

Bài báo nghiên cứu

PHÂN LẬP CÁC CHỦNG NẤM SĂN TUYẾN TRÙNG CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ TUYẾN TRÙNG TRONG ĐẤT VÙNG RỄ CÂY CÓ MÚI

Nguyễn Đào Thanh Hương*, Lê Thanh Bình, Nguyễn Thị Liên, Hồ Thị Nguyệt

Chi nhánh viện Ứng dụng Công nghệ tại Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ: Nguyễn Đào Thanh Hương – Email: ngdthanhhuong2312@gmail.com

Ngày nhận bài: 23-3-2021; ngày nhận bài sửa: 06-7-2022; ngày duyệt đăng: 01-9-2022

TÓM TẮT

Cây có múi là một trong những cây chủ lực của đồng bằng sông Cửu Long, tuy nhiên bệnh vàng lá thối rễ đang gây hại nghiêm trọng, làm giảm sức sống của cây, năng suất và chất lượng quả. Bệnh chủ yếu gây ra do tuyến trùng *Tylenchulus semipenetrans* làm tổn thương rễ tạo điều kiện cho nấm *Fusarium* sp phát triển gây thối rễ. Chính vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu là tuyển chọn được một số chủng nấm có khả năng kiểm soát *T. semipenetrans* kí sinh trên cây có múi. Nghiên cứu đã phân lập được một chủng *Arthrobotrys* sp., hai chủng *Paecilomyces* sp và mười bốn chủng *Trichoderma* sp. Trong đó, *Arthrobotrys* DP7 tiêu diệt tuyến trùng đạt 72,82% sau 15 ngày thí nghiệm ở mật độ bào tử 2×10^7 CFU/ml, *Paecilomyces* NT11 có khả năng kí sinh trên trứng đạt 90,67%, và *Trichoderma* NM22 có khả năng ức chế sự nở của trứng cao đạt 80,33% sau 7 ngày thí nghiệm.

Từ khóa: *Arthrobotrys* sp.; cây có múi; nấm săn tuyến trùng, *Paecilomyces* sp.; *Trichoderma* sp.; *Tylenchulus semipenetrans*

1. Giới thiệu

Cây có múi là một trong những loài cây trồng trọng điểm của Việt Nam nói chung và đồng bằng sông Cửu Long nói riêng, tuy nhiên hiện nay bệnh vàng lá thối rễ đang ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức sống và năng suất của cây có múi (Trinh et al., 2016). Tuyến trùng *Tylenchulus semipenetrans* được xác định là một trong những loài gây hại chính trên cây có múi, chúng kí sinh trên rễ cây và là nhân tố chính gây bệnh chết chậm, gây thiệt hại năng suất hàng năm từ 30-50% (Suganthi et al., 2019).

Nấm săn tuyến trùng (Nematophagous fungi) có trên 200 loài, là chủng nấm có khả năng bắt, giết hoặc kí sinh trên tuyến trùng và sử dụng tuyến trùng làm nguồn dinh dưỡng thay thế hoặc bổ sung (Hsueha et al., 2013; Nordbring-Hertz, 2006). Chúng được phân thành 4 nhóm theo phương thức tấn công tuyến trùng: nấm bẫy tuyến trùng sử dụng keo dính hoặc bẫy cơ học, nấm nội kí sinh sử dụng bào tử, nấm kí sinh trứng hoặc con cái bằng đầu sợi nấm và sinh độc tố nấm cố định tuyến trùng trước khi xâm nhập (Liu et al, 2009). Nấm bẫy

Cite this article as: Nguyen Dao Thanh Huong, Le Thanh Binh, Nguyen Thi Lien, & Ho Thi Nguyet (2022). Isolating Nematophagous fungi for the purpose of controlling nematodes parasite on citrus. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 19(9), 1393-1403.

tuyến trùng có 3 chi chính là *Arthrobotrys*, *Dactylellina* và *Drechslerella* (Nguyen et al., 2019). Trong đó, chi *Arthrobotrys* đặc biệt là *A. oligospora* được báo cáo là chi nấm phân bố rộng rãi có thể được tìm thấy ở châu Âu, châu Á, châu Mỹ và có khả năng phát triển trong nhiều môi trường bao gồm các loại đất tự nhiên, phân động vật và trong môi trường nước (Niu & Zhang, 2011). Bên cạnh đó, nấm kí sinh trứng cũng là một trong những hướng có tiềm năng kiểm soát tuyến trùng hiệu quả, các chủng được nghiên cứu nhiều bao gồm *Paecilomyces* sp., *Pochonia chlamydosporia*, *Trichoderma viride*... cho thấy đặc biệt hiệu quả trên các loài tuyến trùng nốt sần *Meloidogyne* sp., *Heterodera* spp (Truong et al., 2020; Moreno-Gavira et al., 2020; Poveda et al., 2020). Tuy nhiên, đối với loài tuyến trùng *T. semipenetrans* kí sinh trên cây có múi thì có khá ít nghiên cứu được thực hiện.

Hiện nay, trên thị trường đã có cả sản phẩm hóa học và sinh học kiểm soát tuyến trùng hại cây trồng, nhưng các sản phẩm hóa học cho hiệu quả tiêu diệt tuyến trùng không cao và gây độc hại lâu dài cho môi trường. Trong khi đó, các sản phẩm sinh học chủ yếu được sử dụng đơn lẻ các loại thuốc trị tuyến trùng có gốc Abamectin như Tervigo 20SC, chế phẩm *Bacillus thuringiensis*, bổ sung chế phẩm *Trichoderma* nhưng vẫn chưa cho hiệu quả tiêu diệt tuyến trùng như mong đợi. Do đó, với mục tiêu tuyển chọn được một số chủng nấm săn tuyến trùng bản địa có thể kiểm soát tuyến trùng hại rễ cây có múi hiệu quả cao, chúng tôi đã thực hiện phân lập các chủng nấm săn tuyến trùng có khả năng kiểm soát tuyến trùng *T. semipenetrans* hại cây có múi.

2. Vật liệu và phương pháp thí nghiệm

2.1. Vật liệu

30 mẫu đất (mỗi mẫu 1kg) được sử dụng để phân lập *Arthrobotrys* sp., *Paecilomyces* sp., và *Trichoderma* sp., được thu thập từ các vị trí khác nhau, ở độ sâu khoảng 10-20 cm xung quanh các gốc cây trong rừng tự nhiên tại khu vực Tri Tôn, An Giang vào tháng 4/2020.

Mẫu đất có tuyến trùng được thu thập từ đất vườn trồng quýt hồng 20 năm tuổi ở độ sâu khoảng 15-30 cm theo đường kính tán cây có biểu hiện vàng lá thối rễ tại Lai Vung – Đồng Tháp.

Các mẫu đất được thu nhận và bảo quản theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7538-2:2005, TCVN 7538-6:2010.

Môi trường sử dụng

Môi trường phân lập *Arthrobotrys* và nuôi cấy tuyến trùng: agar 2% có bổ sung thêm 0,1 g/L streptomycin sulfate và 0,1 g/L penicillin để ức chế vi khuẩn.

Môi trường Potato dextrose agar (PDA): 200g khoai tây, 20g dextrose glucose, 15g agar, 1000 ml nước cất.

2.2. Phương pháp thí nghiệm

2.2.1. Chuẩn bị tuyến trùng và trứng tuyến trùng

Tuyến trùng *T. semipenetrans* được lọc theo phương pháp lọc tĩnh bearman có cải tiến như sau: Cân 100g đất cho vào rây lọc đường kính mắt lưới là 2mm, bên trong rây có đặt lớp giấy lọc không cho đất và tàn dư thực vật rơi xuống khay. Đặt rây vào khay và cho nước ngập ½ chiều cao rây sao cho vừa đủ ướt hết phần đất. Tuyến trùng sống sẽ di chuyển qua

lớp giấy lọc và rót xuống khay. Lọc từ 36-48 giờ ở điều kiện nhiệt độ phòng, sau đó đổ nước dưới rây vào cốc thủy tinh và kiểm tra dưới kính lúp soi nổi có độ phóng đại từ 10-40 lần. Tuyến trùng được định danh theo khóa phân loại hình thái của Nguyen (2003) và nhân nuôi trên môi trường Agar 2%.

Tuyến trùng được nuôi trong môi trường agar sau 7-10 ngày, quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 10X và khoanh vùng khối agar có trứng. Sau đó cắt khối thạch có chứa trứng tuyến trùng cho vào đĩa agar mới (loại bỏ khối thạch trong đĩa agar mới và thay thế khối thạch có chứa trứng tuyến trùng).

2.2.2. Phân lập nấm *Arthrobotrys* sp.,

Việc phân lập và làm thuần nấm săn tuyến trùng từ các mẫu đất được thực hiện theo phương pháp đã được mô tả bởi (Nguyen et al., 2019; Ojeda-Robertos et al., 2019) có điều chỉnh.

Cân 1 gram mẫu đất và rắc lên bề mặt đĩa petri có chứa môi trường agar 2% có bổ sung 0,1 g/L streptomycin sulfate và 0,1 g/L penicillin. Sử dụng pipette hút 1 ml dịch tuyến trùng tự do có mật độ 50 con/ml được thêm vào đĩa petri dưới dạng môi. Đĩa Petri được ủ ở nhiệt độ phòng và quan sát hàng ngày dưới kính hiển vi Olympus CX31 RFS ở độ phóng đại 20 và 40X. Từ tuần thứ nhất đến tuần thứ ba, thí nghiệm tập trung vào phát hiện tuyến trùng bị mắc kẹt, cấu trúc bẫy và tơ nấm của nấm săn tuyến trùng phát triển từ đất. Sau khi phát hiện nấm bẫy tuyến trùng, đánh dấu và cắt các khối agar đã được đánh dấu chuyển sang môi trường PDA mới và tiếp tục làm thuần.

2.2.3. Phân lập *Paecilomyces* sp., và *Trichoderma* sp., có khả năng kí sinh trứng tuyến trùng

Nấm *Paecilomyces* sp., và *Trichoderma* sp., được phân lập từ 30 mẫu đất thu nhận tại An Giang theo phương pháp của Kumar và cộng sự (2012). Theo đó, cân 1g đất và pha loãng 5 lần trong nước NaCl 0,9% vô trùng. Tiếp theo, hút 100 μ l dung dịch pha loãng trang lên đĩa môi trường PDA có bổ sung 0,1 g/L streptomycin sulfate và 0,1g/L penicillin. Các đĩa được ủ ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 96 giờ. Các khuẩn lạc đơn có hình thái khác nhau được cấy chuyển sang môi trường PDA mới và làm thuần.

2.2.4. Đánh giá khả năng tiêu diệt trứng và tuyến trùng *T. semipenetrans* của các chủng nấm săn môi phân lập được

Đánh giá khả năng bẫy tuyến trùng của Arthrobotrys sp.

Do *Arthrobotrys* sp., không thể tạo bẫy mạng bắt tuyến trùng trong điều kiện *in vitro* vì thiếu một số chất cảm ứng đặc trưng. Do đó, chúng tôi đã thực hiện thí nghiệm đánh giá khả năng bẫy tuyến trùng trực tiếp trên môi trường đất theo phương pháp của Hanawi (2016) có điều chỉnh.

Thí nghiệm trong chậu được thực hiện tại Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại Thành phố Hồ Chí Minh. Mỗi chậu chứa 5kg đất đã được khử trùng để loại bỏ mầm bệnh, vi sinh vật và trồng bưởi 5 tháng tuổi được gieo từ hạt, độ ẩm đất đạt 60%, nhiệt độ thực hiện thí nghiệm 33°C . Tiến hành bơm 20 ml dung dịch tuyến trùng với mật độ 200-210 ấu trùng/ml vào 4 lỗ xung quanh gốc bưởi trong chậu đất. Sau 1 tuần xâm nhiễm tuyến trùng, 0,5 L dịch bào tử nấm *Arthrobotrys* sp., có mật độ 2×10^5 ; 2×10^6 ; 2×10^7 CFU/ml được tưới xung quanh gốc bưởi. Thí nghiệm đối chứng sử dụng dung dịch môi trường không chứa bào

tử nấm *Arthrotrrys* sp. Mật độ tuyến trùng trong đất được xác định lại sau 5; 10 và 15 ngày thí nghiệm. Thí nghiệm được thực hiện theo khối ngẫu nhiên, mỗi một nghiệm thức được lặp lại 3 lần, mỗi cây là một lần lặp lại.

Đánh giá khả năng kí sinh trứng T. semipenetrans của nấm Paecilomyces sp., và Trichoderma sp.

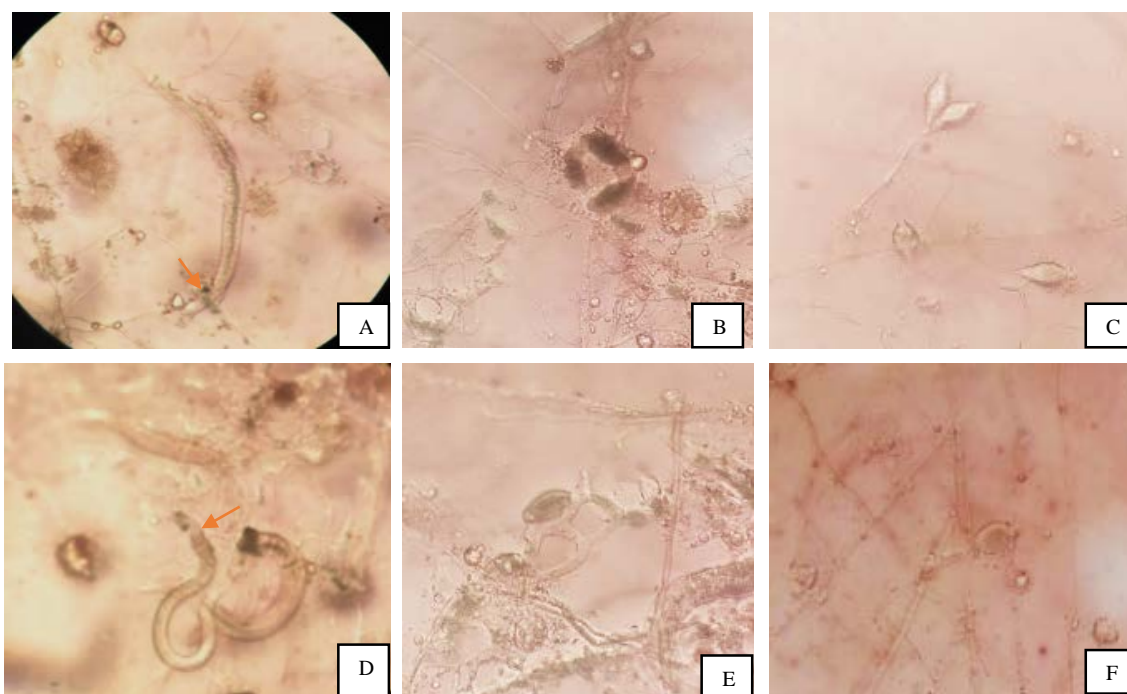
Hút 500 µl dịch bào tử nấm có nồng độ 2×10^5 CFU/ml, nhẹ nhàng trang đều trên đĩa petri có 20-30 trứng tuyến trùng. Đĩa được nuôi cấy ở nhiệt độ 25-28°C, tiến hành quan sát dưới kính hiển vi, nhuộm xanh methylene và ghi nhận tỉ lệ phần trăm (%) trứng bị xâm nhiễm theo thời gian cho đến khi trứng nở thành ấu trùng.

Số liệu được phân tích và xử lí thông kê bằng phần mềm SPSS v.22 và phép thử Duncan.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả Phân lập nấm bẫy tuyến trùng

Từ 30 mẫu đất được thu thập từ các khu vực rừng tự nhiên và khu vực trồng đậu tại An Giang có 2 mẫu đất phát hiện 2 chủng nấm có đặc điểm của nấm săn mồi dựa trên việc quan sát đặc điểm tạo bẫy tuyến trùng và bào tử (Hình 1). Khi quan sát dưới kính hiển vi độ phóng đại 40X cho thấy cấu trúc bẫy ở mẫu nấm ĐP3 có dạng vòng thắt với 3 tế bào nối liền nhau, khi tuyến trùng mắc bẫy, các tế bào cấu tạo nên vòng thắt phồng lên làm tuyến trùng mắc kẹt trong bẫy (Hình 1 A, B), bào tử của ĐP3 có dạng hình thoi, hai đầu nhọn và nhỏ (Hình 1C). Ngược lại, cấu trúc bẫy ở mẫu nấm ĐR7 tạo thành một hệ thống mạng lưới, khi tuyến trùng đi qua bẫy bị dính lại bên trong (Hình 1 D, E), bào tử có dạng giọt nước (Hình 1 F).



Hình 1. Tuyến trùng mắc bẫy nấm săn mồi, cấu trúc bẫy và dạng bào tử của chủng nấm phát hiện (A; D chụp ở độ phóng đại 20X; B; C; E; F: chụp ở độ phóng đại 40X). (A; B; C): tuyến trùng bị mắc bẫy, cấu trúc bẫy và dạng bào tử của chủng nấm ĐP3; (D; E; F):tuyến trùng bị mắc bẫy, cấu trúc bẫy và dạng bào tử của chủng ĐR7

Sau khi phát hiện được nấm bầy tuyến trùng, các khối thạch chứa nấm được chuyển sang môi trường PDA để tiếp tục phân lập và làm thuần. Tuy nhiên, trong quá trình phân lập có một mẫu nấm ĐP3 không thể phân lập thành công do không phát triển khi chuyển sang môi trường mới.

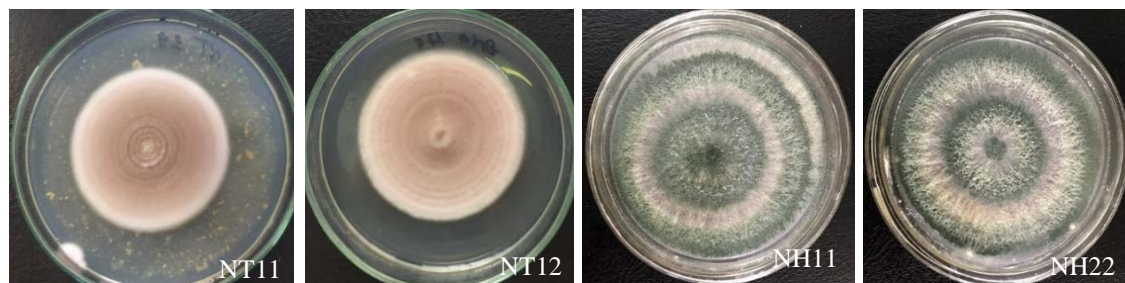


Hình 2. Hình khuẩn lạc nấm bầy tuyến trùng ĐR7 được nuôi cấy 5 ngày trên môi trường PDA (A); cuống phát sinh bào tử và bào tử (B; C được chụp ở độ phóng đại 20 và 40X)

Qua quan sát hình thái ban đầu của nấm săn mồi ĐR7 được phân lập cho thấy: nấm phát triển nhanh trên môi trường PDA, tản nấm phát triển xuyên tâm và có dạng bột xốp có hạt, mép khuẩn lạc mỏng có hình răng cưa. Khuẩn lạc ban đầu có màu trắng, khi sinh bào tử bắt đầu chuyển sang màu vàng nhạt hoặc hồng (Hình 2 A). Khi quan sát dưới kính hiển vi, bào tử có dạng hình trứng, cuống sinh bào tử mọc thẳng ít phân nhánh, mang từ 2 đến 6 bào tử trên phần đỉnh cuống (Hình 2 B, C). Bào tử sinh dục hình trứng với hai tế bào dính liền nhau bao gồm một tế bào đỉnh lớn và một tế bào đáy nhỏ. Các mô tả về hình thái của chủng nấm ĐP7 phân lập được phù hợp với các mô tả về chủng *Arthrobotrys* sp., (Bakr et al., 2014; Nordbring-hertz, 2004).

3.2. Kết quả phân lập nấm *Paecilomyces* sp., và *Trichoderma* sp.

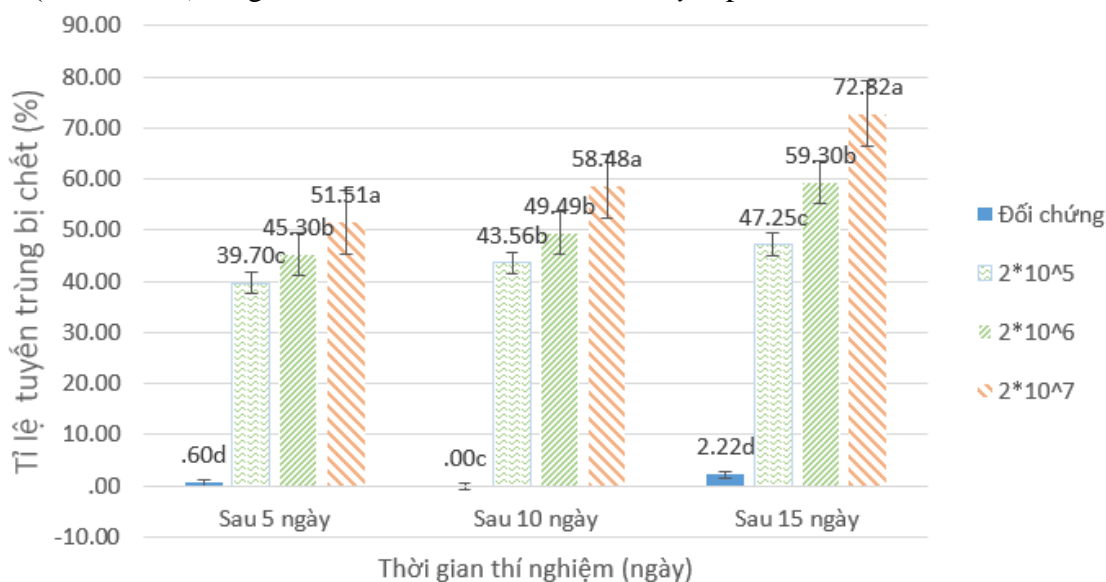
Từ 30 mẫu đất được thu thập tại An Giang, tiến hành phân lập trên môi trường PDA thu được 30 chủng nấm có hình thái và màu sắc khuẩn lạc khác nhau. Trong đó, có 14 mẫu có đặc điểm hình thái đặc trưng cho nấm *Trichoderma* chiếm 46,67% và 2 chủng có đặc điểm hình thái của nấm *Paecilomyces* chiếm 6,67% phù hợp với mô tả về hai chủng nấm này của tác giả Nguyễn Lâm Dũng (Nguyen, 2006) (Hình 3).



Hình 3. Hình ảnh một số chủng nấm *Paecilomyces* sp., và *Trichoderma* sp., được phân lập và nuôi cấy 5 ngày trên môi trường PDA

3.3. Kết quả tiêu diệt tuyến trùng của chủng nấm *Arthrobotrys* sp., phân lập được

Thí nghiệm khả năng tiêu diệt tuyến trùng của chủng *Arthrobotrys* ĐP7 được thực hiện trên bươi trồng trong chậu đã được xâm nhiễm tuyến trùng 2 tuần, kết quả thí nghiệm (biểu đồ trong Hình 4) cho thấy *Arthrobotrys* sp., có khả năng tiêu diệt tuyến trùng hiệu quả so với đối chứng là dịch dinh dưỡng không có bào tử *Arthrobotrys* sp, tỉ lệ tuyến trùng bị tiêu diệt tăng tỉ lệ thuận với mật độ bào tử của nấm *Arthrobotrys* sp. Trong đó, hai nghiệm thức xử lí với mật độ bào tử $2 \cdot 10^5$ và $2 \cdot 10^6$ CFU/ml, tỉ lệ tuyến trùng bị tiêu diệt gia tăng tương tự nhau, ngược lại, ở nghiệm thức xử lí với mật độ bào tử là $2 \cdot 10^7$ CFU/ml tỉ lệ tuyến trùng bị tiêu diệt tăng cao theo thời gian so với hai nghiệm thức còn lại. Cụ thể, trong 5 ngày đầu thí nghiệm, tỉ lệ tuyến trùng chết dao động từ 39,70-51,50%, sau 10 ngày, tỉ lệ tuyến trùng bị chết tiếp tục tăng (dao động từ 43,56-58,48%), sau 15 ngày thí nghiệm, tỉ lệ tuyến trùng bị tiêu diệt ở cả ba nghiệm thức vẫn gia tăng, tuy nhiên, tỉ lệ tuyến trùng bị tiêu diệt đạt cao nhất (đạt 72,82%) ở nghiệm thức được xử lí *Arthrobotrys* sp $2 \cdot 10^7$ CFU/ml.



Hình 4. Biểu đồ tỉ lệ tuyến trùng bị tiêu diệt theo thời gian

Nấm săn tuyến trùng có khả năng kiểm soát và làm giảm quần thể tuyến trùng gây hại cho thực vật đã được nghiên cứu từ khá lâu do sự phân bố rộng rãi trên thế giới và có thể sống được ở nhiều điều kiện khí hậu khác nhau trong đó có *Arthrobotrys* sp (Niu & Zhang, 2011). Nấm *Arthrobotrys* sp., đã được quan tâm và nghiên cứu về cơ chế và cấu trúc hình thành bẫy, khả năng bắt tuyến trùng trong các điều kiện *in vitro*. Qua một số nghiên cứu cho thấy, sự phát triển và hình thành bẫy bắt tuyến trùng của *Arthrobotrys* sp., bị ảnh hưởng mạnh bởi các điều kiện sinh trưởng, yếu tố môi trường như hàm lượng hữu cơ, độ pH đất, nhiệt độ, loài tuyến trùng, quần thể tuyến trùng, chủng loại và mật độ quần thể nấm săn tuyến trùng (Niu & Zhang, 2011). Trong nghiên cứu của Su và cộng sự (2016) cũng đã báo cáo thêm rằng sự tương tác giữa *Arthrobotrys* sp và quần thể vi sinh trong vùng rễ cây có ảnh hưởng đến khả năng tạo bẫy bắt tuyến trùng. Ghahfarokhi và cộng sự (2004) đã báo cáo rằng khả năng tiêu diệt tuyến trùng của *A. oligospora* phụ thuộc vào nhiệt độ môi trường. Trong

báo cáo của nhóm tác giả cho thấy *A. oligospora* có khả năng tiêu diệt ấu trùng tuyến trùng cao (> 95%) ở 15-25°C, ngược lại khả năng tiêu diệt tuyến trùng giảm thấp khi nhiệt độ dưới 10°C hoặc trên 30°C trong điều kiện *in vitro*.

Đối với các thí nghiệm được thực hiện ngoài môi trường đất, Nguyen và cộng sự (2019) đã thí nghiệm khả năng kiểm soát tuyến trùng *Meloidogyne* của 3 chủng nấm *Arthrobotrys* phân lập được từ đất trồng cà phê cho thấy tỉ lệ tiêu diệt tuyến trùng giao động từ 57,77-77,03% trong 7 ngày thí nghiệm trong chậu và kết quả của chúng tôi có sự tương đồng với kết quả của nhóm tác giả. Trong một nghiên cứu khác về khả năng tạo bẫy và bắt tuyến trùng của một số chủng *Arthrobotrys* sp cho thấy hiệu quả của *Arthrobotrys* sp., đạt từ 47,6-62% (Tsay et al., 2006).

3.4. Kết quả tỉ lệ trứng *T. semipenetrans* không nở bởi *Paecilomyces* sp., và *Trichoderma* sp.

Từ kết quả thí nghiệm khả năng tiêu diệt trứng của các chủng nấm *Paecilomyces* và *Trichoderma* trong điều kiện đĩa petri (Bảng 1) cho thấy một số chủng *Trichoderma* và *Paecilomyces* có khả năng tiêu diệt trứng tuyến trùng tốt. Sau 1 ngày xử lý thí nghiệm, ở các thí nghiệm thực hiện với dịch bào tử *Paecilomyces* (NT11, NT12), và *Trichoderma* (NH11, NV21 và NM22), bắt đầu mọc và xâm nhiễm trứng tuyến trùng, tỉ lệ xâm nhiễm trứng dao động từ 11,67-39,67%. Các thí nghiệm thực hiện với *Paecilomyces* có hiện tượng tơ nấm phát triển bao xung quanh trứng và có dấu hiệu xâm nhập vào phần vỏ trứng. Sau 3 ngày thí nghiệm, các chủng *Paecilomyces* phát triển mạnh, tơ nấm ăn sâu vào thành tế bào trứng, các trứng bị nấm kí sinh sau đó bị vỡ ra (Hình 5A). Sau 5 ngày thí nghiệm, Tỉ lệ trứng tuyến trùng bị các chủng *Paecilomyces* kí sinh vẫn gia tăng nhưng chưa có sự khác biệt về mặt thống kê (lần lượt là 53,57 và 50,67%). Sau 7 ngày thí nghiệm, chủng *Paecilomyces* NT11 có khả năng kí sinh trứng cao nhất đạt 90,67%. Đối với các thí nghiệm thực hiện với *Trichoderma* sp., khi quan sát đĩa petri thí nghiệm với các chủng NH11, NV21 và NM22 có hiện tượng tơ nấm phát triển xung quanh trứng, trứng bị ức chế phát triển, teo tóp mất cấu trúc vỏ (Hình 5B, C), với tỉ lệ trứng không nở đạt dao động từ 36,67%-50,33% sau 3 ngày thử nghiệm. Tỉ lệ trứng bị ức chế và mất cấu trúc vỏ tăng dần theo thời gian ở các thí nghiệm thực xử lý với chủng *Trichoderma* NH11; NV21 và NM22 và đạt cao nhất tại thí nghiệm thực xử lý trứng tuyến trùng với chủng NM22 đạt 80,33% sau 7 ngày thực hiện thí nghiệm.

Bảng 1. Tỉ lệ trứng tuyến trùng không nở theo thời gian

Chủng nấm	Thời gian xâm nhiễm			
	1 NSC	3 NSC	5 NSC	7 NSC
Nước cất	0,00 ^g	0,00 ^h	0,00 ⁱ	0,00 ^k
<i>Paecilomyces</i> NT11	39,67 ^a	53,67 ^a	73,33^a	90,67^a
<i>Paecilomyces</i> NT12	34,00 ^b	50,67 ^{ab}	68,33 ^b	75,00 ^c
<i>Trichoderma</i> NH11	35,33 ^b	50,33 ^{bc}	57,33 ^c	68,67 ^d
<i>Trichoderma</i> NV21	29,00 ^c	47,33 ^c	53,00 ^d	57,33 ^e
<i>Trichoderma</i> NM22	25,33 ^d	36,67 ^d	49,00 ^e	80,33 ^b
<i>Trichoderma</i> NR21	11,67 ^e	19,67 ^e	22,33 ^f	25,67 ^f

<i>Trichoderma</i> NR23	0,00 ^g	0,00 ^h	0,00 ⁱ	0,00 ^k
<i>Trichoderma</i> NR31	1,67 ^{fg}	2,67 ^{gh}	3,33 ^{hi}	5,00 ⁱ
<i>Trichoderma</i> NR13	0,00 ^g	0,00 ^h	0,00 ⁱ	0,00 ^k
<i>Trichoderma</i> NR14	0,00 ^g	3,33 ^{gh}	5,33 ^h	5,67 ⁱ
<i>Trichoderma</i> NR34	0,00 ^g	0,00 ^h	0,00 ⁱ	0,00 ^k
<i>Trichoderma</i> NR35	4,33 ^f	7,00 ^f	16,67 ^g	18,33 ^g
<i>Trichoderma</i> NR31	0,00 ^g	0,00 ^h	0,00 ⁱ	0,00 ^k
<i>Trichoderma</i> NR41	0,00 ^g	0,00 ^h	0,00 ⁱ	0,00 ^k
<i>Trichoderma</i> NR42	3,00 ^{fg}	5,00 ^{fg}	5,67 ^h	9,67 ^h
<i>Trichoderma</i> NR43	0,00 ^g	0,00 ^h	0,00 ⁱ	0,00 ^k

Các giá trị trong cùng một cột có mẫu tự (a,b..) theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê $P \leq 0,05$. (NSC: ngày sau cấy)



Hình 5. Trùng tuyến trùng bị nấm kí sinh sau 5 ngày thử nghiệm trên đĩa petri chụp ở độ phóng đại 40X (A): *Paecilomyces* NT11, (B): *Trichoderma* NM22, (C) trùng tuyến trùng bị teo sau 5 ngày thực nghiệm với *Trichoderma* NM22

Khả năng kí sinh trùng tuyến trùng của *Paecilomyces* sp., và *Trichoderma* sp., đã được chứng minh trong các nghiên cứu trước đây và đã được sử dụng rất nhiều trong nông nghiệp như một nhân tố kiểm soát bệnh hại cây trồng đặc biệt trong đó có kiểm soát bệnh do tuyến trùng gây ra.

Các loài trong chi *Paecilomyces* đặc biệt là *P. lilacius* đã được báo cáo là có khả năng kí sinh trên trứng *T. semipenetrans* (Hanawi, 2016). Bên cạnh đó, *Trichoderma* sp cũng đóng vai trò chính trong việc kiểm soát sinh học và hạn chế tuyến trùng gây bệnh (Ibrahim et al., 2019; Poveda et al., 2020).

Theo (Moreno-Gavira et al., 2020; Poveda et al., 2020) thì *Paecilomyces* và *Trichoderma* đều có khả năng xâm nhập vào vỏ trứng và các thành phần cấu trúc của giai đoạn con non và con trưởng thành ở các loài tuyến trùng khác nhau thông qua sự nảy mầm của bào tử, sự phân nhánh của tơ nấm và hình thành giác bám, gia tăng khả năng tiết enzyme ngoại bào hỗ trợ phá hủy cấu trúc vỏ trứng, giảm tỉ lệ nở thành ấu trùng. Khi chúng tiếp xúc với vật chủ, có thể xâm nhập vào vật chủ thông qua giác bám hoặc tiết các loại enzyme như cellulase, glucanase, laccase, leucinoxin, lipase, pectinase, protease, chitinase hoặc giải phóng xylanase để hòa tan lớp bảo vệ bên ngoài vật chủ cho quá trình xâm nhiễm.

Paecilomyces spp., có cơ chế hoạt động chống lại thần kinh của tuyến trùng, đặc biệt là *Meloidogyne* spp., nhưng cũng có khả năng kiểm soát các chủng tuyến trùng khác như *Globodera*, *Rotylenchulus*, *Heterodera*, *Xiphinema* và *Pratylenchus* (Favre-Bonvin et al., 1991).

Đã có nhiều thí nghiệm sử dụng *Paecilomyces* sp., và *Trichoderma* sp., để kiểm soát và tiêu diệt trứng tuyến trùng được thực hiện cho hiệu quả cao. Kết quả thí nghiệm của chúng tôi cho thấy có hiệu quả tương đương với kết quả của Truong và cộng sự (2020) đã báo cáo rằng dịch bào tử nấm *Trichoderma* và *Paecilomyces* đã kí sinh mạnh trên trứng của tuyến trùng. Do đó, các chủng nấm săn tuyến trùng như *Arthrobotrys* sp., *Pecilomyces* sp., *Trichoderma* sp., là những chủng có tiềm năng làm nhân tố kiểm soát sinh học kháng lại tuyến trùng một cách hiệu quả.

4. Kết luận và kiến nghị

Từ 30 mẫu đất thu được ở các vùng khác nhau tại An Giang, đã phân lập được một chủng *Arthrobotrys* sp., hai chủng *Paecilomyces* sp., và mười bốn chủng *Trichoderma* sp. Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy các chủng nấm săn tuyến trùng có khả năng kiểm soát tuyến trùng *T. semipenetrans* trên cây có múi đạt hiệu quả cao. *Arthrobotrys* sp., có khả năng tạo bẫy mạng bắt tuyến trùng đạt 72,82% sau 15 ngày thử nghiệm, *Paecilomyces* sp., có khả năng kí sinh và phá vỡ trứng từ bên trong, đạt hiệu quả cao nhất là 90,87% ở nghiệm thức xử lí với *Paecilomyces* NT11. Các chủng *Trichoderma* sp., có khả năng ức chế và làm mất cấu trúc vỏ trứng *T. semipenetrans*, trong đó chủng *Trichoderma* NM22 đạt hiệu quả cao nhất là 80,33%.

Do khuôn khổ đề tài nghiên cứu có giới hạn về thời gian, do đó, chúng tôi vẫn chưa thể quan sát và thực hiện thí nghiệm khả năng bẫy tuyến trùng của *Arthrobotrys* sp., đủ dài để đưa ra một kết quả rõ ràng. Chúng tôi sẽ tiếp tục nghiên cứu nấm săn mồi trong tiêu diệt tuyến trùng kí sinh vùng rễ cây có múi sâu hơn để đánh giá hiệu quả kiểm soát tuyến trùng của *Arthrobotrys* sp., *Paecilomyces* sp., *Trichoderma* sp. và thực hiện định danh sinh học phân tử các chủng nấm trên trong tương lai.

- ❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.
- ❖ **Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này là một phần nội dung trong đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ – “Nghiên cứu ứng dụng nấm săn mồi *Arthrobotrys* sp., kết hợp với khuẩn kí sinh ấu trùng và nấm kí sinh trứng để tiêu diệt tuyến trùng phòng ngừa bệnh vàng lá thối rễ trên cây có múi” theo Hợp đồng 01/2020/HĐ-ĐTCB. Chúng tôi chân thành cảm ơn Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại Thành phố Hồ Chí Minh đã tài trợ kinh phí và tạo điều kiện cho chúng tôi nghiên cứu đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bakr, R. A., Mahdy, M. E., & Mousa, E. M. (2014). Biological Control Of Root-Knot Nematode *Meloidogyne Incognita* By *Arthrobotrys Oligospora*. *Egyptian Journal of Crop Protection*, 9(1), 1-11.
- Favre-Bonvin, J., Ponchet, M., Djian, C., Arpin, N., & Pijarowski, L. (1991). L. Acetic acid: A selective nematicidal metabolite from culture filtrates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson and *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. *Nematologica*, 37, 101-112.
- Ghahfarokhi, M. S., Abyaneh, M. R., Bahadori, S. R., Eslami, A., Zare, R., & Ebrahimi, M. (2004). Screening of Soil and Sheep Faecal Samples for Predacious Fungi: Isolation and Characterization of the Nematode-Trapping Fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Iranian Biomedical Journal*, 8(3), 135-142.
- Hanawi, M. J. (2016). Fungal and bacterial bio-control agents in controlling citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans* Cobb in greenhouse and field. *European Academic Research*, 4(9), 7824-7841.
- Hsueha, Y.-P., Mahantib, P., Schroederb, F. C., & Sternberg, P. W. (2013). Nematode-trapping fungi eavesdrop on nematode pheromones. *Curr Biol*, 23(1), 83-86.
- Ibrahim, Dina, S., Ayat, M. A., & Howida, A. M. (2019). Bio-management of citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans* and dry root rot fungi, *Fusarium solani* under laboratory and field conditions. *Egypt J. Agronetatol*, 18(2), 118-128.
- Liu, X., Xiang, M., & Che, Y. (2009). The living strategy of nematophagous fungi. *Mycoscience*, 50, 20-25.
- Moreno-Gavira, A., Huertas, V., Diáñez, F., Santos, M., & Sánchez-Montesinos, B. (2020). *Paecilomyces* and its importance in the biological control of agricultural pests and diseases. *Plants*, 9(12), 1-28. <https://doi.org/10.3390/plants9121746>
- Nguyen, N. C. (2003). *Tuyen trung thuc vat va co so phong tru*. Hanoi: Publisher Science & Engineering.
- Nguyen, L. D. (2006). *Vi sinh vat hoc-Phan I: The gioi sinh vat*. Hanoi: Science and Technics Publishing House.
- Nguyen, V. H, Nguyen, T. H, Tran, T. T. T, & Pham, V. T. (2019). Isolation and selection of *Arthrobotrys* nematophagous fungi to control the nematodes on coffee and black pepper plants in Vietnam. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 52(7-8), 825-843.
- Niu, X.-M., & Zhang, K. Q. (2011). *Arthrobotrys oligospora* a model organism for understanding the interaction between fungi and nematodes.pdf. *Mycology*, 2(2), 59-78.
- Nordbring-hertz, B. (2004). Morphogenesis in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* – an extensive plasticity of infection structures, 18, 125-133. <https://doi.org/10.1017/S0269915XO4003052>
- Nordbring-Hertz, B., Jansson, H. B., & Tunlid, A. (2006). Nematophagous Fungi. In *Encyclopedia of life sciences* (pp. 1-11). John Wiley & Sons.
- Ojeda-Robertos, N. F., Aguilar-Marcelino, L., Olmedo-Juárez, A., Luna-Palomera, C., Peralta-Torres, J. A., López-Arellano, M. E., & Mendoza-de-Gives, P. (2019). In vitro predatory activity of nematophagous fungi isolated from water buffalo feces and from soil in the Mexican southeastern. *Braz. J. Vet. Parasitol*, 28(2), 314-319.

- Poveda, J., Abril-Urias, P., & Escobar, C. (2020). Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes by Filamentous Fungi Inducers of Resistance: *Trichoderma*, Mycorrhizal and Endophytic Fungi. *Frontiers in Microbiology*, 11(May), 1-14.
- Su, H. N., Xu, Y. Y., Wang, X., Zhang, K. Q., & Li, G. H. (2016). Induction of trap formation in nematode-trapping fungi by bacteria-released ammonia. *Letters in Applied Microbiology*, 62, 349-353. <https://doi.org/10.1111/lam.12557>
- Suganthi, K., Vetrivelkai, P., Poornima, K., & Vijayakumar, R. M. (2019). In vitro Bioefficacy of Endophytic Isolates against Citrus Nematode. *Tylenchulus semipenetrans*. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 8(5), 1050-1055.
- Trinh, Q. P., Nguyen, T. T., Tran, T. T. T., Nguyen, H. T., & Tran, T. H. A. (2016). Đặc điểm phân bố của tuyến trùng ký sinh thực vật trong đất trồng cam Cao Phong, Hòa Bình [Distribution Characteristics of Plant Parasitic Nematodes in Citrus Growing Soil in Cao Phong, Hoa Binh] *VNU Journal of Science: Earth and Environmental Sciences*, 32, 301-308.
- Truong, T. N. H., Vang, T. T. L., Ly, L. P., & Nguyen, T. T. X. (2020). Su ký sinh của nấm *Trichoderma*, *Paecilomyces* trên tuyến trùng gây bệnh cây tiêu. *Vietnam Agricultural Science Journal*, 1(110), 1-6.
- Tsay, T., Chen, P., & Wu, W. (2006). A New Method for Isolating and Selecting Agents with High Antagonistic Ability Against Plant Parasitic Nematodes. *Plant Pathology Bulletin*, (10), 9-16.

**ISOLATING NEMATOPHAGOUS FUNGI FOR THE PURPOSE
OF CONTROLLING NEMATODES PARASITE ON CITRUS**

Nguyen Dao Thanh Huong*, Le Thanh Binh, Nguyen Thi Lien, Ho Thi Nguyet

Branch of National Center for Technological Process, Vietnam

*Corresponding author: Nguyen Dao Thanh Huong – Email: ngdthanhhuong2312@gmail.com

Received: March 23, 2021; Revised: July 06, 2022; Accepted: December 01, 2022

ABSTRACT

Citrus is one of the main crops in the Mekong Delta. However, yellow leaf and root rot disease are causing serious harm, reducing the vitality of the tree, yield, and fruit quality. The disease is mainly caused by Tylenchulus semipenetrans causing damage to the roots, allowing Fusarium sp to grow and cause root rot. Therefore, the study was carried out to isolate and select several strains of microorganisms be capable of controlling T. semipenetrans well on citrus. The study isolated 1 strain of Arthrobotrys sp., 2 strains of Paecilomyces, and 11 strains of Trichoderma sp. Arthrobotrys sp., was able to reduce nematodes by 72.82% after 15 days of the experiment, strain Paecilomyces NT11 could parasitize strongly on eggs reached 90.67%, and Trichoderma NM22 was able to inhibit the hatching of eggs reached 80.33%.

Keywords: *Arthrobotrys* sp.; Citrus; Nematophagous fungi; *Paecilomyces* sp.; *Trichoderma* sp.; *Tylenchulus semipenetrans*