



ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG CỦA NẤM *Trichoderma asperellum* HL6 ĐỐI VỚI NẤM *Aspergillus niger* Van Tieghem GÂY BỆNH HÉO RŨ GỐC MỐC ĐEN TRÊN CÂY LẠC

Nguyễn Xuân Hiếu^{1,2}, Nguyễn Đức Huy¹, Tôn Đức Hồng³, Nguyễn Tiến Long¹,
Thái Thị Huyền⁴, Nguyễn Thị Thu Thủy^{4*}

¹ Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế, Nguyễn Đình Tú, Huế, Việt Nam

² Trường THCS & THPT Cửa Việt, Thị trấn Cửa Việt, huyện Gio Linh, tỉnh Quảng Trị, Việt Nam

³ Đại học Huế, 3 Lê Lợi, Huế, Việt Nam

⁴ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Thu Thủy <nttthuy.huaf@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 7-5-2024; Ngày chấp nhận đăng: 8-8-2024)

Tóm tắt. Bệnh héo rũ gốc mốc đen do nấm *Aspergillus niger* Van Tieghem ảnh hưởng lớn đến sản xuất lạc. Sự tồn tại lâu dài của nấm bệnh trong đất có thể làm giảm hiệu quả của thuốc hoá học diệt nấm. Việc sử dụng vi sinh vật đối kháng có thể khống chế được nấm bệnh *A. niger*. Chủng nấm HL6 được chúng tôi phân lập từ đất quanh vùng rễ cây lạc trồng tại huyện Hải Lăng, tỉnh Quảng Trị, có khả năng ức chế sự phát triển của nấm bệnh *A. niger*, với hiệu suất đối kháng đạt 77,41% trong điều kiện *in vitro*. Kết quả định danh phân tử dựa trên so sánh trình tự nucleotide vùng ITS1-4 chỉ ra chủng nấm HL6 thuộc loài *Trichoderma asperellum*. Kết quả thử nghiệm đã cho thấy chủng *T. asperellum* HL6 không ảnh hưởng đến tỉ lệ nảy mầm của hạt lạc. Trong thử nghiệm ở điều kiện nhà lưới, việc bổ sung nấm *T. asperellum* HL6 đã làm giảm mạnh tỉ lệ cây lạc bị bệnh héo rũ gốc mốc đen, hiệu lực phòng trừ bệnh đạt được 99,55%. Kết quả nghiên cứu này là tiền đề cho nghiên cứu thử nghiệm trên đồng ruộng để đánh giá hiệu quả phòng chống bệnh héo rũ gốc mốc đen của chủng nấm *T. asperellum* HL6 nhằm tiến tới sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ nấm bệnh *A. niger*.

Keywords: cây lạc, héo rũ gốc mốc đen, *Trichoderma asperellum*, *Aspergillus niger*, kiểm soát sinh học

Evaluation of *Trichoderma asperellum* HL6 against *Aspergillus niger* Van Tieghem causing collar rot in groundnut

Nguyen Xuan Hieu^{1,2}, Nguyen Đức Huy¹, Ton Đức Hong³, Nguyen Tien Long¹, Thai Thi Huyen⁴, Nguyen Thi Thu Thuy^{4*}

¹ Institute of Biotechnology, Hue University, Nguyen Dinh Tu St., Hue, Vietnam

² Cua Viet Lower & Upper Secondary School, Cua Viet Town, Gio Linh, Quang Tri, Vietnam

³ Hue University, 3 Le Loi, Hue, Vietnam

⁴ University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Thi Thu Thuy <nttthuy.huaf@hueuni.edu.vn>

(Submitted: May 7, 2024; Accepted: August 8, 2024)

Abstract. Collar rot disease, caused by the fungus *Aspergillus niger* Van Tieghem, significantly impacts peanut production. The long-term survival of fungal pathogens in soil can decrease the effectiveness of chemical fungicides. The use of antagonistic microorganisms can help control the fungal pathogen *A. niger*. A fungus strain HL6 which has been isolated from the soil around the root zone of peanut plants grown in Hai Lang district, Quang Tri province, exhibited the inhibitory against *A. niger* of 77.41% efficiency under *in vitro* conditions. Molecular identification revealed that the strain HL6 belonged to the *Trichoderma asperellum* species based on nucleotide sequence comparison of the ITS1-4 region. The test results showed that the *T. asperellum* HL6 did not affect the germination rate of the peanut seeds. In net-house experiments, the addition of *T. asperellum* HL6 significantly reduced the occurrence of collar rot disease in peanut plants, with a disease prevention effectiveness reaching 99.55%. These results propose the field trials to evaluate the effectiveness of the *T. asperellum* HL6 in preventing collar rot diseases for production of bio-inoculants against *A. niger*.

Keywords: groundnut, collar rot, *Trichoderma asperellum*, *Aspergillus niger*, biological control

1 Đặt vấn đề

Lạc (*Arachis hypogaea* L.) còn gọi là đậu phộng, là cây họ đậu hàng năm được trồng ở hơn 80 quốc gia ở vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới và ôn đới ẩm [1]. Hạt lạc chứa nhiều chất dinh dưỡng như protein, carbohydrate, canxi và khoáng chất, là nguồn thực phẩm cho con người, nguyên liệu cho công nghiệp và thức ăn chăn nuôi [2]. Về mặt kinh tế, lạc thuộc nhóm cây đứng đầu danh sách cây lấy dầu trên thế giới [1].

Việc trồng lạc bị ảnh hưởng bởi nhiều loại bệnh như bệnh đốm lá, héo rũ gốc mốc đen, héo rũ gốc mốc trắng, lở cổ rễ, thối thân và quả ... [3]. Trong số các bệnh ở lạc, héo rũ gốc mốc đen do nấm *Aspergillus niger* gây ra là một loại bệnh xuất hiện phổ biến, có sức tàn phá nghiêm trọng, gây thiệt hại lớn về năng suất lạc [1]. Nấm *A. niger* xâm nhập, tấn công làm thối hạt, nấm xâm nhập làm tổn thương trầm trọng phần rễ và gốc thân. Cây con và cây trưởng thành bị nhiễm bệnh, vết bệnh phát triển trên thân ngay dưới bề mặt đất và sau đó lan lên dọc theo cành. Điều này dẫn đến héo vĩnh viễn các cành của toàn bộ cây, vùng cổ rễ bị thối, phủ lớp nấm màu đen

[4]. Thiệt hại năng suất hàng năm trên thế giới do bệnh héo rũ gốc mốc đen gây ra ước tính khoảng 10% có nơi lên đến 40% ở nhiều quốc gia như Ấn Độ, Ethiopia [5, 6]. Ở Việt Nam, bệnh héo rũ gốc mốc đen dao động từ 9 đến 30%, hầu hết các giống lạc đều mắc cảm với bệnh này [7].

Hiện nay, sử dụng thuốc hóa học để phòng trừ bệnh cho cây lạc vẫn được áp dụng rộng rãi. Tuy nhiên, phương pháp này không chỉ tốn kém mà còn gây ô nhiễm môi trường và không đem lại hiệu quả như mong đợi. Bên cạnh đó, việc lạm dụng thuốc hóa học trong thời gian dài có thể dẫn đến các đột biến gen mà cuối cùng được cho là tạo ra các kiểu gen kháng thuốc diệt nấm [8]. Vì vậy, việc sử dụng đối kháng sinh học để kiểm soát *A. niger* gây hại cây lạc được xem là giải pháp thân thiện với môi trường. Các loài *Trichoderma* đã được sử dụng rộng rãi trong nông nghiệp nhờ thể hiện những tiềm năng nổi trội như tiết ra enzyme phân giải màng tế bào của nấm [6, 9]; tiết ra các loại kháng sinh gây độc mạnh cho nấm; tạo ra các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học có thể kích thích sinh trưởng, tăng cường khả năng chống chịu stress, hấp thu tích cực các chất dinh dưỡng và bảo vệ cây trồng; cạnh tranh dinh dưỡng, không gian sống với mầm bệnh [6, 10]. Trần Thị Thu Hà và Phạm Thanh Hòa đã báo cáo về khả năng ức chế sự phát triển nấm bệnh *Sclerotium rolfsii* của *Trichoderma* trong điều kiện *in vitro* [11]. Nguyễn Đình Thi và cs. đã báo cáo về khả năng kiểm soát bệnh hại và giúp lạc sinh trưởng tốt khi sử dụng kết hợp *Trichoderma* và *Pseudomonas* trên đồng ruộng [12]. Tuy nhiên, không phải các chủng *Trichoderma* đều hoạt động tương đồng đối với một chủng nấm bệnh cụ thể [13]. Do đó, việc tiếp tục nghiên cứu tìm ra chủng nấm *Trichoderma* bản địa nhằm kiểm soát nấm bệnh *A. niger* trên cây lạc là hết sức cần thiết.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Nguồn nấm bệnh: Chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Công nghệ Enzyme và Protein, Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế. Đây là chủng nấm bệnh được phân lập từ cây lạc bị bệnh héo rũ gốc mốc đen ở huyện Triệu Phong, tỉnh Quảng Trị. Chủng nấm QT1 này đã được định danh dựa vào đặc điểm hình thái, quy tắc Koch và phương pháp sinh học phân tử [7].

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Phân lập, tuyển chọn nấm *Trichoderma* có khả năng đối kháng nấm *A. niger*

Phân lập nấm *Trichoderma*

Sáu mẫu đất (300 g/mẫu) được thu thập ở độ sâu 15–20 cm, xung quanh gốc các cây lạc khỏe, ở các khu vực chuyên canh trồng lạc của tỉnh Quảng Trị và tỉnh Thừa Thiên Huế (Bảng 1). Mẫu đất được đựng trong các túi nilon, ghi nhãn rồi chuyển về phòng thí nghiệm, bảo quản ở nhiệt độ 4 °C cho tới khi sử dụng. Một gram của mỗi mẫu đất được hòa tan trong 99 mL nước cất vô trùng, khuấy đều trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp tục pha loãng mẫu đến các nồng độ 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} và 0,5 mL mỗi nồng độ được trải đều lên bề mặt môi trường phân lập *Trichoderma*,

bổ sung propamocarb. Các đĩa được nuôi ở 28 ± 2 °C trong 96 giờ cho đến khi nhìn thấy được các khuẩn lạc nấm xuất hiện. Chọn các khuẩn lạc nấm khác nhau, có hình thái đặc trưng của *Trichoderma* cấy chuyển sang đĩa môi trường PDA (20 g cao khoai tây và 20g dextrose, pH 7,0) bằng phương pháp cấy đơn bào tử để thu các chủng nấm thuần khiết [14]. Các chủng nấm *Trichoderma* được lưu giữ và bảo quản trên môi trường PDA, ở 4 °C.

Tuyển chọn chủng nấm *Trichoderma* có khả năng đối kháng

Tuyển chọn chủng nấm *Trichoderma* được thực hiện theo phương pháp của Watanabe [15]. Ở đĩa thí nghiệm, hai khoanh nấm *Trichoderma* và *A. niger* đều có đường kính 4 mm được cấy đối xứng nhau qua tâm của đĩa Petri chứa môi trường PDA, mỗi bên cách tâm 30 mm. Ở đĩa đối chứng, nấm *A. niger* được cấy tương tự như đĩa thí nghiệm, nhưng không cấy nấm *Trichoderma*. Tất cả các đĩa nấm được nuôi ở 28 ± 2 °C, sau 6 ngày nuôi cấy, phân tích sự đối kháng của mỗi chủng nấm *Trichoderma* đối với *A. niger*. Chỉ số đối kháng (H) theo tỷ lệ phần trăm ức chế sinh trưởng của *A. niger* được tính theo công thức sau:

$$H (\%) = \frac{D - d}{D} \times 100 \quad (1)$$

trong đó, D là đường kính tản nấm *A. niger* trên đĩa đối chứng (mm) và d là đường kính tản nấm *A. niger* trên đĩa thí nghiệm (mm). Thí nghiệm được lặp lại ba lần.

Định danh chủng nấm *Trichoderma* đối kháng mạnh

Nhận dạng hình thái

Các chủng nấm phân lập được nhận dạng sơ bộ dựa trên các đặc trưng hình thái của nấm *Trichoderma* như màu sắc, sự phát triển sợi nấm và kết cấu tản nấm, sự phân nhánh của bào tử, kích thước và hình dạng bào tử [16].

Định danh phân tử

Nuôi cấy chủng nấm *Trichoderma* được tuyển chọn trong môi trường PDA. Sợi nấm ở giai đoạn phát triển mạnh được chuyển sang môi trường PDB (Potato Dextrose Broth), nuôi lắc ở 28 ± 2 °C với tốc độ 180 vòng/phút trong 2 ngày để sản xuất sinh khối. DNA được tách chiết bằng kit TopPURE® Plant DNA Extraction Kit (ABT) (Công ty TNHH Giải pháp Y Sinh ABT, Việt Nam). Vùng Internal transcribed spacer (ITS) của nấm được khuếch đại với cặp primer ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCGG-3') và ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') [17]. Quá trình khuếch đại phản ứng chuỗi polymerase (PCR) được thực hiện trong máy gia nhiệt SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) với tổng thể tích phản ứng là 50 µL chứa 25 µL Go Taq Green 2X Master Mix (Promega, USA), 5 µL (50 ng) mẫu DNA, 5 µL mỗi mồi (10 pmol) và 15 µL H₂O. Chu trình khuếch đại như sau: 95 °C trong 10 phút; 30 chu kỳ ở 95 °C trong 50 giây, 53 °C trong 50 giây và 72 °C trong 1 phút; 72 °C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,0 % và được nhuộm bằng Safe-View™ Classic Nucleic Acid Stain (Applied Biological Materials Inc., Canada). Hình ảnh điện di được ghi nhận bằng hệ thống Ultra Slim LED Illuminator. Sản phẩm được tinh sạch và tiến hành

giải trình tự tại công ty First BASE (Malaysia). Các trình tự thô được xử lý bằng phần mềm BioEdit v. 7 [18] và so sánh với các trình tự tương ứng của các chủng đã được đăng ký trên GenBank bằng công cụ BLASTn trên National Center for Biotechnology Information - NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Phân tích phát sinh loài

Cây phát sinh loài được xây dựng bằng 31 trình tự tham chiếu vùng ITS được thu thập và tải xuống từ NCBI của các loài thuộc chi *Trichoderma* (Bảng 2) cùng với trình tự ITS của chủng HL6. Hai chủng *Protocrea farinosa* CBS 121551 (chủng TYPE, NR_119700) và *Protocrea pallida* CBS 29978 (chủng TYPE, NR_111329) được sử dụng làm nhóm ngoài (outgroup). Các trình tự này được căn chỉnh bằng ClustalW [19]. Sau đó, cây phát sinh loài được dựng bằng phần mềm trực tuyến IQ-TREE v. 2.1.3 bằng phương pháp Maximum Likelihood với 1000 lần ultrafast bootstrap [20]. ModelFinder được sử dụng để xác định mô hình thuật toán tối ưu cho phân tích phát sinh loài [21]. Kết quả được hiển thị bằng phần mềm Interactive Tree of Life (iTOL) v. 5 và chỉnh sửa thủ công bằng Adobe Illustrator CC 2021 (Adobe Systems, CA, USA) [22].

Ảnh hưởng của chủng nấm *Trichoderma* HL6 đến sự nảy mầm của hạt lạc

Chủng nấm *Trichoderma* HL6 được nuôi cấy trên môi trường PDA trong 5 ngày ở 28 ± 2 °C. Dịch bào tử nấm được xác định nồng độ bằng buồng đếm Neubauer, sau đó pha loãng bằng nước cất vô trùng đến nồng độ 10^8 bào tử/mL để sử dụng cho thí nghiệm [23]. Thí nghiệm được tiến hành trên giống lạc L14. Chọn hạt lạc giống đồng đều, không bị sâu bệnh. Ở công thức thí nghiệm, lấy ngẫu nhiên 100 hạt lạc giống ngâm trong 500 mL nước cất có bổ sung 30 mL dung dịch huyền phù bào tử HL6 nồng độ $1,5 \times 10^8$ bào tử/mL trong thời gian 3 h. Ở công thức đối chứng, hạt lạc được ngâm trong 500 mL nước cất. Hạt lạc ở công thức thí nghiệm và đối chứng sau đó được vớt ra, để ráo nước và ủ riêng trong các khay ở điều kiện ở nhiệt độ phòng, theo dõi sự nảy mầm của hạt sau 48 h. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Xác định tỉ lệ nảy mầm của hạt lạc theo công thức:

$$\text{Tỉ lệ nảy mầm (\%)} = \frac{\text{Số hạt lạc nảy mầm}}{\text{Tổng hạt lạc}} \times 100 \quad (1)$$

Thử nghiệm khả năng kiểm soát nấm bệnh *A. niger* của chủng nấm *Trichoderma* HL6 trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 công thức, 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại được thực hiện trên 1 chậu nhựa (kích thước $35 \times 30 \times 30$ cm) chứa 5 kg đất hữu cơ trồng cây đã được khử trùng, mỗi chậu được gieo 5 hạt lạc, các công thức gồm:

Sử dụng 15g hạt giống lạc ngâm trong 2 mL dung dịch nấm *Trichoderma* HL6 (mật độ $1,5 \times 10^8$ bào tử/mL) trong thời gian 3 giờ, sau đó gieo hạt vào chậu thí nghiệm. Hai tuần sau gieo (cây lạc có 2–4 lá), tưới 20 mL dung dịch nấm *Trichoderma* HL6 ở mật độ $1,5 \times 10^8$ bào tử/mL cho một chậu thí nghiệm vào gốc cây lạc và vùng đất xung quanh gốc theo từng công thức tương ứng. Sau 1 ngày, tưới 20 mL dung dịch bào tử nấm/chậu với mật độ 1×10^6 bào tử/mL *A. Niger* QT1 vào gốc lạc và vùng đất xung quanh gốc. Công thức 1 và 2 được sử dụng với nước cất. Sau

Bảng 1. Công thức thí nghiệm

Công thức thí nghiệm	Cách xử lý
Công thức 1 (CT1)	Cây không bị nhiễm <i>A. niger</i> , hạt lạc và cây lạc được xử lý bằng nước cất.
Công thức 2 (CT2)	Cây bị nhiễm <i>A. niger</i> , hạt lạc và cây lạc được xử lý bằng chủng nấm <i>Trichoderma</i> HL6.
Công thức 3 (CT3 – Đối chứng)	Cây bị nhiễm <i>A. niger</i> , hạt lạc và cây lạc được xử lý bằng nước cất.

đó, đặt các chậu thí nghiệm trong nhà lưới và theo dõi tỷ lệ cây chết trong mỗi công thức.

Chỉ tiêu theo dõi: Theo dõi tỷ lệ cây chết do nhiễm bệnh (%) tại các thời điểm 7, 14, 21, 28 và 45 ngày sau nhiễm nấm bệnh (SNNB) [24].

2.1 Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phân tích phương sai One-way ANOVA (Duncan's test) bằng phần mềm SPSS v. 26. Sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các giá trị trung bình được xác định với $p < 0,05$.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Phân lập chủng nấm *Trichoderma* đối kháng nấm bệnh *A. niger*

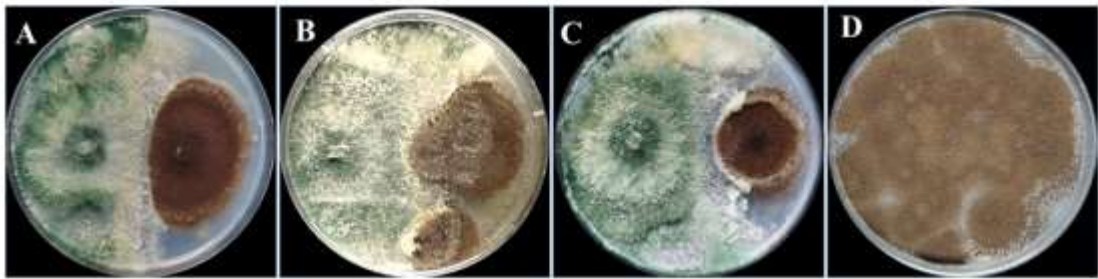
Từ các mẫu đất vùng rễ cây lạc khoẻ thu thập ở tỉnh Quảng Trị và tỉnh Thừa Thiên Huế, chúng tôi đã phân lập được 06 chủng nấm có hoạt tính đối kháng với chủng nấm bệnh *A. niger* QT1. Hiệu suất đối kháng với nấm bệnh của 6 chủng nấm này đạt từ 37,04 đến 77,41% (Bảng 2). Trong đó, chủng HL6 có hiệu suất đối kháng cao nhất, đường kính vòng ức chế sinh trưởng nấm bệnh đạt 69,67 mm, hiệu suất đối kháng đạt 77,41% và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại. Vì vậy, chủng HL6 được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo (Hình 1).

Màu sắc sợi nấm của loài nấm *A. niger* rất phức tạp, trên các môi trường nuôi cấy khác nhau, ở các điều kiện nhân nuôi khác nhau và thậm chí là các chủng nấm khác nhau màu sắc sợi

Bảng 2. Hiệu suất đối kháng của các chủng nấm đối với nấm bệnh *A. niger* QT1

Ký hiệu chủng	Đường kính vòng ức chế (D-d, mm)	Hiệu suất đối kháng (%)	Địa điểm thu mẫu
VL1	33,33 ± 3,06 ^f	37,04 ± 3,40 ^d	Vĩnh Linh, Quảng Trị
Đak3	42,00 ± 2,00 ^e	46,67 ± 2,23 ^c	Đakrong, Quảng Trị
HL6	69,67 ± 1,15 ^a	77,41 ± 1,28 ^a	Hải Lăng, Quảng Trị
PhĐ3	43,00 ± 2,65 ^e	47,78 ± 2,94 ^c	Phong Điền, Thừa Thiên Huế
TPH4	45,33 ± 2,08 ^e	50,37 ± 2,31 ^c	Thành phố Huế, Thừa Thiên Huế
PhV1	55,33 ± 0,58 ^{bc}	61,48 ± 0,64 ^b	Phú Vang, Thừa Thiên Huế

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test). M ± SD: Trung bình mẫu (Mean) ± độ lệch chuẩn.



Hình 1. Khả năng đối kháng của một số chủng nấm đối kháng với nấm bệnh *A. niger* QT1 sau 6 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA, (A) chủng TPH4, (B) chủng PhV1, (C) chủng HL6 và (D) đĩa đối chứng.

nấm có thể khác nhau. Một số nghiên cứu cho thấy màu sắc tản nấm trên môi trường nuôi cấy có màu đen [25, 26], một số nghiên cứu khác lại chỉ ra tản nấm *A. niger* có màu nâu nhạt đến nâu đậm [27–29]. Về mặt di truyền màu sắc bào tử nấm *A. niger* được quy định bởi nhiều gen khác nhau trong chu trình sinh tổng hợp polyketide. Dựa vào mức độ biểu hiện khác nhau của các gen trong chu trình này mà màu sắc của *A. niger* có thể thay đổi từ vàng nhạt, xanh oliu, nâu, đen và thậm chí không màu (màu trắng). Sự thay đổi màu sắc xảy ra khi một hoặc nhiều gen trong chu trình sinh tổng hợp polyketide không hoạt động dẫn đến sự gián đoạn của chu trình tạo sắc tố ở bào tử nấm [30]. Trong nghiên cứu này, màu sắc của nấm *A. niger* có màu nâu đậm, điều này thể hiện sự đa dạng về màu sắc của loài nấm này trên môi trường nuôi cấy.

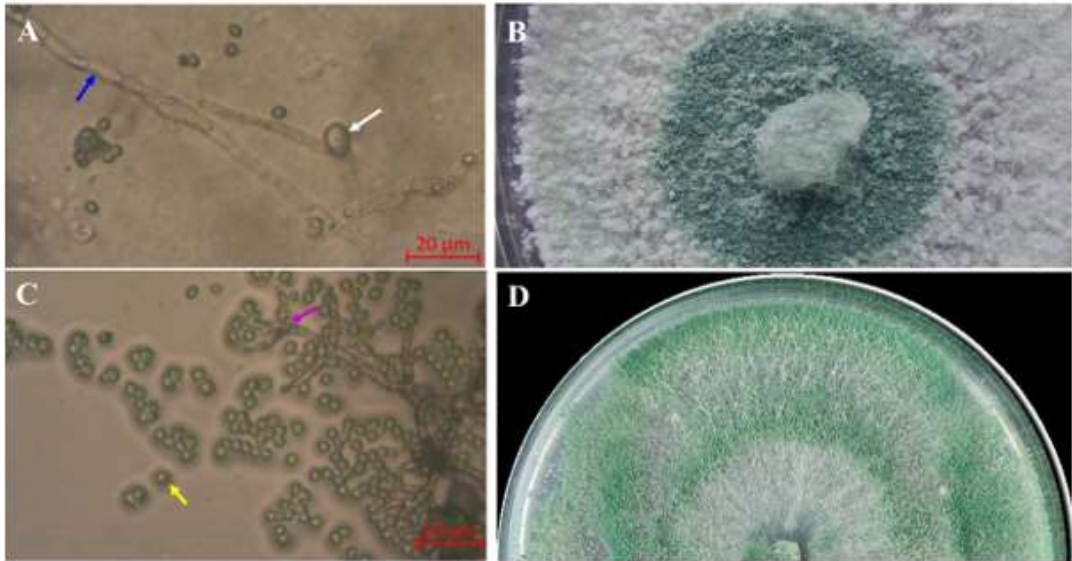
Các loài nấm thuộc chi *Trichoderma* là một trong những tác nhân kiểm soát sinh học được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi để phòng chống các bệnh nấm, vi khuẩn, tuyến trùng ở thực vật [31]. Trước đây, đã có các nghiên cứu xác nhận về khả năng của các loài *T. viride*, *T. harzianum*, *T. hamanatum*, *T. reesei* và *T. koningii* trong kiểm soát sinh học chống lại nấm *S. rolfsii*, *A. niger* và *A. flavus* gây bệnh ở cây lạc [32]. Kết quả khảo sát của Trần Thị Thu Hà và Phạm Thanh Hòa về khả năng đối kháng của 40 chủng nấm *Trichoderma* phân lập từ các mẫu đất ở hai tỉnh Quảng Trị, Thừa Thiên Huế cho thấy có 11 chủng đối kháng cao với nấm bệnh *S. rolfsii* với hiệu suất ức chế sợi nấm đạt được từ 61,39 đến 88,06% [11]. Gần đây, các báo cáo của Alwadai và cs., Raja và cs. cũng xác nhận rằng 3 loài *T. harzianum*, *T. brevicompactum* và *T. velutinum* có khả năng đối kháng với các nấm bệnh *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* và *Exserohilum rostratum*, ... [33, 34].

3.2 Định danh chủng nấm HL6

Trên môi trường PDA, sợi nấm của chủng HL6 khi mới xuất hiện có màu trắng, lúc hình thành bào tử có màu xanh lục hoặc xanh lục nhạt. Tản nấm sinh trưởng nhanh, lúc đầu có màu trắng, hơi xốp; sau 2 ngày tản nấm chuyển thành màu xanh lục, sau 6 ngày đường kính tản nấm đạt tới 90 mm và hình thành nhiều bào tử. Bào tử có dạng hình cầu, hình trứng, bề mặt nhẵn, thể bình có dạng hình trụ (Hình 2).

Kết quả điện di sản phẩm PCR ghi nhận xuất hiện băng ở vị trí khoảng 600 bp so với thang chuẩn. Quá trình định danh phân tử được tiến hành bằng cách sử dụng trình tự sau căn chỉnh của chủng HL6 so sánh với các chuỗi trình tự tham chiếu trong cơ sở dữ liệu nucleotide NCBI

bằng công cụ BLASTn. Kết quả BLASTn ghi nhận rằng chủng nấm HL6 có mức độ tương đồng cao (100%) với trình tự tham chiếu vùng ITS của chủng *T. asperellum* CBS 433.97 (chủng TYPE, MH021852) (Bảng 3).



Hình 2. Đặc điểm của chủng nấm HL6, quan sát dưới kính hiển vi Olympus BX51 (độ phóng đại 40X) (A) sợi nấm; (C) bào tử; (B và D) đặc điểm tản nấm HL6 trên môi trường PDA.

Bảng 3. Thông tin các chủng tham chiếu sử dụng sử dụng trong phân tích phát sinh loài

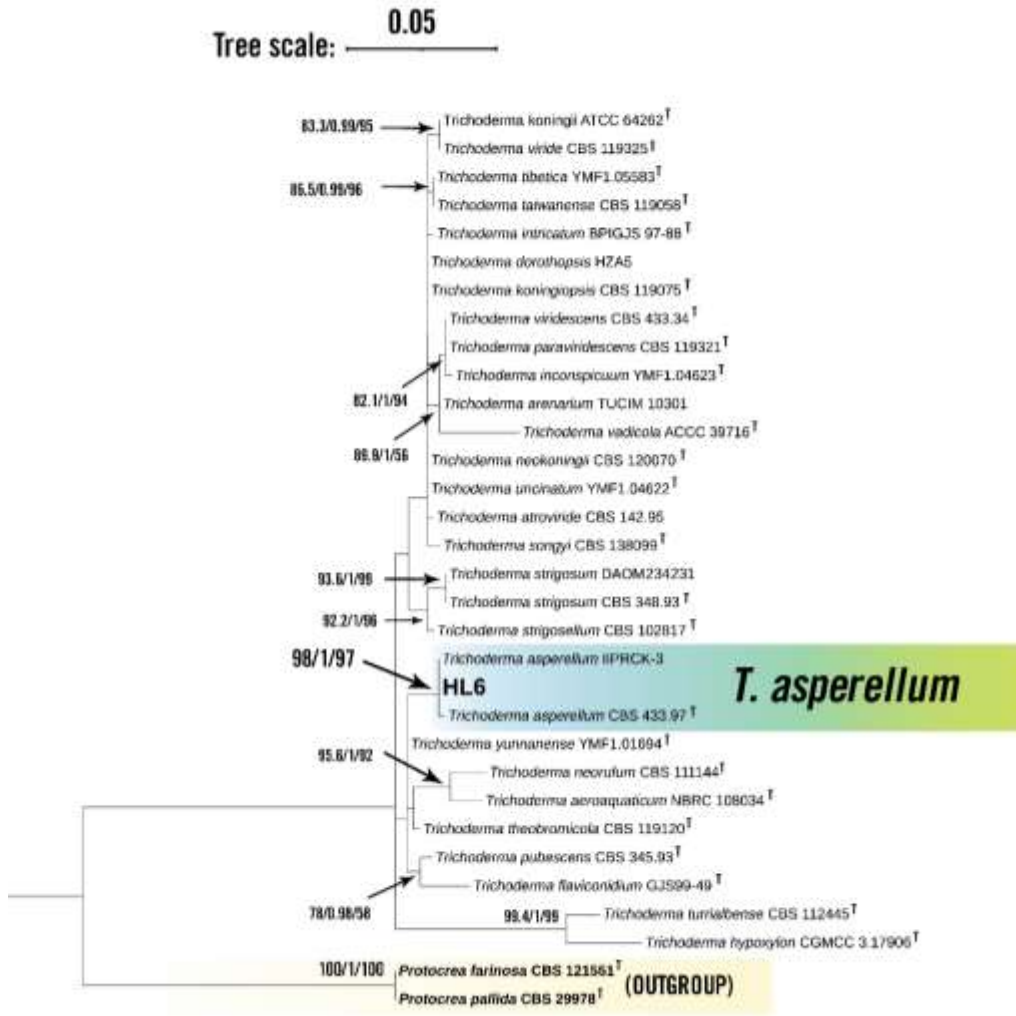
Tên loài tham chiếu	Chủng	Mã truy cập Genbank	Mức độ tương đồng (%)	Ghi chú
<i>Trichoderma asperellum</i>	CBS 433.97	NR_130668	100	TYPE
<i>Trichoderma pubescens</i>	CBS 345.93	MH862413	98,49	TYPE
<i>Trichoderma strigosum</i>	DAOM 234231	EU280114	97,48	
<i>Trichoderma koningii</i>	CBS 345.93	NR_138456	97,44	TYPE
<i>Trichoderma dorotheopsis</i>	HZA5	MH624140	97,32	
<i>Trichoderma neorufum</i>	CBS 111144	NR_077132	96,90	TYPE
<i>Trichoderma uncinatum</i>	YMF 1.04622	MK795994	97,09	TYPE
<i>Trichoderma inconspicuum</i>	YMF 1.04623	MK795993	96,98	TYPE
<i>Trichoderma turrialbense</i>	CBS 112445	NR_138448	90,51	TYPE
<i>Trichoderma atroviride</i>	CBS 142.95	AF456917	97,09	
<i>Trichoderma flaviconidium</i>	GJS 99-49	DQ023301	97,66	TYPE
<i>Trichoderma strigosum</i>	CBS 348.93	AY387661	97,50	TYPE

Tên loài tham chiếu	Chủng	Mã truy cập Genbank	Mức độ tương đồng (%)	Ghi chú
<i>Trichoderma arenarium</i>	TUC IM10301	MT217123	97,44	
<i>Trichoderma viridescens</i>	CBS 433.34	AY380905	97,10	TYPE
<i>Trichoderma yunnanense</i>	YMF1.01694	AY941823	99,47	TYPE
<i>Trichoderma theobromicola</i>	CBS 119120	MH863052	98,68	TYPE
<i>Trichoderma asperellum</i>	IIPRCK-3	MK841004	99,66	
<i>Trichoderma hypoxylon</i>	CGMCC 3.17906	NR_153269	90,28	TYPE
<i>Trichoderma vadicola</i>	ACCC 39716	NR_184886	95,55	TYPE
<i>Trichoderma aeroaquaticum</i>	NBRC 108034	NR_134333	97,04	TYPE
<i>Trichoderma paraviridescens</i>	CBS 119321	NR_134367	96,79	TYPE
<i>Trichoderma viride</i>	CBS 119325	NR_138441	97,02	TYPE
<i>Trichoderma intricatum</i>	BPI GJS 97-88	NR_134343	97,10	TYPE
<i>Trichoderma tibetica</i>	YMF 1.05583	NR_176705	97,25	TYPE
<i>Trichoderma neokoningii</i>	CBS 120070	NR_138446	97,58	TYPE
<i>Trichoderma strigosellum</i>	CBS 102817	NR_134437	97,11	TYPE
<i>Trichoderma songyi</i>	CBS 138099	NR_159053	97,24	TYPE
<i>Trichoderma taiwanense</i>	CBS 119058	NR_144874	97,49	TYPE
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	CBS 119075	NR_131281	97,49	TYPE
<i>Protocrea farinosa</i>	CBS 121551	NR_119700	83,48	TYPE
<i>Protocrea pallida</i>	CBS 299,78	NR_111329	83,68	TYPE

Ghi chú: TYPE là chủng chuẩn tham chiếu.

Kết quả này cũng được xác nhận bằng cách sử dụng phương pháp cây phá hệ - phân tích phát sinh loài. Mô hình tối ưu: JC được lựa chọn theo Bayesian information criterion (BIC) để phân tích phát sinh loài. Cụ thể, chủng HL6 được tái cấu trúc (reconstruction) trong cụm đơn ngành (monophyletic clade) với sự có mặt của các chủng tham chiếu như *T. asperellum* CBS 433.97 (chủng TYPE) và *T. asperellum* PRCK-3 (MK841004) với tham số hỗ trợ cao (SH-aLRT)/ Bayesian posterior probability (BPP)/Ultrafast bootstrap (UFB): 98/1/97 (Hình 3). Dựa trên các kết quả trên, cho thấy chủng HL6 được xác định thuộc loài *T. asperellum*.

Tại mỗi nút, các giá trị biểu thị các giá trị tham số hỗ trợ theo thứ tự lần lượt là SH-aLRT/ xác suất hậu nghiệm Bayesian (BPP)/ultrabootstrap (UFB) ML. Các chủng TYPE tham chiếu đại diện được ký hiệu bằng "T". Thanh tỷ lệ biểu thị tỷ lệ thay thế nucleotide trên mỗi vị trí. Hai chủng *Protocrea farinosa* CBS 121551 và *Protocrea pallida* CBS 29978 được sử dụng làm nhóm ngoài (outgroup).



Hình 3. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự ITS của chủng nấm HL6.

3.3 Ảnh hưởng của chủng *T. asperellum* HL6 đến sự nảy mầm của hạt lạc

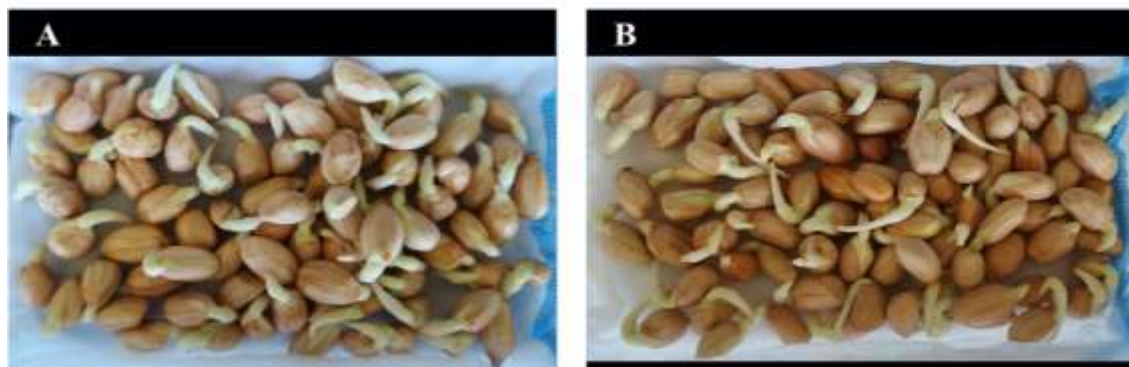
Tỷ lệ nảy mầm của hạt lạc giống đạt 99,33 % đối với công thức thí nghiệm và đạt 98,67% đối với công thức đối chứng nhưng không khác biệt ở mức ý nghĩa thống kê giữa hai công thức (Bảng 4, Hình 4).

Như vậy, có thể khẳng định chủng *T. asperellum* HL6 không làm giảm tỉ lệ nảy mầm của hạt lạc. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu của Ayyandurai và cs., cho biết chủng *T. longibrachiatum* SP-20 đã không ảnh hưởng đến sự nảy mầm của hạt lạc với tỷ lệ nảy mầm đạt 93,33% [35].

Bảng 4. Tỷ lệ nảy mầm của hạt lạc khi được xử lý với chủng nấm *T. asperellum* HL6

Công thức	Tỷ lệ hạt nảy mầm (%)
Xử lý với nấm <i>T. asperellum</i> HL6	99,33 ^a ± 0,58
Đối chứng	98,67 ^a ± 1,16

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test). M ± SD: Trung bình mẫu (Mean) ± độ lệch chuẩn (Standard deviation).



Hình 4. Tỷ lệ nảy mầm của hạt lạc, (A) xử lý bằng dung dịch bào tử nấm *T. asperellum* HL6, (B) xử lý bằng nước cất.

3.4 Khả năng hạn chế bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc của chủng nấm *T. asperellum* HL6 trong điều kiện nhà lưới

Chủng nấm *T. asperellum* HL6 thể hiện khả năng hạn chế bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc khi thử nghiệm ở điều kiện nhà lưới (Bảng 5).

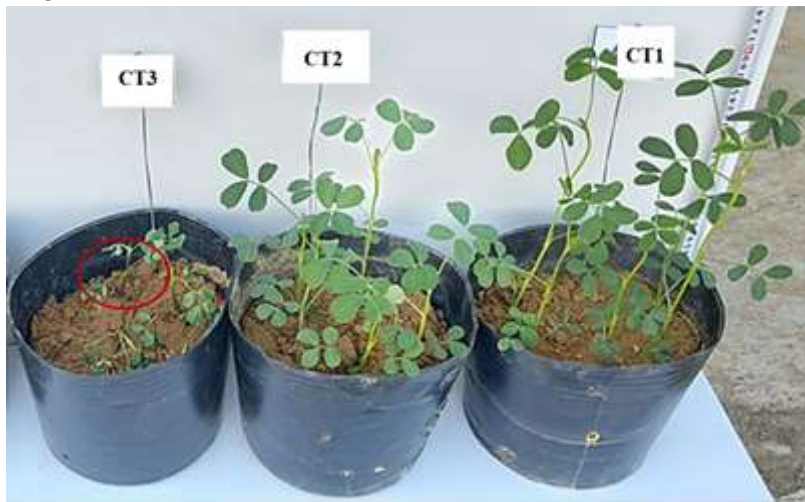
Bảy ngày sau nhiễm nấm *A. niger* QT1, ở CT3 có tỉ lệ cây chết lên đến 60%, khác biệt rõ so với các công thức còn lại, tiếp đến CT2 (*T. asperellum* HL6) tỉ lệ cây bị chết là 2,2%. Như vậy sử dụng dung dịch bào tử nấm *T. asperellum* HL6 có hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen ở mức sai khác có ý nghĩa thống kê.

Bảng 5. Hiệu quả phòng trừ sinh học của chủng nấm *T. asperellum* HL6 đối với bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc trong điều kiện nhà lưới

Công thức	Tỷ lệ (%) cây lạc bị chết do héo rũ gốc mốc đen tại các thời điểm điều tra					Hiệu quả phòng chống bệnh 45 NSN (%)
	7 NSN	14 NSN	21 NSN	28 NSN	45 NSN	
CT1	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	100
CT2	2,2 ± 3,8 ^b	4,5 ± 3,8 ^b	4,4 ± 3,8 ^b	4,4 ± 3,8 ^b	4,4 ± 3,8 ^b	95,5
CT3 (Đ/c)	60,0 ± 6,6 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	0,0

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test). M ± SD: Trung bình mẫu (Mean) ± độ lệch chuẩn (Standard deviation). NSN: Ngày sau nhiễm.

Mười bốn ngày sau nhiễm nấm bệnh, tỷ lệ cây chết cao nhất lên đến 100% được ghi nhận ở CT3, tuy nhiên ở CT2 có tỷ lệ cây chết thấp hơn (4,4%). Ở các kỳ điều tra tiếp theo, tỉ lệ cây chết của các công thức không thay đổi. Hiệu quả phòng chống bệnh héo rũ gốc mốc đen đạt 95,5% sau 45 ngày lây nhiễm. Như vậy, kết quả khảo sát cho thấy công thức xử lý bằng chủng nấm *T. asperellum* HL6 thể hiện khả năng kiểm soát tốt bệnh héo rũ gốc mốc đen hại lạc và duy trì hiệu quả ổn định trong điều kiện nhà lưới (Hình 5).



Hình 5. Khả năng kiểm soát bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc của chủng nấm *T. asperellum* HL6 trong điều kiện nhà lưới 14 ngày sau nhiễm nấm (Khoanh tròn là cây bị héo vì nhiễm nấm, cổ rễ bị thối, phủ lớp nấm màu đen)

4 Kết luận và đề nghị

4.1 Kết luận

Trong điều kiện *in vitro*, chủng HL6 có khả năng đối kháng mạnh với nấm bệnh *A. niger* QT1, đường kính vùng ức chế sinh trưởng nấm bệnh đạt 69,67 mm, hiệu suất đối kháng đạt 77,41%. Phân tích trình tự ITS và so sánh trình tự trên NCBI bằng công cụ BLAST cho thấy chủng HL6 thuộc loài *T. asperellum*. Chủng nấm *T. asperellum* HL6 không ảnh hưởng đến khả năng nảy mầm của hạt lạc. Thử nghiệm lây nhiễm nhân tạo trong điều kiện nhà lưới, cho thấy chủng nấm *T. asperellum* HL6 thể hiện khả năng kiểm soát tốt bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc do nấm *A. niger* gây ra khi xử lý hạt giống trước khi gieo và tưới chế phẩm vào thời điểm trước khi nhiễm nấm bệnh 1 ngày với hiệu quả kiểm soát bệnh đạt 95,5%.

4.2 Đề nghị

Tiếp tục thử nghiệm chế phẩm nấm *T. asperellum* HL6 trên đồng ruộng để đánh giá hiệu quả phòng trừ sinh học của chủng nấm này được chính xác hơn.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số [VINIF.2022.TS042].

Tài liệu tham khảo

1. Bajaya, T., Ghasolia, R. P., Bajya, M., Choudhary, M., Shivran, M., Kumari, P., Sharma J. (2022), Isolation, identification, pathogenicity and host range of *Aspergillus niger* causing collar rot of groundnut (*Arachis hypogaea*), *The Pharma Innovation Journal*, 11(2), 1441–1445.
2. Arya, S. S., Salve, A. R., Chauhan, S. (2016), Peanuts as functional food: a review, *J Food Sci Technol*, 53(1), 31–41. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2007-9>.
3. Lora, S., and Begum, T. (2019), Managing of Collar Rot Disease in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) by few Chemicals, *Int. J. Sci. Res. in Biological Sciences*, 6(3), 2347–7520. <https://doi.org/10.26438/ijrbs/v6i3.133136>
4. Kumar, C. V., Saifulla, M., Reddy, M. G., Naveenkumar, R., Prabhukarthikeyan, S. R. (2020), Occurrence, Pathogenicity and Assessment of Groundnut Genotypes Resistance to *Aspergillus niger* Inciting Collar Rot Disease, *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 9(11), 874–886. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.911.105>.
5. Mohammed, A., and Chala, A. (2014), Incidence of *Aspergillus* contamination of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) in Eastern Ethiopia, *African Journal of Microbiology Research*, 8(8), 759–765. <https://doi.org/10.5897/ajmr12.2078>.
6. Gajera, H. P., and Vakharia, D. N. (2012), Production of lytic enzymes by *Trichoderma* isolates during *in vitro* antagonism with *Aspergillus niger*, the causal agent of collar rot of peanut, *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 43–52.
7. Hieu, N. X., Nga, N. T. M., Huy, N. D., Co, N. Q., Thuyet, C. T., Hoai, P. T. T., Thuy, N. T. T. (2023), Identification and characterization of *Aspergillus niger* causing collar rot of groundnut (*Arachis hypogaea*), *Biodiversitas*, 24(5), 2556–2562. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240507>.
8. Zhihui, B., Bo, J., Yuejie, L., Jian, C., Zuming L. (2008), Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation, *Journal of Environmental Sciences*, 20(3), 353–358. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)60055-8](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)60055-8).
9. Loc, N. H., Huy, N. D., Quang, H. T., Lan, T. T., Ha, T. T. T. (2020), Characterisation and antifungal activity of extracellular chitinase from a biocontrol fungus, *Trichoderma asperellum* PQ34, *Mycology*, 11(1), 38–48. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1703839>.
10. Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwiy, M. S., Ramakrishnan, M., Landi, M., Araniti, F., Sharma, A. (2020), *Trichoderma*: The ‘secrets’ of a multitalented biocontrol agent, *Plants*, 9(6), 762–785. <https://doi.org/10.3390/plants9060762>.
11. Trần Thị Thu Hà và Phạm Thanh Hòa (2012), Khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma* với nấm bệnh hại cây trồng *Sclerotium rolfsii* Sacc trong điều kiện *in vitro*, *Tạp chí Khoa học, Đại học*

Huế, 75A(6), 49–55.

12. Nguyễn Đình Thi, Lê Đình Hùng, Trần Thị Thu Hà, và Đỗ Vũ Quốc (2014), Nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm *Trichoderma* và *Pseudomonas* trên các nền phân bón đến lạc hè thu tại Thừa Thiên Huế, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, 98, 177–187.
13. Gajera, H., Rakholiya, K., Vakharia, D. (2011), Bioefficacy of *Trichoderma* isolates against *Aspergillus niger* Van Tieghem inciting collar rot in groundnut (*Arachis hypogaea* L.), *Journal Of Plant Protection Research*, 51(3), 240–247. <https://doi.org/10.2478/v10045-011-0040-x>.
14. Askew, D. J., and Laing, M. D. (1993), An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species, *Plant Pathology*, 42(5), 686–690.
15. Watanabe, N. (1988), Antagonism by various kinds of *Trichoderma* fungi to soil-born plant pathogen, *Bulletin of the Faculty of Agriculture Meiji University*, 66, 45–50.
16. Bissett, J. (1984), A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov, *Canadian Journal of Botany*, 62(5), 924–931. <https://doi.org/10.1139/b84-131>.
17. Manter, D. K., Vivanco, J. M. (2007), Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis, *Journal of Microbiological Methods*, 71(1), 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.06.016>.
18. Hall, T., Biosciences, I., Carlsbad, C. (2011), BioEdit: an important software for molecular biology, *GERF Bulletin of Biosciences*, 2(1), 60–61.
19. Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994), CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids*, 22(22), 4673–4680.
20. Trifinopoulos, J., Lam, N., T., Haeseler, A., V., Minh, B., Q. (2016), W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis, *Nucleic Acids Research*, 44, 232–235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>.
21. Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., Haeseler, A., V., Jermini, L. S. (2017), ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates, *Nature Methods*, 14(6), 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>.
22. Letunic, I., and Bork, P. (2021), Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation, *Nucleic Acids Research*, 49, 293–296, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>.
23. Tao, V. X., Tho, N. T., Linh, M. T. D., Tri, B. T., Diep, L. H., Ha, B. T. V., Huy, N. Q., Binh, N. X., Tuan, T. V. (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. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.11.019>.
24. Rao, S. K. T., and Sitaramaiah, K. (2000), Management of collar rot disease (*Aspergillus niger*) in groundnut with *Trichoderma* spp., *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 30(2), 221–224.

25. Gautam AK, Bhadauria R. (2012), Characterization of *Aspergillus* species associated with commercially stored triphala powder, *Afr J Biotechnol*, 11(104), 16814–16823.
26. Kasfi K., Taheri P, Jafarpour B, Tarighi S. (2018), Characterization of antagonistic microorganisms against *Aspergillus* spp. from grapevine leaf and berry surfaces, *J Plant Pathol*, 100, 179–190.
27. Guchi, E. (2015), Effect of storage time on occurrence of *Aspergillus* species in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) in eastern Ethiopia, *J Appl Environ Microbiol* [Internet], 3(1), 1–5. DOI:10.12691/jaem-3-1-1.
28. Njoroge, S. M. C., Kanenga, K., Siambi, M., Waliyar, F., & Monyo, E. S. (2016), Identification and toxigenicity of *Aspergillus* spp. from soils planted to peanuts in Eastern Zambia, *Peanut Science*, 43(2), 148–156.
29. Dania, VO, Fajemisin, AO, Azuh, VO. (2021), Morphological and molecular characterization of *Aspergillus niger* causing postharvest rot of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir), *Arch Phytopathol Plant Prot*, 54(1), 1–19.
30. Jørgensen, T. R., Nielsen, K. F., Arentshorst, M., Park, J., van den Hondel, C. A., Frisvad, J. C., & Ram, A. F. (2011), Submerged Conidiation and Product Formation by *Aspergillus niger* at Low Specific Growth Rates Are Affected in Aerial Developmental Mutants, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5270–5277. doi:10.1128/aem.00118-11.
31. Kredics, L., Büchner, R., Balázs, D., Allaga, H., Kedves, O., Racić, G., Varga, A., Nagy, V. D., Vágvölgyi, C., Sipos, G. (2024), Recent advances in the use of *Trichoderma* containing multicomponent microbial inoculants for pathogen control and plant growth promotion, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40, 162–176. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03965-5>.
32. Bagwan, N. B. (2011), Evaluation of biocontrol potential of *Trichoderma* species against *Sclerotium rolfsii*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*, *International Journal of Plant Protection*, 4(1), 107–111.
33. 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), 2525–2539.
34. Raja, M., Sharma, R. K., Jambhulkar, P. P., Pandian, R. T. P., Sharma, P. (2023), Comparative evaluation of native *Trichoderma* species from groundnut rhizosphere against stem rot caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Indian Phytopathology*, 76(2), 459–471. <https://doi.org/10.1007/s42360-023-00610-3>.
35. Ayyandurai, M., Akila, R., Manonmani, K., Theradimani, M., Vellaikumar, S. (2021), Phytostimulation and growth promotion activities of *Trichoderma* spp. on groundnut (*Arachis hypogaea* L.) crop, *Journal of Applied and Natural Science*, 13(4), 1172–1179.