

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG NẤM *Pyricularia oryzae* GÂY BỆNH ĐẠO ÔN Ở LÚA

LÊ NHƯ KIỀU, LÊ THỊ THU HOÀI, LÃ TUẤN ANH, NGUYỄN THỊ KIM THOÀ, LÃ TUẤN NGHĨA

1. MỞ ĐẦU

Đạo ôn (rice blast disease) hay còn gọi là bệnh cháy lá lúa do nấm *Pyricularia oryzae* gây ra đang là vấn nạn lớn cho các quốc gia trồng lúa trên thế giới. Chúng thường xuất hiện ở các quốc gia có khí hậu thời tiết nóng ẩm và có thể tấn công vào tất cả các phần trên cây lúa: lá, đốt thân, cổ gié, nhánh gié, hạt [6, 9]. Ở Việt Nam, bệnh xuất hiện cả 2 vụ lúa đông xuân, hè thu và xuất hiện ở hầu khắp các tỉnh thành. Ngoài ra, nấm *P.oryzae* cũng tấn công trên một số loài cỏ dại và bào tử có thể phát tán trong không khí từ nơi này đến nơi khác, nên nguồn bệnh hầu như lúc nào cũng tiềm ẩn trong tự nhiên và có thể xâm nhiễm cây trồng bất kể khi nào gặp điều kiện thuận lợi [2]. Hiện nay, biện pháp phòng trừ bệnh đạo ôn đang được sử dụng phổ biến là dùng các loại thuốc hóa học. Tuy nhiên thuốc hóa học cũng là tác nhân gây ô nhiễm môi trường [7]. Do đó, việc hạn chế sử dụng hóa chất đang là một vấn đề cấp bách và đã được nhiều nhà khoa học quan tâm [4, 5]. Đã có nhiều nghiên cứu cải tiến giống lúa mới có tính kháng bệnh cao được đưa vào sản xuất, nhưng hầu như tính kháng của các giống lúa này ít khi có hiệu quả kéo dài hơn 3 năm, vì nấm dễ phát sinh nòi mới phá vỡ tính kháng [1]. Vì vậy, hạn chế sự phát tán và gây bệnh của nấm *P.oryzae* dựa vào khả năng đối kháng của các vi sinh vật đang là một lựa chọn của các nhà nghiên cứu, nhằm đưa ra một phương pháp tối ưu để phòng trừ bệnh đạo ôn hại lúa bằng các chế phẩm vi sinh vật. Để bổ sung thêm và làm giàu nguồn vi sinh vật có khả năng đối kháng với nấm gây bệnh đạo ôn hại lúa, chúng tôi đã tiến hành phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng nấm bệnh *P.oryzae* cao ở quy mô phòng thí nghiệm, để từ đó có thể nghiên cứu và đưa ra quy trình sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh đạo ôn ở lúa có hiệu quả cao nhất.

Từ khóa. *Pyricularia oryzae*; vi khuẩn đối kháng, bệnh đạo ôn ở lúa.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Các mẫu lúa bị nhiễm bệnh được thu ở các tỉnh khu vực miền Bắc và miền Trung.
- Các mẫu đất, rau.... để tuyển chọn vi khuẩn đối kháng được thu thập ở nhiều địa phương khác nhau.
- Các thí nghiệm được tiến hành tại Bộ môn Vi sinh vật – Viện Thổ nhưỡng Nông hóa.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập nấm *P.oryzae*

- Chọn mẫu lá lúa có vết bệnh mới và rửa sạch dưới vòi nước máy.

- Cắt vết bệnh thành những mẫu nhỏ tại điểm tiếp giáp giữa phần mô bệnh và mô khỏe.
- Khử trùng bề mặt vết bệnh bằng dung dịch natri hypochlorite 10% khoảng 1 – 3 phút.
- Lấy mẫu ra khỏi dung dịch khử trùng, rửa sạch lại bằng nước cất, sau đó làm khô mẫu bằng cách đặt mẫu lên giấy lọc đã khử trùng. Dùng panh chuyên vết bệnh lên môi trường PDA (potato 200 g, D-glucoza 200 g, agar 20 g, nước cất 1.000 ml).
- Mẫu bệnh được ủ ở nhiệt độ 26 – 28°C trong 24 giờ. Theo dõi sự phát triển của sợi nấm trên môi trường và tiến hành cấy tách để làm tinh sạch sợi nấm.
- Kiểm tra hình thái sợi và bào tử nấm.

2.2.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn đối kháng

Nghiền nhỏ 10 g đất, sau đó cho vào bình tam giác loại 250 ml chứa sẵn 90 ml nước vô trùng. Lắc trong 30 phút, để lắng tự nhiên, lấy phần dịch trong để sử dụng. Mẫu thu từ các cây cà chua, hành, ớt được nghiền nhỏ trong các cối sứ có chứa sẵn 1ml nước vô trùng, bỏ cặn thu phần dịch trong để sử dụng. Vi khuẩn đối kháng được phân lập từ phần dịch trong thu được theo phương pháp của Geels and Schippers [3].

2.2.3. Phương pháp thử tính đối kháng

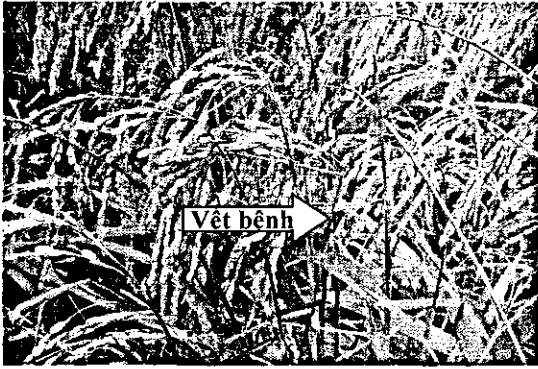
- Dùng que cấy đầu nhọn cắt ở phía đỉnh sinh trưởng của sợi nấm *P.oryzae* đã được nuôi cấy trên môi trường PDA với diện tích khoảng 4-5 mm², rồi cấy chuyên sang điểm giữa của một đĩa môi trường PDA khác.
- Dùng que cấy đầu tròn cấy điểm 2 chủng vi khuẩn cần nghiên cứu cách mép ngoài của đĩa khoảng 1,5 cm (2 chủng vi khuẩn được cấy nằm đối diện nhau qua tâm đĩa trên cùng đường kính).
- Ủ ở nhiệt độ 25 – 28°C, quan sát khả năng đối kháng của vi khuẩn được thể hiện qua hiện tượng có hay không có vòng ức chế.
- Đo chiều rộng của vòng ức chế, dựa vào kích thước của vòng ức chế để đánh giá hiệu lực đối kháng của chúng.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

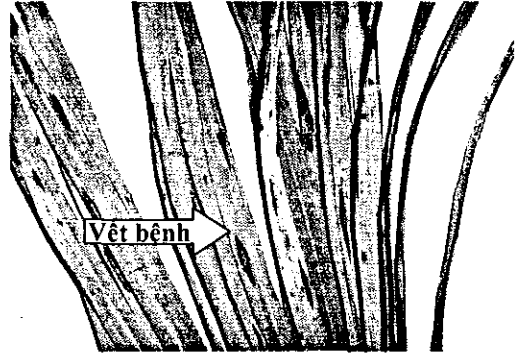
3.1. Kết quả phân lập nấm *P.oryzae*

Qua ảnh 1 và 2 thấy rằng nấm *P.oryzae* gây ra các vết bệnh trên lá lúa có hình ôvan, trắng ở tâm, màu nâu ở viền ngoài, vết bệnh ở cổ bông thể hiện màu nâu nhạt, cổ bông thắt nhỏ lại do phần mô bị hoại tử và mất nước. Khi bị bệnh lá lúa cũng như cổ bông bị khô, mất khả năng dẫn nước và thực hiện chức năng của mình, làm cho cây lúa bị chết dần, hoặc bông lúa bị hỏng, hạt lúa lép.

Các mẫu lúa bệnh được thu ở các tỉnh: Bắc Ninh, Bắc Giang, Hưng Yên, Hải Phòng, Hà Nội, Hà Nam, Thái Bình, Nghệ An, Hà Tĩnh và Phú Yên và sử dụng môi trường PDA để nuôi cấy mẫu và phân lập nấm. Kết quả đã thu được 60 mẫu nấm (isolates) gây bệnh bao gồm từ I₁ đến I₆₀ từ nhiều giống lúa khác nhau. Các isolate này được bảo quản trong ống nghiệm thạch nghiêng và trong cát khử trùng để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo [8].



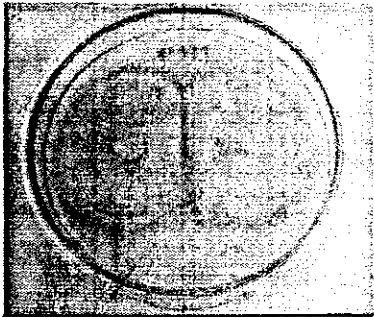
Ảnh 1. Ruộng lúa bị bệnh đạo ôn cổ bông



Ảnh 2. Lá lúa bị nhiễm bệnh đạo ôn

Đường kính khuẩn lạc của các isolate nấm *P.oryzae* khi nuôi cấy trên môi trường PDA sau 7 ngày ở điều kiện nhiệt độ 24 – 28°C có thể đạt từ 3,5 – 4,0 cm. Hệ sợi nấm mảnh, tỏa rộng, khuẩn lạc có màu xám ở vùng trung tâm, rìa có màu đậm hơn, mặt dưới đen (ảnh 3); hoặc màu xám đen (ảnh 6). Bào tử có hình quả lê, phình to ở phía gốc và nhỏ dần về phía ngọn với 2 vách ngăn rõ rệt và có màu trong suốt.

Qua theo dõi dưới kính hiển vi chúng tôi nhận thấy ở các vùng sinh thái khác nhau và ở điều kiện nhiệt độ khác nhau thì hình thái khuẩn lạc cũng như bào tử nấm cũng có hình thái và kích thước khác nhau, điều này thể hiện rất rõ trên ảnh 3, 4, 5 và 6. Ảnh 4 cho thấy bào tử có xu hướng kéo dài như hình củ cà rốt, thon ở cuối. Ảnh 5 các bào tử có dạng hình chùy rõ rệt hơn.



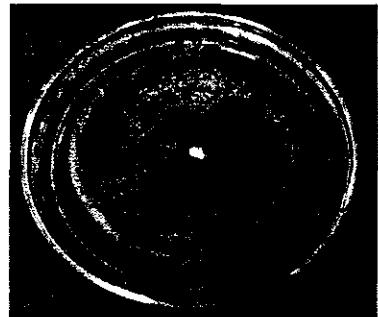
Ảnh 3. Khuẩn lạc nấm đạo ôn ở tỉnh Thái Bình



Ảnh 4. Bào tử nấm đạo ôn ở tỉnh Thái Bình



Ảnh 5. Bào tử nấm đạo ôn ở tỉnh Hà Tây



Ảnh 6. Khuẩn lạc nấm đạo ôn ở tỉnh Hưng Yên, Nghệ An

3.2. Kết quả phân lập và đánh giá tính đối kháng nấm *P.oryzae* của vi khuẩn

Từ các mẫu đất và cây ở nhiều vùng sinh thái khác nhau đã phân lập và tuyển chọn được 11 chủng vi khuẩn (RH1; RH2; RH3; RH5; RH6; RH7; RH8; RH9; RH10; RH11; RH13) có khả năng sinh trưởng tốt trên môi trường PDA (môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng của nấm) và có khả năng đối kháng với một số loài vi khuẩn.

Các chủng vi khuẩn này đã được đánh giá tính đối kháng với đại diện các chủng nấm *P.oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa được phân lập từ các tỉnh Thái Bình (TB), Nghệ An (NA), Phú Yên (PY) và Hải Phòng (HP), kết quả được trình bày trên bảng 1:

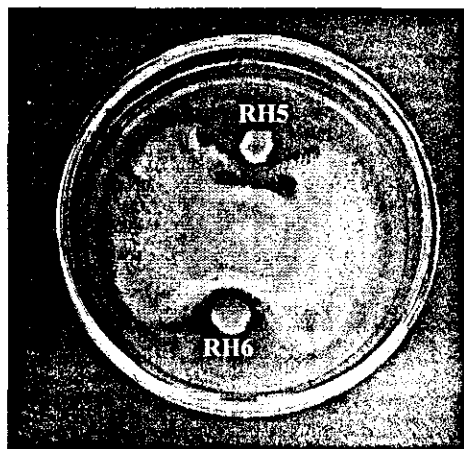
Bảng 1. Đánh giá tính đối kháng nấm *P.oryzae* của 11 chủng vi khuẩn

TT	Chủng vi khuẩn	Hoạt lực đối kháng với nấm <i>P.oryzae</i>											
		Lần 1				Lần 2				Lần 3			
		NA	HP	TB	PY	NA	HP	TB	PY	NA	HP	TB	PY
1	RH1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2	RH2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	RH3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	RH5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	RH6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	RH7	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
7	RH8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	RH9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	RH10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	RH11	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	RH13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

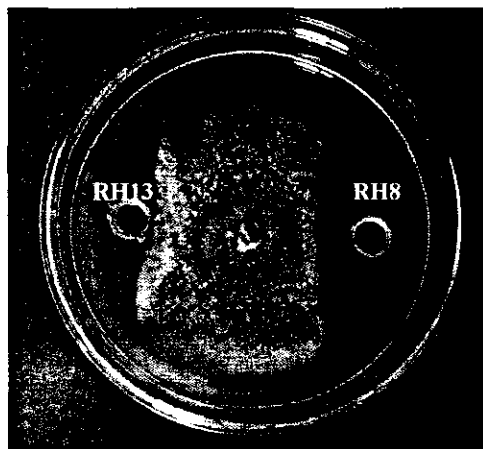
Ghi chú: + ức chế; - không ức chế;

Từ bảng 1 cho thấy, trong 11 chủng vi khuẩn được kiểm tra tính đối kháng thì có các chủng RH5, RH6, RH8 và RH13 có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *P.oryzae* đại diện ở 4 địa phương và ức chế cả 4 loại nấm được phân lập ở 4 tỉnh. Các chủng vi khuẩn này đã được bảo quản trên môi trường thạch nghiêng ở nhiệt độ 5⁰C. Đã tiến hành đánh giá lại hoạt tính sinh học của chúng sau 1 tháng (lần 2) và 2 tháng (lần 3) bảo quản, kết quả cho thấy hoạt lực đối kháng nấm đạo ôn của chúng rất ổn định, không có dấu hiệu mất hoạt tính đối kháng (bảng 2). Rõ ràng đây là các chủng vi khuẩn đối kháng rất có tiềm năng trong việc sản xuất chế phẩm sinh học để sử dụng trong phòng trừ bệnh đạo ôn ở lúa.

Trong khi đó, các chủng RH1 và RH11 cũng có ức chế được sự phát triển của nấm *P.oryzae*, tuy nhiên hoạt tính không ổn định sau 2 tháng bảo quản, thường không còn khả năng đối kháng.



Ảnh 7. Hoạt lực đối kháng của chủng RH5 và RH6 với nấm *P. oryzae*



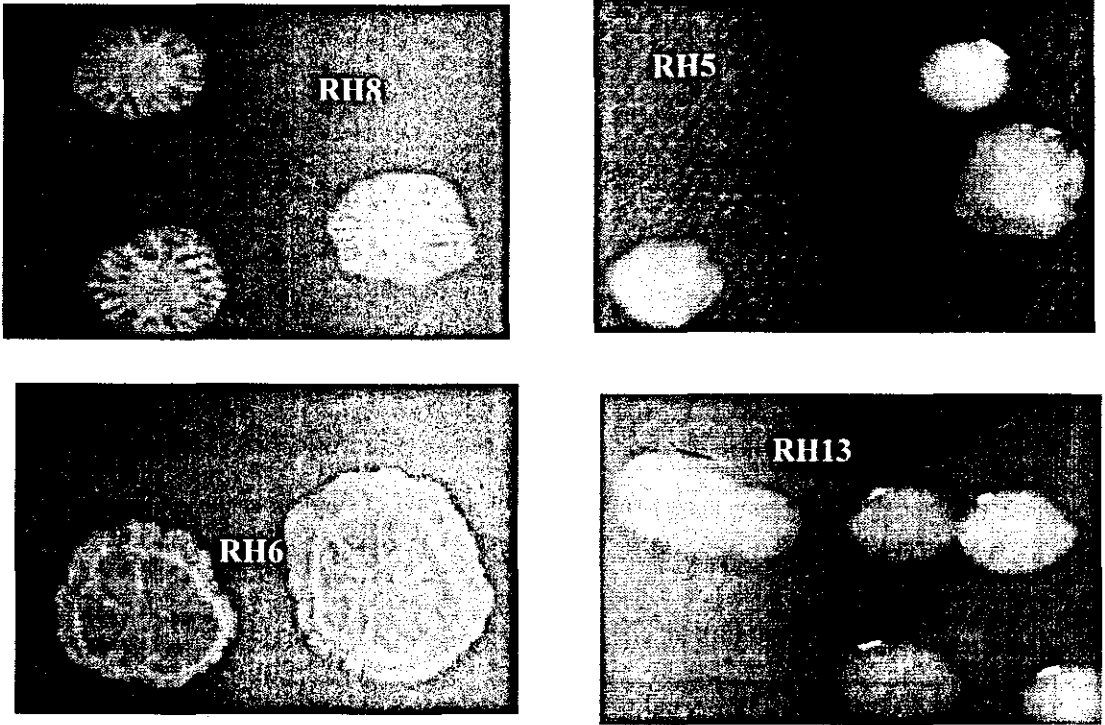
Ảnh 8. Hoạt lực đối kháng của chủng RH8 và RH13 với nấm *P. oryzae*

Bảng 2. Hoạt tính ức chế nấm *P. oryzae* của 4 chủng vi khuẩn

TT	Chủng vi khuẩn	Kích thước (D-d, mm) vòng ức chế nấm <i>P. oryzae</i>											
		Lần 1				Lần 2				Lần 3			
		NA	HP	TB	PY	NA	HP	TB	PY	NA	HP	TB	PY
1	RH5	3,0	2,5	3,0	3,0	3,0	2,5	3,0	3,0	3,0	2,5	3,0	3,0
2	RH6	2,0	2,0	2,0	2,5	2,0	2,0	2,0	2,5	2,0	2,0	2,0	2,5
3	RH8	2,0	2,5	2,5	3,0	2,0	2,5	2,5	3,0	2,0	2,5	2,5	3,0
4	RH13	4,0	4,0	4,5	4,0	4,0	4,0	4,5	4,0	4,0	4,0	4,5	4,0
5	RH1	0	0	3,0	0	0	0	2,0	0	0	0	0	0
6	RH11	2,5	2,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Bảng 3. Hình thái khuẩn lạc các chủng vi khuẩn đối kháng nấm đạo ôn trên môi trường King B

TT	Chủng	Hình thái khuẩn lạc	Tiết sắc tố
1	RH5	Khuẩn lạc tròn, lồi, có màu trắng ngà	Xanh vàng
2	RH6	Khuẩn lạc hình elip, dẹt, màu trắng hồng, bề mặt nhẵn, có gân hình bánh xe	Không có
3	RH8	Khuẩn lạc tròn, đặc ở tâm, có gân hình bánh xe, màu trắng ngà	Không có
4	RH13	Khuẩn lạc tròn, màu trắng trong, phớt hồng ở giữa	Không có



Ảnh 9. Hình thái khuẩn lạc chủng vi khuẩn RH5, RH6, RH8 và RH13 trên môi trường King B

Từ kết quả trên cho thấy: hai chủng vi khuẩn RH5 và RH6 có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *P.oryzae*. Kết quả đã mở ra hướng có thể sử dụng các chủng vi khuẩn đối kháng này để sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh nấm đạo ôn ở lúa.

4. KẾT LUẬN

Đã thu thập và phân lập được 60 isolates mẫu nấm gây bệnh đạo ôn trên 26 giống lúa khác nhau ở các tỉnh Hà Nam, Thái Bình, Hưng Yên, Hà Nội, Hải Phòng, Bắc Ninh, Bắc Giang, Hà Tây, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình và Phú Yên. Bước đầu tuyển chọn được 4 chủng vi khuẩn (RH5, RH6, RH8 và RH13) phân lập từ rễ hành có khả năng ức chế mạnh sự sinh trưởng của nấm *P.oryzae* gây bệnh đạo ôn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Devlin Kuyek - Blast, biotech and big business, Implications of crop cooperative strategies on rice research in ASIA – August, 2000.
2. F. A. Onofeghara, R. G. Kapooria and D. O. Ademokula - Studies on *Pyricularia oryzae* Cav. In Sierra Leone Morphological and Physiological Variability of Some Isolates, March 1972.
3. Geels and Schippers - Selection of Antagonistic Fluorescent *Pseudomonas* sp. and their Root Colonization and Persistence following Treatment of Seed Potato, *Phytopath. Z*, 108 (1983) 193-206.

4. Le Nhu Kieu, Pham Cong Minh, Tran Quang Minh, Nguyen Ngoc Cuong - The process produce the VK58 antagonistic bacteria product to protect tomato from the bacterial wilt disease on tomato, Vietnamese Journal of Science and Technology **43** (5) (2005) 47-54.
5. Le Nhu Kieu, Tran Quang Minh and Nguyen Thi Kim Thoa - Effect of VK58 product in preventing *Ralstonia solanacearum* bacteria caused bacterial wilt disease on tomato; Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology **45** (3) (2007) 97-101.
6. Moris Levy, Fernando. J. Correa-Victoria - Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia, September 1993.
7. Phan Hữu Tôn - Khả năng chống bệnh đạo ôn (*P.oryzae*) Bắc Việt Nam và đặc điểm nông sinh học một số dòng lúa chứa gen chống bệnh, Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp **2** (1) (2004) 3-8.
8. Roger Shivas, Dean Beasley, John Thomas, Andrew Geering and Ian Riley - Management of plant pathogen collection, 2005.
9. T. W. Mew and J. K. Misra - A manual of rice seed health testing, IRRI, 1994, 83.

SUMMARY

ISOLATION AND SELECTION OF BACTERIA ANTAGONISTIC TO *Pyricularia oryzae* WHICH CAUSE RICE BLAST DISEASE

Rice blast disease which is caused by *P.oryzae* is still being a big problem for many countries planting rice in the world. Nowadays, the best way considered to prevent rice blast disease is using chemical. However, the Agrochemical is one of the agents that make the environment polluted. Therefore, using antagonistic bacteria to restrict dispersion and pathogenous ability of *P.oryzae* fungi is one choice of researchers. In this paper the researching about antagonistic property of bacteria against *P.oryzae* is reported. There are 60 isolates of *P.oryzae* is isolated and selected from 26 different rice varieties at 11 provinces as Ha Nam, Thai Binh, Hung Yen, Hanoi, Hai Phong, Bac Ninh, Ha Tay, Nghe An, Ha Tinh, Quang Binh and Phu Yen. The preliminary obtained 4 isolates of bacteria indicated that they strong inhibiting activity against *P.oryzae*.

Keywords. *Pyricularia oryzae*; antagonistic bacteria; rice blast disease.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 15 tháng 2 năm 2007

Lê Như Kiều, Lê Thị Thu Hoài, Lê Tuấn Anh, Nguyễn Thị Kim Thoa,

Viện Thổ nhưỡng Nông hóa

Lê Tuấn Nghĩa,

Viện Di truyền Nông nghiệp.