

Phân lập và tuyển chọn một số dòng nấm có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Corticium salmonicolor* gây bệnh trên cây cao su

Trần Hồng Anh^{1*}, Võ Đình Quang¹, Nguyễn Thị Liên¹, Lương Thị Thu Hằng²

¹Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại Tp Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

Ngày nhận bài 10/6/2016, ngày chuyển phản biện 13/6/2016, ngày nhận phản biện 29/7/2016, ngày chấp nhận đăng 1/8/2016

Cao su (*Havea brasiliensis* Muell.Arg.) là một trong những cây công nghiệp quan trọng của Việt Nam. Tuy nhiên, việc phát triển và tăng diện tích cây cao su đang gặp những khó khăn, trong đó khó nhất là phòng và trị bệnh cho cây. Trong số các bệnh thường gặp thì bệnh nấm hồng do nấm *Corticium salmonicolor* gây ra là một bệnh phổ biến. Trong nghiên cứu này, từ 20 mẫu đất vườn cao su và đất tự nhiên đã phân lập được 65 chủng nấm mốc và 288 chủng xạ khuẩn. Khả năng đối kháng của 65 chủng nấm mốc đối với sự phát triển của nấm hồng biến động rất lớn theo thời gian, trong đó 2 chủng PT15G9 và CT14G1 đối kháng 100% với nấm hồng chỉ sau 7 ngày nuôi cấy và chủng PC4G8 đối kháng 76% với nấm hồng sau 28 ngày nuôi cấy. Dựa vào đặc điểm khuẩn lạc trên thạch, quan sát đặc điểm vi học; dựa vào khóa phân loại của Robert A. Samson (1984) và của Bergey (1994) có thể xác định chủng PC4G8 là nấm *Aspergillus* sp., chủng CT14G1 là nấm *Trichoderma* sp., chủng PC15G9 là xạ khuẩn *Kibdelosporangium* sp. Việc kết hợp cả 3 chủng này đã ức chế mạnh nhất sự phát triển của nấm hồng trên đoạn cắt thân cao su.

Từ khóa: cao su, *corticium salmonicolor*, nấm hồng, phân lập, ức chế.

Chỉ số phân loại 4.1

Đặt vấn đề

Cao su (*Havea brasiliensis* Muell.Arg.) là một trong những cây công nghiệp dài ngày cung cấp mủ và gỗ cho rất nhiều ngành công nghiệp. Đây cũng là cây có giá trị kinh tế cao trong lĩnh vực nông - lâm nghiệp. Hiện nay, cây cao su đang được mở rộng diện tích và với việc áp dụng khoa học kỹ thuật nên cho sản lượng khá cao, đóng góp vào sự phát triển của nền kinh tế. Tuy nhiên, việc phát triển và tăng diện tích cây cao su đang gặp những vấn đề khó khăn, trong đó khó nhất là phòng và trị bệnh cho cây. Trong số các bệnh thường gặp trên cao su tại Việt Nam thì bệnh nấm hồng do nấm *Corticium salmonicolor* gây ra là một bệnh phổ biến, nhất là ở khu vực Đông Nam Bộ và rìa phía Nam của Tây Nguyên [1].

Để trị bệnh nấm hồng, thuốc hóa học như Validamycine (Validacin 5L, Vanicide 5SL...), hexaconazole (Alvin 5SC, Callihex 50SC...) phối hợp với chất bám dính tỏ ra có hiệu quả [2]. Tuy nhiên, sử dụng thuốc hóa học để trị bệnh cho cây cao su trong thời kỳ kinh doanh không dễ dàng và tốn nhiều chi phí, phụ thuộc vào chiều cao của cây và diện tích trồng.

Hơn nữa, việc sử dụng thuốc hóa học về lâu dài sẽ ảnh hưởng đến hệ vi sinh vật đối kháng và côn trùng có ích khác, từ đó sẽ ảnh hưởng tới môi trường sinh thái. Khác với thuốc hóa học, chế phẩm sinh học có các ưu điểm như không gây ảnh hưởng tiêu cực đến sức khỏe con người, không gây ô nhiễm môi trường, có khả năng phân hủy, chuyển hóa các chất hữu cơ, phế thải, góp phần làm sạch môi trường mà lại có tác dụng tiêu diệt nấm bệnh gây hại nên các nhà khoa học trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng đều đang tập trung nghiên cứu. Chính vì lý do đó, chúng tôi tiến hành đề tài nghiên cứu “Phân lập và tuyển chọn một số dòng nấm có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Corticium salmonicolor* gây bệnh trên cây cao su”.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Vật liệu phân lập nấm đối kháng: các chủng nấm mốc hiệu khí được phân lập từ các nguồn mẫu đất:

- 11 mẫu đất vườn cao su ở huyện Thuận An, thị xã Thủ Dầu 1, huyện Bến Cát và huyện Dầu Tiếng, tỉnh Bình Dương.

*Tác giả liên hệ: Tel: 0989369665; Email: saomai6@yahoo.com

Isolation and selection of some fungi inhibiting *Corticium salmonicolor* which causes pink diseases on rubber trees

Summary

Rubber (*Havea brasiliensis* Muell.Arg.) is one of the most important industrial plants of Vietnam. However, the expansion of rubber plantation in Vietnam is difficult because of diseases on rubber trees. Pink disease, caused by *Corticium salmonicolor*, is a common disease on rubber. From 20 soil samples collected in rubber plantation and natural areas, 65 fungi and 288 actinomycetes were isolated. The antagonistic ability with *Corticium salmonicolor* of 65 fungi varied greatly according to the follow-up period. Among the isolated ones, CT14G1 and PT15G9 were antagonistic 100% with *Corticium salmonicolor* after 7 days of culture, and PC4G8 was antagonistic 78% with *Corticium salmonicolor* after 28 days of culture. Based on the characteristics of colonies and characteristics under microscope; based on classifications of Robert A. Samson (1984) and Bergey's Manual of Determinative bacteriology-9 (1994), PC4G8 is *Aspergillus* sp.; CT14G1 is *Trichoderma* sp.; and PC15G9 is *Kibdelosporangium* sp. (actinomycetes). The combination of PT15G9 + CT14G1 + PC4G8 inhibited strongest the growth of *Corticium salmonicolor* on cutting branch of rubber trees.

Keywords: *corticium salmonicolor*, fungi, inhibition, isolated, pink disease.

Classification number 4.1

- 9 mẫu đất tự nhiên ở các tỉnh Bình Dương, Bình Thuận, Ninh Thuận, Lâm Đồng và Tp Hồ Chí Minh.

Nấm hồng gây bệnh hại cao su: được phân lập và làm thuần từ giống cao su RRIV4 (ký hiệu là RRIV4) do Viện Nghiên cứu cao su Việt Nam cung cấp.

Thân cao su để thử tính đối kháng: đoạn thân cao su thu thập trên cây cao su giống RRIV4 từ vườn cao su 5 năm tuổi của ông Lý Văn Xây, ấp Bến Mương, xã An Nhơn Tây, Củ Chi, Tp Hồ Chí Minh.

Phương pháp nghiên cứu

Phân lập các chủng nấm đối kháng: sử dụng phương pháp pha loãng [3, 4]. Phân lập và làm thuần các giống vi sinh vật trong mẫu đất trên đĩa petri chứa các môi trường Czapek-Dox và PGA. Bảo quản các chủng thuần này theo phương pháp thạch nghiêng.

Khảo sát sơ bộ khả năng ức chế sự phát triển nấm hồng của các chủng nấm thu thập được: trên đường kính của thạch đĩa chứa môi trường PDA: cấy điểm nấm bệnh *Corticium salmonicolor* cách mép đĩa 3 cm, sau đó cấy điểm nấm đối kháng với khoảng cách giữa hai điểm cấy là 3 cm, ủ ở nhiệt độ 30°C [5]. Đĩa đối chứng là đĩa chỉ cấy nấm bệnh *Corticium salmonicolor*.

Tính đối kháng với nấm *Corticium salmonicolor* (I) được xác định theo công thức:

$$I = 100 - (100 R2/R1)$$

Trong đó: R1 là đường kính khuẩn lạc *Corticium salmonicolor* trong đĩa đối chứng; R2 là đường kính khuẩn lạc *Corticium salmonicolor* trong đĩa cấy chủng nấm đối kháng.

Định danh và xác định đặc tính sinh học của các chủng có khả năng ức chế sự phát triển của nấm hồng: dựa theo khóa phân loại của Robert A. Samson (1984) và của Bergey (1994).

Khảo sát hiệu quả đối kháng của các chủng vi sinh vật tuyển chọn với chủng nấm bệnh Corticium salmonicolor trên đoạn cắt thân cây cao su con trong phòng thí nghiệm: thân cao su được khử trùng và tạo vết thương kích thước 1 mm² ở giữa đoạn thân bằng kim tiêm vô trùng, lấy tơ nấm hồng cấy trên vết thương. 3 chủng vi sinh vật có kết quả đối kháng mạnh nhất được nuôi cấy trên môi trường PGA và thu nhận bào tử sau 7 ngày. Nhúng thân cao su đã gây nhiễm nấm hồng vào dung dịch chứa bào tử các chủng đối kháng hoặc nước cất trong 30 phút. Sau đó đặt thân cao su vào đĩa petri chứa giấy thấm đã được thấm ướt bằng nước cất khử trùng, nuôi ở nhiệt độ 30°C. Bổ sung 1 ml nước

cất vào mỗi đĩa sau 2 ngày nuôi cấy để duy trì độ ẩm. Sau 2-9 ngày, tiến hành đo đường kính nấm hồng phát triển trên thân.

Xử lý số liệu

Các số liệu ghi nhận được đánh giá bằng phương pháp phân tích phương sai một yếu tố (One way anova) và phép thử Duncan để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức ở mức ý nghĩa 0,05 (xử lý thống kê bằng phần mềm Statistical Program Scientific System - SPSS phiên bản 11.5 dành cho Window). Sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p = 0,05$ của các giá trị được biểu hiện bằng các mẫu tự khác nhau kèm theo sau số trung bình và sai số chuẩn.

Kết quả và thảo luận

Phân lập các chủng nấm đối kháng

Để có thể phân lập các chủng nấm có khả năng đối kháng với nấm hồng, môi trường đất vườn cao su vùng Đông Nam Bộ và một số môi trường đất tự nhiên thuộc vùng Đông Nam Bộ và Nam Trung Bộ đã được sử dụng. Các mẫu đất được pha loãng và được cấy trên môi trường PGA và Czapek-Dox để phân lập các chủng vi sinh vật. Các vi sinh vật phân lập được sau khi quan sát khuẩn lạc thuần chủng sau 8 ngày nuôi cấy được tạm phân chia như sau:

- Các vi sinh vật được gọi là nấm khi khuẩn lạc gồm một khối những sợi đan xen với nhau khi quan sát bằng mắt thường [6].

- Các vi sinh vật được gọi là xạ khuẩn khi có khuẩn lạc khô và đa số có dạng hình phóng xạ [7].

Sau khi phân lập và làm thuần các chủng vi sinh trên môi trường PGA và môi trường Czapek-Dox, số lượng nấm và xạ khuẩn thu được của từng mẫu đất được thống kê trong bảng 1.

Bảng 1 cho thấy, đối với 11 mẫu đất vườn cao su, cả hai môi trường PGA và Czapek-Dox đều có nấm mốc và xạ khuẩn phát triển, trong đó môi trường PGA có số lượng nấm mốc phát triển nhiều hơn môi trường Czapek-Dox (23 chủng so với 14 chủng), nhưng số lượng xạ khuẩn phân lập được trên môi trường PGA lại thấp hơn môi trường Czapek-Dox (52 chủng so với 61 chủng). Số lượng xạ khuẩn phân lập được từ 11 mẫu đất vườn cao su cũng lớn hơn gấp 3 lần so với số lượng nấm mốc phân lập được (113 chủng so với 37 chủng). Như vậy, trong đất vườn cao su vùng Đông Nam Bộ, xạ khuẩn chiếm ưu thế hơn so với nấm mốc.

Bảng 1: số lượng các chủng nấm mốc và xạ khuẩn phân lập được trên môi trường PGA và Czapek-Dox

Ký hiệu mẫu đất	Môi trường PGA		Môi trường Czapek-Dox	
	Số chủng nấm mốc (chủng)	Số chủng xạ khuẩn (chủng)	Số chủng nấm mốc (chủng)	Số chủng xạ khuẩn (chủng)
Mẫu đất vườn cao su				
C1	0	6	0	4
C2	4	1	2	8
C3	3	7	4	6
C4	3	9	0	9
C5	3	1	0	2
C6	3	10	2	6
C7	4	1	3	8
C8	0	5	0	3
C9	0	3	0	5
C10	1	3	0	3
C11	2	6	3	7
Tổng	23	52	14	61
Mẫu đất tự nhiên				
T12	3	7	0	11
T13	2	9	0	16
T14	3	12	1	9
T15	2	7	1	8
T16	3	9	2	10
T17	0	11	0	16
T18	0	7	1	13
T19	0	8	1	11
T20	6	3	2	8
Tổng	19	73	9	102

Tương tự như từ đất vườn cao su, từ đất tự nhiên khi phân lập trên hai môi trường PGA và Czapek-Dox đều có nấm mốc và xạ khuẩn phát triển, trong đó môi trường PGA có số lượng nấm mốc phát triển nhiều hơn môi trường Czapek-Dox (19 chủng so với 9 chủng) và số lượng xạ khuẩn phân lập được trên môi trường PGA thấp hơn môi trường Czapek-Dox (73 chủng so với 102 chủng). So với từ đất vườn cao su, số lượng nấm mốc phân lập được từ đất tự nhiên ít hơn (28 chủng so với 37 chủng) nhưng số lượng xạ khuẩn phân lập được từ đất tự nhiên nhiều hơn gần gấp 2 lần (175 chủng so với 113 chủng). Từ 9 mẫu đất tự nhiên khi phân lập trên 2 môi trường, số lượng xạ khuẩn phân lập được (175 chủng) lớn hơn gấp 6 lần so với số lượng nấm mốc phân lập được (28 chủng).

Như vậy, tương tự như trong đất vườn cao su vùng Đông Nam Bộ, xạ khuẩn ở đất tự nhiên vùng Đông

Nam Bộ và Nam Trung Bộ cũng chiếm ưu thế hơn so với nấm mốc. Từ 11 mẫu đất vườn cao su, trên môi trường PGA đã phân lập được tổng cộng 23 chủng nấm và trên môi trường Czapek-Dox đã phân lập được 14 chủng nấm. Từ 9 mẫu đất tự nhiên, trên môi trường PGA đã phân lập được tổng cộng 19 chủng nấm và trên môi trường Czapek-Dox đã phân lập được 9 chủng nấm. Các chủng nấm này được sử dụng để thử tính đối kháng với nấm hồng trên môi trường thạch đĩa PDA để lựa chọn chủng có khả năng đối kháng mạnh với nấm hồng.

Khảo sát sơ bộ khả năng ức chế sự phát triển nấm hồng của các chủng nấm thu thập được

Các nấm phân lập được được phân làm 4 nhóm để khảo sát sơ bộ khả năng ức chế sự phát triển của nấm hồng:

Nhóm 1: nấm phân lập từ đất vườn cao su trên môi trường PGA, ký hiệu là PCiGj, trong đó i để chỉ thứ tự mẫu đất vườn cao su, biến thiên từ 1 đến 11 và j để chỉ số thứ tự của nấm phân lập được trên môi trường PGA.

Nhóm 2: nấm phân lập từ đất vườn cao su trên môi trường Czapek-Dox, ký hiệu là CCiGj, trong đó i để chỉ thứ tự mẫu đất vườn cao su, biến thiên từ 1 đến 11 và j để chỉ số thứ tự của nấm phân lập được trên môi trường Czapek-Dox.

Nhóm 3: nấm phân lập từ đất tự nhiên trên môi trường PGA, ký hiệu là PTmGn, trong đó m để chỉ thứ tự mẫu đất tự nhiên, biến thiên từ 12 đến 20 và n để chỉ số thứ tự của nấm phân lập được trên môi trường PGA.

Nhóm 4: nấm phân lập từ đất tự nhiên trên môi trường Czapek-Dox, ký hiệu là CTmGn, trong đó m để chỉ thứ tự mẫu đất tự nhiên, biến thiên từ 12 đến 20 và n để chỉ số thứ tự của nấm phân lập được trên môi trường Czapek-Dox.

Tỷ lệ đối kháng của các nấm phân lập được đối với nấm hồng sau 7 ngày được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2 cho thấy, sau 7 ngày cấy đối kháng, hầu hết các nấm phân lập được từ đất vườn cao su trên môi trường PGA đều có khả năng đối kháng với nấm hồng, nhưng tỷ lệ đối kháng của các chủng khác nhau là rất khác nhau. Tỷ lệ đối kháng sau 7 ngày cấy biến động từ 4,38 đến 48,72%, trong đó chủng PC6G4 và PC4G8 đã đối kháng với nấm hồng cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nấm khác, đạt tỷ lệ đối kháng 42,8 và 48,7% tương ứng sau 7 ngày.

Bảng 2: tỷ lệ đối kháng của các nấm phân lập đối với nấm hồng sau 7 ngày

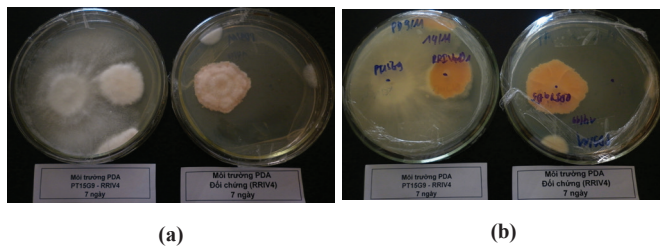
Nhóm 1	TL đối kháng	Nhóm 2	TL đối kháng	Nhóm 3	TL đối kháng	Nhóm 4	TL đối kháng
PC2G1	9,69±1,41 ab	CC2G1	31,74±1,97 de	PT12G1	41,64±3,83 h	CT14G1	100±0,00 e
PC2G2	18,19±3,83 cd	CC2G3	15,81±1,14 bc	PT12G5	7,80±0,82 bc	CT15G1	34,50±4,2 c
PC2G4	9,96±3,22 ab	CC3G1	32,12±1,65 de	PT12G10	28,73±0,30 g	CT16G1	4,80±0,82 a
PC2G5	4,38±1,59 a	CC3G2	19,39±0,53 c	PT13G1	18,95±0,78 ef	CT16G2	17,11±4,40 b
PC3G1	32,81±2,10 fg	CC3G8	8,23±1,65 a	PT13G7	0,80±0,08 a	CT18G6	47,85±2,82 d
PC3G2	18,14±0,99 cd	CC3G9	18,09±1,97 c	PT14G6	9,38±2,84 bc	CT19G1	18,82±1,49 b
PC3G5	15,54±0,92 bc	CC6G1	14,68±1,97 bc	PT14G7	7,33±0,47 b	CT20G6	32,20±1,98 c
PC4G1	9,43±0,70 ab	CC6G2	25,86±1,69 d	PT14G10	8,75±1,89 bc	CT20G10	13,50±2,81 b
PC4G8	48,72±3,56 i	CC7G1	31,31±0,92 de	PT15G1	11,11±1,89 bcd	CT20G11	14,45±3,40 b
PC4G11	16,60±1,92 bc	CC7G3	32,11±5,07 de	PT15G9	100±0,00 i		
PC5G1	21,10±0,99 cde	CC7G6	31,69±0,95 de	PT16G1	8,54±2,00 bc		
PC5G2	16,60±1,41 bc	CC11G1	9,96±1,93 ab	PT16G2	28,35±1,27 g		
PC5G3	15,01±0,53 bc	CC11G5	37,70±0,92 e	PT16G6	17,61±2,18 ef		
PC6G1	26,87±0,63 ef	CC11G9	14,45±0,89 bc	PT20G1	21,03±0,48 f		
PC6G4	42,80±4,30 hi			PT20G2	21,30±0,25 f		
PC6G5	7,33±0,47 a			PT20G3	16,52±0,32 def		
PC7G2	26,56±1,67 ef			PT20G4	19,23±2,27 ef		
PC7G3	22,77±1,14 cde			PT20G8	13,45±2,73 bode		
PC7G4	24,82±4,29 de			PT20G9	13,92±4,01 cde		
PC7G6	39,53±5,25 gh						
PC10G1	15,52±0,63 bc						
PC11G1	39,96±1,59 gh						
PC11G2	20,87±2,69 cde						

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$

Tương tự như những nấm phân lập được từ vườn cao su trên môi trường PGA, sau 7 ngày cấy đối kháng, hầu hết các nấm phân lập được từ đất vườn cao su trên môi trường Czapek-Dox đều có khả năng đối kháng với nấm hồng và tỷ lệ đối kháng của các chủng khác nhau là rất khác nhau. Tỷ lệ đối kháng sau 7 ngày cấy biến động từ 8,23 đến 37,70%, trong đó các chủng CC3G1, CC7G6 và CC11G5 đối kháng với nấm hồng cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nấm phân lập được từ vườn cao su trên môi trường Czapek-Dox, đạt tỷ lệ đối kháng tương ứng là 32,1%, 31,7% và 37,7%. Tỷ lệ đối kháng này là thấp hơn so với chủng PC6G4 và PC4G8 phân lập được từ đất vườn cao su trên môi trường PGA.

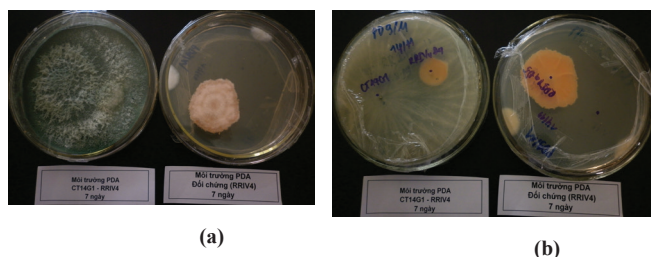
Bảng 2 cũng thể hiện hầu hết các nấm phân lập được từ đất tự nhiên trên môi trường PGA đều có khả năng đối kháng với nấm hồng sau 7 ngày và tỷ lệ đối kháng của các chủng khác nhau cũng rất khác nhau, biến động từ 0,80% đến 100,00%, trong đó chủng PT15G9 đối kháng 100% với nấm hồng và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nấm phân lập được từ

đất tự nhiên trên môi trường PGA khác. Tơ của chủng PT15G9 đã tấn công và mọc đè lên tơ của nấm hồng chỉ sau 7 ngày cấy đối kháng (hình 1).



Hình 1: chủng PT15G9 đối kháng với nấm hồng trên môi trường PDA sau 7 ngày
(a) mặt trước (b) mặt sau

Tương tự như những nấm phân lập được từ đất tự nhiên trên môi trường PGA, sau 7 ngày cấy đối kháng, hầu hết các nấm phân lập được từ đất tự nhiên trên môi trường Czapek-Dox đều có khả năng đối kháng với nấm hồng với tỷ lệ đối kháng biến động từ 4,80 đến 100,00%, trong đó chủng CT14G1 đối kháng 100% với nấm hồng và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nấm phân lập được từ đất tự nhiên trên môi trường Czapek-Dox khác. Tơ của chủng CT14G1 cũng đã tấn công và mọc đè lên tơ của nấm hồng chỉ sau 7 ngày cấy đối kháng tương tự như chủng PT15G9 (hình 2).



Hình 2: chủng CT14G1 đối kháng với nấm hồng trên môi trường PDA sau 7 ngày
(a) mặt trước (b) mặt sau

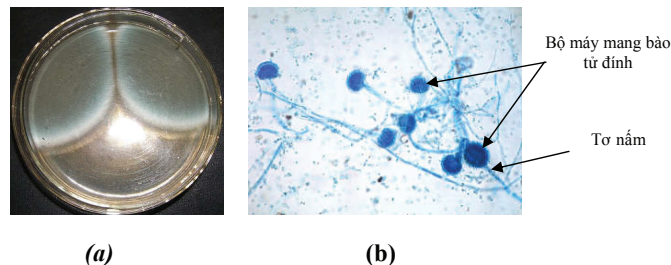
Định danh và xác định đặc tính sinh học của các chủng có khả năng ức chế sự phát triển của nấm hồng

Định danh chủng PC4G8:

Quan sát đặc điểm khuẩn lạc trên thạch: PC4G8 mọc sau 2 ngày nuôi cấy trên môi trường PGA. PC4G8 có màu xanh lục đậm khi phát sinh bào tử, tơ nấm trắng ở rìa khuẩn lạc. Dạng mặt khuẩn lạc mịn, không có khía. Mép khuẩn lạc mỏng, không có giọt tiết. Khuẩn lạc không mùi và không có sắc tố hòa tan (hình 3a).

Quan sát đặc điểm vi học: sau khi nhuộm và quan sát tơ nấm và bào tử dưới kính hiển vi quang học ở vật kính x40 và x100, PC4G8 có các đặc điểm: sợi nấm có vách ngăn ngang, khuẩn ty hình thành một cộng mang bào tử và bào tử đỉnh với cộng mang túi bào tử không

vách ngăn và không xuất phát từ tế bào chân, túi hay bong là tế bào đa nhân và phát triển bề mặt gắn liền với các thể bình, thể bình bậc 1, mỗi thể bình là cấu trúc đa nhân và trên đầu thể bình tạo thành một chuỗi bào tử đỉnh, những bào tử non ở trong và càng xa càng già. Bào tử đỉnh có hình tròn, không có túi bao bọc, giá sinh bào tử trần với đỉnh phồng to (hình 3b).



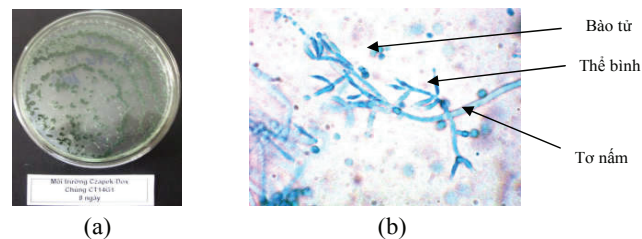
Hình 3: (a) khuẩn lạc và (b) đặc điểm vi học của chủng PC4G8 ở vật kính x40

Như vậy, dựa vào đặc điểm của khuẩn lạc, đặc điểm vi học và dựa vào khóa phân loại của Robert A. Samson (1984) có thể phân loại chủng PC4G8 như sau: giới: Fungi; ngành: Ascomycota; lớp: Eurotiomycetes; bộ: Eurotiales; họ: Trichocomaceae; giống: *Aspergillus*.

Định danh chủng CT14G1:

Quan sát đặc điểm khuẩn lạc trên thạch: CT14G1 mọc sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường Czapek-Dox có màu xanh lục đậm khi phát sinh bào tử, tơ nấm trắng ở rìa khuẩn lạc. Khuẩn lạc gồm những vòng tròn đồng tâm, dạng mặt khuẩn lạc gồ ghề, không có khía, mép khuẩn lạc mỏng, không có giọt tiết. Khuẩn lạc không mùi và không có sắc tố hòa tan (hình 4a).

Quan sát đặc điểm vi học: sau khi nhuộm và quan sát tơ nấm và bào tử dưới kính hiển vi quang học ở vật kính x40 và x100, CT14G1 có các đặc điểm: sợi nấm không có vách ngăn ngang. Giá sinh bào tử trần, không có đỉnh phồng to. Tế bào sinh bào tử trần hình bình, thể bình cổ ngắn, thể bình rõ rệt. Bào tử đỉnh hình thành từ những cụm trên những cuống bào tử đỉnh, bào tử đỉnh có hình tròn, không có túi bao bọc (hình 4b).



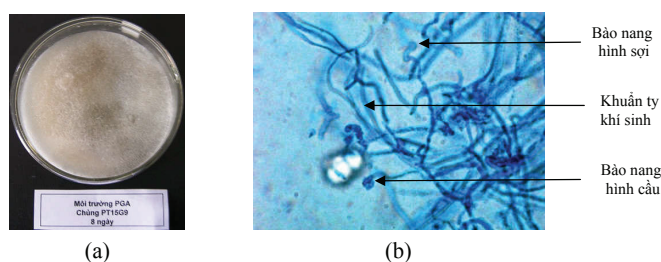
Hình 4: (a) khuẩn lạc và (b) đặc điểm vi học của chủng CT14G1 ở vật kính x40

Như vậy, dựa vào đặc điểm của khuẩn lạc, đặc điểm vi học và dựa vào khóa phân loại của Robert A. Samson (1984) có thể phân loại chủng CT14G1 như sau: giới: Fungi; ngành: Ascomycota; lớp: Eurotiomycetes; bộ: Eurotiales; họ: Trichocomaceae; giống: *Trichoderma*.

Định danh chủng PT15G9:

Quan sát đặc điểm khuẩn lạc trên thạch: PT15G9 mọc sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường PGA có màu trắng, dạng mặt khuẩn lạc mịn, không có khía, mép khuẩn lạc mỏng, không có giọt tiết. Khuẩn lạc không mùi và không có sắc tố hòa tan (hình 5a).

Quan sát đặc điểm vi học: sau khi nhuộm và quan sát tở nấm và bào tử dưới kính hiển vi quang học ở vật kính x40 và x100, PT15G9 có các đặc điểm: sợi khuẩn ty khí sinh không có vách ngăn ngang, bào tử nằm trong bào nang (nang bào tử, bào tử kín). Có 2 dạng bào nang cùng tồn tại: bào nang hình sợi và bào nang hình cầu (hình 5b).



Hình 5: (a) khuẩn lạc và (b) đặc điểm vi học của chủng PT15G9 ở vật kính x100

Như vậy, dựa vào đặc điểm của khuẩn lạc, đặc điểm vi học và dựa vào khóa phân loại của Bergey (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9) có thể phân loại chủng PT15G9 như sau: giới: Bacteria; ngành: Actinobacteria; lớp: Actinobacteria; bộ: Actinomycetales; họ: Pseudonocardiaceae; giống: *Kibdelosporangium*.

Khảo sát hiệu quả đối kháng của các chủng vi sinh vật tuyển chọn với chủng nấm bệnh *Corticium salmonicolor* trên đoạn cắt thân cây cao su con trong phòng thí nghiệm

Khả năng ức chế nấm hồng của 3 vi sinh vật tuyển chọn trên đoạn cắt cao su trong phòng thí nghiệm được thể hiện qua chiều dài vết nấm bệnh trên thân cao su theo thời gian. Chiều dài vết nấm bệnh sau khi xử lý các vi sinh vật càng ngắn thì khả năng đối kháng của

các vi sinh vật đối với nấm hồng càng cao. Sau khi gây nhiễm nấm bệnh trên thân cao su và xử lý hỗn hợp các vi sinh vật có khả năng đối kháng mạnh với nấm hồng, chiều dài vết nấm bệnh được theo dõi theo thời gian và được thể hiện qua bảng 3.

Bảng 3: chiều dài vết nấm bệnh (mm) theo thời gian

Công thức	Chiều dài vết nấm bệnh (mm) theo thời gian			
	Sau 2 ngày	Sau 4 ngày	Sau 7 ngày	Sau 9 ngày
Đối chứng - không nhúng nước	5,67±0,67 b	7,67±0,88 c	10,33±2,19 b	17,00±0,58 c
Đối chứng - nhúng nước	6,00±0,58 b	6,67±0,88 bc	9,86±2,18 b	16,67±1,76 c
Nhúng hỗn hợp PT15G9 + CT14G1	2,67±0,67 a	6,67±0,67 bc	10,83±1,92 b	12,00±2,08 b
Nhúng hỗn hợp PT15G9 + PC4G8	2,67±0,33 a	5,00±0,58 ab	6,33±0,67 ab	2,67±0,33 a
Nhúng hỗn hợp CT14G1 + PC4G8	5,33±0,88 b	6,67±0,33 b	9,80±1,56 b	10,60±1,40 b
Nhúng hỗn hợp PT15G9 + CT14G1 + PC4G8	2,00±0,58 a	3,33±0,88 a	1,33±0,33 a	2,33±0,33 a

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$

Bảng 3 cho thấy, chỉ sau 2 ngày, chiều dài vết nấm hồng trên thân cao su có xử lý các vi sinh vật đối kháng với nấm hồng đã ngắn hơn có ý nghĩa thống kê so với các công thức đối chứng không xử lý.

Hai công thức đối chứng không nhúng nước hoặc nhúng nước cho chiều dài vết nấm hồng trên thân cao su không khác biệt có ý nghĩa thống kê. Các công thức xử lý hỗn hợp các vi sinh vật đối kháng với nấm hồng thì khác biệt có ý nghĩa thống kê với các công thức đối chứng ở tất cả các thời điểm theo dõi.

Khi kết hợp mỗi 2 vi sinh vật đối kháng với nhau, hỗn hợp CT14G1 + PC4G8 tỏ ra chưa hiệu quả sau 2 ngày xử lý, tuy nhiên, sau 4 ngày xử lý thì công thức này cũng ức chế sự phát triển của nấm hồng trên thân cao su có ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

Trong các công thức xử lý vi sinh vật đối kháng thì việc kết hợp cả 3 chủng vi sinh tỏ ra là có hiệu quả đối kháng với nấm hồng mạnh nhất ở các thời điểm theo dõi, chiều dài vết nấm hồng gây bệnh của công thức này chỉ 2 mm sau 2 ngày so với 5,7-6 mm sau 2 ngày ở công thức đối chứng và chỉ 2,33 mm so với 16,67-17 mm sau 9 ngày ở công thức đối chứng.



Hình 6: nấm hồng phát triển trên thân cao su khi xử lý hoặc không xử lý hỗn hợp PT15G9 + CT14G1 + PC4G8: (a) sau 2 ngày, (b) sau 9 ngày

Kết luận

Từ 11 mẫu đất vườn cao su vùng Đông Nam Bộ phân lập trên môi trường PGA được 23 chủng nấm mốc, 52 chủng xạ khuẩn; trên môi trường Czapek-Dox được 14 chủng nấm mốc, 61 chủng xạ khuẩn. Từ 9 mẫu đất tự nhiên vùng Đông Nam Bộ và Nam Trung Bộ phân lập trên môi trường PGA được 19 chủng nấm mốc, 73 chủng xạ khuẩn; trên môi trường Czapek-Dox được 9 chủng nấm mốc, 102 chủng xạ khuẩn. Tỷ lệ đối kháng của các chủng khác nhau biến động rất lớn tùy theo từng chủng. Sau 7 ngày, tỷ lệ đối kháng của các chủng phân lập được đối với nấm hồng từ 0,80 đến 100%.

Các chủng nấm có khả năng đối kháng cao với nấm hồng gồm các chủng PC4G8, PC6G4, CC3G1, CC11G5, PT15G9 và CT14G1. Chủng CT14G1 và PT15G9 có khả năng đối kháng với nấm hồng đạt tỷ lệ 100% sau 7 ngày cấy đối kháng. Trong các chủng còn lại thì chủng PC4G8 có khả năng đối kháng với nấm hồng cao nhất, tỷ lệ đối kháng đạt 48,72% sau 7 ngày. Dựa vào đặc điểm khuẩn lạc trên thạch và đặc điểm vi học; dựa vào khóa phân loại của Robert A. Samson

(1984) và khóa phân loại của Bergey (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9) có thể xác định 3 chủng có khả năng đối kháng mạnh với nấm hồng: chủng PC4G8 là nấm *Aspergillus* sp.; chủng CT14G1 là nấm *Trichoderma* sp. và chủng PC15G9 là xạ khuẩn *Kibdelosporangium* sp.

Việc kết hợp cả 3 chủng vi sinh PT15G9 + CT14G1 + PC4G8 đã ức chế mạnh nhất sự phát triển của nấm hồng: chiều dài vết nấm hồng gây bệnh của công thức xử lý hỗn hợp bào tử của ba chủng PT15G9 + CT14G1 + PC4G8 chỉ 2 mm sau 2 ngày so với 5,7-6 mm sau 2 ngày ở công thức đối chứng và chỉ 2,33 mm so với 16,67-17 mm sau 9 ngày ở công thức đối chứng.

Tài liệu tham khảo

- [1] Phan Thành Dũng (2006), "Tình hình bệnh cây cao su tại Việt Nam, hiện trạng và hướng khắc phục", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, **tập 1+2**, tr.50-52.
- [2] Phan Thành Dũng, Trần Anh Pha, Nguyễn Thái Hoan, Mai Văn Sơn (2005), "Sử dụng chất bám dính BDNH 2000 phối hợp với thuốc trừ nấm trị bệnh nấm hồng cho cây cao su", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, **tập 1**, tr.73-75.
- [3] Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Lê Đình Lương, Đoàn Xuân Mượu, Phạm Văn Ty (1972), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- [4] Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Lê Đình Lương, Đoàn Xuân Mượu, Phạm Văn Ty (1978), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- [5] A.S. Ahmed, C.P. Sanchez, C. Egea, M.E. Candela (1999), "Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants", *Plant Pathology*, **48**, pp.58-65.
- [6] Bùi Tấn Anh, Võ Văn Bé, Phạm Thị Nga, *Nấm mốc, nấm nhầy và địa y*, <http://vietsciences1.free.fr/vietscience/giaokhoa/biology/virologie/nammocnamnhaydiay.htm>
- [7] Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Kim Nữ Thảo, *Các nhóm vi khuẩn chủ yếu - Phân loại xạ khuẩn*, <http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/phanloaixakhuan01.htm>