

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG NẤM *Botryodiplodia theobromae* Pat GÂY BỆNH CHẾT KHÔ CÀNH CÂY CAO SU

Le Như Kiều¹, Nguyễn Thị Thanh Tâm¹, Lê Thị Thanh Thủy¹

TÓM TẮT

Cây cao su là loại cây công nghiệp có giá trị kinh tế cao, nhưng trong quá trình trồng cao su thường gặp nhiều sâu bệnh đã làm giảm năng suất và chất lượng mủ, một trong những bệnh phổ biến là bệnh chết khô cành gây nên bởi nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat. Theo điều tra của Viện Nghiên cứu Cao su, bệnh này đang gây thiệt hại cho những vùng trồng cao su và có thể gây hại đến 100% diện tích. Trong phạm vi bài báo này các tác giả trình bày một số kết quả nghiên cứu về phân lập, tuyển chọn vi khuẩn đối kháng bệnh chết khô cành do nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat gây ra. Kết quả đã tuyển chọn được 06 chủng nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat là TC1, QN1, MS1, SM1, YC1, ML2; các chủng này đều có độc tính cao, gây chết 100% cây cao su trong điều kiện thí nghiệm nhà lưới; hai chủng vi khuẩn C6 là *Bacillus subtilis* và S1 là *Bacillus amyloliquefaciens* đảm bảo an toàn sinh học và có khả năng đối kháng với 06 chủng nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat đã chọn, đường kính vòng ức chế tương ứng từ 13 - 15 mm và 14 - 16 mm. Chủng vi khuẩn C6 và S1 có khả năng làm giảm tỷ lệ chết cây cao su vườn ươm từ 100% xuống còn 20,8% và 25,0% trong điều kiện nhà lưới.

Từ khóa: Cây cao su, vi sinh vật đối kháng, nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat.

L MỞ ĐẦU

Ở Việt Nam, cao su là cây công nghiệp chủ lực, một trong mười mặt hàng xuất khẩu chủ yếu của nước ta. Theo số liệu thống kê của Tổng cục Hải quan, năm 2010, Việt Nam đã xuất hơn 750.000 tấn cao su các loại, với giá trị kim ngạch xuất khẩu 1,2 tỷ USD. Nhưng thực tế vấn đề trồng cao su ở nước ta gặp rất nhiều khó khăn bởi các loại bệnh do nấm gây ra, một trong những loại bệnh phổ biến là bệnh chết khô cành do nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat. Loại nấm này sống ở vùng nhiệt đới, trong quá trình sống ký sinh và hoại sinh, nấm tiết ra enzym xenuloza (β -glucosidaza) để phân hủy xenuloza và hemi xenuloza của mô gỗ. Nấm hoạt động mạnh vào giai đoạn mùa mưa, đồng thời ký sinh trên nhiều loại cây trồng khác, tấn công hầu hết các bộ phận của cây, gây ra các hiện tượng chết lại (die-back) trên cây hay toàn bộ hệ thống rễ, thối trái [1].

Theo điều tra của Viện Nghiên cứu Cao su, bệnh này gây hại hầu hết các vùng trồng cao su ở nước ta và thiệt hại có thể lên đến 100%. Theo số liệu tổng hợp của Công ty Cổ phần Cao su Sơn La năm 2010, diện tích cao su toàn tỉnh là 5.354 ha, tỷ lệ bị nhiễm bệnh chết khô cành gần 11%, nếu không phòng trừ kịp thời cây trong giai đoạn vườn ươm khi bị nhiễm bệnh thì tỷ lệ cây chết lên đến 97%, giai đoạn vườn

ươm tỷ lệ cây chết là 41 - 57%, giai đoạn kiến thiết cơ bản là 6%.

Các chuyên gia nghiên cứu về các loại nấm bệnh trên cây cao su dự báo rằng, trong thời gian tới cùng với sự phát triển của cây cao su và sự biến đổi khí hậu, bệnh chết khô cành sẽ phát triển mạnh và gây thiệt hại ngày càng trầm trọng hơn trong sản xuất. Cho đến nay, ở nước ta phòng trừ bệnh bằng biện pháp sử dụng thuốc hoá học là duy nhất nhưng cũng chưa đem lại hiệu quả như mong muốn và nó tác động tiêu cực đến môi trường, làm giảm các loại sinh vật có ích đồng thời gây ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người. Chính vì vậy, việc phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn đối kháng để sử dụng trong phòng trừ bệnh chết khô cành cây cao su là rất cần thiết.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Nấm gây bệnh chết khô cành (*Botryodiplodia theobromae* Pat) cây cao su; vi khuẩn đối kháng nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat; cây cao su vườn ươm; hóa chất và các thiết bị cần thiết của Bộ môn Vi sinh vật - Viện Thổ nhưỡng Nông hóa.

2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp thu mẫu: Thu mẫu ở giai đoạn đầu, lúc bệnh đang phát triển mạnh, thu 5 mẫu trên 5 cây nhiễm bệnh chết khô cành, thu mẫu lớp vỏ bị bệnh khoảng 10 x 10 cm giữ trong túi polyetylen. Ghi thời gian thu mẫu (ngày, tháng, năm), địa điểm,

¹ Viện Thổ nhưỡng Nông hóa

giống cây.... Sau mỗi lần cắt, kéo phải được tẩy trùng bằng cồn 70% để tránh làm lây lan nấm gây bệnh giữa các mẫu với nhau [2, 6].

- Phương pháp phân lập nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat. Cắt một phần nhỏ vỏ cây đã bị nhiễm bệnh, sát trùng bề mặt bằng dung dịch chất tẩy natri hypoclorit 10% trong 5 phút, lấy mẫu ra và rửa sạch bằng nước cất, làm khô mẫu bằng cách đặt mẫu lên giấy thấm. Cắt từng mảnh nhỏ có kích thước khoảng 3 x 3 mm, dùng panh đặt 5 - 6 mảnh trên đĩa môi trường PDA, ủ dưới ánh sáng huỳnh quang. Các sợi nấm sẽ phát triển sau 36 giờ, tiến hành cấy tách và tinh sạch sợi nấm, các chủng nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat có hình thái đặc trưng được giữ lại trong môi trường thạch đĩa và thạch nghiêng để dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

- Phương pháp phân lập vi khuẩn đối kháng theo Geels và Schippers, 1983 [5]. Lấy 10 g đất thu tại các vườn cao su cho vào cối sứ khử trùng nghiền nhỏ, hòa tan với 90 ml nước cất vô trùng, lắc 30 phút, để lắng tự nhiên, lấy phần dịch trong để phân lập vi khuẩn đối kháng.

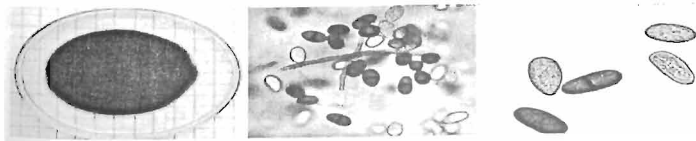
- Phương pháp đánh giá hoạt tính đối kháng: Dùng dụng cụ đục lỗ trên môi trường PDA trong đĩa petri, dùng que trang cờ nhỏ trang một vòng tròn dung dịch nấm gây bệnh từ mép đĩa đến lỗ đục, nhỏ 20 µl dung dịch vi khuẩn đối kháng vào lỗ, giữ ở nhiệt độ 28-32°C, theo dõi trong 48-72 h, đánh giá hoạt lực đối kháng của vi khuẩn dựa vào kích thước vòng vô khuẩn. Kích thước vòng vô khuẩn được tính theo công thức: D - d (trong đó: D- là đường kính vòng vô khuẩn; d- là đường kính lỗ đục).

- Phương pháp đánh giá độc tính của chủng vi khuẩn đối kháng trên cây trồng theo 10TCN: 216-1995 (216-2003). Cây cao su được trồng trong các chậu sắt, công thức CT1 không bổ sung vi khuẩn đối kháng; CT2 có bổ sung chủng vi khuẩn đối kháng C6; CT3 có bổ sung chủng vi khuẩn đối kháng S1; CT4 có bổ sung chủng vi khuẩn đối kháng C6 và S1. Theo dõi tỉ lệ cây chết trong 8 tuần.

- Phương pháp đánh giá hiệu quả phòng bệnh nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat: Chậu và các dụng cụ trồng cây cao su được khử trùng với KMnO₄ trong 24 giờ, rửa sạch bằng nước máy. Cây giống được ươm trong vườn ươm của Công ty Cổ phần Cao su Sơn La. Đất dùng trong thí nghiệm được khử trùng dưới ánh nắng mặt trời (đất được phủ polyetylen màu đen và phơi trên nền xi măng trong 2 ngày), mục đích nhằm loại bỏ vi sinh vật ngoại lai có hại trong đất, cho vào các chậu sắt có kích thước 30 x 40 cm, mỗi chậu trồng một cây. Mỗi công thức được bố trí 6 cây với 3 lần lặp lại. Các chậu cây được đặt dưới điều kiện ánh sáng tự nhiên, tưới nước và chăm sóc hàng ngày [3, 7]. Thí nghiệm có 5 công thức: CT1 (ĐC(-): Không nhiễm nấm gây bệnh và chủng đối kháng; CT2 (ĐC(+): Nhiễm nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat; CT3: Nhiễm nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat + chủng đối kháng C6; CT4: Nhiễm nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat + chủng đối kháng S1; CT5: Nhiễm nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat + hỗn hợp hai chủng vi khuẩn đối kháng. Theo dõi số cây bị chết trong 8 tuần.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thu mẫu nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat
Để có được các chủng nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat gây bệnh chết khô cành, 170 mẫu bệnh đã được thu là đại diện ở 19 xã trồng cao su tại 6 huyện của tỉnh Sơn La. Từ những mẫu thu được tại các địa phương trên, đã tiến hành phân lập nấm bệnh theo phương pháp Carrol (2003), kết quả thu được 30 chủng có khả năng gây chết 100% cây cao su vườn ươm. Cụ thể, huyện Thuận Châu có 4 chủng TC1, TC3, TC3, TC5; huyện Quỳnh Nhai có 4 chủng QN1, QN2, QN4, QN5; huyện Mai Sơn có 4 chủng MS1, MS2, MS3, MS5; huyện Yên Châu có 3 chủng YC1, YC3, YC4; huyện Sông Mã có 4 chủng SM1, SM2, SM4, SM5; huyện Mường La có 3 chủng ML2, ML3, M15. Dựa trên độc tính cao của các chủng đã chọn được 6 chủng đại diện cho 6 huyện trồng cao su ở Sơn La để làm các thí nghiệm tiếp theo, đó là chủng TC1, QN1, MS1, SM1, YC1 và M12.



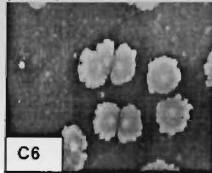
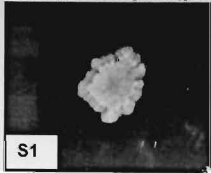
Hình 1. Hình thái khuẩn lạc và bào tử các chủng *Botryodiplodia theobromae* Pat

Hình 1 cho thấy, bào tử nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat có hình bầu dục, có vách ngăn và không có vách ngăn, màu trắng xám đến nâu đỏ, khuẩn lạc phát triển mạnh, có màu nâu đen, sợi nấm mọc theo hình đồng tâm.

2. Phân lập vi sinh vật đối kháng

Từ mẫu đất thu tại những vùng không có hoặc có ít bệnh chết khô cành đã phân lập và tuyển chọn

các chủng vi sinh vật đối kháng theo Geels và Schippers, 1983 [5]. Kết quả thu được 6 chủng C6, C10, N6, S1, Y6, M6 có hoạt tính đối kháng cao với 6 chủng nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat (bảng 1). Đặc điểm hình thái khuẩn lạc được minh họa tại hình 2, khuẩn lạc có hình không xác định, lồi, nhẵn nhéo ở mép, thường có màu trắng đục.



Hình 2. Hình thái khuẩn lạc của 2 chủng vi khuẩn đối kháng S1 và C6 trên môi trường KB

Hình 3. Vòng ức chế của vi khuẩn đối kháng với nấm

Botryodiplodia theobromae Pat

Bảng 1. Kích thước vòng ức chế của các chủng vi khuẩn đối kháng với các chủng nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat

STT	Chủng vi khuẩn đối kháng	Chủng nấm gây bệnh					
		Đường kính vòng ức chế (mm)					
		TC1	QN1	MS1	SM1	YC1	ML2
1	C6	14	14	15	13	14	14
2	C10	4	3	4	4	4	4
3	N6	6	3	6	5	5	5
4	S1	16	14	14	15	16	15
5	Y6	6	4	6	5	4	6
6	M6	9	11	11	7	14	11

ràng hai chủng vi khuẩn tuyển chọn đều an toàn với cây cao su, có thể sử dụng chúng để sản xuất chế phẩm vi sinh đối kháng phòng bệnh nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat.

Bảng 2. Kết quả thử độc tính của các chủng vi khuẩn đối kháng trên cây cao su

STT	Công thức thí nghiệm	Số cây thí nghiệm	Số cây chết sau 8 tuần	Tỷ lệ cây chết (%)
1	CT1	18	0	0
2	CT2	18	0	0
3	CT3	18	0	0
4	CT4	18	0	0

Đường kính vòng ức chế thể hiện hoạt lực đối kháng của các chủng vi khuẩn [4]. Số liệu ở bảng 1 cho thấy: chủng C6 và S1 là hai chủng vi khuẩn có hoạt lực đối kháng nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat cao nhất, kích thước vòng ức chế đạt từ 13 mm đến 16 mm, đây là hai chủng có tiềm năng cao để sử dụng sản xuất chế phẩm vi sinh đối kháng phòng trừ bệnh nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat. (Hình 3)

3. Đánh giá độc tính của các chủng vi khuẩn đối kháng trên cây

Để sử dụng các chủng vi khuẩn đối kháng an toàn thì việc xác định chúng có gây độc trên cây trồng hay không là việc làm rất cần thiết. Hai chủng C6 và S1 đã được đánh giá độc tính trên cao su vườn ươm. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, 2 chủng vi khuẩn đối kháng đều không gây độc cho cây cao su kể cả khi phối trộn hai chủng. Kết quả này đã chứng minh



Hình 4. Đánh giá khả năng phòng trừ bệnh chết khô cành của 2 chủng vi khuẩn đối kháng C6 và S1

4. Phân loại các chủng vi khuẩn đối kháng

Nhằm tạo cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo, đề tài đã định danh 2 chủng vi khuẩn đối kháng bằng phương pháp phân tích trình tự đoạn ADN mã hóa 16S rRNA. Kết quả cho thấy, chủng C6 là *Bacillus subtilis*, chủng S1 là *Bacillus amyloliquefaciens*.

Bảng 3. Kết quả định danh các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Chủng vi khuẩn	Loài gần nhất	Mã số ngân hàng gen	Độ tương đồng (%)
C6	<i>Bacillus subtilis</i>	GU826160	100
S1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	CP002627	100

Đối chiếu với danh mục các loài vi sinh vật an toàn của Cộng đồng châu Âu, cũng như danh mục các loài vi sinh vật bị hạn chế sử dụng, cho thấy hai chủng vi khuẩn đối kháng được lựa chọn C6 và S1 là các chủng vi sinh vật có độ an toàn sinh học cao.

5. Đánh giá khả năng phòng trừ bệnh nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat gây chết khô cành cao su của các chủng vi khuẩn đối kháng

Thí nghiệm đánh giá khả năng phòng trừ bệnh chết khô cành của hai chủng vi khuẩn đối kháng C6 và S1 đã được thực hiện tại nhà lưới Viện Thổ nhưỡng Nông hóa; kết quả thể hiện tại bảng 4 và hình 4. Số liệu ở bảng 4 cho thấy, ở công thức không bổ sung nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat (CT1) thì không xuất hiện cây chết; ở công thức có bổ sung nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat (CT2) thì 100% cây cao su đã bị chết; ở công thức có bổ sung nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat và chủng C6 (CT3) thì số cây chết là 20,8%; ở công thức có bổ sung nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat và chủng S1 (CT4) thì số cây chết là 25,0%.

Bảng 4. Kết quả đánh giá khả năng phòng trừ bệnh chết khô cành của các chủng vi khuẩn đối kháng (Sơn La, tháng 6 năm 2011)

STT	Công thức thí nghiệm	Số cây thí nghiệm	Số cây chết sau 8 tuần	Tỷ lệ cây chết (%)
1	CT 1	24	0	0
2	CT 2	24	24	100,0
3	CT 3	24	5	20,8
4	CT 4	24	6	25,0
5	CT 5	24	4	16,7
<i>LSD₀₅</i>				4,55

Trong khi đó ở công thức có bổ sung nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat và hỗn hợp hai chủng vi khuẩn đối kháng (CT5) thì số cây chết chỉ là 16,7%. Như vậy, sử dụng hỗn hợp hai chủng vi khuẩn đối kháng đã làm tăng khả năng phòng trừ bệnh chết khô cành cây cao su giai đoạn vườn ươm, đạt 83,3%. Đây là những chủng vi khuẩn có tiềm năng để nghiên cứu và sản xuất chế phẩm vi sinh đối

kháng ứng dụng trong phòng bệnh chết khô cành cao su nói riêng và cây trồng nói chung.

IV. KẾT LUẬN

Đã tuyển chọn được 06 chủng nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat là TC1, QN1, MS1, SM1, YC1, ML2 đại diện cho 6 huyện trồng cao su ở Sơn La; các chủng này đều có độc tính cao, tỷ lệ gây chết cây cao su trong điều kiện thí nghiệm nhà lưới là 100%. Phân lập, tuyển chọn được 02 chủng vi khuẩn đối kháng C6 và S1 an toàn sinh học và có khả năng đối kháng cao với nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat, đường kính vòng ức chế nấm tương ứng từ 13 – 15 mm và 14 – 16 mm. Hai chủng C6 *Bacillus subtilis* và S1 *Bacillus amyloliquefaciens* có khả năng làm giảm tỷ lệ chết của cây cao su vườn ươm từ 100% xuống còn 16,7% trong điều kiện nhà lưới (hiệu quả phòng trừ đạt 83,3%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Văn Cảnh (2006). *Công tác bảo vệ thực vật ngành cao su Việt Nam*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, TP HCM.
2. Nguyễn Ngọc Dũng, Nguyễn Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Minh Anh, 2003. Sử dụng vi khuẩn *Pseudomonas* sinh huỳnh quang trong phòng chống nấm gây bệnh cây trồng. *Proceedings Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, tr. 66-69.
3. Việt Chương, Nguyễn Văn Minh. *Kỹ thuật trồng cây cao su với diện tích nhỏ*. Nhà xuất bản thành phố Hồ Chí Minh, 2000.
4. Fravel D. R. (1988). Role of antibiotics in the biocontrol of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26, pp. 75-91.
5. Geels and Schippers (1983). Selection of Antagonistic Fluorescent *Pseudomonas* sp. and their Root Colonization and Persistence following Treatment of Seed Potato. *Phytopath. Z.*, 108, pp. 193-206.
6. Lê Như Kiều, Trần Quang Minh, Lê Thị Thanh Thủy, Nguyễn Văn Huân, 2010. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh lác và vũng. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ số 3 (48)*, tr. 33-42.
7. Sopheaveasna Mak, Sali Chinsathit, Aphiphan Pookpakdi and Poonpipope, Kasemsap, 2008. *The Effect of Fertilizer and Irrigation on Yield and Quality of Rubber (Hevea rasilienis) Grown in Chanthaburi Province of Thailand*. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 42:226-237.

ISOLATION AND SELECTION OF ANTAGONISTIC BACTERIA AGAINST *Botryodiplodia theobromae* Pat FUNGI CAUSING BRANCH DRY DISEASE RUBBER TREES

Le Nhu Kieu, Nguyen Thi Thanh Tam, Le Thi Thanh Thuy

Summary

The rubber is the major industrial plant and having high economic value, but the planting rubber in our country has been faced a number of fungal diseases reducing the yield and quality of sap. One of the common diseases is branch dry disease caused by *Botryodiplodia theobromae* Pat fungi. According to the investigation of the Rubber Research Institute this disease was most damaging in the rubber growing areas and can damage up to 100%. In this paper, the authors present some initial results on isolation, selection of microorganisms that has highly antagonistic action to fungi *Botryodiplodia theobromae* Pat to control the branch dry disease of rubber. The result has been selected 06 strains *Botryodiplodia theobromae* Pat that is TC1, QN1, MS1, SM1, YC1, ML2; these strains are highly toxic and were killed 100% rubber trees in the greenhouse condition; two strain C6- *Bacillus subtilis* and S1 - *Bacillus amyloliquefaciens* are biosafety and antagonistic against all 06 *Botryodiplodia theobromae* Pat strains selected, diameter of corresponding inhibition ring was 13 – 15 mm and 14 – 16 mm. Two strains C6 and S1 have the potential to reduce the mortality rate of rubber trees from 100% to 20.8% and 25.0% in the greenhouse condition.

Keywords: Rubber, antagonistic bacteria, *Botryodiplodia theobromae* Pat fungi.

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Tuất

Ngày nhận bài: 11/6/2012

Ngày thông qua phản biện: 6/8/2012

Ngày duyệt đăng: 13/8/2012