

TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH TÊN CHỦNG NẤM CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ENZYME CELLULASE VÀ XYLANASE

Nguyễn Thị Hồng Hà^{1,*}, Nguyễn Thị Hương Trà¹, Lê Thị Trang¹,

Nguyễn Ngọc Huyền¹, Nguyễn Tuấn¹, Vũ Thu Diễm¹,

Nguyễn Trọng Uyên², Lê Khánh Linh³, Nguyễn Văn Hiếu⁴

¹ Viện Cơ điện Nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch

² Sở Nông nghiệp và PTNT tỉnh Bắc Kạn

³ Trường Đại học Curtin, Tây Úc

⁴ Viện Công nghệ sinh học

*Email: ngthongha77@gmail.com

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là tuyển chọn chủng nấm được phân lập từ đất trồng dong riềng có khả năng phân giải cellulose và hemicellulose. Kết quả cho thấy, 36 chủng *Trichoderma* đã được phân lập và tuyển chọn được 3 chủng *Trichoderma* có khả năng phân giải cellulose và hemicellulose cao nhất là *Trichoderma* D5 có vòng phân giải cơ chất cellulose và xylan, tương ứng 3,02 cm và 3,43 cm; *Trichoderma* D19 là 2,65 cm và 2,88 cm; *Trichoderma* D25 là 2,86 cm và 2,61 cm. Cả 3 chủng *Trichoderma* đều có khả năng ức chế nấm gây bệnh *Collectotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae* và *Thielaviopsis paradoxa* với tỷ lệ từ 74,1 - 91,3%; 58,2 - 70,2% và 55,1 - 77,2%, theo thứ tự ở điều kiện *in vitro*. Ba chủng đã được định danh là: *Trichoderma viride* (*T. viride* D5), *Trichoderma harzianum* (*T. harzianum* D19), *Trichoderma asperellum* (*T. asperellum* D25) và được đăng kí trên GenBank với mã số tương ứng là: OR686312, OR690335, OR686311. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tiềm năng phân giải cellulose và xylan của 3 chủng *Trichoderma* phân lập từ đất trồng dong riềng.

Từ khóa: *Trichoderma*, cellulose, hemicellulose.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây dong riềng (*Canna elidus* Ker) là cây trồng chủ lực của các tỉnh miền núi trung du Bắc bộ và Bắc Trung bộ. Ở Việt Nam, diện tích trồng dong riềng ước tính khoảng 30.000 ha, sản lượng khoảng 300.000 tấn củ tươi. Phụ phẩm trong quá trình chế biến tinh bột dong riềng là bã dong riềng chiếm khoảng 80% khối lượng củ tươi. Nếu lượng chất thải rắn này không được xử lý sẽ gây lãng phí và ô nhiễm môi trường, tác động trực tiếp tới sức khỏe con người, ảnh hưởng không nhỏ tới sự phát triển bền vững của làng nghề. Thành phần hóa học chính của bã dong riềng (% chất khô): Độ ẩm khoảng 71,0 - 78,9%, hemicellulose 23,9%, cellulose 8,3%, tinh bột 1,4%, nitrogen 0,05%, phosphorus

0,1% và thành phần khoáng khoảng 0,6% [1]. Như vậy, bã dong riềng có độ ẩm cao, thành phần chủ yếu là chất xơ không hòa tan nên mục tiêu của nghiên cứu này là lựa chọn chủng vi sinh vật có hoạt tính phân giải cellulose và hemicellulose tốt để xử lý bã dong riềng làm phân bón hữu cơ.

Vi sinh vật phân giải cellulose và hemicellulose gồm: Vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm mốc nhờ hệ enzyme cellulase và hemicellulase. Nghiên cứu đánh giá khả năng phân giải cellulose của các chủng vi sinh vật phục vụ sản xuất chế phẩm phân hủy rơm rạ cho thấy, nhóm nấm mốc cho khả năng phân giải cellulose tốt nhất, thể hiện qua khả năng phân giải cellulose D/d từ 20 - 24, tiếp đến là vi khuẩn 5 - 18 và thấp nhất là nhóm xạ

khuẩn 2 - 14 [2]. Nhiều nghiên cứu cho thấy, *Trichoderma* có khả năng phân hủy tốt phụ phẩm nông nghiệp sau thu hoạch vì chúng có hệ enzyme phân giải lignin, hemicellulose và đặc biệt là cellulose. 123 chủng *Trichoderma* đều có hoạt tính phân giải cellulose và xylan với đường kính vòng phân giải từ 0,2 - 2,8 cm và 0,2 - 3,5 cm, theo thứ tự [3]. Nghiên cứu cho thấy, trong 100 loài nấm thử nghiệm thì *Trichoderma* có khả năng sinh tổng hợp 2 loại enzyme này chiếm 42,6%, trong đó *Trichoderma viride* Fd18 có khả năng sinh xylanase và cellulase cao nhất là 1,30 U/mg và 1,23 U/mg, theo thứ tự [4]. *Trichoderma* được dùng để xử lý bùn thải nhà máy bia và nhà máy chế biến thủy sản làm phân bón. Sau 45 ngày xử lý, phân bón hữu cơ đạt chất lượng cao với 2,8% N; 6,6% P₂O₅, 2,1% K₂O và 40,9% C. Hàm lượng kim loại nặng, *Salmonella* và *Escherichia coli* đều đạt dưới ngưỡng cho phép. Mật độ *Trichoderma* sau ủ đạt $7,8 \times 10^7$ CFU/g. Phân bón đã được thử nghiệm trên rau cải, đậu bắp, dưa leo và bí đao [5]. *Trichoderma* còn được ứng dụng trong xử lý rơm rạ làm phân bón. Sau 4 tuần xử lý, phân bón hữu cơ có tỷ lệ C/N 20,4 và tăng hàm lượng NPK (1% N, 0,2% P₂O₅ và 3,3% K₂O). Sử dụng phân bón hữu cơ từ rơm rạ trên cây lúa giúp giảm 30% phân hóa học, tăng năng suất lúa 3,9 - 4,4% ở vụ đông xuân và 1,4 - 3,9% ở vụ hè thu [6].

Ngoài khả năng phân giải các chất hữu cơ cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng, *Trichoderma* còn tiết ra các kháng sinh gây độc cho nấm bệnh hoặc cạnh tranh điều kiện sống với nấm gây bệnh cho cây trồng [7]. *Trichoderma* có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên cây xoài, ớt, cà phê; nấm *Phytophthora helicoides*, *Fusarium* và *Phytophthora citrophthora* gây bệnh vàng lá thối rễ trên cây ăn quả có múi; nấm *Rhizoctonia solani* gây bệnh lở cổ rễ trên cây bắp cải; nấm *Sclerotinia sclerotiorum* gây bệnh bạc lá trên đậu; nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm nâu trên thanh long; nấm *Lasiodiplodia theobromae* gây bệnh đốm đen, thối cuống trên chuối, xoài, cây có múi; nấm *Thielaviopsis paradoxa* gây bệnh thối quả, thối gốc chồi trên dưa.

Nghiên cứu này tuyển chọn chủng nấm được phân lập từ đất trồng dong riềng có hoạt tính phân

giải cellulose, hemicellulose cao và khả năng ức chế nấm gây bệnh trên cây trồng, làm tiền đề cho nghiên cứu xử lý bã dong riềng làm phân bón hữu cơ.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng

Ba mươi sáu chủng *Trichoderma* (phân lập từ đất trồng dong riềng) và vi sinh vật kiểm định là *Colletotrichum musae* MS2, *Lasiodiplodia theobromae* LT3 (phân lập trên quả xoài bệnh) và *Thielaviopsis paradoxa* (phân lập trên quả dưa bệnh) trong bộ sưu tập giống của Bộ môn Nghiên cứu Công nghệ sinh học sau thu hoạch, Viện Cơ điện nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch.

2.1.2. Môi trường

Môi trường khảo sát khả năng thủy phân cellulose (MT1): Môi trường PDA có 1% CMC.

Môi trường khảo sát khả năng thủy phân xylan (MT2): Môi trường PDA có 1% xylan.

Môi trường nhân nuôi và quan sát đặc điểm phát triển: PDA, PDB và Czapek-Dox.

Hóa chất cho định danh *Trichoderma* đạt mức độ phân tích.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Định tính khả năng tiết enzyme cellulase và xylanase của các chủng *Trichoderma*

Tiến hành theo phương pháp của Roman và cs (2018) có cải tiến [3] như sau:

Các chủng *Trichoderma* được hoạt hóa trên môi trường PDB, lắc 150 vòng/phút, 28°C trong 3 - 4 ngày. Dịch lên men được pha loãng đến giá trị OD là 0,4. Hút 0,25 ml dịch lên men mỗi chủng *Trichoderma* cho vào 5 ml môi trường PDB glucose được thay bằng 1% CMC hay 1% xylan rồi lên men 5 ngày ở 28°C, 150 vòng/phút. Dịch lên men được ly tâm 4.000 vòng/phút trong 20 phút, thu dịch nổi. Sau đó chuyển 0,2 ml dịch nổi được nhỏ vào giếng thạch trên đĩa petri chứa môi trường MT1, MT2 rồi ủ ở 37°C trong 24 giờ. Đĩa thạch được nhuộm bằng dung dịch Congo 0,5% trong 15 phút. Nấm có hoạt tính cellulase, xylanase sẽ tạo vòng trong suốt quanh lỗ khoan. Độ lớn của vòng

trong suốt phản ánh khả năng sinh cellulase và xylanase của vi sinh vật. Công thức tính khả năng phân giải: $V \text{ (cm)} = D - d$. Trong đó: V là khả năng phân giải, D là đường kính vòng phân giải (cm), d là đường kính lỗ khoan (cm).

2.2.2. Đánh giá khả năng đối kháng của các chủng *Trichoderma* với một số loài nấm chính gây bệnh trên rau quả

Tiến hành theo phương pháp của Nguyễn Thị Thu Huyền và cs (2013) có cải tiến [7].

Mẫu đối chứng: Đĩa petri chứa 20 ml môi trường PDA được đục lỗ với đường kính 8 mm tại 2 vị trí đối diện nhau, cách mép đĩa 15 mm. Một mảnh sợi nấm đường kính 6 mm của từng chủng nấm gây bệnh *C. musae* MS2, *L. theobromae* LT3, *T. paradoxa* đã nuôi cấy 7 ngày trên môi trường PDA được đặt vào lỗ thạch và nuôi cấy ở 28 - 30°C.

Mẫu thí nghiệm: Đĩa petri chứa 20 ml môi trường PDA được đục lỗ với đường kính 8 mm tại 2 vị trí đối diện nhau, cách mép đĩa 15 mm. Một mảnh sợi nấm đường kính 6 mm của từng loại nấm gây bệnh (*C. musae* MS2, *L. theobromae* LT3, *T. paradoxa*) đã nuôi cấy 7 ngày trên môi trường PDA được đặt vào một lỗ thạch. Một mảnh sợi nấm của từng chủng *Trichoderma* được đặt vào vị trí lỗ thạch còn lại. Nuôi cấy ở 28 - 30°C. Bán kính khuẩn lạc của nấm gây bệnh theo hướng đối diện với nấm *Trichoderma* được đo sau 7 ngày nuôi cấy. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Hiệu quả ức chế - nấm gây bệnh của *Trichoderma* được tính theo công thức:

$$H = (R1 - R2) / R1 \times 100$$

Trong đó: H là hiệu quả ức chế (%), $R1$ là bán kính của khuẩn lạc nấm bệnh trong đĩa đối chứng (cm), $R2$ là bán kính của khuẩn lạc nấm bệnh trong đĩa thí nghiệm (cm).

2.2.3. Định danh chủng *Trichoderma*

Quan sát đặc điểm hình thái và cấu trúc vi học theo tài liệu phân loại *Trichoderma* của Gams và

Bissett (2002) [8]. Các chủng *Trichoderma* được cấy chấm điểm trên đĩa petri có chứa môi trường PDA và nuôi cấy ở 28°C đến 6 ngày. Quan sát đặc điểm: Hình dạng, đường kính khuẩn lạc, hệ sợi khuẩn ty bao gồm mặt sau khuẩn lạc, màu sắc bào tử, mùi khuẩn lạc, sắc tố hòa tan.

Định danh các chủng *Trichoderma* dựa trên trình đoạn gen 5.8S rDNA: Các chủng nấm được nuôi trong môi trường Czapek-Dox, 180 vòng/phút, 28 - 30°C trong 48 - 72 giờ để thu hệ sợi khuẩn ty dùng cho tách chiết ADN tổng số. Vùng 5.8S rDNA được khuếch đại từ mẫu ADN tổng số mỗi chủng nấm bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu ITS1F (5'-CTTGG TCATTAGAGGAAGTAA-3')/ITS4R (5'-TCCTC CGCTTATTGATAGC-3'). Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR như sau: Bước 1: 94°C 5 phút; bước 2: 94°C 1 phút; bước 3: 53°C 1 phút; bước 4: 72°C 1 phút (lặp lại 35 lần từ bước 2 đến bước 4); bước 5: 72°C 7 phút; bước 6: 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1%, sau đó được tinh sạch bằng bộ kit tinh sạch ADN (Qiagen, Mỹ). Mẫu ADN sau tinh sạch được tiến hành giải trình tự gen. Trình tự gen được so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank và lập cây phát sinh loài với phần mềm CLC DNA Worbench 8.0.

2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2010 và SPSS 20.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá khả năng sinh enzyme cellulase và xylanase của các chủng *Trichoderma*

Khả năng sinh enzyme cellulase và xylanase của các chủng *Trichoderma* được đánh giá qua đường kính vòng phân giải cơ chất CMC và xylan, giá trị $D-d$ càng lớn thì khả năng sinh cellulase và xylanase càng cao. Kết quả được trình bày ở bảng 1 và hình 1.

Bảng 1. Khả năng sinh enzyme cellulase và xylanase của các chủng nấm *Trichoderma*

TT	Tên chủng	Đường kính vòng phân giải ($D-d$) (cm)	
		Cellulose	Xylan
1	TrD1	$1,70 \pm 0,90$	$1,98 \pm 0,19$

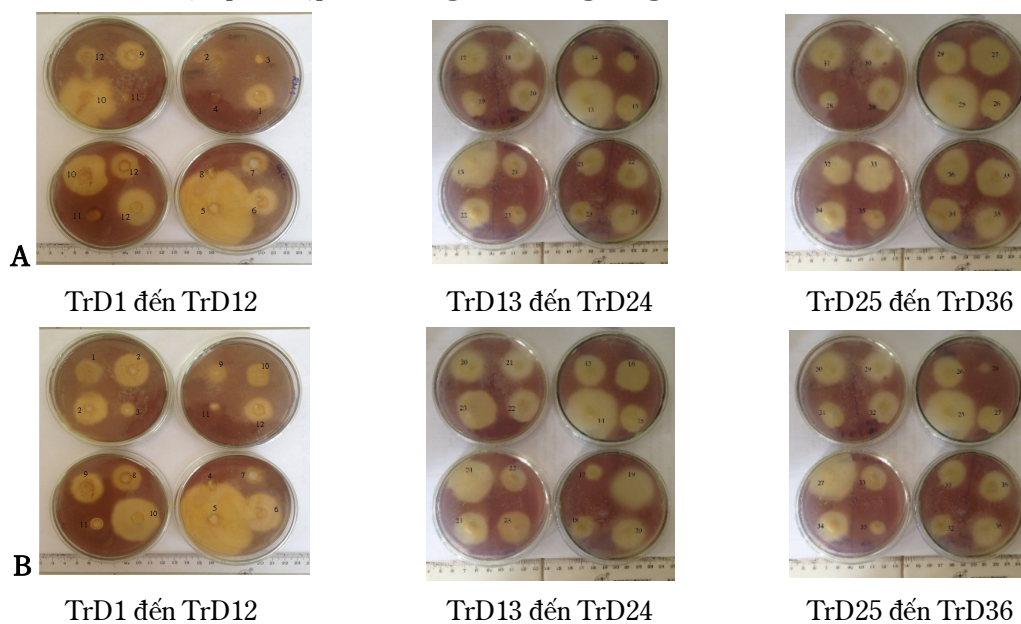
2	TrD2	$0,55 \pm 0,31$	$0,47 \pm 0,11$
3	TrD3	$1,00 \pm 0,12$	$1,23 \pm 0,16$
4	TrD4	0	0
5	TrD5	$3,02 \pm 0,25$	$3,43 \pm 0,24$
6	TrD6	$2,06 \pm 0,15$	$2,42 \pm 0,16$
7	TrD7	$1,10 \pm 0,17$	$0,82 \pm 0,12$
8	TrD8	$0,78 \pm 0,18$	$1,15 \pm 0,17$
9	TrD9	$1,55 \pm 0,16$	$1,51 \pm 0,18$
10	TrD10	$2,56 \pm 0,23$	$1,78 \pm 0,16$
11	TrD11	0	0
12	TrD12	$0,63 \pm 0,21$	$0,88 \pm 0,13$
13	TrD13	$2,50 \pm 0,22$	$1,46 \pm 0,17$
14	TrD14	$1,35 \pm 0,16$	$1,67 \pm 0,20$
15	TrD15	$0,52 \pm 0,15$	$0,60 \pm 0,09$
16	TrD19	$1,83 \pm 0,17$	$1,45 \pm 0,15$
17	TrD17	$0,31 \pm 0,19$	$0,50 \pm 0,12$
18	TrD18	$1,65 \pm 0,2$	$0,78 \pm 0,13$
19	TrD19	$2,65 \pm 0,22$	$2,88 \pm 0,26$
20	TrD20	$1,27 \pm 0,16$	$1,19 \pm 0,19$
21	TrD21	$0,85 \pm 0,09$	$0,32 \pm 0,1$
22	TrD22	$0,76 \pm 0,1$	$0,90 \pm 0,16$
23	TrD23	$1,40 \pm 0,15$	$1,35 \pm 0,22$
24	TrD24	$1,35 \pm 0,13$	$1,85 \pm 0,19$
25	TrD25	$2,86 \pm 0,24$	$2,61 \pm 0,2$
26	TR26	$0,87 \pm 0,11$	$0,45 \pm 0,12$
27	TrD27	$2,51 \pm 0,32$	$1,98 \pm 0,25$
28	TrD28	0	0
29	TrD29	$1,82 \pm 0,18$	$2,04 \pm 0,19$
30	TrD30	$0,45 \pm 0,1$	$0,37 \pm 0,08$
31	TrD31	$0,62 \pm 0,13$	$0,80 \pm 0,12$
32	TrD32	$1,12 \pm 0,2$	$0,72 \pm 0,19$
33	TrD33	$1,54 \pm 0,11$	$2,10 \pm 0,21$
34	TrD34	$1,77 \pm 0,15$	$0,81 \pm 0,13$
35	TrD35	$0,76 \pm 0,16$	$0,60 \pm 0,12$
36	TrD36	$1,45 \pm 0,2$	$1,62 \pm 0,19$

Kết quả nghiên cứu cho thấy, 3/36 chủng (8,3%) không có khả năng phân giải cellulose và xylan; 33/36 chủng (91,7%) có khả năng phân giải cellulose và xylan, với đường kính vòng phân giải từ 0,31 - 3,02 cm và 0,32 - 3,43 cm, theo thứ tự. Trong đó, 3 chủng *Trichoderma* có đường kính vòng phân giải CMC và xylan lớn nhất.

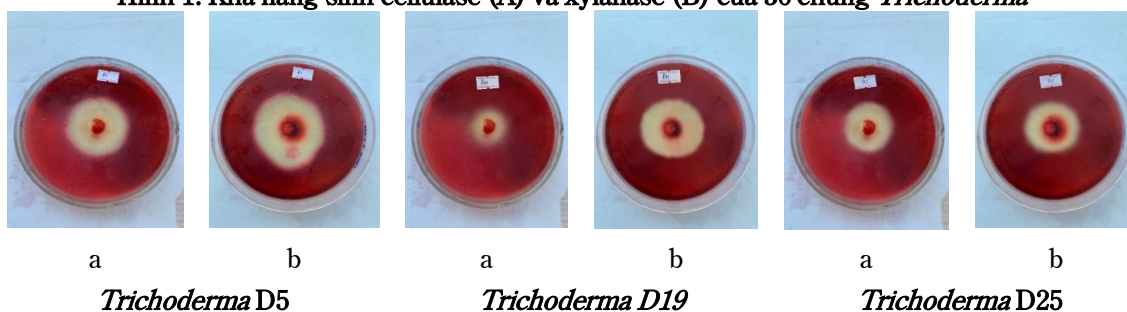
Trichoderma D5 có vòng phân giải CMC, xylan tương ứng là 3,02 cm và 3,43 cm; *Trichoderma* D19 là 2,65 cm và 2,88 cm; *Trichoderma* D25 là 2,86 cm và 2,61 cm, theo thứ tự (Hình 2). So sánh với các nghiên cứu khác cho thấy, 3 chủng *Trichoderma* tuyển chọn có khả năng phân giải CMC cao hơn so với 4 chủng *T. asperellum* (cao nhất là 1,4 cm)

trong nghiên cứu của Nguyễn Hồng Vân và cs (2013) là sau 24 giờ ủ [9]. Kết quả nghiên cứu của Trần Hoàng Dũng và cs (2018) [2] cho thấy, 7 chủng nấm sợi được phân lập từ đất, mặt cưa, rơm rạ có khả năng phân giải CMC với tỷ lệ D/d dao động từ 20 - 24,5. Trong nghiên cứu khác, 123 chủng *Trichoderma* được phân lập từ các nguồn

như: Gỗ rừng, đất rừng, đất vườn, hạt lúa mỳ, ngô... có hoạt tính phân giải CMC và xylan với đường kính vòng phân giải dao động từ 0,2 - 2,8 cm và 0,2 - 3,5 cm, theo thứ tự [3]. Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng phân giải cellulose và xylan của 3 chủng *Trichoderma* phân lập từ đất trồng dong riềng.



Hình 1. Khả năng sinh cellulase (A) và xylanase (B) của 36 chủng *Trichoderma*



Hình 2. Khả năng sinh cellulase (a) và xylanase (b) của *Trichoderma* D5, *Trichoderma* D19 và *Trichoderma* D25

3.2. Khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh của các chủng *Trichoderma*

Ba chủng *Trichoderma* tiếp tục được đánh giá khả năng ức chế với một số nấm gây bệnh trên cây trồng.

Kết quả cho thấy, 3 chủng: *Trichoderma* D5, *Trichoderma* D19, *Trichoderma* D25 đều có khả năng ức chế với 3 chủng nấm gây bệnh là: *C. musae* MS2, *L. theobromae* LT3, *T. paradoxa*; hệ

số biến động sai số thí nghiệm chấp nhận được, hệ số biến động dao động từ 8,3 - 15,6 đều nhỏ hơn 20%, với độ tin cậy 95% ($P \leq 0,05$). Trong 3 chủng, *Trichoderma* D5 có khả năng ức chế mạnh nhất, đạt 91,3% đối với *C. musae* MS2; 77,2% đối với *T. paradoxa* và 70,2% đối với *L. theobromae* LT3. Kết quả nghiên cứu trên phù hợp với kết quả nghiên cứu của Ganesan và cs (2009) [10], khi khảo sát khả năng ức chế của 20 chủng *Trichoderma* với 2 loài nấm gây bệnh là *C. musae* và *L. theobromae*.

Nghiên cứu của Ganesan và cs (2009) [10] cũng cho thấy, khả năng ức chế với từng loại nấm gây bệnh của các chủng *Trichoderma* là khác nhau.

Chủng *Trichoderma* TV₉ có khả năng ức chế *L. theobromae* cao nhất, đạt 91,7%, đối với *C. musae* là 54,8%.

Bảng 2. Mức độ đối kháng của các chủng *Trichoderma* với 3 loài nấm gây bệnh

Chủng <i>Trichoderma</i>	Mức độ đối kháng (%)		
	<i>C. musae</i> MS2	<i>L. theobromae</i> LT3	<i>T. paradoxa</i>
<i>Trichoderma</i> D5	91,3 ± 1,7 ^a	70,2 ± 1,24 ^a	77,2 ± 1,64 ^a
<i>Trichoderma</i> D19	74,1 ± 1,95 ^c	58,2 ± 0,62 ^c	55,1 ± 1,07 ^c
<i>Trichoderma</i> D25	84,0 ± 2,03 ^b	67,4 ± 0,69 ^b	61,8 ± 0,89 ^b
CV (%)	9,2	8,3	15,6

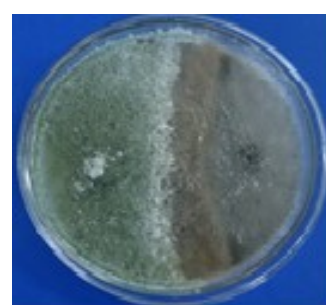
Ghi chú: Các chữ cái a, b, c... trong cùng cột biểu thị sự khác biệt ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức theo phép thử Duncan.



C. musae



L. theobromae



T. paradoxa

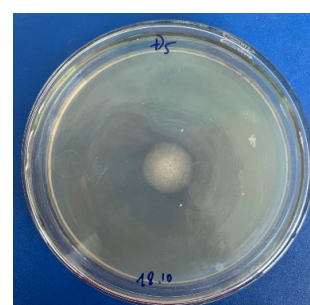
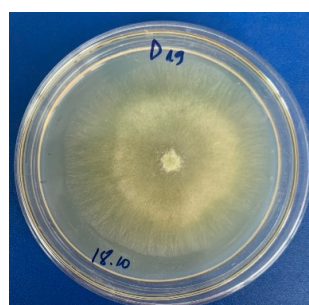
Hình 3. Khả năng đối kháng của chủng *Trichoderma* D5 với các nấm bệnh

3.3. Định danh các chủng *Trichoderma* dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự gen vùng 5.8S rDNA

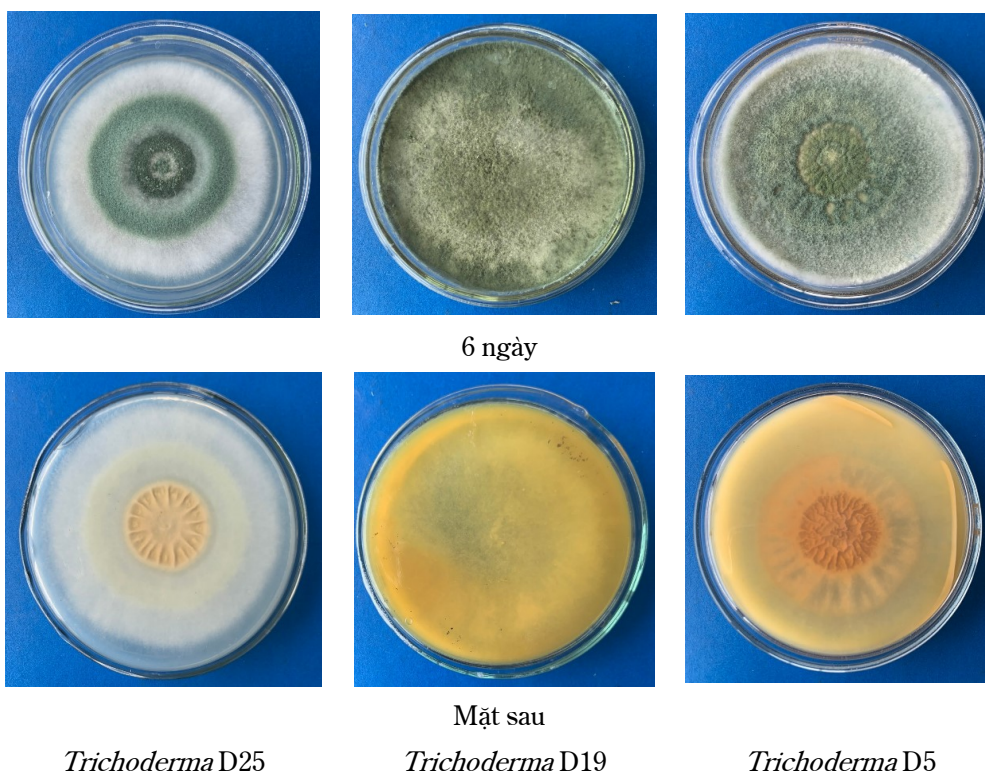
3.3.1. Đặc điểm hình thái và cấu trúc vi học

Để đảm bảo độ chính xác tới loài cho 3 chủng nấm *Trichoderma* dùng cho nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh xử lý bã dong riềng làm phân bón hữu cơ, 3 chủng nấm này được định danh tới loài dựa vào các đặc điểm về hình thái, cấu trúc vi học kết hợp với trình tự vùng 5.8S rDNA.

Trên môi trường PDA, các chủng nấm phát triển nhanh, tuy nhiên tốc độ phát triển khác nhau. Sau 2 ngày, chủng *Trichoderma* D19 phát triển nhanh nhất, đường kính khuẩn lạc 81 mm. Chủng *Trichoderma* D25 và *Trichoderma* D5 phát triển chậm hơn, đường kính khuẩn lạc tương ứng là 24 mm và 20 mm. Sau 6 ngày nuôi cấy, đường kính khuẩn lạc của *Trichoderma* D19, *Trichoderma* D25 và *Trichoderma* D5 là 90 mm, 90 mm và 85 mm, theo thứ tự. Cả 3 chủng, khuẩn lạc ban đầu có màu trắng, sau đó có màu xanh lục do bào tử được hình thành (Hình 4). Hệ sợi khí sinh, dày, tơi, xốp.



2 ngày



Hình 4. Khuẩn lạc 3 chủng *Trichoderma* trên môi trường PDA sau thời gian nuôi cấy

Quan sát cấu trúc vi học của 3 chủng *Trichoderma* cho thấy, các chủng đều có cuống sinh bào tử phân nhánh. Thể bình hình trụ hoặc hình chai. Bào tử trần có hình cầu đến hình elip, bề mặt nhẵn hoặc sần sùi. *Trichoderma* D25 hình thành bào tử áo.

Từ đặc điểm hình thái, cấu trúc vi học và đối chiếu với khóa phân loại nấm *Trichoderma* của Gams và Bissett (2002) [8], đã nhận thấy cả 3 chủng có đặc điểm hình thái giống chi *Trichoderma*.



Hình 5. Cấu trúc vi học của 3 chủng *Trichoderma* ở độ phóng đại 400 lần

3.3.2. Giải trình tự vùng 5.8S rDNA

Để phân loại đến loài, đã sử dụng đoạn mồi ITS1F và ITS4R cho phép nhân đoạn gen nằm giữa hai tiểu phân 18S và 28S có kích thước khoảng 600

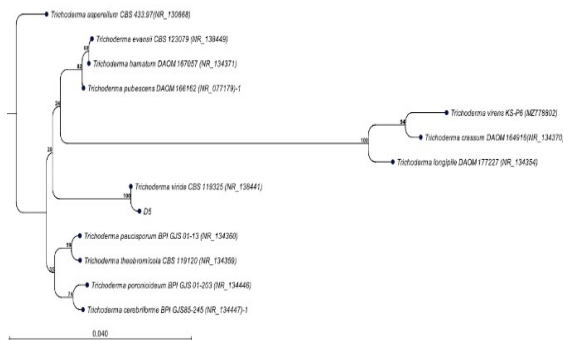
bp. Kết quả cho thấy, sản phẩm đoạn gen sau phản ứng PCR tạo thành băng duy nhất có độ nét với kích thước thu được khoảng 600 bp khi đối chiếu với thang chuẩn và tập trung rõ ràng, không tạo ra các

bằng phụ. Điều này chứng tỏ các đoạn gen thu được sau phản ứng PCR có chất lượng cao, cấp mỗi sử dụng cho phản ứng có tính đặc hiệu.

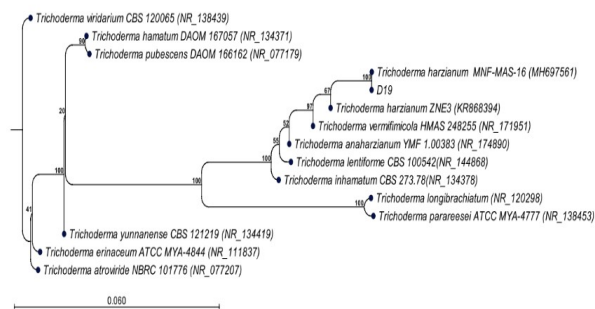
Kết quả giải trình tự và so sánh với trình tự đoạn gen mã hóa tương ứng đã được đăng kí trên cơ sở dữ liệu GenBank cho kết quả như sau:

Trình tự gen vùng 5.8S rDNA của chủng *Trichoderma* D5 có độ tương đồng cao trên 99,0%, với gen 5.8S rDNA tương ứng của chủng *T. viride* CBS 119325 (NR_138441). Chủng *Trichoderma* D5 là loài *T. viride* (ký hiệu *T. viride* D5) và được đăng kí trên GenBank với mã số OR686312.

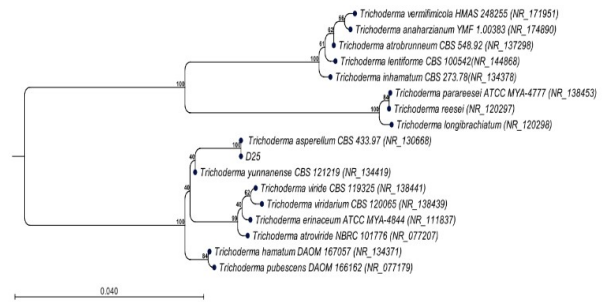
Trình tự gen vùng 5.8S rDNA của chủng *Trichoderma* D19 có độ tương đồng cao trên 99,0%, với gen 5.8S rDNA tương ứng của chủng *T. harzianum* MNF-MAS-16 (MH697561). Chủng *Trichoderma* D19 là loài *T. harzianum* (ký hiệu *T. harzianum* D19) và được đăng kí trên GenBank với mã số OR690335.



Hình 6. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen 5.8S rDNA của chủng *Trichoderma* D5 với các chủng nấm có họ hàng gần GenBank



Hình 7. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen 5.8 S rDNA của chủng *Trichoderma* D19 với các chủng nấm có họ hàng gần GenBank



Hình 8. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen 5.8S rDNA của chủng *Trichoderma* D25 với các chủng nấm có họ hàng gần GenBank

Trình tự gen vùng 5.8S rDNA của chủng *Trichoderma* D25 có độ tương đồng cao trên 99,0%, với gen 5.8S rDNA tương ứng của chủng *T. asperellum* CBS 433.97 (NR_130668). Chủng *Trichoderma* D25 là loài *T. asperellum* (ký hiệu *T. asperellum* D25) và được đăng kí trên GenBank với mã số OR686311.

Bên cạnh khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzyme ngoại bào cao thì *Trichoderma* còn được coi là tác nhân kiểm soát sinh học từ năm 1930 và là tác nhân phòng trừ sinh học thương mại (BCA) cho cây trồng. Cho đến nay, hơn 80 loài *Trichoderma* đã được báo cáo, trong số này 6 loài là: *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. virens*, *T. Longibrachiatum*, *T. viride* là những tác nhân kiểm soát sinh học được ứng dụng phổ biến trên cây trồng [11]. *T. harzianum* Tr.X2 và *T. asperellum* Tr.X3 được phân lập từ đất trồng xoài là 2 chủng nấm đối kháng có tiềm năng trong kiểm soát sinh học bệnh thán thư gây hại trên cây xoài do nấm *Colletotrichum asianum* TT.03 và *C. asianum* TT.02 trong điều kiện *in vitro* và nhà lưới [12]. *T. harzianum* và *T. asperellum* được phân lập từ đất vùng rễ cây nghệ vàng. Các chủng này đều có khả năng sinh tổng hợp cellulase, amylase, protease cao và có tiềm năng ứng dụng trong xử lý bã thải sau chế biến nghệ vàng làm phân bón [13]. *T. asperellum* T10 được phân lập từ đất vườn trồng thanh long. *T. asperellum* T10 đã được ứng dụng trong phòng bệnh đốm trắng trên cây thanh long do nấm *Neoscytalidium dimidiatum* ở điều kiện nhà lưới, giảm tỷ lệ bệnh từ 28 - 40% và giảm chỉ số bệnh từ 23 - 33% so với đối chứng [14]. *T. viride* ĐR10T8 được phân lập từ đất trồng cà phê, có hiệu

quả đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp., có tiềm năng ứng dụng để phòng trừ bệnh khô cành, khô quả trên cây cà phê [15]. Như vậy, 3 loài *Trichoderma* được phân lập từ đất trồng dong riềng là: *T. viride* D5, *T. harzianum* D19, *T. asperellum* D25 là các loài an toàn và có tiềm năng ứng dụng phân hủy vật liệu hữu cơ có hàm lượng cellulose và hemicellulose cao như bã dong riềng.

4. KẾT LUẬN

Từ 36 chủng *Trichoderma* phân lập từ đất trồng dong riềng, đã tuyển chọn được 3 chủng *Trichoderma* có khả năng sinh cellulase và xylanase cao: *Trichoderma* D5 có vòng phân giải cơ chất cellulose, xylan tương ứng là 3,02 cm và 3,43 cm. *Trichoderma* D19 có vòng phân giải cơ chất tương ứng là 2,65 cm và 2,88 cm. *Trichoderma* D25 có vòng phân giải cơ chất là 2,86 cm và 2,61 cm, theo thứ tự. Khả năng ức chế của các chủng *Trichoderma* với nấm bệnh *C. musae* MS2 từ 74,1 - 91,3%, *L. theobromae* LT3 từ 58,2 - 70,2% và *T. paradoxa* từ 55,1 - 77,2%.

Dựa vào đặc điểm hình thái, cấu trúc vi học, kết hợp giải trình tự đoạn gen 5.8S rDNA đã xác định 3 chủng nấm có khả năng sinh enzyme cellulase và xylanase mạnh thuộc chủng *Trichoderma* D5 là loài *T. viride* D5 với mã số OR686312, chủng *Trichoderma* D19 là loài *T. harzianum* D19 với mã số OR690335 và chủng *Trichoderma* D25 là loài *T. asperellum* D25 với mã số OR686311. Các chủng này có tiềm năng phân hủy vật liệu hữu cơ chứa hàm lượng cellulose và hemicellulose cao như bã dong riềng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Như Ngọc (2017). Nghiên cứu áp dụng công nghệ vi sinh vật để xử lý chất thải làng nghề sản xuất tinh bột dong riềng và miến dong. Luận án Tiến sỹ ngành Công nghệ sinh học, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.
2. Trần Hoàng Dũng, Huỳnh Văn Hiếu, Trần Duy Dương, Nguyễn Thành Công (2018). Phân lập các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose mạnh phục vụ sản xuất chế phẩm phân hủy rơm. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, 60(6), 32 - 36.
3. Roman M., Lidia B., Roza B., *et al.* (2018). Screening and identification of *Trichoderma* strains isolated from natural habitats with potential to cellulose and xylan degrading enzymes production. *Polish journal of microbiology*, Vol 67, No2, pp. 181 - 190.
4. Mohammed Inuwa Ja afaru (2013). *Screening of fungi isolated from environmental samples for xylanase and cellulose production*. Hindawi publishing corporation ISRN microbiology. Article ID 283423.
5. Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Mỹ Hoa, Đỗ Thị Xuân (2018). Sản xuất và đánh giá hiệu quả phân bón hữu cơ vi sinh từ bùn thải nhà máy sản xuất bia và nhà máy chế biến thủy sản. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, (54), 81 - 89.
6. Trần Thị Ngọc Sơn, Trần Thị Anh Thư, Nguyễn Ngọc Nam, Lưu Hồng Mẫn (2012). Ảnh hưởng của rơm rạ xử lý bằng chế phẩm *Trichoderma* sp. đến năng suất, độ phì nhiêu đất và hiệu quả kinh tế lúa hè thu 2010 tại đồng bằng sông Cửu Long. Đề tài khoa học và công nghệ cấp Bộ Nông nghiệp và PTNT.
7. Nguyễn Thị Thu Huyền, Nguyễn Thị Hương Trà, Trần Thị Mai (2013). Nghiên cứu thu nhận chế phẩm nấm đối kháng *Trichoderma* spp. ứng dụng trong bảo quản chuối tiêu. Đề tài khoa học và công nghệ cấp Bộ Nông nghiệp và PTNT.
8. Gams, W. and Bissett, J. (2002). Morphology and identification of *Trichoderma*. *Trichoderma and Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor & Francis e-Library, 1, 3 - 34.
9. Nguyễn Hồng Vân, Hoàng Tấn Quảng, Lê Mỹ Tiểu Ngọc, Nguyễn Hữu Nhân, Cao Đăng Nguyên, Nguyễn Hoàng Lộc (2013). Phân lập và xác định tính chất hóa lý của enzyme carboxymethyl cellulase từ *Trichoderma asperellum*. Hội nghị Khoa học công nghệ Sinh học toàn quốc, 569 - 573.
10. Ganesan S., Swaminathan U., Arjunan M. (2009). Biocontrol with *Trichoderma* species for the management of postharvest crown rot of banana. *Phytopathol. Mediter*, 48, 214 - 225.

11. Paulina G., Ajay K., Sergio S., Fannie P., Ma. del C. O., Ayomide E. F., Sajjad H., Olubukola O. B. and Gustavo S. (2023). *Trichoderma* species: Our best fungal allies in the biocontrol of plant diseases - A review. *Plants*, 12(432).
12. Phạm Thị Lý Thu, Lê Trung Thành, Lưu Thị Mỹ Dung, Hà Viết Cường, Nguyễn Đức Thành, Nguyễn Thị Hồng Hải (2021). Tuyển chọn nấm *Trichoderma* spp. có khả năng đối kháng với tác nhân gây bệnh thán thư trên xoài. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 19(12): 1617 - 1627.
13. Vũ Xuân Tạo, Lê Thu Hương, Trần Bảo Trâm, Đào Ngọc Ánh, Lê Thị Hoàng Yến (2023). Nghiên cứu sàng lọc các chủng nấm *Trichoderma* phân lập từ đất trồng nghệ vàng (*Curcuma longa*) tại Hưng Yên trong xử lý bã thải sau chế biến nghệ vàng. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 65(5), 70 - 75.
14. Lê Thanh Bình, Trương Minh Ngọc, Hồ Thị Nguyệt, Lê Thị Huyền (2022). *Trichoderma asperellum* T10 - Chủng vi sinh tiềm năng đối kháng với nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm trắng trên thanh long ở Bình Thuận. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 64(10ĐB), 14 - 19.
15. Nguyễn Bá Thọ, Trương Minh Ngọc, Đỗ Thị Mai Trinh, Nguyễn Đào Thanh Hương, Lê Thanh Bình, Nguyễn Thị Liên, Hồ Thị Nguyệt, Lê Thị Huyền (2022). Phân lập, tuyển chọn chủng *Streptomyces* sp. và vi nấm *Trichoderma* sp. đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. CC1.5 gây bệnh khô cành, khô quả trên cây cà phê ở tỉnh Đắk Nông. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 64(10ĐB), 76 - 80.

SCREENING AND IDENTIFYING MOLD STRAINS CAPABLE OF BIOSYNTHESIZING ENZYME CELLULASE AND XYLANASE

Nguyen Thi Hong Ha¹, Nguyen Thi Huong Tra¹, Le Thi Trang¹, Nguyen Ngoc Huyen¹,
 Nguyen Tuan¹, Vu Thu Diem¹, Nguyen Trong Uyen², Le Khanh Linh³, Nguyen Van Hieu⁴

¹Vietnam Institute of Agricultural Engineering and Post - Harvest Technology

²Bac Kan Department of Agriculture and Rural Development

³Curtin University, Perth Western Australia

⁴Institute of Biotechnology

Summary

The aim of this study was to select mold strains capable of degrading cellulose and hemicellulose. The results showed that among 36 *Trichoderma* strains, 3 *Trichoderma* strains were selected with the highest ability to degrade cellulose and hemicellulose: *Trichoderma* D5 had cellulose and xylan substrate degrading zone diameters of 3.02 cm and 3.43 cm; *Trichoderma* D19 got 2.65 cm and 2.88 cm; *Trichoderma* D25 got 2.86 cm and 2.61 cm, respectively. Three *Trichoderma* strains had strong antagonistic activity against pathogenic fungi of *Colletotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae* and *Thielaviopsis paradoxa* from 74.1 - 91.3%, 58.2 - 70.2% and 55.1 - 77.2%, respectively under *in vitro* conditions. The three strains were identified as *Trichoderma viride* (*T. viride* D5), *Trichoderma harzianum* (*T. harzianum* D19) and *Trichoderma asperellum* (*T. asperellum* D25) and were registered on GenBank with the corresponding code OR686312; OR690335 and OR686311. These strains were considered to have the potential to decompose organic materials with high cellulose and hemicellulose content such as *C. edulis* Ker. residue.

Keywords: *Trichoderma*, cellulose, hemicellulose.

Ngày nhận bài: 15/7/2024

Ngày chuyển phản biện: 30/7/2024

Ngày thông qua phản biện: 15/8/2024

Ngày duyệt đăng: 25/9/2024