



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003709

(51) **C12N 1/14**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00496

(22) 16/11/2022

(45) 25/09/2024 438

(43) 27/01/2023 418

(73) Trường Đại học Kinh tế- Kỹ thuật công nghiệp (VN)

Số 456 đường Minh Khai, phường Vĩnh Tuy, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Mai Hương (VN); Phạm Thị Thu Hoài (VN).

(54) **CHŨNG NẤM TRICHODERMA KONILANGBRA ĐL3 ĐƯỢC PHÂN LẬP, QUY
TRÌNH SẢN XUẤT VÀ CHẾ PHẨM NẤM CỘNG SINH RỄ CÂY ĐÌNH LĂNG
THU ĐƯỢC TỪ QUY TRÌNH NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 được phân lập, trong đó chủng nấm này có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1, chủng nấm này có khả năng cộng sinh rễ cây đình lăng (*Polyscias fruticosa* L.), có hoạt tính enzym phosphatase với đường kính vòng phân giải trên môi trường $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ lên tới 12 mm khi kiểm tra bằng phương pháp đục lỗ thạch, có khả năng phân giải phospho khó tan (P_2O_5) đạt tới nồng độ tích lũy 390,79 ppm sau từ 7 đến 10 ngày nuôi cấy, và có khả năng tổng hợp IAA khi nuôi cấy ở 30°C trong môi trường PDA lỏng bổ sung tryptophan nồng độ 2 g/l lên tới 33,34 ppm. Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đình lăng và chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đình lăng thu được từ quy trình này để ứng dụng như chế phẩm nông dụng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ vi sinh ứng dụng trong nông nghiệp, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 được phân lập, quy trình sản xuất và chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng thu được từ quy trình này ứng dụng như một loại phân bón nấm cộng sinh với rễ cây đinh lăng để cung cấp phospho hòa tan và chất kích thích sinh trưởng IAA cho cây trồng.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Trong các nghiên cứu về lĩnh vực vi sinh vật học, việc nghiên cứu về tính đa dạng nhằm phát triển các chế phẩm vi sinh cho phép tăng cường hiệu quả đối với từng loại cây trồng đang được chú trọng.

Hiện tại trong việc trồng các cây dược liệu, vẫn sử dụng một số loại phân bón hóa học để thúc đẩy sinh trưởng nhằm tăng năng suất cây trồng. Tuy nhiên, việc lạm dụng phân bón hóa học có thể gây nên các tác dụng không mong muốn đối với dược liệu thu được. Việc sử dụng phân bón vi sinh được xem là hướng phát triển bền vững, cho phép hạn chế được việc sử dụng phân bón hóa học mà còn góp phần tăng tính đa dạng sinh học trong vùng đất trồng cây và tạo nên mối quan hệ cộng sinh giữa các loài sinh vật có lợi, giảm thiểu tác hại của các tác nhân gây bệnh.

Nấm vùng rễ là một hình thức cộng sinh giữa nấm có lợi trong đất và rễ của thực vật bậc cao. Đây là quần hợp nấm - thực vật được biết nhiều nhất và đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển của thực vật cũng như hệ sinh thái, hơn 90% các loài thực vật có quan hệ với nấm theo hình thức nấm rễ và phụ thuộc vào mối quan hệ này để tồn tại. Nấm sẽ cố định trong rễ nhận các sản phẩm từ quá trình quang hợp và phát triển mạng lưới hệ sợi nấm trong vùng bầu rễ để tạo thuận lợi cho việc lấy nước, chất dinh dưỡng như phospho, lưu huỳnh, nitơ và các vi chất dinh dưỡng khác trong đất. Hiện đã có nhiều nghiên cứu, phân lập các nấm cộng sinh, ví dụ trên cây ngô, cây cà chua, cây cam, cây cà phê,... (Đỗ Thị Xuân, 2016, Lê Thị Hoàng Yên, 2018; Nguyễn Thị Kim Liên, 2012; Nguyễn Văn Viên, 2012), tuy nhiên đối với cây dược liệu vẫn chưa có nghiên cứu phân lập, đặc biệt là các cây như bạch chỉ, đinh lăng và cỏ ngọt.

Nấm cộng sinh vùng rễ làm tăng diện tích bề mặt rễ để hút nước và chất dinh dưỡng (Hamel et al., 2007), việc sử dụng phân bón sinh học nấm rễ giúp rễ cây phân nhánh nhiều hơn, sợi nấm phát triển từ gốc xuống đất tạo điều kiện cho rễ cây tiếp xúc với diện tích bề mặt đất rộng hơn, do đó, tăng diện tích hấp thụ nước và chất dinh dưỡng của cây hệ thống rễ cây. Vì vậy, cây trồng có tổ chức rễ nấm sẽ cho hiệu quả hấp thụ các chất dinh dưỡng cao hơn như đạm, lân, kali, canxi, magie, kẽm, đồng; và cũng tăng khả năng chống hạn của cây trồng. Lợi ích của việc bón phân sinh học nấm rễ cho pháp giúp cây trồng hấp phụ chất dinh dưỡng khó sử dụng, từ đó tăng năng suất cây trồng thông qua kích thích sự phát triển tự nhiên của cây, đồng thời cải thiện sức đề kháng của cây đối với bệnh hại, đặc biệt là đối với vi khuẩn gây bệnh, như bệnh thối rễ và thối cổ rễ. Sự liên kết của nấm rễ trong rễ cây sẽ giúp cây chống lại các bệnh thối rễ và thối cổ rễ do các loại nấm khác gây ra. Hơn nữa, có thể được sử dụng nấm rễ với các hóa chất nông nghiệp khác mà không bị ảnh hưởng đến hiệu quả.

Sự liên kết của nấm rễ không chỉ làm tăng lượng dinh dưỡng và nước sẵn có mà còn bảo vệ cây trồng khỏi nhiều loại stress phi sinh học (Evelin et al. 2009; Miransari 2010). Nấm rễ đóng một vai trò quan trọng trong việc tăng cường sự phát triển của cây trồng bằng các cơ chế khác nhau. Việc khám phá các cơ chế thúc đẩy tăng trưởng của nấm rễ cộng sinh sẽ giúp tăng cường sự phát triển của thực vật bằng cách sử dụng các quần thể vi sinh vật này cùng nhau. Mặc dù một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc áp dụng kết hợp nấm rễ có thể là một cách tiếp cận có ý nghĩa cho nông nghiệp bền vững (Denton, 2007; Najafi et al., 2012; Ordookhani et al., 2010). Tuy vậy, vẫn còn một số khía cạnh cần được nghiên cứu thêm để thu được lợi ích tối đa trong điều kiện tăng trưởng thực vật được cải thiện từ quần thể tự nhiên này. Sự kết hợp cho nhận và ngược lại giữa rễ cây và nấm có ảnh hưởng lớn đến số lượng và chất lượng cây trồng. Chúng hình thành mối quan hệ cộng sinh với thực vật trên cạn cũng như dưới nước (Christie et al. 2004; Liu và Chen 2007; Willis et al. 2013).

Bên cạnh khả năng hỗ trợ sinh trưởng của cây chủ, nhiều nấm nội sinh còn có khả năng sinh tổng hợp nhiều chất kháng sinh, kháng nấm có tác dụng trong ức chế vi sinh vật gây bệnh. Năm 2003, Strobel và cộng sự đã nghiên cứu về chủng nấm nội sinh *Cryptosporiopsis quercina* được ly trích từ cây *Tripterigeum wilfordii*, vì nấm này có thể sản xuất cryptocandin và cryptocin. Trong đó, cryptocandin kháng một số vi nấm gây bệnh cho người như *Candida albicans*, *Trichophyton* spp. và chống một số nấm gây

bệnh thực vật như *Sclerotinia sclerotiorum* và *Botrytis cinerea*. Cryptocin có tác dụng kháng *Pryriaria oryzae* và một số vi nấm gây bệnh thực vật (Germain, 1995). Cùng năm 2003, Taechowisan và Lumyong đã nghiên cứu về endophyt có hoạt tính kháng nấm từ rễ cây *Zingiber officinale* và *Alpinia galanga*. Năm 2019, Lê Thị Minh Thành và cộng sự đã tìm ra vi nấm *Penicillium* sp. LDL4.4 từ *Huperzia serrate* có khả năng sản xuất huperzin A có tác dụng là chất ức chế enzym acetylcholinesteraza, và được dùng trong điều trị bệnh Alzheimer. Kusari và cộng sự (2009), đã phân lập được *Fusarium solani* từ *Camptotheca acuminata* có khả năng sản xuất camptothecin và 2 dẫn xuất (9-methoxycamptothecin và 10-hydroxycamptothecin) có khả năng chống ung thư. Năm 2012, Agnes Joseph Aswathy và cộng sự đã nghiên cứu về endophyt trong cây Nghệ (*Curcuma longa*). Các chất dinh dưỡng trong thân rễ của cây nghệ là môi trường sống đa dạng cho các nhóm vi khuẩn khác nhau. Một số vi khuẩn nội sinh liên quan có thể thúc đẩy tăng trưởng. Trong nghiên cứu này, hai chủng endophyt *Paenibacillus* sp. được phân lập từ thân rễ củ nghệ và cả hai chủng đã được tìm thấy có khả năng để sản xuất IAA qua phân tích HPLC. Cùng năm này, Cui và cộng sự đã phát hiện vi nấm nội sinh *Fusarium oxysporum* phân lập từ cây *Ginkgo biloba* có khả năng sản xuất ginkgolid B dùng để điều trị bệnh tim mạch.

Nói chung, nấm rễ cộng sinh tăng cường sự phát triển của thực vật trong môi trường bằng cách cân bằng một số cơ chế như: điều chỉnh dinh dưỡng thực vật, sản xuất hormone, enzym chống oxy hóa và điều chỉnh một số quá trình sinh lý. Tuy nhiên, cũng có thể thấy rõ hiệu quả của các cơ chế này còn phụ thuộc vào mức độ của nấm rễ và sự liên kết của cây chủ cũng như một số yếu tố đất và thực vật.

Đối với các chất kích thích sinh trưởng như IAA, các nghiên cứu cho thấy chúng có khả năng được sinh tổng hợp từ vi sinh vật. Đây là một hướng hữu hiệu trong việc kích thích sinh trưởng thực vật bền vững. Akbari và cộng sự đã phân lập và tuyển chọn được một số chủng *Azospirillum* spp. có khả năng sinh tổng hợp IAA kích thích sinh trưởng cây lúa mì. Kết quả là sự nhiễm các chủng *Azospirillum* spp. đã làm tăng đường kính gốc lúa, chiều dài rễ, trọng lượng khô và số lượng lông rễ so với đối chứng (Akbari *et al.*, 2007). Naiman và cộng sự đã nghiên cứu gây nhiễm vi khuẩn *Azospirillum brasilens* và *Pseudomonas fluorescens* cho lúa mì. Kết quả cho thấy chiều cao cây tăng 12%, đường kính gốc thân tăng 40%, năng suất tăng 16% (Naiman *et al.*, 2009).

Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy, hầu hết các vi khuẩn vùng rễ là các vi khuẩn Gram âm, không sinh bào tử nên việc bảo quản các chế phẩm chứa các chủng vi khuẩn tồn kém và ít hiệu quả. Chính vì vậy, một hướng đi trong sản xuất phân bón vi sinh là sử dụng nấm vùng rễ có khả năng sinh IAA và phân giải phospho khó tan là lựa chọn có thể thay thế cho phân bón vô cơ nhằm giúp tăng trưởng và năng suất cây (Ladha & Reddy, 2000). Bên cạnh đó, các vi sinh vật phân lập từ rễ các loại cây có khả năng sinh IAA như chất chuyển hóa thứ cấp giúp tham gia vào quá trình hấp thu dinh dưỡng cho cây, có vai trò quan trọng đối với sự nảy mầm, sinh trưởng và tăng năng suất cây trồng. Trong đó, nấm rễ còn thể hiện như một yếu tố kích thích cây sản sinh ra các chất có hoạt tính tự bảo vệ mình thường được gọi là các phytoalexin. Muraleedharan và cộng sự đã khảo sát vai trò của nấm rễ trên rễ cây *Trifolium repens* trong việc kích thích cây chủ sinh ra các chất có hoạt tính kích thích sinh trưởng của nấm rễ, chủng *Penicillium digitatum* và ức chế chủng gây bệnh *Rhizoctonia* sp. khi nuôi cây *in vitro* (Muraleedharan G.Nair et al., 1991).

Theo Phạm Thanh Hà và cộng sự (1999), 02 chủng nấm sợi *Aspergillus awamori* MN1 và *Penicillium cyaneofulvum* ĐT1 có khả năng phân giải phospho khó tan và nguồn dinh dưỡng KNO₃, NaNO₃ và (NH₄)₂SO₄ là những nguồn nitơ tốt nhất cho môi trường nuôi chủng MN1 để tạo khả năng phân giải lân cao. Ngoài ra, Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Thị Mộng Huyền (2015) đã phân lập được 36 dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường LGI từ các mẫu rễ cây khoai lang trồng ở huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang. Tất cả các dòng vi khuẩn này đều có dạng hình que và có khả năng chuyển động. Thực hiện các phép thử sinh hóa đã xác định được các dòng KL9, KL11, KL39a, KL39b là các vi khuẩn nội sinh có đủ 3 đặc tính tốt là cố định đạm, hòa tan lân khó tan, tổng hợp IAA. Khi giải trình tự đoạn gen 16S-DNA của 4 dòng vi khuẩn này, nhận diện được dòng KL9 có tỷ lệ đồng hình của đoạn gen 16S-DNA với loài *Burkholderia sprentiae* và *Burkholderia vietnamiensis* là 99%; tỷ lệ đồng hình đoạn gen 16S-DNA của dòng KL39a với loài *Burkholderia ambifaria* và *Burkholderia vietnamiensis* là 99%; tỷ lệ đồng hình đoạn gen 16S-rDNA của dòng KL39b với loài *Enterobacter ludwigii* và *Enterobacter cloacae* là 99%; tỷ lệ đồng hình đoạn gen 16SDNA của dòng KL11 với loài *Klebsiella pneumoniae* là 99%.

Kết quả nghiên cứu ở nhiều nơi cho thấy phân vi sinh phân giải phospho khó tan có thể nâng cao hiệu quả sử dụng lân khoáng lên 20-30% so với đối chứng, đồng thời

có tác dụng nâng cao năng suất cây trồng 5-10% tùy loại đất trồng. Việc sử dụng vi sinh vật phân giải lân có thể thay thế 30-50% lượng lân cần bón bằng quặng phosphorit với hàm lượng lân tổng số tương đương mà năng suất cây trồng không bị giảm sút. Ngoài ra, các vi sinh vật phân giải lân còn có khả năng sản sinh ra các chất kích thích sinh trưởng thực vật hoặc các chất kháng sinh giúp cây trồng phát triển và chống chịu tốt hơn với các điều kiện bất lợi từ môi trường. Nguyễn Thị Phương Chi, Phạm Thanh Hà, Nguyễn Thị Quỳnh Mai (2005) đã nghiên cứu khả năng tiết enzym phosphatase của 10 chủng vi sinh vật hòa tan lân và nhận thấy rằng ngoài khả năng hòa tan lân khó tan các chủng vi sinh vật này có khả năng sản sinh enzym phosphat (chủ yếu là nấm sợi và vi khuẩn) enzym này đóng vai trò xúc tác không thể thiếu cho quá trình phân hủy sinh học các hợp chất hữu cơ chứa lân. Vũ Thúy Nga và cộng sự (2003) nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp IAA và phân giải phosphate vô cơ khó tan của vi khuẩn *Bradyrhizobium*. Kết quả cho thấy chúng có khả năng tổng hợp IAA với hàm lượng 20-100 µg/ml môi trường nuôi cấy. Phạm Thanh Hà và Nguyễn Thị Phương Chi (1999) nghiên cứu ảnh hưởng của các nguồn nitơ lên khả năng phân giải phospho khó tan của hai chủng nấm sợi *Aspergillus awamori* MN1 và *Penicillium cyaneofulvum* ĐT1. Tác giả đã sử dụng 7 nguồn nitơ khác nhau, kết quả cho thấy KNO_3 , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là những nguồn nitơ tốt nhất cho môi trường nuôi chủng MN1 tạo khả năng phân giải phosphate cao. Còn đối với chủng ĐT1 là NH_4Cl .

Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy rằng các chủng vi khuẩn có khả năng tạo IAA như vi khuẩn thuộc chi *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* đã cho kết quả khả quan (Phạm Việt Cường, 2003; Lăng Ngọc Dâu, 2004; Vũ Thúy Nga, 2003).

Nhận thấy rằng ở nước ta, các nghiên cứu chủ yếu là tuyển chọn được một số chủng vi khuẩn và một số ít nghiên cứu về khu hệ nấm cộng sinh trong rễ và đất, đặc biệt là về khả năng vừa phân giải phospho và vừa sinh chất kích thích sinh trưởng IAA của chúng còn rất hạn chế, trong khi đó, phospho là một nguyên tố cần thiết đối với cây trồng, tham gia vào việc hình thành màng tế bào, axit nucleic, làm tăng sự phát triển của rễ. Do đó, vẫn có nhu cầu về các chủng vi sinh có khả năng vừa phân giải phospho vừa sinh chất kích thích sinh trưởng IAA cũng như các chế phẩm vi sinh ổn định chứa các chủng này để sử dụng cho cây trồng góp phần giảm sự phụ thuộc vào phân bón vô cơ.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là nhằm phát triển chế phẩm nấm thay thế cho phân bón vô cơ, các tác giả đã phân lập thành công chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 từ rễ cây đinh lăng có đặc tính nông dụng hữu ích. Cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3, quy trình sản xuất chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng và chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng chứa bào tử của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 cộng sinh với rễ cây đinh lăng thu được từ quy trình này để cung cấp phospho hòa tan và chất kích thích sinh trưởng axit indol axetic (IAA) cho cây đinh lăng.

Theo mục đích thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 được phân lập, trong đó chủng nấm này có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1 và được lưu giữ đông sâu tại Trường Đại học Kinh tế-Kỹ thuật công nghiệp, 456 Minh Khai, Hai Bà Trưng, Hà Nội với số lưu giữ ĐL03, khác biệt ở chỗ chủng nấm này:

- có khả năng cộng sinh rễ cây đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L.);
- có hoạt tính enzym phosphatase với đường kính vòng phân giải trên môi trường $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ lên tới 12 mm khi kiểm tra bằng phương pháp đục lỗ thạch;
- có khả năng phân giải phospho khó tan (P_2O_5) đạt tới nồng độ tích lũy 390,79 ppm sau từ 7 đến 10 ngày nuôi cấy; và
- có khả năng tổng hợp IAA khi nuôi cấy ở 30°C trong môi trường PDA lỏng bổ sung tryptophan nồng độ 2 g/l lên tới 33,34 ppm.

Theo mục đích thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) hoạt hóa chủng giống gốc bằng cách tan đông chủng giống nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 có số lưu giữ ĐL03 tại Trường Đại học Kinh tế-Kỹ thuật công nghiệp, 456 Minh Khai, Hai Bà Trưng, Hà Nội, tiếp đó cấy vào môi trường PDA thạch vô trùng, nuôi cấy ở nhiệt độ từ 25 đến 30°C trong 7 ngày thu được chủng giống gốc nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 hoạt hóa;

b) thu hỗn hợp bào tử nấm bằng cách cấy chủng giống gốc *Trichoderma konilangbra* ĐL3 đã hoạt hóa vào môi trường thạch rắn, nuôi cấy trong điều kiện nhiệt

độ từ 25 đến 30°C sau từ 7 đến 10 ngày, bào tử được thu nhận và phân tán trong nước muối sinh lý đến mật độ khoảng 10^8 bào tử/ml thu được hỗn hợp bào tử nấm; và

c) thu chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng bằng cách cấy hỗn hợp bào tử nấm theo tỷ lệ từ 2 đến 5% khối lượng vào bịch môi trường giá thể rắn bao gồm hỗn hợp thóc và bột ngô đã được hấp chín và để nguội với tỷ lệ thóc/bột ngô là 2/1 (theo khối lượng), sau đó chuyển bịch môi trường này vào nuôi cấy trong điều kiện tối, nhiệt độ từ 28 đến 35°C, độ ẩm giá thể duy trì từ 50 đến 60% trong từ 7 đến 14 ngày để nấm phát triển hệ sợi và tạo bào tử, sau khi sấy khô ở nhiệt độ khoảng 45°C đến độ ẩm khoảng 15%, nghiền nhỏ, thu được chế phẩm nấm cộng sinh rễ đinh lăng dạng bột.

Theo khía cạnh thứ ba, giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó chế phẩm này ở dạng bột độ ẩm khoảng 15% bao gồm giá thể thóc/bột ngô tỷ lệ 2/1 (theo khối lượng) chứa bào tử của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 đạt ít nhất 10^8 CFU/g và có khả năng phát triển cộng sinh với rễ cây đinh lăng để phân giải phospho khó tan lên tới 390,79 ppm và tổng hợp IAA lên tới 33,34 ppm.

Chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 và chế phẩm nấm cộng sinh thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích để phát triển phân bón vi sinh đặc hiệu cho cây đinh lăng, giúp giảm sự phụ thuộc vào phân bón vô cơ, cho phép phát triển nền nông nghiệp bền vững.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 kết quả xác định hình thái của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 phân lập được.

Hình 2 là kết quả xác định cây phả hệ của đoạn 16S dựa trên trình tự gen ITS của chủng nấm phân lập được (ĐL3).

Hình 3 là biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá khả năng phát triển của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 phát triển trên các môi trường nuôi cấy khác nhau.

Hình 4 là biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá khả năng phát triển của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 trên các điều kiện nhiệt độ nuôi cấy khác nhau.

Hình 5 là biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá khả năng phát triển của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 trên các điều kiện pH nuôi cấy khác nhau.

Hình 6 là biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá khả năng phát triển của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 trên các điều kiện thời gian nuôi cấy khác nhau.

Hình 7 là biểu đồ thể hiện kết quả thử nghiệm đánh giá khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 trong các môi trường nuôi cấy khác nhau.

Hình 8 là biểu đồ thể hiện kết quả thử nghiệm đánh giá khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 trong các điều kiện nhiệt độ nuôi cấy khác nhau.

Hình 9 là biểu đồ thể hiện kết quả thử nghiệm đánh giá khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 trong các điều kiện pH nuôi cấy khác nhau.

Hình 10 là kết quả thử nghiệm khả năng phát triển của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 trong các giá thể khác nhau.

Hình 11 là kết quả thử nghiệm khả năng phát triển của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 đối với các tỷ lệ phối trộn cơ chất khác nhau.

Hình 12 là kết quả thử nghiệm khả năng phát triển của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 đối với các tỷ lệ bổ sung giống khác nhau.

Hình 13 là kết quả thử nghiệm khả năng phát triển của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 theo độ ẩm giá thể.

Hình 14 là kết quả thử nghiệm khả năng phát triển của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 trên bịch nấm với trọng lượng khác nhau. Trong đó kết quả phát triển của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 trên bịch nấm có trọng lượng (A) 0,25 kg; (B) 0,5 kg và (C) 1 kg.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện và các ví dụ cụ thể, tuy nhiên các phương án và các ví dụ này chỉ nhằm mục đích là rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích thu hẹp phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 được phân lập, trong đó chủng nấm này có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1 và được lưu

giữ đông sâu tại Trường Đại học Kinh tế-Kỹ thuật công nghiệp, 456 Minh Khai, Hai Bà Trưng, Hà Nội với số lưu giữ ĐL03, khác biệt ở chỗ chủng nấm này:

- có khả năng cộng sinh rễ cây đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L.);
- có hoạt tính enzym phosphatase với đường kính vòng phân giải trên môi trường $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ lên tới 12 mm khi kiểm tra bằng phương pháp đục lỗ thạch;
- có khả năng phân giải phospho khó tan (P_2O_5) đạt tới nồng độ tích lũy 390,79 ppm sau từ 7 đến 10 ngày nuôi cấy; và
- có khả năng tổng hợp IAA khi nuôi cấy ở 30°C trong môi trường PDA lỏng bổ sung tryptophan nồng độ 2 g/l lên tới 33,34 ppm.

Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) hoạt hóa chủng giống gốc; b) thu hỗn hợp bào tử nấm; và c) thu chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng.

Trong bước hoạt hóa chủng giống gốc, tiến hành tan đông mẫu chủng giống nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 có số lưu giữ ĐL03 tại Trường Đại học Kinh tế-Kỹ thuật công nghiệp, 456 Minh Khai, Hai Bà Trưng, Hà Nội. Chủng sau khi hoạt hóa này được cấy vào môi trường PDA thạch vô trùng, nuôi cấy ở nhiệt độ từ 25 đến 30°C trong 7 ngày thu được chủng giống gốc nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 hoạt hóa ở dạng cụm khuẩn lạc trắng, bông xốp.

Trong bước thu hỗn hợp bào tử nấm, tiến hành cấy chủng giống gốc *Trichoderma konilangbra* ĐL3 đã hoạt hóa vào môi trường thạch rắn. Tiến hành nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ từ 25 đến 30°C sau từ 7 đến 10 ngày. Bào tử sản sinh được thu nhận và phân tán trong nước muối sinh lý đến mật độ khoảng 10^8 bào tử/ml thu được hỗn hợp bào tử nấm.

Để thu chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng, tiến hành cấy hỗn hợp bào tử nấm theo tỷ lệ từ 2 đến 5% khối lượng vào bịch môi trường giá thể rắn. Giá thể rắn được sử dụng theo sáng chế để nuôi cấy chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 bao gồm hỗn hợp thóc và bột ngô đã được hấp chín và để nguội với tỷ lệ thóc/bột ngô là 2/1 (theo khối lượng). Sau đó chuyển bịch môi trường này vào nuôi cấy trong điều kiện tối, nhiệt độ từ 28 đến 35°C. Duy trì điều kiện nuôi cấy trong điều kiện độ ẩm giá thể duy trì từ 40 đến 60%. Thời gian nuôi cấy được thực hiện trong khoảng từ 7 đến 14 ngày để nấm phát triển hệ sợi và tạo bào tử. Sau khi sấy khô ở nhiệt độ khoảng 45°C đến độ ẩm khoảng 15%, nghiền nhỏ, thu được chế phẩm nấm cộng sinh rễ đinh lăng dạng bột.

Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó chế phẩm này ở dạng bột độ ẩm khoảng 15% bao gồm giá thể thóc/bột ngô tỷ lệ 2/1 (theo khối lượng) chứa bào tử của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* DL3 đạt ít nhất 10^8 CFU/g và có khả năng phát triển cộng sinh với rễ cây đinh lăng để phân giải phospho khó tan lên tới 390,79 ppm và tổng hợp IAA lên tới 33,34 ppm.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Phân lập nấm cộng sinh từ rễ cây đinh lăng

Mẫu rễ và đất xung quanh rễ cây đinh lăng được thu thập từ huyện Hải Hậu, Nam Định và huyện Sapa, Lào Cai. Các mẫu được thu thập tại các độ sâu khác nhau từ mặt đất đến độ sâu 20 cm. Các mẫu đất và rễ này được cho vào túi nilon sạch, bao quản ở 4°C chuyển về phòng thí nghiệm để phân lập.

Đối với mẫu rễ, rửa mẫu dưới vòi nước chảy trong 5 phút. Khi bề mặt mẫu đã ráo nước, ngâm mẫu trong cồn 70°C trong 1 phút. Để mẫu khô trong tủ cấy vô trùng. Dùng dụng cụ vô trùng cắt mẫu rễ thành những đoạn nhỏ dài từ 5 đến 10mm, đặt các đoạn rễ lên đĩa petri có môi trường phân lập (môi trường MMN: glucoza 10 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,25 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0732 g/l; KH_2PO_4 0,5 g/l, CaCl_2 0,0662 g/l; NaCl 0,025 g/l; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g/l, sau khi khử trùng bổ sung kháng sinh streptomycin, ampicilin, tetracyclin hoặc cloramphenicol), sau đó chuyển vào tủ ấm 30°C trong thời gian từ 48 đến 72 giờ.

Đối với mẫu đất, lấy một lượng đất nhỏ đưa vào ống nghiệm chứa 9ml nước cất đã vô trùng, lắc đều, dùng pipet hút dịch nổi vào đĩa petri có môi trường phân lập (môi trường MMN, như trên), sau đó chuyển vào tủ ấm 30°C trong thời gian từ 48 đến 72 giờ.

Chọn các sợi nấm mọc ra từ mô rễ cây trên các đĩa phân lập, cấy ria trên môi trường MMN để tinh sạch chủng. Lựa chọn các chủng sạch để cấy trên môi trường thạch nghiêng MMN hoặc môi trường PDA để lưu giữ trong môi trường thạch nghiêng cao malt 2% ở nhiệt độ từ 25 đến 27°C, kiểm tra hoạt tính phosphatase và chọn lọc theo hoạt tính mong muốn.

Chọn lọc các chủng có hoạt tính enzym phosphatase theo nguyên lý khuếch tán trên thạch bằng phương pháp đục lỗ thạch trên môi trường Pikovkaya (cao nấm men 5

g/l, dextroza 10 g/l, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g/l, KCl 0,2 g/l, MgSO_4 0,1 g/l, MnSO_4 0,0001 g/l, FeSO_4 0,0001 g/l, agar 20 g/l, pH=6). Dịch nuôi cấy (chứa enzym thô) được đưa vào các lỗ thạch chứa $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ phương pháp đục lỗ thạch, chọn lọc những chủng có đường kính vòng phân giải lớn nhất.

Chọn lọc các chủng có khả năng phân giải phospho khó tan (P_2O_5) bằng phương pháp định lượng phospho hòa tan trong dịch nuôi cấy theo TCVN 8565:2010. Các chủng vi sinh vật được nuôi cấy lắc trong môi trường Pikovskaya trong 7 -10 ngày. Dịch nuôi cấy được ly tâm 6000 vòng/phút trong 20 phút, gạn lấy phần nước trong; Hàm lượng phospho trong dung dịch chiết được xác định bằng phương pháp trắc quang sau khi đã phân giải gốc xitrat. Đo màu xanh molipden do phản ứng của phospho với molybdat tạo thành phức đa dị vòng có màu xanh khi bị khử, từ đó suy ra hàm lượng phospho hòa tan trong mẫu. Chọn lọc các chủng có khả năng tích lũy phospho hòa tan lớn nhất.

Chọn lọc các chủng có khả năng tổng hợp IAA khi nuôi cấy ở 30°C trong môi trường PDA lỏng bổ sung tryptophan nồng độ 2 g/l, chọn lọc các chủng có khả năng tổng hợp IAA lớn nhất.

Kết quả chọn lọc từ mẫu rễ thu được 06 chủng ứng viên, từ mẫu đất thu được 05 chủng ứng viên. Thu được chủng nấm có hoạt tính enzym phosphataza với đường kính vòng phân giải trên môi trường $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ lên tới 12 mm và tích lũy P_2O_5 hòa tan đạt tới 390,79 ppm sau từ 7 đến 10 ngày nuôi cấy và có khả năng tổng hợp IAA khi nuôi cấy ở 30°C trong môi trường PDA lỏng bổ sung tryptophan nồng độ 2 g/l lên tới 33,34 ppm. Chủng phân lập này được ký hiệu là ĐL3.

Chủng ĐL3 sau khi phân lập, làm sạch được nuôi trên môi trường khoai tây cho thấy đây là chủng nấm có khuẩn lạc màu trắng, bông, không tiết sắc tố ra môi trường. Khuẩn lạc trên môi trường Czapek đạt có màu lục nhạt mặt trái và môi trường xung quanh màu vàng lục. Thể bình không thành cụm, không mập, hơi thót đáy. Bào tử có hình elip, kích thước khoảng 3-7,5x3-3,5 μm . Giá bào tử có cuống sinh bào tử trần và các nhánh dài, không dày. Kết quả phân lập và xác định hình thái như được thể hiện trên Hình 1.

Ví dụ 2. Định danh và phân loại chủng nấm ĐL3 phân lập

Để xác định chính xác chủng nấm phân lập được, tiến hành chiết tách ADN tổng số bằng cách lấy hệ sợi nấm mốc, trộn trong 0,5 ml đệm (Tris-HCl, EDTA, NaCl, SDS).

Ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, siêu âm 50% năng lượng 1 phút, nghỉ 1 phút. Bổ sung proteaza K 20 µg/ml, ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Bổ sung 0,15 ml CH₃COOK. Ly tâm 10000 x g, thu dịch trong, kết tủa ADN bằng isopropanol tỉ lệ 1:1. Sau khi ly tâm ở 13000 x g trong 10 phút ở 4°C thu tủa và rửa tủa bằng EtOH 70%. Sau khi làm khô, tái hòa tan trong 50 µl H₂O PCR. Bảo quản ADN ở -20°C để làm khuôn PCR.

Để khuếch đại gen mã hóa 16S rADN, sử dụng cặp mồi đặc hiệu: ITS1/ITS4, với trình tự sau

ITS1: 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' SEQ ID NO.2

ITS4: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' SEQ ID NO.3

Tiến hành PCR với thành phần bao gồm 5 mM dNTP: 1,5 µl; 10X đệm Taq: 2,5 µl; 5 µM ITS1: 1; 5 µM ITS4: 1; ADN khuôn: 1; Taq ADN pol: 0,3 µl; H₂O: 17,5 µl. Tổng thể tích phản ứng: 25 µl. Chu trình nhiệt: (1) 95°C: 5 phút; (2) 95°C: 45 giây; (3) 59°C: 1 phút; (4) 72°C: 4-5 phút, lặp lại từ bước 2 đến 4: 35 chu kỳ; (5) 72°C: 5 phút.

Kết quả giải trình tự được đánh giá bằng thuật toán Clustal W của phần mềm MEGA-X. Cây phả hệ được xây dựng sử dụng thuật toán Maximum Likelihood của phần mềm MEGA-X với model Kimura 2-parameter và giá trị bootstrap là 1000. Các nhánh có giá trị hỗ trợ < 50% sẽ không được hiển thị trên cây phả hệ.

Kết quả giải trình tự đoạn gen ITS của chủng nấm sợi ĐL3 nêu trong SEQ ID NO.1 có kích thước 579 nucleotit. Kết quả so sánh trình tự gen với cơ sở dữ liệu của GenBank thông qua giao diện tìm kiếm BLAST nucleotit-nucleotit đặt tại National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Hoa Kỳ: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, cho thấy chủng nấm sợi ĐL3 phân lập được tương đồng với các chủng nấm thuộc chi *Trichoderma* (Hình 2). Cây phả hệ của chủng ĐL3 với các chủng nấm có độ tương đồng cao trên ngân hàng gen NCBI cho thấy chủng ĐL3 nằm trong nhánh với các chủng thuộc chi *Trichoderma*.

Như vậy, dựa vào các đặc điểm hình thái và kết quả giải trình tự gen ITS của chủng nấm sợi ĐL3, có thể xác định được chủng nấm ĐL3 phân lập được thuộc loài *Trichoderma konilangbra*. Chủng này được định danh là *Trichoderma konilangbra* ĐL3.

Ví dụ 3. Đánh giá khả năng phát triển trên môi trường lỏng

Để đánh giá khả năng phát triển của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 trong môi trường lỏng khác nhau. Tiến hành nuôi cấy trên môi trường lỏng khác nhau

bao gồm môi trường PDA (khoai tây 200 g/l; pepton 5 g/l; glucoza 20 g/l; pH 6,5-7,0), Hansen (cao thịt 10 g/l; glucoza 20 g/l; K_2HPO_4 2 g/l; $MgSO_4$ 2 g/l; pH=6), Gause 1 (tinh bột tan 10 g/l; K_2HPO_4 0,5 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g/l; KNO_3 0,5 g/l; NaCl 0,5 g/l; $FeSO_4$ 0,01 g/l; pH=6), Gause 2 (cao thịt 3 g/l; pepton 5 g/l; glucoza 10 g/l, pH=6) và Malt 2%.

Chủng được cấy và nuôi trên các môi trường lỏng với tỷ lệ giống 2%, ở nhiệt độ phòng (25 - 30°C). Sau 5 ngày nuôi cấy tiến hành xác định lượng sinh khối của các chủng nấm sinh ra trên từng môi trường. Kết quả được thể hiện trên Hình 3.

Trên môi trường lỏng chủng nấm *T. konilangbra* ĐL3 phát triển tạo thành các pelet dạng cầu tròn, không đồng nhất, màu nâu đậm. Trên môi trường Gause 1, Gause 2, Malt 2% chủng *T. konilangbra* ĐL3 không sinh sắc tố, tuy nhiên khi nuôi cấy trên môi trường Hansen chủng *T. konilangbra* ĐL3 có sinh sắc tố màu nâu đậm, trên môi trường PDA hình thành sắc tố màu nâu cam.

Thông qua các kết quả nghiên cứu nhận thấy, chủng nấm *T. konilangbra* ĐL3 sinh trưởng khá chậm trên hầu hết các môi trường khảo sát, lượng sinh khối ươm sinh ra trên môi trường đạt 6 – 56,13 g/L. Trên môi trường Gause 2 chủng *T. konilangbra* ĐL3 phát triển khá kém, lượng sinh khối thu được đạt 6 g/L. Có thể thấy. Trên môi trường PDA, hàm lượng sinh khối ươm thu được từ chủng *T. konilangbra* ĐL3 lớn nhất, đạt 56,13 (g/L) gấp 5 - 9 lần so với các môi trường khác trong nghiên cứu. pH trên các môi trường nuôi cấy dao động từ 4 – 6, đây là pH thích hợp cho sự phát triển của chủng nấm. Có thể thấy, PDA là môi trường tối ưu nhất cho sự sinh trưởng của chủng nấm *T. konilangbra* ĐL3.

Ví dụ 4. Đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng phát triển

Để khảo sát để tìm ra yếu tố nhiệt độ ảnh hưởng đến khả năng phát triển của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 trên môi trường tối ưu PDA, nhiệt độ khảo sát trong khoảng từ 15 đến 45°C với bước nhảy 5°C. Điều kiện nuôi cấy như nêu trong Ví dụ 3 với nhiệt độ nuôi cấy thay đổi theo công thức thử nghiệm.

Kết quả được thể hiện trên Hình 4 cho thấy, chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 phát triển tạo thành các pelet lớn có dạng cầu tròn màu trắng ngà đồng nhất, kích thước 4 - 5 mm. Chủng sinh sắc tố nâu đậm khi nuôi cấy trên môi trường lỏng.

Thông qua kết quả thu được thấy rằng nấm *T. konilangbra* ĐL3 có khả năng sinh trưởng trong khoảng nhiệt từ 25 – 45°C lượng sinh khối đạt được 30,9 – 118,2 g/L. Nấm

T. konilangbra ĐL3 phát triển tốt nhất trong khoảng nhiệt 20 – 25°C, với hàm lượng sinh khối ướt đạt 87,6 – 118,3 g/L, ngoài khoảng nhiệt này khả năng sinh trưởng của chủng giảm 2 -3 lần. Độ pH môi trường sau nuôi cấy chủng *T. konilangbra* ĐL3 đều so với pH ban đầu (pH 6) và chuyển về vùng axit (3,5-4,0). Khoảng nhiệt độ 20 – 25°C được lựa chọn làm nhiệt độ thích hợp cho quá trình sinh trưởng của chủng *T. konilangbra* ĐL3.

Ví dụ 5. Đánh giá ảnh hưởng của pH đến khả năng phát triển

Để khảo sát để tìm ra yếu tố pH ảnh hưởng đến khả năng phát triển của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 trên môi trường tối ưu PDA, nhiệt độ 25°C, pH được khảo sát trong khoảng từ 3 đến 10 với bước nhảy là 1. Điều kiện nuôi cấy như nêu trong Ví dụ 3.

Kết quả được thể hiện trên Hình 5 cho thấy chủng *Trichoderma konilangbra* ĐL3 hình thành các pellet có dạng cầu tròn nhỏ mịn màu nâu. Chủng sinh sắc tố ở hầu hết các pH của môi trường.

Nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 cho thấy có khả năng sinh trưởng trong khoảng pH 3 -9, lượng sinh khối ướt đạt khoảng 31,8 – 147,8 g/L. Tuy nhiên, khoảng pH thích hợp nhất cho sự phát triển của nấm *T. konilangbra* ĐL3 là từ 4 đến 8, với hàm lượng sinh khối ướt đạt trên 119,80 g/L. Trong quá trình lên men pH môi trường có xu hướng giảm mạnh, dao động từ 4-5. Nấm *T. konilangbra* ĐL3 phát triển thích hợp nhất khi nuôi cấy trên môi trường PDA với khoảng pH rộng 4 -8.

Ví dụ 6. Đánh giá ảnh hưởng của thời gian đến khả năng phát triển

Để đạt được hàm lượng sinh khối tốt nhất thì việc xác định thời điểm thu hồi trong quá trình lên men là rất quan trọng. Tiến hành nuôi cấy chủng *Trichoderma konilangbra* ĐL3 trên môi trường và các điều kiện tối ưu được xác định ở các Ví dụ trên. Sau các thời điểm 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 giờ nuôi cấy, tiến hành lấy mẫu, kiểm tra đánh giá hàm lượng sinh khối tạo thành và pH cuối. Kết quả được thể hiện trên Hình 6.

Kết quả thử nghiệm cho thấy chủng *Trichoderma konilangbra* ĐL3 bắt đầu sinh trưởng tốt sau 72 giờ lên men, lượng sinh khối ướt sinh ra tại thời điểm này đạt 56,4 g/L. Sinh trưởng của chủng nấm *T. konilangbra* ĐL3 đạt cực đại khi ở thời điểm từ 120 đến 144 giờ, lượng sinh khối ướt sinh ra đạt trên từ 127 đến 131,2 g/L. Sau 144 giờ lên men nấm *T. konilangbra* ĐL3 bắt đầu dừng phát triển, lượng sinh khối sinh ra xu hướng giảm.

Khi tiến hành xác định pH sau khi thu hồi nhận thấy, ở hầu hết tất cả các thời điểm lên men pH môi trường đều giảm so với ban đầu và dao động ở pH 5. Do đó môi trường tối ưu nhất của chủng *T. konilangbra* ĐL3 thường hơi axit.

Ví dụ 7. Đánh giá các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp IAA

Chủng nấm nghiên cứu *Trichoderma konilangbra* ĐL3 được đánh giá khả năng sinh tổng hợp IAA trên một số điều kiện về môi trường, nhiệt độ, pH khác nhau. Sau 5 ngày nuôi cấy kiểm tra hàm lượng IAA được tổng hợp. Kết quả được chỉ ra ở các bảng và các hình dưới.

Kết quả thể hiện trên Hình 7 cho thấy hầu hết các môi trường sử dụng trong thử nghiệm đều có khả năng sinh IAA. Hàm lượng IAA sinh ra cao nhất trên môi trường Hansen đạt 21,13 ppm. Ngoài ra, khi nuôi cấy trên môi trường PDAn hàm lượng IAA sinh ra cũng khá cao đạt 12,47 ppm.

Kết quả thu được trên Hình 8 cho thấy nhiệt độ cũng ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng nấm lựa chọn. Khi nuôi cấy ở các mức nhiệt khác nhau các chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 đều có khả năng sinh IAA, tuy nhiên, nhiệt độ thích hợp cho sự sinh tổng hợp IAA của chủng *Trichoderma konilangbra* ĐL3 là 35°C đạt 22,75 ppm. Như vậy, nhiệt độ tối ưu đối với sự sinh tổng hợp IAA thích hợp nhất đối với chủng *Trichoderma konilangbra* ĐL3 là 35°C.

Kết quả nghiên cứu về pH đến khả năng sinh tổng hợp IAA chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 thể hiện trên Hình 9. Kết quả cho thấy khoảng pH thích hợp cho sự sinh tổng hợp IAA của chủng *Trichoderma konilangbra* ĐL3 là 7 đạt tới 25,9 ppm.

Ảnh hưởng của thời gian đến sự sinh tổng hợp IAA được thể hiện trên Hình 10. Trong đó cho thấy thời gian tối ưu cho lượng IAA cao khi đạt từ 120 đến 168 giờ nuôi cấy, và đạt từ 26,31 đến 23,15 ppm, tương ứng.

Ví dụ 8. Sản xuất chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng

+ Đánh giá khả năng phát triển của nấm trên giá thể mang

Chủng *Trichoderma konilangbra* ĐL3 được nuôi cấy trên giá thể khác nhau bao gồm thóc:ngô và gạo:ngô để tìm ra giá thể tốt nhất cho sản xuất chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng và quan sát khả năng phát triển của hệ sợi theo thời gian. Quá trình phát triển của chủng nấm được mô tả và thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1: Hình thái hệ sợi nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 trên giá thể mang

Thóc : ngô	1:1	Hệ sợi nấm phát triển bình thường, hình thành các các hệ sợi màu trắng bông xốp bám sát giá thể. Sau 7 ngày nuôi cấy, hình thành bào tử dạng bột, có xanh.
	2:1	Hệ sợi nấm phát triển tốt, hình thành các các hệ sợi màu trắng bông xốp bám sát giá thể. Sau 6 ngày nuôi cấy, hình thành bào tử dạng bột, có xanh.
	3:1	Hệ sợi nấm phát triển bình thường, hình thành các các hệ sợi màu trắng bông xốp bám sát giá thể. Sau 7 ngày nuôi cấy, hình thành bào tử dạng bột, có xanh.
	4:1	Hệ sợi nấm phát triển bình thường, hình thành các các hệ sợi màu trắng bông xốp bám sát giá thể. Sau 7 ngày nuôi cấy, hình thành bào tử dạng bột, có xanh.
Gạo : ngô	1:1	Hệ sợi nấm phát triển kém, hình thành các các hệ sợi màu trắng bông xốp bám sát giá thể. Sau 7 ngày nuôi cấy, mới bắt đầu hình thành bào tử dạng bột, có xanh.
	2:1	Hệ sợi nấm phát triển kém, hình thành các các hệ sợi màu trắng bông xốp bám sát giá thể. Sau 7 ngày nuôi cấy, mới bắt đầu hình thành bào tử dạng bột, màu xanh đậm. Sau 10 ngày, bào tử nấm mới hình thành rõ rệt.
	3:1	Hệ sợi nấm phát triển bình thường, hình thành các các hệ sợi màu trắng bông xốp bám sát giá thể. Sau 7 ngày nuôi cấy, hình thành bào tử dạng bột, màu xanh đậm.
	4:1	Hệ sợi nấm phát triển bình thường, hình thành các các hệ sợi màu trắng bông xốp bám sát giá thể. Sau 7 ngày nuôi cấy, hình thành bào tử dạng bột, màu xanh đậm.

Kết quả cho thấy chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 có khả năng sử dụng các nguồn cơ chất thóc, gạo và bột ngô làm nguồn dinh dưỡng để phát triển. Trên các giá thể, chủng *T. konilangbra* ĐL3 phát triển tạo thành các các hệ sợi màu trắng bông xốp bám sát giá thể và hình thành bào tử dạng bột, có xanh. Giá thể khá chặt do có sự đan xen và liên kết của sợi nấm.

+ Đánh giá tỷ lệ phối trộn cơ chất, giá thể thích hợp để sản xuất nấm cộng sinh vùng rễ

Để đánh giá tỷ lệ phối trộn tối ưu, tiến hành nuôi cấy chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 trên các giá thể mang với tỷ lệ phối trộn cơ chất khác nhau nhằm lựa chọn giá thể mang tốt nhất. Kết quả được thể hiện trên Bảng 2 và Hình 11.

Bảng 2. Mật độ chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 trên các giá thể khác nhau

Giá thể	Tỷ lệ phối trộn	Tốc độ phát triển	Mật độ (CFU/g)
Thóc : ngô	1:1	++	$2,53.10^8$
	2:1	+++	$3,67.10^8$

Gạo : ngô	3:1	++	$2,55.10^8$
	4:1	++	$2,50.10^8$
	1:1	+	5.10^7
	2:1	+	$1,6.10^8$
	3:1	++	$1,36.10^7$
	4:1	++	$2,67.10^7$

Ghi chú: (+) phát triển kém, (++) phát triển tốt, (+++) phát triển rất tốt

Trên các giá thể, chủng *T. konilangbra* ĐL3 phát triển tạo thành các hệ sợi màu trắng bông xốp bám sát giá thể và hình thành bào tử dạng bột, có xanh. Giá thể khá chặt do có sự đan xen và liên kết của sợi nấm.

Kết quả trên Bảng 2 và Hình 11 cho thấy tỷ lệ phối trộn cơ chất có ảnh hưởng đến khả năng phát triển cũng như mật nấm trên giá thể của nấm *T. konilangbra* ĐL3. Sau 10 ngày nuôi cấy, hầu hết các giá thể mang đều có mật độ đạt trên $10^7 - 10^8$ CFU/g. Cơ chất thóc và bột ngô cho khả năng tạo mật độ nấm tốt hơn so với các giá thể làm từ gạo và ngô với mật độ nấm đạt trên 10^8 CFU/g. Thóc: ngô với tỷ lệ phối trộn 2:1 được xem là giá thể thích hợp nhất cho lựa chọn tạo chế phẩm, mật độ nấm đạt $3,67 \times 10^8$ CFU/g và tốc độ phát triển của nấm *T. konilangbra* ĐL3 cũng khá nhanh.

+ Đánh giá tỷ lệ giống cấp trong sản xuất chế phẩm nấm cộng sinh

Để đánh giá tỷ lệ cấp giống trong nuôi cấy, tiến hành thử nghiệm với các tỷ lệ bổ sung giống vào giá thể khác nhau. Kết quả nêu trên Bảng 3 và Hình 12.

Bảng 3. Mật độ chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 trên giá thể có tỷ lệ bổ sung giống khác nhau sau 7 ngày

Chủng nấm	Tỷ lệ giống (%)	Tốc độ phát triển	Mật độ
<i>Trichoderma konilangbra</i> ĐL3	1	+++	$2,24.10^8$
	2	+++	$3,17.10^8$
	3	+++	$3,51.10^8$
	4	+++	$2,26.10^8$
	5	+++	$2,22.10^8$

Ghi chú: (+) phát triển kém, (++) phát triển tốt, (+++) phát triển rất tốt

Từ kết quả trong Bảng 3 và Hình 12 cho thấy, nấm *T. konilangbra* ĐL3 phát triển khá tốt trên môi trường giá thể, tạo hệ sợi và bào tử màu xanh, bông xốp và ăn lan tốt.

Mật độ chủng nấm trên các thí nghiệm đạt trên 10^8 CFU/g. Ở tỷ lệ giống từ 2 đến 3% giống thúc đẩy quá sinh trưởng của nấm trên cơ chất mạnh mẽ, khả năng làn sợi nấm tốt và mật độ nấm trên giá thể cao đạt $3,51.10^8$ CFU/g. Với mức sử dụng tỷ lệ giống 1%, cho mật độ nấm trên giá thể khá cao đạt $2,24 \times 10^8$ CFU/g. Có thể thấy, mật độ nấm hình thành trên giá thể có mức dùng giống 1% và 3% không có sự khác biệt nhiều. Tuy nhiên, để phù hợp với yêu cầu sản xuất, tỷ lệ bổ sung giống 1% được xem là mức dùng phù hợp cho nhân nuôi tạo chế phẩm chủng *T. konilangbra* ĐL3.

+ Đánh giá độ ẩm thích hợp để sản xuất chế phẩm nấm cộng sinh vùng rễ

Chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 được thực hiện đánh giá ảnh hưởng của độ ẩm đến khả năng sinh trưởng của chúng thông qua việc thay đổi lượng nước vào cơ chất. Các mức độ ẩm trên cơ chất được nghiên cứu 40%, 50%, 60%, 70% và 80%. Sau 10 ngày bổ sung 1% giống và nuôi ở điều kiện thiếu sáng, các mẫu sẽ được thu hồi, đánh giá khả năng sinh trưởng và mật độ nấm hình thành trên giá thể. Kết quả được thể hiện trên Bảng 4 và Hình 13.

Bảng 4. Mật độ chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 trên giá thể với các độ ẩm khác nhau

Chủng nấm	Độ ẩm (%)	Tốc độ phát triển	Mật độ (CFU/g)
<i>Trichoderma konilangbra</i> ĐL3	40	+++	$4,30.10^8$
	50	+++	$4,86.10^8$
	60	+++	$4,94.10^8$
	70	+++	$4,40.10^8$
	80	++	$1,45.10^8$

Ghi chú: (+) phát triển kém, (++) phát triển tốt, (+++) phát triển rất tốt

Kết quả trên Bảng 4 và Hình 13 cho thấy nấm *T. konilangbra* ĐL3 phát triển trên môi trường giá thể có độ ẩm 40 – 80%, tạo hệ sợi và bào tử màu xanh, bông xốp, ăn lan tốt, tuy nhiên, độ ẩm thích hợp nhất cho sinh trưởng của nấm khoảng 40 – 70%. Ở độ ẩm 80% chủng N3 phát triển chậm hơn so với các mức độ ẩm khác, mật độ nấm đạt $1,45 \times 10^8$ CFU/g. Mật độ nấm *T. konilangbra* ĐL3 cao nhất khi nuôi trên cơ chất có độ ẩm 60%, đạt $4,94 \times 10^8$ CFU/g. Từ kết quả thu được, độ ẩm giá thể phù hợp cho nhân nuôi nấm là 50 – 60 % làm điều kiện thích hợp cho nhân nuôi tạo chế phẩm chủng *T. konilangbra* ĐL3.

+ Đánh giá khả năng phát triển hệ sợi trên giá thể theo thời gian

Để đánh giá khả năng phát triển của nấm trên các bịch giá thể khác nhau, tiến hành đánh giá tốc độ phát triển của chủng nấm trên các bịch giá thể với thời gian khác nhau ở các thời điểm nuôi cấy khác nhau. Kết quả thể hiện trên Bảng 5.

Bảng 5. Mật độ chủng nấm *T. konilangbra* ĐL3 trên các giá thể ở các thời điểm 5, 7, 10 và 14 ngày

Thời gian (ngày)	Tốc độ phát triển	Mật độ
5	++	$5,68.10^7$
7	++	$1,81.10^8$
10	+++	$4,45.10^8$
14	+++	$4,46.10^8$

Ghi chú: (+) phát triển kém, (++) phát triển tốt, (+++) phát triển rất tốt

Chủng nấm *T. konilangbra* ĐL3 phát triển trên cơ chất mang hình thành các hệ sợi nấm có màu trắng sau 5 ngày nuôi cấy, hệ sợi có xu hướng kết chặt tạo thành khối rắn chắc, mật độ nấm trên giá thể đạt $5,68 \times 10^7$ CFU/g. Sau 7 ngày nuôi cấy, hệ sợi nấm ăn lan gần kín cơ túi cơ chất và bắt đầu hình thành bào tử có màu xanh, mật độ nấm đạt $1,81 \times 10^8$ CFU/g. Mật độ nấm khi tiến hành thu mẫu ở 10 ngày, đạt $4,45 \times 10^8$ CFU/g. Ở thời điểm này, nấm *T. konilangbra* ĐL3 trên giá thể đã hình thành nhiều bào tử màu xanh, mịn. Sau 14 ngày nuôi cấy, mật độ nấm đạt $4,46 \times 10^8$ CFU/g. Có thể thấy, thời điểm thích hợp nhất cho nhu nhận chế phẩm nấm *T. konilangbra* ĐL3 là sau 10 - 14 ngày nuôi cấy.

+ Đánh giá khả năng phát triển hệ sợi trên giá thể theo khối lượng bịch nấm

Để ứng dụng sản xuất chế phẩm theo quy mô lớn, việc xác định khối lượng chất mang trên bịch chế phẩm là yêu cầu không thể thiếu. Nó không chỉ giúp giảm diện tích trong quá trình nuôi cấy mà còn tăng hiệu suất thu hồi và đảm bảo được chất lượng chế phẩm. Tiến hành đánh giá khả năng phát triển các chủng nấm tuyển chọn trên giá thể và trong điều kiện thích hợp ở các bịch lớn 0,25; 0,5 kg và 1 kg/ bịch. Quá trình thực hiện nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng trên các bịch, mô tả và kiểm tra mật độ sau 7 ngày nuôi. Kết quả được thể hiện ở Hình 14 và Bảng 6.

Trên nguồn cơ chất thóc ngô, nấm *T. konilangbra* ĐL3 phát triển trên giá thể hình thành hệ sợi màu trắng, bông xốp ăn sâu vào giá thể. Sau 7 ngày hệ sợi nấm chuyển xanh hình thành các bào tử bám trên giá thể.

Chủng nấm *T. konilangbra* ĐL3 có khả năng phát triển trên hầu hết các thử nghiệm, tuy nhiên khả năng lan sợi trên các bịch là không giống nhau. Khi nuôi cấy trên giá thể 0,25 kg/bịch chủng phát triển rất tốt, kết sợi chặt tạo độ rắn chắc cho giá thể mang. Tuy nhiên khi chuyển sang nuôi cấy bịch lớn 0,5 và 1 kg/bịch, khả năng sinh trưởng của chủng bị giảm mạnh, chủng phát triển kém hệ sợi nấm không ăn sâu vào trong giá thể tạo độ lỏng lẻo, thời gian thu hồi lâu (có thể lên đến 20 -25 ngày) trong khi nuôi bịch nhỏ thời gian thu hồi chế phẩm rồi vào khoảng 7 – 14 ngày nuôi cấy. Ngoài ra, khi nuôi cấy trên túi lớn khả năng tập nhiễm cao hơn so với túi 0,25kg. Điều này có thể thấy, khả năng thông thoáng của túi cơ trên bịch lớn kém hơn so với các túi bé, do đó, tốc độ lan sợi của nấm bị giảm nhiều, khả năng ăn lan sâu vào trong cơ chất cũng kém hơn dẫn đến giá thể mang bị lỏng lẻo và không có độ kết bám. Ngoài ra, với tốc độ phát triển chậm trên các bịch cơ chất lớn sẽ là cơ hội cho các loài vi sinh vật tạp nhiễm phát triển đặc biệt là vi khuẩn và một số chủng nấm mốc khác.

Tiến hành đánh giá mật độ của chủng nấm sau 10 ngày nuôi cấy đối với các túi chế phẩm 0,25 kg và 20 ngày đối với các túi chế phẩm 0,5 và 1 kg/ bịch, kết quả được thể hiện ở Bảng 6 nêu trên. Thông qua các kết quả trên nhận thấy, mật độ chủng nấm *T. konilangbra* ĐL3 trên bịch giá thể 0,25 kg cao hơn so với các bịch 0,5 và 1 kg. Mật độ chủng *T. konilangbra* ĐL3 trên túi 0,25 kg đạt $4,8 \times 10^8$ CFU/g, mật độ nấm các bịch 0,5 và 1 kg đạt lần lượt $1,1 \times 10^8$ và $5,2 \times 10^7$ CFU/g.

Bảng 6. Mật độ chủng nấm *T. konilangbra* ĐL3 trên thể tích túi giá thể có thể tích khác nhau

Giá thể (kg)	Tốc độ phát triển	Mật độ (CFU/g)
0,25	+++	$4,8 \times 10^8$
0,5	++	$1,1 \times 10^8$
1	+	$5,2 \times 10^7$

Ghi chú: (+) phát triển kém, (++) phát triển tốt, (+++) phát triển rất tốt

Thông qua các kết quả thu được nhóm nghiên cứu nhận thấy, các bịch có khối lượng 0,25 kg là là giá thể mang tốt nhất cho việc nhân nuôi chế phẩm chủng nấm *T. konilangbra* ĐL3.

+ Sản xuất thu sản phẩm hoàn thiện

Tiến hành tan đông chủng giống nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 có số lưu giữ ĐL03 tại Trường Đại học Kinh tế-Kỹ thuật công nghiệp, 456 Minh Khai, Hai Bà Trưng,

Hà Nội. Tiếp đó cấy vào môi trường PDA thạch rắn vô trùng, nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 7 ngày thu chủng nấm *Trichoderma konilangbra* DL3 hoạt hóa.

Cấy chủng giống gốc *Trichoderma konilangbra* DL3 đã hoạt hóa vào môi trường thạch rắn. Tiến hành nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ 30°C trong 10 ngày. Bào tử được thu nhận và phân tán trong nước muối sinh lý đến mật độ khoảng 10^8 bào tử/ml thu được hỗn hợp bào tử nấm.

Cấy hỗn hợp bào tử nấm theo tỷ lệ 2% khối lượng vào bịch môi trường giá thể rắn. Bịch giá thể này được chuẩn bị trước bao gồm hỗn hợp thóc và bột ngô đã được hấp chín và để nguội, trong đó tỷ lệ thóc/bột ngô là 2/1 (theo khối lượng). Sau khi cấy, tiến hành chuyển bịch môi trường này vào nuôi cấy trong điều kiện tối, nhiệt độ từ 28 đến 35°C. Duy trì độ ẩm giá thể khoảng 60% trong 7 ngày để nấm phát triển hệ sợi và tạo bào tử. Sau khi hệ sợi phát triển và sinh bào tử, tiến hành sấy khô ở nhiệt độ khoảng 45°C đến độ ẩm khoảng 15%. Hỗn hợp được nghiền nhỏ, thu được chế phẩm nấm cộng sinh rễ định lượng dạng bột.

Hỗn hợp được kiểm tra ngẫu nhiên bằng cách pha loãng kiểm tra mật độ và khả năng phân hủy phospho khó tan và khả năng sinh tổng hợp theo phương pháp nêu trên. Kết quả cho thấy bào tử của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* DL3 đạt khoảng 3×10^8 CFU/g và có khả năng phân giải phospho khó tan lên tới 390,79 ppm và tổng hợp IAA lên tới 33,34 ppm.

Ví dụ 9. Đánh giá khả năng phân hủy phospho và sinh tổng hợp IAA của chế phẩm

Đối với thực vật, photpho và chất điều hòa sinh trưởng IAA là những yếu tố quan trọng tham gia vào nhiều chu trình trao đổi chất thiết yếu và thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển. Tuy nhiên, trong đất trồng photpho thường tồn tại ở dạng khó tan do đó, chúng rất khó hấp thụ nếu không có tác động bởi các yếu tố bên ngoài. Với xu hướng phát triển cây được liệu hiện nay, việc áp dụng các loài nấm phân hủy photpho và sinh tổng hợp IAA là rất cần thiết.

Trong báo cáo này, ngoài việc đánh giá khả năng sinh trưởng, nhóm nghiên cứu còn tiến hành đánh giá khả năng phân hủy photpho và sinh tổng hợp IAA của các chủng nấm trên túi cơ chất. Kết quả được thể hiện ở Bảng 7.

Bảng 7. Khả năng phân hủy photpho và sinh tổng hợp IAA của chủng nấm *T. konilangbra* DL3 trên túi chế phẩm

Giá thể (kg)	Phân giải photpho	IAA (ppm)
--------------	-------------------	-----------

0,25	+	18,92
0,5	+	6,97
1	+	7,03

Ghi chú: (+) có khả năng phân hủy photpho, (-) không có khả năng phân hủy photpho

Thông qua các kết quả thu nhận được có thể thấy, chủng *T. konilangbra* ĐL3 có khả năng phân hủy photpho trên hầu hết các bịch giá thể với khối lượng khác nhau. Chủng *T. konilangbra* ĐL3 có khả năng sinh IAA khi nuôi cấy trên các bịch giá thể có khối lượng khác nhau. Trên túi giá thể 0,25 kg hàm lượng IAA của chủng *T. konilangbra* ĐL3 sinh ra cao nhất đạt 18,92 mg/ml. Ở các bịch chế phẩm 0,5 và 1kg hàm lượng IAA sinh ra thấp hơn nhiều so với túi 0,25 kg. Điều này có thể thấy, tốc độ sinh trưởng có ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp IAA. Khả năng sinh trưởng càng nhanh thì hàm lượng sinh tổng hợp IAA của các chủng nấm diễn ra càng mạnh mẽ.

Với những kết quả thu nhận được cho thấy bịch có khối lượng 0,25 kg làm giá thể tốt nhất cho các chủng nấm.

Ví dụ 10. Đánh giá khả năng cộng sinh của nấm trên rễ đinh lăng

Chế phẩm thu được từ Ví dụ 8 được thử nghiệm trên vườn trồng cây đinh lăng. Đất xung quanh vùng rễ cây đinh lăng từ các công thức đối chứng không sử dụng chế phẩm nấm rễ, CT1 sử dụng nấm rễ thương mại chứa các chủng *Trichoderma* sp. và *Bacillus subtilis*, CT2 sử dụng thu được từ Ví dụ 8 chứa *Trichoderma konilangbra* ĐL3. Đinh lăng sau khi trồng vào bầu 5 ngày sẽ được lấy mẫu đất quanh rễ để theo dõi thời gian xuất hiện trở lại của các chủng nấm rễ.

Bảng 8 Thời gian xuất hiện trở lại của các chủng nấm rễ tại vùng đất từ rễ trồng cây đinh lăng

Thời gian xuất hiện trở lại của các chủng nấm (ngày)	Đối chứng	CT1	CT2
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma konilangbra</i> ĐL3
5	-	-	+
10	-	+	+
15	+	+	+

Chú thích: + ngày xuất hiện trở lại của chủng nấm
- chủng nấm chưa xuất hiện

Từ kết quả nêu trong Bảng 8 cho thấy rằng, chủng nấm rễ thuộc nghiên cứu ở công thức ĐC là công thức không sử dụng chế phẩm nấm thì đến ngày thứ 15 sau khi trồng

cây giống vào bầu chủng nấm xuất hiện tại vùng đất quanh rễ cây. CT1 là công thức sử dụng chế phẩm nấm thương mại chứa các chủng *Trichoderma sp.* và *Trichoderma konilangbra* thì 10 ngày sau khi trồng cây, 02 chủng nấm trên đã xuất hiện tại vùng đất quanh rễ cây. Cuối cùng là CT2 sử dụng chế phẩm theo giải pháp hữu ích thì sau 5 ngày gieo trồng đầu tiên thì tại vùng đất xung quanh rễ cây đã xuất hiện chủng *Trichoderma konilangbra* ĐL3 có khả năng sinh tổng hợp IAA và phân giải phospho khó tan cộng sinh trên rễ đỉnh lăng. Sau 10 ngày trồng cây thì 2 chủng nấm bắt đầu xuất hiện tại vùng đất quanh rễ cây.

Như vậy, có thể thấy rằng việc sử dụng chế phẩm nấm rễ sẽ tăng khả năng xuất hiện trở lại sớm hơn của các chủng nấm vùng rễ do mật độ các chủng nấm này trong đất được bổ sung qua chế phẩm cao hơn do vậy thời gian hoạt hóa xuất hiện lại trong vùng đất quanh rễ cây cũng nhanh hơn so với công thức đối chứng.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Bằng cách phân lập tuyển chọn được chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 có khả năng sinh tổng hợp IAA và phân giải phospho khó tan trên rễ cây đỉnh lăng, giải pháp hữu ích cho thấy hiệu quả trong việc phát triển chế phẩm nấm cho phép cộng sinh trên cây đỉnh lăng giúp cân bằng hệ vi sinh trên thực địa tăng được hiệu quả sử dụng phospho và tăng khả năng sinh trưởng của cây trồng.

Chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 phân lập được theo giải pháp hữu ích có tiềm năng phát triển thành chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đỉnh lăng có khả năng sinh tổng hợp IAA kích thích sự phát triển của cây trồng, đồng thời có khả năng hòa tan phospho khó tan cho cây trồng hấp phụ mở ra hướng phát triển bền vững, an toàn hiệu quả trong nông nghiệp, giúp góp phần phát triển ngành nông nghiệp giảm phụ thuộc vào phân bón hóa học.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 được phân lập, trong đó chủng nấm này có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1 và được lưu giữ đông sâu tại Trường Đại học Kinh tế-Kỹ thuật công nghiệp, 456 Minh Khai, Hai Bà Trưng, Hà Nội với số lưu giữ ĐL03, khác biệt ở chỗ chủng nấm này:

- có khả năng cộng sinh rễ cây đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L.);
- có hoạt tính enzym phosphatase với đường kính vòng phân giải trên môi trường $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ lên tới 12 mm khi kiểm tra bằng phương pháp đục lỗ thạch;
- có khả năng phân giải phospho khó tan (P_2O_5) đạt tới nồng độ tích lũy 390,79 ppm sau từ 7 đến 10 ngày nuôi cấy; và
- có khả năng tổng hợp IAA khi nuôi cấy ở 30°C trong môi trường PDA lỏng bổ sung tryptophan nồng độ 2 g/l lên tới 33,34 ppm.

2. Quy trình sản xuất chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) hoạt hóa chủng giống gốc bằng cách tan đông chủng giống nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 có số lưu giữ ĐL03 tại Trường Đại học Kinh tế-Kỹ thuật công nghiệp, 456 Minh Khai, Hai Bà Trưng, Hà Nội, tiếp đó cấy vào môi trường PDA thạch vô trùng, nuôi cấy ở nhiệt độ từ 25 đến 30°C trong 7 ngày thu được chủng giống gốc nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 hoạt hóa;

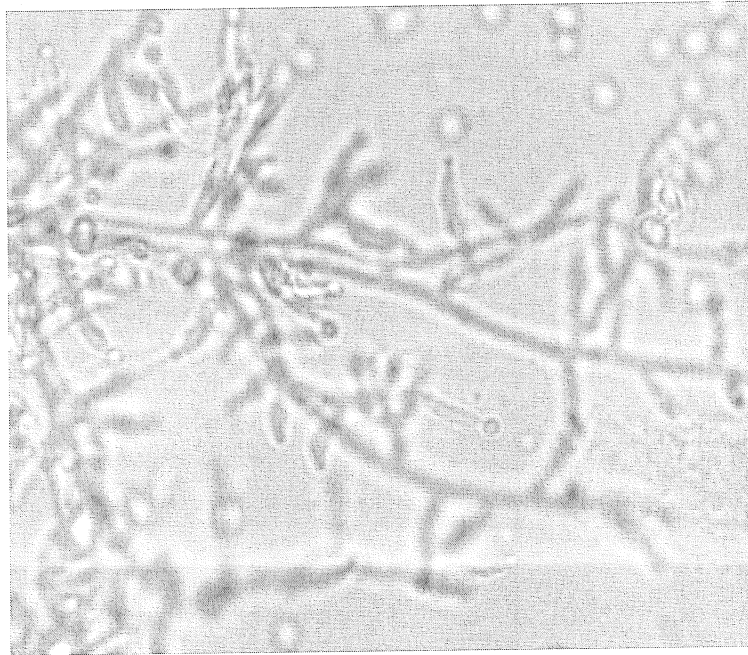
b) thu hỗn hợp bào tử nấm bằng cách cấy chủng giống gốc *Trichoderma konilangbra* ĐL3 đã hoạt hóa vào môi trường thạch rắn, nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ từ 25 đến 30°C sau từ 7 đến 10 ngày, bào tử được thu nhận và phân tán trong nước muối sinh lý đến mật độ khoảng 10^8 bào tử/ml thu được hỗn hợp bào tử nấm; và

c) thu chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng bằng cách cấy hỗn hợp bào tử nấm theo tỷ lệ từ 2 đến 5% khối lượng vào bịch môi trường giá thể rắn bao gồm hỗn hợp thóc và bột ngô đã được hấp chín và để nguội với tỷ lệ thóc/bột ngô là 2/1 (theo khối lượng), sau đó chuyển bịch môi trường này vào nuôi cấy trong điều kiện tối, nhiệt độ từ 28 đến 35°C, độ ẩm giá thể duy trì từ 50 đến 60% trong từ 7 đến 14 ngày để nấm phát triển hệ sợi và tạo bào tử, sau khi sấy khô ở nhiệt độ khoảng 45°C đến độ ẩm khoảng 15%, nghiền nhỏ, thu được chế phẩm nấm cộng sinh rễ đinh lăng dạng bột.

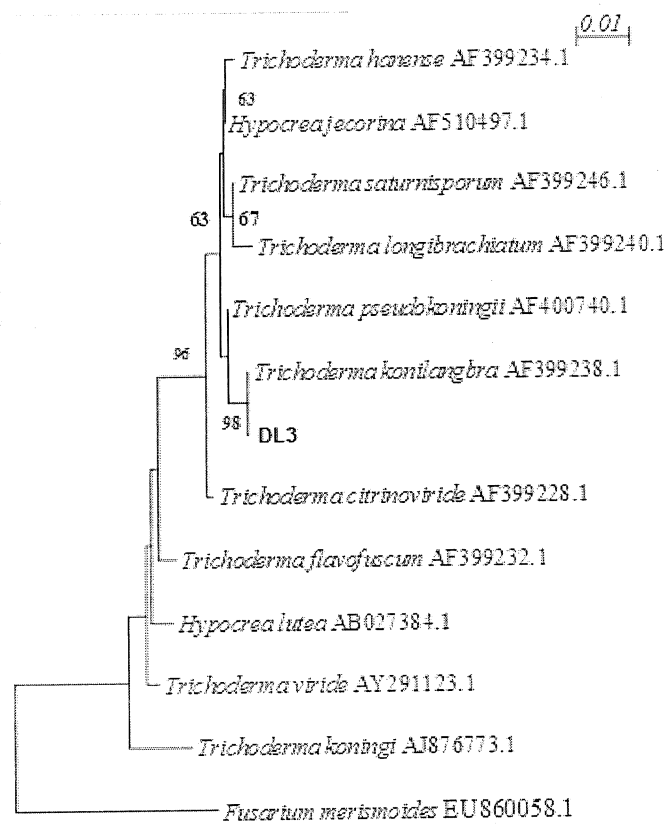
3. Chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng thu được từ quy trình theo điểm 2, trong đó chế phẩm này ở dạng bột độ ẩm khoảng 15% bao gồm giá thể thóc/bột ngô tỷ lệ 2/1

(theo khối lượng) chứa bào tử của chủng nấm *Trichoderma konilangbra* ĐL3 đạt ít nhất 10^8 CFU/g và có khả năng phát triển cộng sinh với rễ cây đinh lăng để phân giải phospho khó tan lên tới 390,79 ppm và tổng hợp IAA lên tới 33,34 ppm.

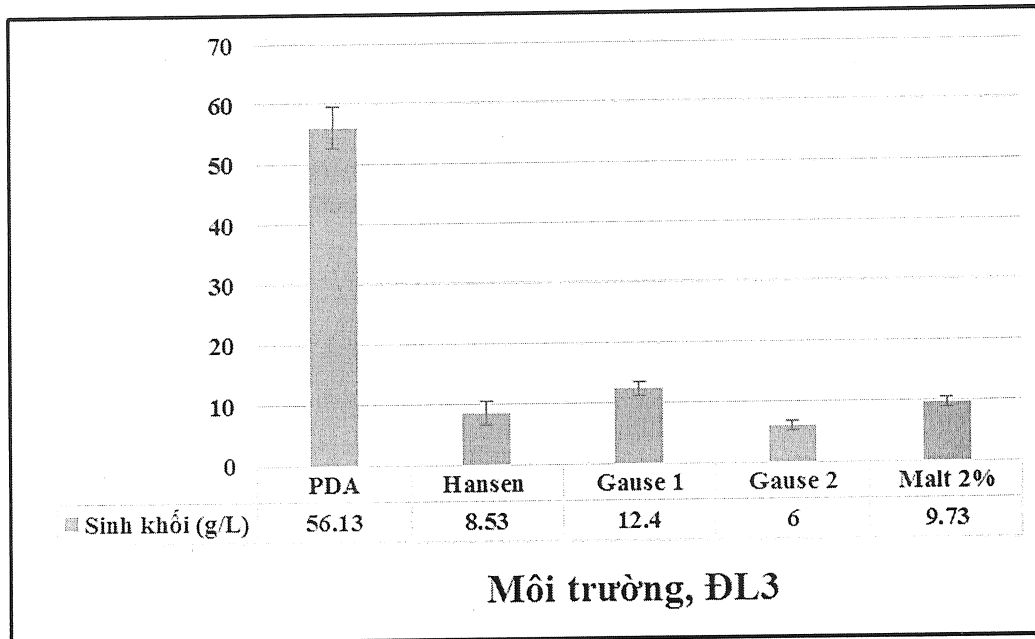
HÌNH 1



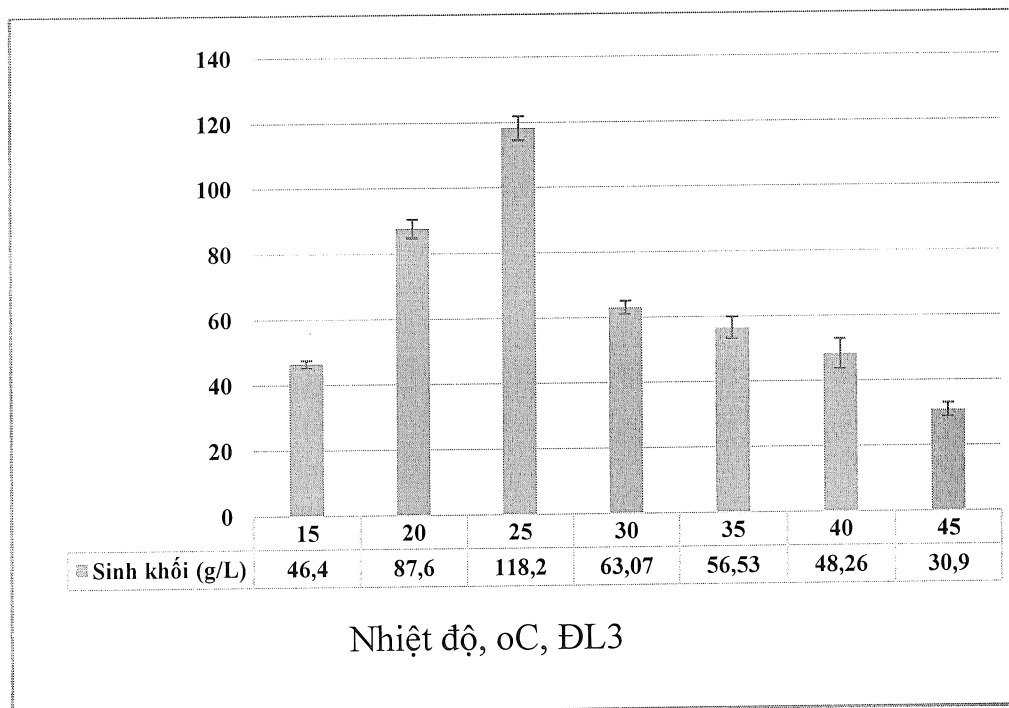
HÌNH 2



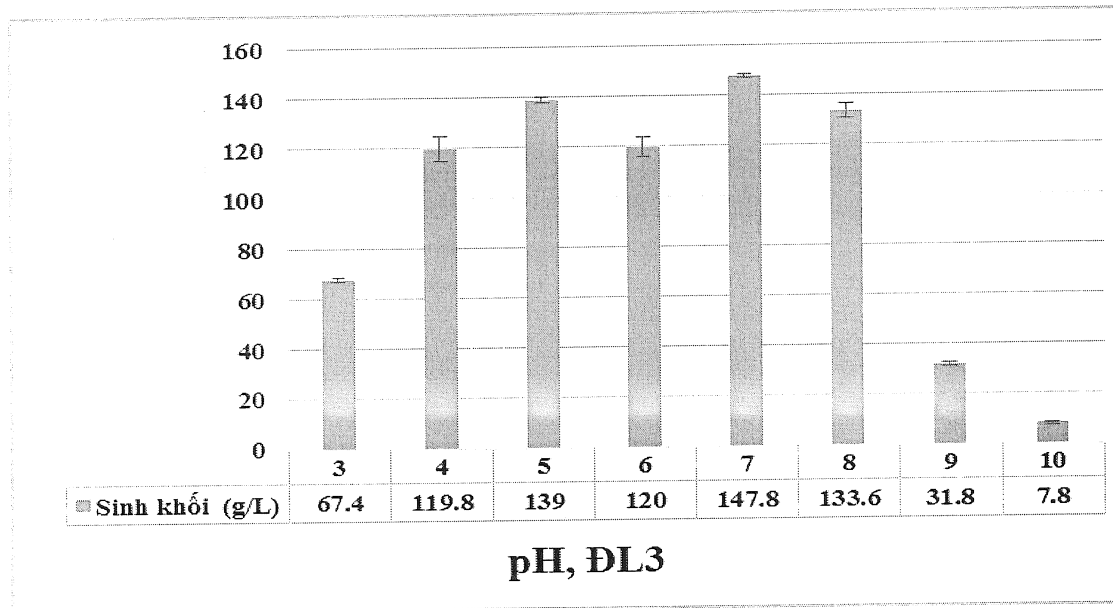
HÌNH 3



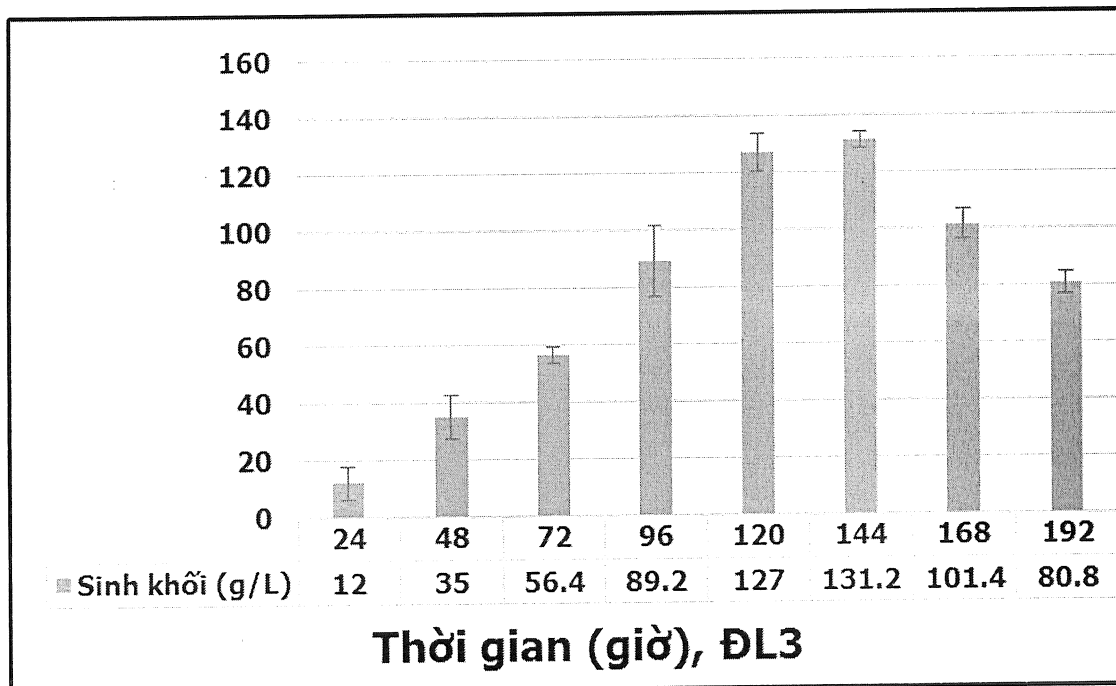
HÌNH 4



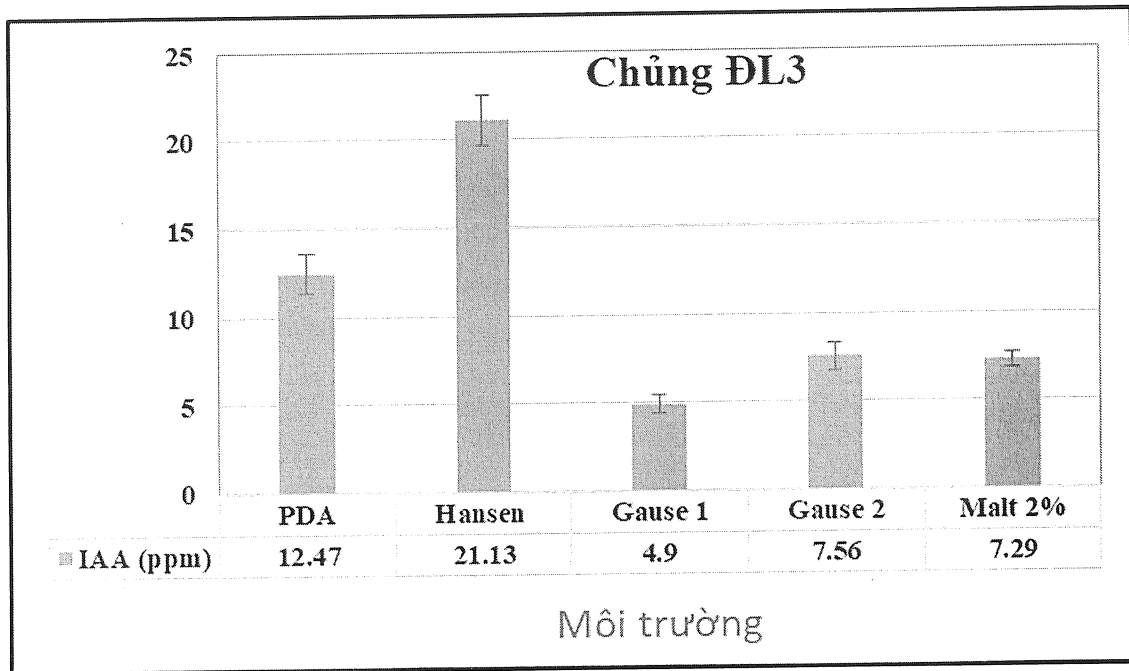
HÌNH 5



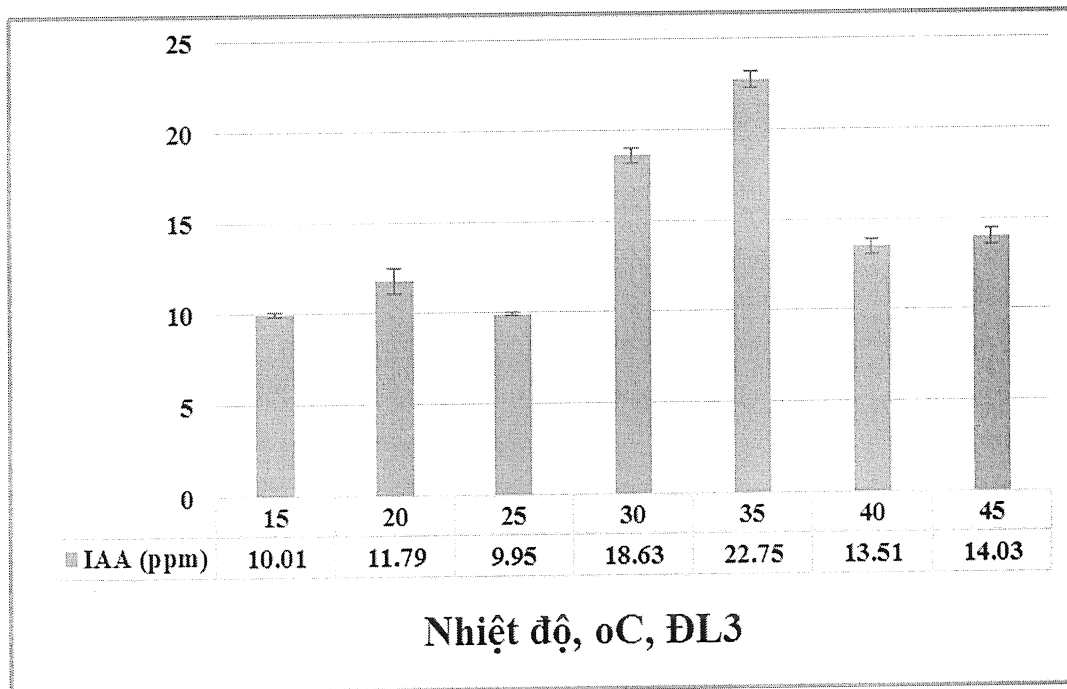
HÌNH 6



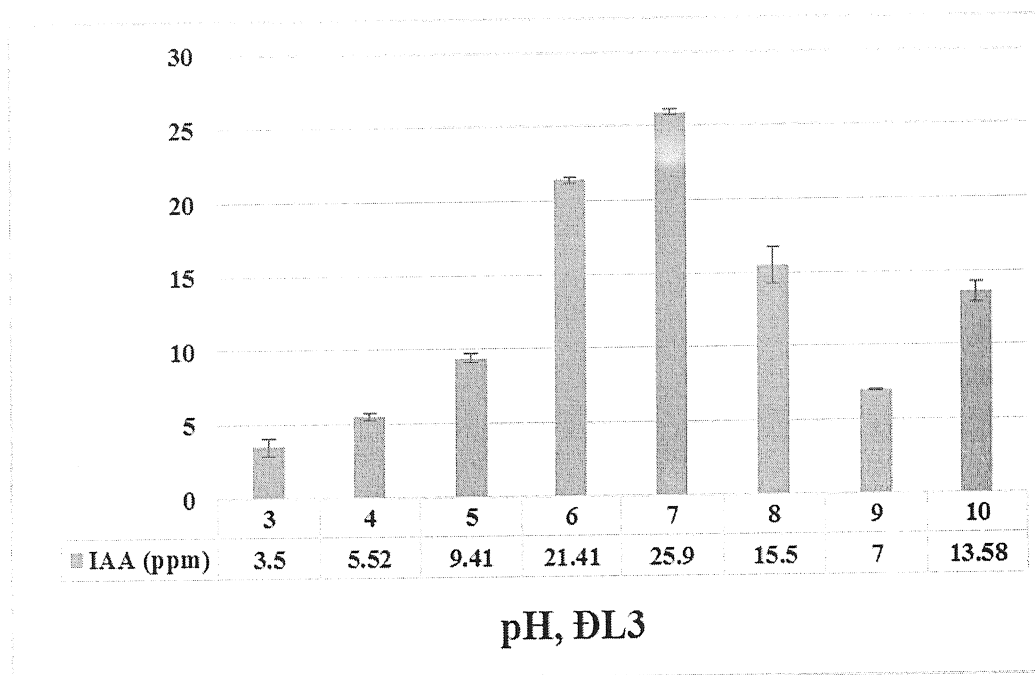
HÌNH 7



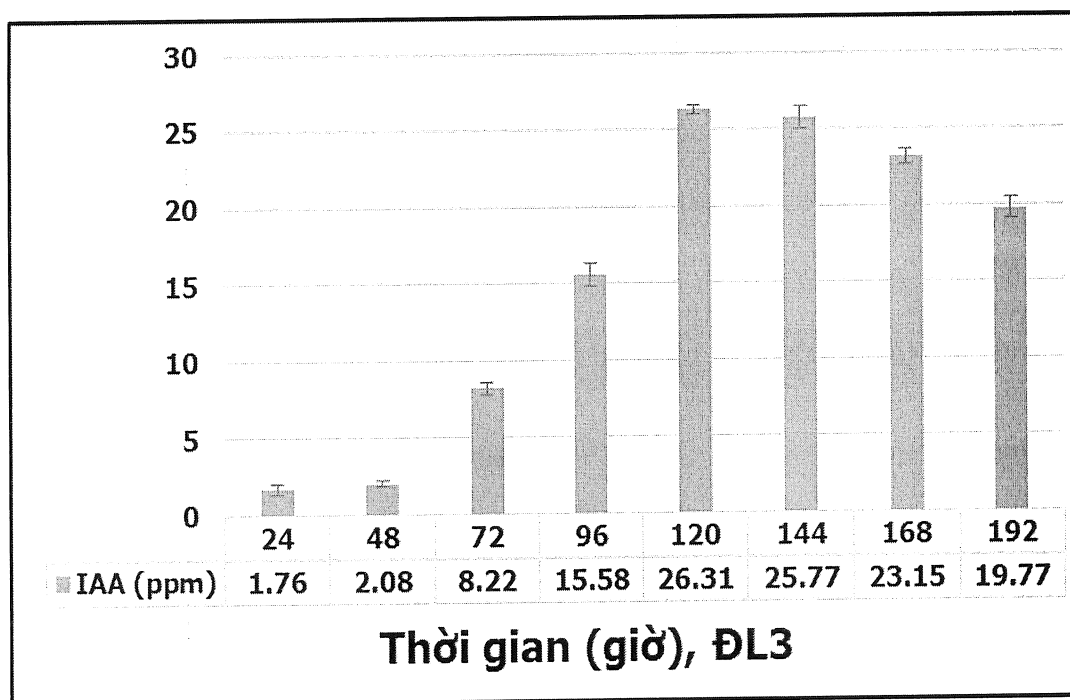
HÌNH 8



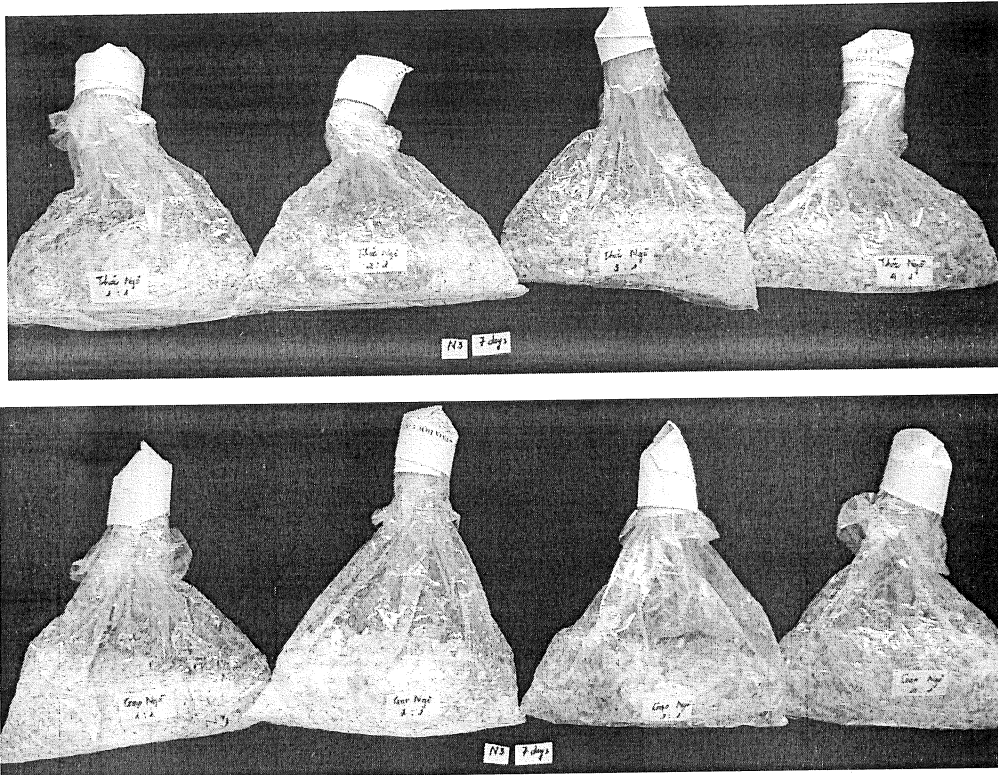
HÌNH 9



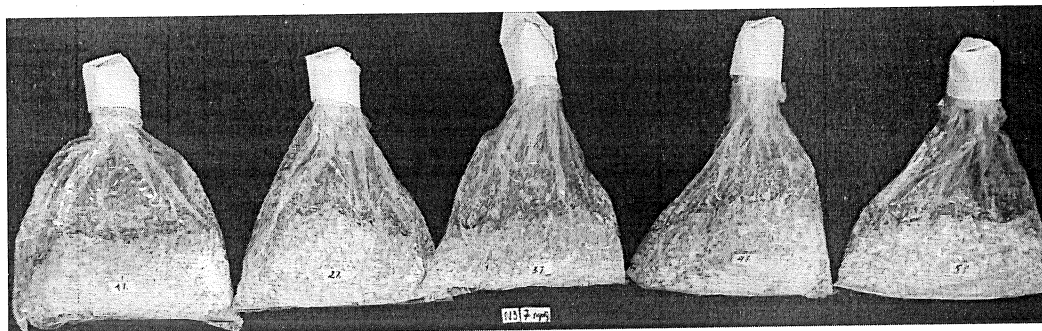
HÌNH 10



HÌNH 11



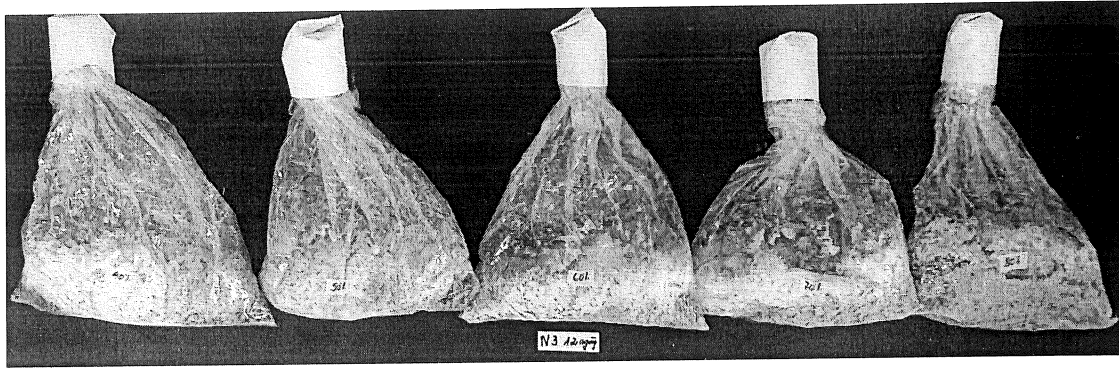
HÌNH 12



3709

7/7

HÌNH 13



HÌNH 14



(A)

(B)

(C)

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Trường Đại học Kinh tế-Kỹ thuật công nghiệp

<120> CHỨNG NẤM TRICHODERMA KONILANGBRA ĐL3 ĐƯỢC PHÂN LẬP, QUY TRÌNH SẢN XUẤT VÀ CHẾ PHẨM NẤM CỘNG SINH RỄ CÂY ĐÌNH LĂNG THU ĐƯỢC TỪ QUY TRÌNH NÀY

<130>

<160> 3

<170>

<210> 1

<211> 1397

<212> ADN

<213> Trichoderma konilangbra ĐL3

<220>

<223> 16S

<220>

<400> 1

CACAGGGATT	GCCCCAGTAC	GGCGTAGAGA	AGCGGCAACA	GCTCAAATTT	GAAATCCGGC	60
CCCTCGGGTC	CGAGTTGTAA	TTTGTAGAGG	ATGCTTTTGG	CAAGGCGCCG	CCCAGATTCC	120
CTGGAACGGG	ACGCCACAGA	GGGTGAGAGC	CCCGTCTGGC	TGGCCGCCGA	GCCTCTGTAA	180
AGCTCCTTCG	ACGAGTCGAG	TAGTTTGGGA	ATGCTGCTCA	AAATGGGAGG	TATATGTCTT	240
CTAAAGCTAA	ATATTGGCCA	GAGACCGATA	GCGCACAAGT	AGAGTGATCG	AAAGATGAAA	300
AGCACCTTGA	AAAGAGGGTT	AAATAGTACG	TGAAATTGTT	GAAAGGGAAG	CGCTTGTGAC	360
CAGACTTGGG	CGCGGCGGAT	CATCCGGGGT	TCTCCCCGGT	GCACTTCGCC	GCGTCCAGGC	420
CAGCATCAGT	TCGTCGCGGG	GGAAAAAGGC	TTCGGAACG	TGGCTCCCCT	GGGAGTGTTA	480
TAGCCCGTTG	CACAATACCC	TGCGGTGGAC	TGAGGACCGC	GCATCTGCAA	GGATGCTGGC	540
GTAATGGTCA	CCAGCGACCC	GTCTGGAAAA	CACGGACCA			579

<210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220>

<223> Nhân tạo

<220>

<400> 2

TCCGTAGGTGAACCTGCGG

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220>

<223> Nhân tạo

<220>

<400> 3

TCCTCCGCTTATTGATATGC