệnh cháy lá sầu riêng ở Tiền Giang. Bệnh do loài *Lasiodiplodia theobromae* gây cháy ở đuôi lá màu trắng bạc trên lá già, trên vết bệnh có nhiều hạch nấm màu nâu đen trên vết bệnh cũ. Triệu chứng bệnh do loài *Phomopsis durionis* gây ra vết bệnh có những đốm bằng đầu kim, mỗi vết bệnh có quang vàng xung quanh, vết bệnh có dạng oval, nặng có hình mắt cua có màu tro hay nâu dọc theo gân chính lan dần vào bên trong lá.

**Từ khóa:** Cây sầu riêng, bệnh cháy lá, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis durionis*

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh cháy lá trên sầu riêng đã được báo cáo ở các quốc gia nhiệt đới và cận nhiệt đới như ở Malaysia, Trung Quốc và Thái Lan. Bệnh được xem là phổ biến nhất và gây ảnh hưởng đến ra hoa và đậu quả sầu riêng. Một số loài *Phomopsis* là nấm gây bệnh thực vật gây ra các triệu chứng đa dạng như đốm, thối rữa, chết thối, thối rễ, thối trái, cháy lá và héo trên nhiều loại ký chủ (Uecker, 1988; Uecker and Johnson, 1991; Uecker and Kuo, 1992; Santos and Phillips, 2009). *Phomopsis durionis* đã được báo cáo là tác nhân gây bệnh đốm lá sầu riêng được tìm thấy ở một số vùng trồng sầu riêng của Thái Lan (Lim and Sangchote, 2003). Triệu chứng bệnh đốm lá đặc trưng bởi các đốm hoại tử màu nâu đen, đường kính khoảng 1 mm, có quang vàng. Các vết bệnh đốm này phổ biến hơn trên lá sầu riêng trong giai đoạn trưởng thành. *Phomopsis durionis* cũng được phát hiện là tác nhân gây bệnh đốm lá mới trên cây phát tòi (*Pachira macrocarpa*) ở Trung Quốc, gây ra các triệu chứng nghiêm trọng và phổ biến khắp các khu vực trồng loại cây này (PingGen *et al.*, 2000). Nấm *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl còn có tên gọi khác là *Botryodiplodia theobromae*, phân bố rộng tại nhiều quốc gia trên thế giới thuộc khu vực khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới, và được ghi nhận là

loại nấm kí sinh gần 500 loại cây trồng khác nhau (Punithalingam, 1976). Nội dung trình bày dưới đây là kết quả nghiên cứu hình thái và sinh học phân tử của nấm đã xác định được là tác nhân gây bệnh cháy lá trên sầu riêng tại tỉnh Tiền Giang.

### II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: nấm gây bệnh cháy lá sầu riêng.

- Nguyên vật liệu: Bộ kit ly trích DNA của Mỹ; agarose; dung dịch safeview; đệm TAE 1X; hóa chất PCR (Dung dịch 10X; Taq polymerase: 5U/μL; dNTPs: 10 mM; Các muối; nước cất HPCL; MgCl<sub>2</sub>: 25 mM; DNA mẫu; H<sub>2</sub>O cất). ITS1 F: TCCGTAGGTGAACCTGCGG (Kumar and Shukla, 2005) và ITS4 R:TCCTCCGCTTATTGATATGC (Kumar and Shukla, 2005).

- Thuốc BVTV, dịch trích thảo mộc cây móng tay, củ đậu, môi trường PDA,...

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp phân lập, chẩn đoán, giám định tác nhân gây bệnh do nấm được thực hiện theo Agrios (2005); Shen và cộng tác viên (2010).

<sup>1</sup> Viện Cây ăn quả miền Nam

\* Tác giả liên hệ, e-mail: hoayuen28052005@gmail.com