

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG VI NẤM CÓ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG VỚI NẤM *CORYNESPORA CASSIICOLA* GÂY BỆNH VÀNG LÁ, RỤNG LÁ Ở CÂY CAO SU

ĐỖ THỊ THANH DUNG*, LÊ THANH BÌNH**,
PHAN THỊ PHƯƠNG TRANG***, VÕ ĐÌNH QUANG****

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm tuyển chọn một số chủng vi nấm có tính đối kháng cao đối với chủng *Corynespora cassiicola* gây bệnh vàng lá và rụng lá trên cây cao su. Kết quả đã phân lập và làm thuần được 17 chủng vi nấm có khả năng đối kháng với nấm *C. cassiicola* từ 20 mẫu đất tại tỉnh Đồng Nai và Bình Dương. Từ đó đã chọn được 3 chủng BD1N1, DN9N2, DN5N1 thuộc chủng *Trichoderma* sp. có khả năng đối kháng mạnh với nấm *C. cassiicola* và có tiềm năng ứng dụng làm chế phẩm vi sinh giúp phòng và trị bệnh *Corynespora* trên cây cao su.

Từ khóa: bệnh cao su, *Corynespora cassiicola*, *Trichoderma* sp., bệnh *Corynespora* trên cao su.

ABSTRACT

Isolating and selecting some strains of the fungus that have the ability to countervail Corynespora Cassiicola fungi, which causes Corynespora in rubber plant

The aim of this study is to select some strains of the fungus that have the ability to countervail *Corynespora Cassiicola* fungi, which causes *Corynespora* in rubber plant. From 20 different soil samples in Dong Nai and Binh Duong, a total of 17 strains of fungus were isolated and purified. From those, three strains of BD1N1, DN9N2 and DN5N1 belonging to *Trichoderma* sp. were selected due to their high ability to countervail *C. Cassiicola* fung. These results will be applied to make organic products in order to prevent and treat pathogenic of *Corynespora* in rubber plant.

Keyword: Rubber diseases, *Corynespora cassiicola*, *Trichoderma* sp., *Corynespora* in rubber plant

1. Mở đầu

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 các lĩnh vực nông – lâm nghiệp. Trong những năm gần đây, bệnh

* KS, Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TPHCM; Email: dothithanhdung1990@gmail.com

** ThS, Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TPHCM

*** TS, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TPHCM

**** TS, Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TPHCM

rụng lá cao su do nấm *C. cassiicola* gây ra đã trở thành dịch hại nguy hiểm đối với nhiều vườn cao su của nước ta. Được ví như bệnh “AIDS” của cây cao su, bệnh đã gây ra ảnh hưởng nghiêm trọng tới năng suất cây, làm điêu đứng những người trồng cao su. Bệnh có thể xảy ra trên cây cao su ở mọi lứa tuổi và xảy ra quanh năm gây thiệt hại lớn về năng suất mủ cao su.

Hiện nay, đã có một số nghiên cứu tập trung vào giống cây trồng kháng bệnh [1], [2] và sử dụng thuốc hóa học để phòng trị bệnh [1]. Tuy nhiên, việc phòng và trị bệnh bằng phương pháp hóa học gây ảnh hưởng xấu đến môi trường sinh thái và sức khỏe cộng đồng. Thực tế cho đến nay chưa có thuốc đặc trị. Trong khi đó chế phẩm sinh học không những ngăn chặn một số bệnh hại mà còn không làm ảnh hưởng đến sức khỏe con người, khả năng phát triển của cây; không làm ảnh hưởng đến các vi sinh vật đối kháng và côn trùng có ích; không gây ô nhiễm môi trường; có khả năng phân hủy và chuyển hóa các chất hữu cơ, phế thải... Trong đó, đáng chú ý là một số loại vi nấm có thể đối kháng với một số nấm bệnh gây hại cho cây trồng. Một số nghiên cứu gần đây cho thấy tiềm năng của một số chủng vi nấm đối kháng lại bệnh trên một số cây trồng như thối rễ trên cà tím [4], bệnh chảy nhựa *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes) von Hohnel trên dứa [5]...

Như vậy, việc nghiên cứu đặc điểm của các chủng vi nấm đối kháng nấm *C. cassiicola* gây bệnh vàng lá, rụng lá ở cây cao su là cần thiết.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Nấm *C. cassiicola* được phân lập và làm thuần từ giống cao su RRIV4 bị nhiễm bệnh do Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam cung cấp.

Chủng vi nấm đối kháng được phân lập từ mẫu đất tại các vườn cao su khỏe trong vùng dịch bệnh tại Bình Dương và rừng tự nhiên Nam Cát Tiên tỉnh Đồng Nai.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập nấm đối kháng

Mẫu đất được xử lí trước khi phân lập bằng cách phơi khô ở nhiệt độ phòng 2 – 3 ngày, sau đó sàng qua rây có kích thước 2 – 3mm. Cân 10g đất/mẫu cho vào erlen 250ml chứa 90ml nước cất vô trùng, lắc trong 30 phút trên máy lắc, pha loãng dung dịch đất bằng cách lấy 1ml dung dịch đất cho vào ống nghiệm có chứa 9ml nước cất vô trùng, đồng nhất mẫu đất và nước cất bằng cách lắc ống nghiệm nhiều lần. Tiếp tục pha loãng ra các nồng độ 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Lấy 1ml dung dịch ở nồng độ 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} trải trên bề mặt môi trường PGA, ủ ở nhiệt độ 22 °C – 25 °C, quan sát khuẩn lạc trên bề mặt môi trường PGA sau 48 h – 72 h, phân lập chủng vi nấm từ những khuẩn lạc riêng lẻ trên đĩa thạch sau khoảng thời gian từ 4 – 10 ngày.

2.2.2. *Khảo sát khả năng đối kháng sự phát triển với nấm C. cassiicola của các chủng vi nấm được phân lập trong môi trường dinh dưỡng trên đĩa petri:*

Khả năng ức chế của các chủng vi nấm được phân lập đối với sự phát triển của nấm C. cassiicola đã cấy trước 2 ngày: Nấm bệnh *C. cassiicola* được cấy trước hai ngày, ủ ở nhiệt độ phòng. Sau 2 ngày, cấy nấm đối kháng đối xứng với nấm bệnh trên đường kính và mỗi bên cách tâm đĩa petri 3 cm. Mỗi chủng nấm được cấy trên 3 đĩa petri, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Sau 2, 4, 7 và 10 ngày cấy nấm đối kháng, tiến hành đo các chỉ tiêu để đánh giá kết quả. Tỷ lệ ức chế sự phát triển của nấm (I) được tính theo công thức sau ^[3]:

$$\text{Tỷ lệ ức chế (I)} = (R_B - R_U) * 100\% / R_B$$

Trong đó:

R_B : bán kính nấm phát triển bình thường

R_U : bán kính nấm phát triển bị ức chế.

Khả năng ức chế của các chủng vi nấm được phân lập đối với sự phát triển của nấm C. cassiicola khi cấy đối kháng cùng lúc: Trên đĩa môi trường PGA, cấy điểm nấm bệnh *C. cassiicola* cách mép đĩa 3cm, đồng thời cấy điểm nấm đối kháng đối xứng qua tâm đĩa petri. Ủ ở nhiệt độ phòng, quan sát trong 7 ngày. Đĩa đối chứng là đĩa chỉ cấy nấm bệnh *C. cassiicola*. Mỗi chủng nấm được cấy trên 3 đĩa và thí nghiệm được lặp lại 2 lần. Sau 2, 4 và 7 ngày cấy nấm đối kháng, tiến hành đo các chỉ tiêu để đánh giá kết quả. Theo dõi đường kính sinh trưởng sợi tơ nấm bệnh và nấm đối kháng theo dạng tỏa tròn (mm) cho đến khi tơ nấm ở đĩa đối chứng lan tỏa hết đĩa thạch. Tỷ lệ đối kháng với nấm *C. cassiicola* (I) được tính theo công thức trên.

Xác định tỷ lệ đối kháng với nấm *C. cassiicola* dựa vào tỷ lệ ức chế sự phát triển của nấm *C. cassiicola* để đánh giá hiệu lực đối kháng của chúng. Từ kết quả thí nghiệm, chọn 3 chủng có kết quả tốt nhất để tiến hành bảo quản, định danh.

2.2.3. *Định danh và xác định đặc tính sinh học các chủng có khả năng ức chế sự phát triển của nấm C. cassiicola*

Dựa vào khóa phân loại đến lớp theo Robert A. Samson (1984) để định danh các chủng vi nấm có khả năng đối kháng mạnh với nấm bệnh *C. cassiicola*.

2.2.4. *Khảo sát hiệu quả đối kháng của các chủng vi sinh vật tuyển chọn với chủng nấm bệnh C. cassiicola trong môi trường lỏng*

Các chủng tuyển chọn được nuôi cấy riêng lẻ với *C. cassiicola* hoặc tổ hợp 2 và 3 chủng với chủng *C. cassiicola* với mật độ nấm bệnh và nấm đối kháng ở các công thức tương đương nhau. Mỗi công thức được nuôi cấy trên erlen 250ml (có lắc) và lặp lại 3 lần. Sau các thời điểm 2, 4, 6, 8 ngày, kiểm tra mật độ *C. cassiicola* trên đĩa petri chứa môi trường PGA và mỗi thời điểm lặp lại 3 lần.

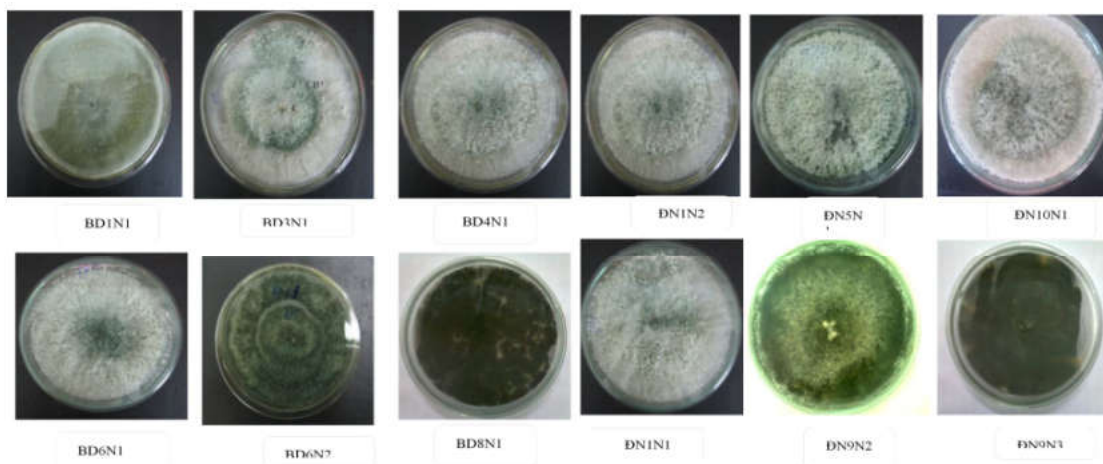
2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Dùng phần mềm excel để xử lý các số liệu. Các số liệu ghi nhận được xử lý thống kê bằng phương pháp One_Way ANOVA trên phần mềm Statistical Program Scientific System (SPSS) phiên bản 19.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập các chủng vi nấm

Từ 20 mẫu đất đã phân lập được 17 chủng nấm trên môi trường PGA. Trong 17 chủng nấm phân lập được có 11/17 chủng nấm được phân lập từ các mẫu đất lấy tại Đồng Nai (rừng tự nhiên) chiếm tỉ lệ 64,71% và 6/17 chủng nấm được phân lập từ các mẫu đất lấy tại Bình Dương (vườn cao su khỏe trong vùng dịch bệnh) chiếm tỉ lệ 35,29%. Như vậy, kết quả cho thấy số lượng các chủng vi nấm được phân lập từ các mẫu đất tại Đồng Nai lớn hơn nhiều so với số lượng các chủng vi nấm được phân lập tại các mẫu đất lấy từ Bình Dương.



Hình 1. Một số chủng vi nấm phân lập từ đất rừng tự nhiên thuộc tỉnh Đồng Nai và đất vườn cao su Bình Dương trên môi trường PGA

3.2. Khảo sát khả năng đối kháng sự phát triển nấm *C. cassiicola* của các chủng vi nấm được phân lập trong môi trường dinh dưỡng trên đĩa petri

Khả năng ức chế của các chủng vi nấm phân lập đối với sự phát triển của nấm *C. cassiicola* đã cấy trước 2 ngày

Sau khi thử nghiệm kết quả cho thấy, sau 2 ngày cấy đối kháng trên môi trường PGA (bảng 1) có 15/17 các chủng vi nấm (chiếm tỉ lệ 88,24%) có khả năng đối kháng với nấm *C. cassiicola* với tỉ lệ dưới 20%. Tỉ lệ đối kháng của các chủng khác nhau là khác nhau, tỉ lệ đối kháng sau 2 ngày cấy biến động từ 0,00% đến 17,69%. Sau 2 ngày cấy đối kháng, các chủng DN1N1, DN5N1, DN9N2 có tỉ lệ đối kháng cao nhất với nấm bệnh với tỉ lệ tương ứng 17,69%, 11,54%, 13,85%. Sau 4 ngày cấy đối kháng (bảng 1) cho thấy: Tỉ lệ ức chế sự phát triển của nấm bệnh ở các chủng vi nấm phân lập

tăng lên so với thời điểm 2 ngày, tuy nhiên tỉ lệ vẫn còn thấp, sự gia tăng này khác nhau giữa các chủng nghiên cứu. Tỉ lệ đối kháng sau 4 ngày biến động từ 11,18% đến 30%. Khả năng đối kháng mạnh nhất với nấm bệnh cũng đã thay đổi sau 4 ngày cấy đối kháng so với thời điểm sau 2 ngày và thứ tự đối kháng cao nhất cũng đã thay đổi cụ thể là chủng BD1N1, BD4N1, ĐN6N1, ĐN10N1 với tỉ lệ đối kháng tương ứng 30%, 27,65%, 26,47%, 27,06%. Tại thời điểm này một số chủng như BD4N1, ĐN2N1, ĐN5N1 tuy mới tiếp xúc với nấm bệnh nhưng đã tiêu diệt tơ nấm bệnh tại nơi tiếp xúc. Một số chủng vi nấm như BD3N1, ĐN3N1, BD6N1, ĐN9N1 mặc dù chưa tiếp xúc với nấm bệnh nhưng vẫn có tác động làm cho đường kính nấm bệnh giảm đáng kể so với đối chứng. Sau 7 ngày cấy chủng vi nấm phân lập (bảng 1) cho thấy: tại thời điểm này nấm *C. cassiicola* ở lô thí nghiệm phát triển chậm hơn so với lô đối chứng một cách rõ rệt. Tương tự như tại thời điểm 4 ngày, sự gia tăng tỉ lệ ức chế sự phát triển nấm bệnh của các chủng vi nấm phân lập cũng khác nhau giữa các chủng nghiên cứu. Tỉ lệ đối kháng sau 7 ngày biến động từ 20,56% đến 63,89% và cao nhất là chủng BD1N1 với tỉ lệ đối kháng đạt tương ứng 63,89% (khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nấm còn lại) và đã tăng lên 100% tương ứng sau 10 ngày. Sau 10 ngày cấy chủng vi nấm phân lập, kết quả thu được qua bảng 1 cho thấy có 13/17 (chiếm tỉ lệ 76,47%) chủng vi nấm được phân lập có tỉ lệ đối kháng với nấm bệnh trên 50%, trong đó có 9/17 (chiếm tỉ lệ 52,94%) chủng có khả năng tiêu diệt hoàn toàn nấm *C. cassiicola*, biểu hiện bằng sự phủ kín toàn bộ bề mặt đĩa petri của chủng nấm đối kháng.

Bảng 1. Khả năng ức chế của các chủng vi nấm phân lập được đối với sự phát triển của nấm *C. cassiicola* đã cấy trước 2 ngày

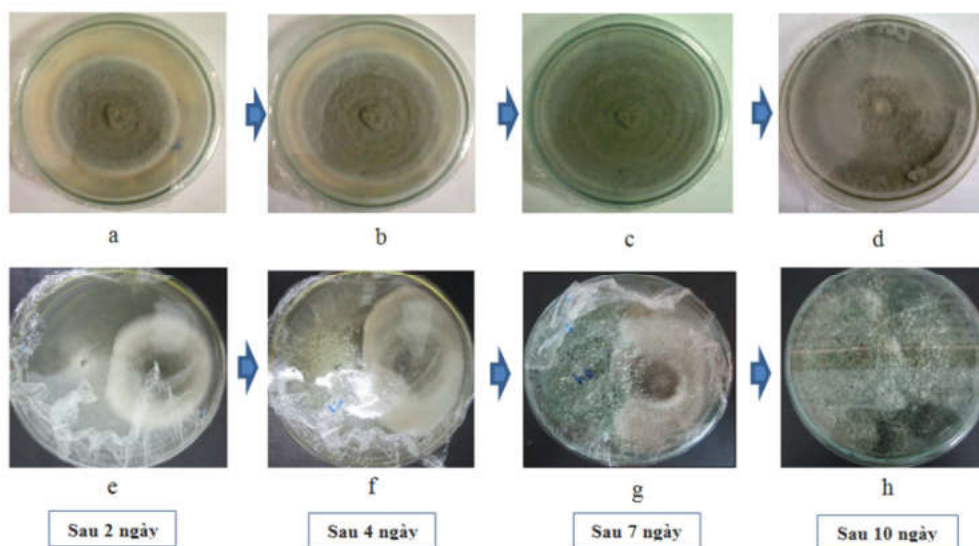
Chủng	Tỉ lệ đối kháng tính theo %			
	Sau 2 ngày	Sau 4 ngày	Sau 7 ngày	Sau 10 ngày
BD1N1	8,47±5,39 abcd	30±1,76 f	63,89±0,56 g	100±0,00 f
BD3N1	6,92±0,77 abc	17,06±2,94 abc	52,78±0,56 ef	100±0,00 f
BD4N1	8,46±2,31 abcd	27,65±0,59 ef	45±1,67 d	100±0,00 f
ĐN1N1	17,69±2,31 d	18,24±1,77 cd	46,67±2,23 d	100±0,00 f
ĐN1N2	7,70±3,08 abc	18,24±0,59 cd	42,78±2,78 d	97,78±3,14 f
ĐN2N1	9,23±1,54 abcd	23,53±1,18 de	55,56±0,00 ef	100±0,00 f
ĐN3N1	6,16±1,55 abc	17,65±0,0 bcd	51,67±0,56 e	65,56±3,34 d
ĐN5N1	11,54±2,31 bcd	22,35±7,06 ef	54,45±1,12 ef	100±0,00 f
BD6N1	4,62±3,08 ab	18,24±5,3 abc	35±2,87 c	26,67±6,67 ab
BD6N2	7,69±0,0 abc	16,47±1,18 abc	32,78±0,56 c	76,67±3,34 e
ĐN6N1	7,70±3,08 abc	26,47±2,94 ef	54,45±1,12 ef	71,67±6,11 c
ĐN7N1	3,08±1,54 ab	11,18±0,59 a	26,56±2,34 b	45,56±5,56 f

ĐN10N1	9,24±4,62 abcd	27,06±2,35 ef	51,67±0,56 e	100±0,00 f
ĐN9N1	4,62±3,08 abc	17,65±2,36 bcd	54,45±1,12 ef	100±0,00 f
ĐN9N2	13,85±3,08 cd	19,41±0,59 cd	57,23±0,56 f	100±0,00 f
ĐN9N3	0,00±0,00 a	14,12±1,18 ab	21,11±1,11 a	31,11±2,22 b
BD8N1	0,00±0,00 a	11,77±1,18 abc	20,56±1,67 a	21,67±0,56 a

In đậm thể hiện tỉ lệ đối kháng cao

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau khác nhau có sự khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$).

Tỉ lệ đối kháng của các chủng vi nấm phân lập được thể hiện qua Bảng 1 cũng cho thấy một số chủng đối kháng mạnh với nấm bệnh sau 2 ngày cấy như ĐN1N1, ĐN5N1, ĐN9N2 đã có sự thay đổi sau 4 ngày cấy là BD1N1, BD4N1, ĐN10N1 và tiếp tục có sự thay đổi sau 7 ngày cấy là các chủng BD1N1, ĐN2N1, ĐN9N2. Tuy nhiên sau 10 ngày cấy chủng vi nấm phân lập, tỉ lệ đối kháng ổn định không thay đổi. Với 9/17 chủng gồm BD1N1, BD3N1, BD4N1, ĐN1N1, ĐN2N1, ĐN5N1, ĐN10N1, ĐN9N1, ĐN9N2 có khả năng đối kháng mạnh với nấm bệnh (tỉ lệ đối kháng 100% sau 10 ngày cấy đối kháng) trong đó có 6/9 (chiếm tỉ lệ 66,67%) chủng có nguồn gốc tại rừng tự nhiên và 3/9 chủng (chiếm tỉ lệ 33,33%) có nguồn gốc từ vườn cao su khỏe trong vùng dịch bệnh.



Hình 2. Thử nghiệm đối kháng chủng vi nấm với *Corynespora cassiicola* sau 2 ngày cấy nấm bệnh. Chủng *C. cassiicola* (đĩa đối chứng) (a, b, c, d). Chủng ĐN9N2 đối kháng với nấm *C. cassiicola* (e, f, g, h) trên môi trường PGA khi cấy đối kháng sau 2 ngày cấy nấm *C. cassiicola*

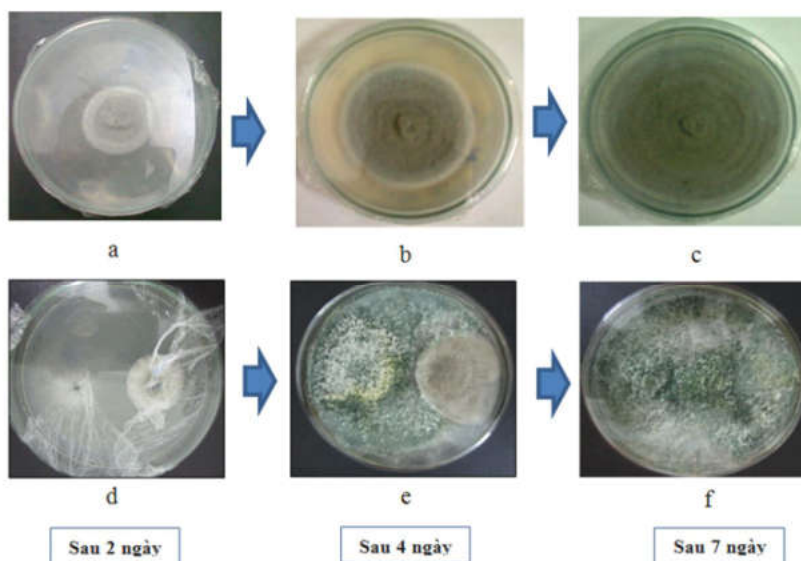
Khả năng ức chế của các chủng vi nấm phân lập đối với sự phát triển của nấm *C. cassiicola* khi cấy đối kháng cùng lúc với chủng vi nấm phân lập.

Kết quả đối kháng của các chủng vi nấm thể hiện qua bảng 2 cũng cho thấy một số chủng có khả năng đối kháng mạnh với *C. cassiicola* ngay từ giai đoạn 2 ngày và khả năng đối kháng vẫn duy trì ổn định sau 7 ngày như chủng BD1N1, ĐN5N1. Ngoài ra cũng có một số chủng tại thời điểm 2 ngày, tỉ lệ đối kháng chưa cao nhưng tỉ lệ đối kháng đã tăng lên sau 7 ngày ví dụ ĐN1N2, ĐN9N2. Tại thời điểm 7 ngày cấy đối kháng, các chủng BD1N1, ĐN1N1, ĐN1N2, ĐN5N1, ĐN9N2 cho tỉ lệ đối kháng với nấm *C. cassiicola* cao nhất (100%). Trong 5 chủng cho tỉ lệ đối kháng cao nhất thì có 4/5 (chiếm tỉ lệ 80%) chủng vi nấm được phân lập có nguồn gốc từ rừng tự nhiên.

Bảng 2. Khả năng ức chế của các chủng vi nấm phân lập được đối với sự phát triển của nấm *C. cassiicola* khi cấy đối kháng cùng lúc với chủng vi nấm phân lập

Chủng	Tỉ lệ đối kháng tính theo %		
	Sau 2 ngày	Sau 4 ngày	Sau 7 ngày
BD1N1	21,25 ± 1,25 efg	63,47 ± 1,16 k	100 ± 0,00 e
BD3N1	16,25 ± 3,75 cde	45,00 ± 0,38 de	67,50 ± 0,28 bc
BD4N1	20,75 ± 0,75 efg	48,46 ± 2,31 ef	98,89 ± 1,11 e
ĐN1N1	13,13 ± 1,88 bcd	55,39 ± 1,54 gh	100 ± 0,00 e
ĐN1N2	18,75 ± 1,25 efg	61,93 ± 0,39 ik	100 ± 0,00 e
ĐN2N1	25,00 ± 0,00 h	51,16 ± 1,16 fg	91,11 ± 2,22 dc
ĐN3N1	13,13 ± 0,64 bcd	41,93 ± 2,7 cd	71,67 ± 15 bc
ĐN5N1	21,88 ± 0,64 fgh	60,77 ± 2,31 hik	100 ± 0,00 e
BD6N1	18,13 ± 0,64 def	38,46 ± 3,08 c	58,34 ± 2,76 b
BD6N2	21,25 ± 1,25 efg	53,85 ± 1,54 fg	80,56 ± 2,76 cd
ĐN6N1	16,88 ± 3,14 cdef	56,93 ± 3,08 ghi	97,22 ± 2,78 e
ĐN7N1	10,63 ± 1,88 b	48,46 ± 2,31 ef	71,67 ± 1,67 bc
ĐN10N1	23,75 ± 1,25 gh	48,85 ± 1,93 ef	76,95 ± 0,84 c
ĐN9N1	12,50 ± 2,5 bc	53,85 ± 1,54 fg	79,72 ± 7,5 cd
ĐN9N2	20,00 ± 0,00 efg	55,39 ± 1,54 gh	100 ± 0,00 e
ĐN9N3	0,00 ± 0,00 a	30,00 ± 0,77 b	38,34 ± 0,56 a
BD8N1	0,00 ± 0,00 a	23,85 ± 0,77 a	30,56 ± 0,56 a

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau khác nhau có sự khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$).



Hình 3. Thử nghiệm đối kháng chủng vi nấm với *Corynespora cassiicola* khi cấy đối kháng cùng lúc. Chủng *C. cassiicola* (đĩa đối chứng) (a, b, c). Chủng ĐN9N2 đối kháng với nấm *C. cassiicola* (d, e, f) trên môi trường PGA khi cấy đối kháng cùng lúc

Kết hợp cả 2 nghiệm thức trên ta nhận thấy ở cả 2 nghiệm thức khả năng đối kháng qua các lần theo dõi không đồng đều giữa các chủng. Ở nghiệm thức 1 cho thấy các chủng BD1N1, BD3N1, BD4N1, ĐN1N1, ĐN2N1, ĐN5N1, ĐN10N1, ĐN9N1, ĐN9N2 thể hiện tỉ lệ đối kháng mạnh nhất tuy nhiên ở nghiệm thức 2 thì các chủng BD1N1, ĐN1N1, ĐN1N2, ĐN5N1, ĐN9N2 lại cho tỉ lệ đối kháng cao nhất. Điều này có thể cho giả thuyết rằng khi cấy trước 2 ngày nấm bệnh đã phát triển mạnh do đó dễ ngăn chặn sự phát triển của nấm bệnh thì các chủng vi nấm có thể tiết ra kháng sinh để ức chế. Trong khi cấy cùng lúc điều kiện dinh dưỡng tốt tạo điều kiện cạnh tranh giữa các chủng nấm bệnh và các chủng vi nấm nên khả năng ức chế phần lớn phụ thuộc vào sự cạnh tranh dinh dưỡng nên ở cả 2 nghiệm thức kết quả thu được có sự khác nhau.

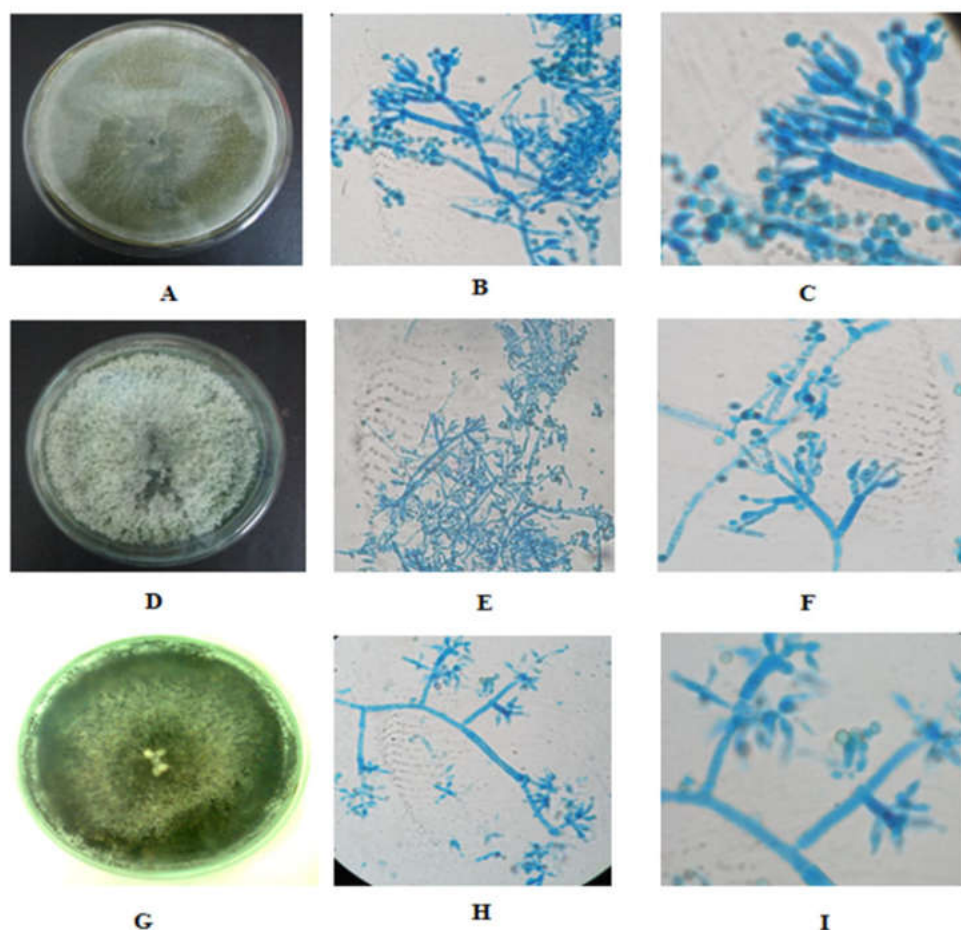
Dựa vào kết quả thu được, 3 chủng có khả năng đối kháng mạnh nhất là chủng BD1N1, ĐN9N2, ĐN5N1 và có tỉ lệ đối kháng hoàn toàn (100%) sau 7 và 10 ngày quan sát ở cả 2 nghiệm thức.

3.3 Một số đặc điểm sinh học của ba chủng vi nấm tuyển chọn

Chủng BD1N1 mọc sau 2 ngày nuôi cấy trên môi trường PGA, sau 7 ngày lan toàn bộ bề mặt đĩa nuôi cấy, ban đầu có màu trắng, khi phát sinh bào tử thì có màu xanh vàng, tơ nấm trắng ở rìa khuẩn lạc, dạng bề mặt khuẩn lạc hơi mịn, không có khía, mép khuẩn lạc mỏng, không có giọt tiết, khuẩn lạc không mùi, không tiết sắc tố ra môi trường (Hình 4.A). Đối với chủng ĐN9N2 khi quan sát đặc điểm khuẩn lạc trên thạch cho thấy ban đầu có màu trắng, khi phát sinh bào tử có màu trắng xanh, tơ nấm trắng ở bề mặt khuẩn lạc, lớp dưới có màu xanh lục sậm, dạng bề mặt khuẩn lạc gồ ghề, không có khía, mép khuẩn lạc mỏng, không có giọt tiết, khuẩn lạc không mùi,

không tiết sắc tố ra môi trường (Hình 4.D). Chủng ĐN5N1 mọc sau 1 ngày nuôi cấy trên môi trường PGA, ban đầu có màu trắng, có màu trắng xanh khi phát sinh bào tử, tơ nấm trắng ở bề mặt khuẩn lạc, lớp dưới có màu xanh lục sậm. Dạng bề mặt khuẩn lạc gồ ghề, không có khía, mép khuẩn lạc mỏng, không có giọt tiết, khuẩn lạc không mùi, không tiết sắc tố ra môi trường (Hình 4.F). Sau khi nhuộm để quan sát tơ nấm và bào tử dưới kính hiển vi quang học ở vật kính x40 và x100, cả 3 chủng trên đều có các đặc điểm như sợi nấm có vách ngăn ngang, giá sinh bào tử trần, không có đỉnh phồng to. Tế bào sinh bào tử trần hình bình, thể bình rõ rệt, bào tử đính hình thành từ những cụm trên những cuống bào tử đính, bào tử đính có dạng hình cầu, không có túi bao bọc.

Dựa vào đặc điểm của khuẩn lạc, đặc điểm vi học và dựa vào khóa phân loại Robert A. Samson (1984) có thể phân loại các chủng BD1N1, ĐN9N2, ĐN5N1 đều thuộc chủng *Trichoderma* sp..



Hình 4. Khuẩn lạc, tơ nấm, thể bình và bào tử các chủng vi nấm tuyển chọn BD1N1 (A, B, C), ĐN5N1 (D, E, F), ĐN9N2 (G, H, I)

3.4. Khảo sát hiệu quả đối kháng của các chủng vi sinh vật tuyển chọn với chủng nấm bệnh *C. cassiicola* trong môi trường lỏng

Thu bào tử vi nấm và tiến hành pha loãng ở mật độ chung (10^3 CFU/ 1 ml) sau đó thực hiện bổ sung vào 100 ml môi trường PGA lỏng với các công thức có sẵn và nuôi cấy, trong đó tổng mật độ nấm đối kháng và nấm bệnh ở các công thức thí nghiệm tương đương nhau (mật độ chung 10^3 CFU).

Sau khi khảo sát mật độ nấm bệnh theo thời gian ta thu được kết quả bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát hiệu quả đối kháng của các chủng vi sinh vật tuyển chọn với chủng nấm bệnh *C. cassiicola* trong môi trường lỏng

CÔNG THỨC	Mật độ nấm bệnh (CFU*) theo thời gian			
	Sau 2 ngày	Sau 4 ngày	Sau 6 ngày	Sau 8 ngày
<i>C. cassiicola</i>	$2,6.10^4 \pm 6,4.10^3$ b	$4,8.10^5 \pm 3,90.10^4$ b	$2,86.10^6 \pm 6,52.10^5$ b	$2,78.10^7 \pm 6,76.10^6$ b
BD1N1 + <i>C. cassiicola</i>	$1,16.10^1 \pm 3,32$ a	$1,67 \pm 0,84$ a	$0,00 \pm 0,00$ a	$0,00 \pm 0,00$ a
ĐN5N1 + <i>C. cassiicola</i>	$2,84.10^2 \pm 91,19$ a	$16,11 \pm 3,11$ a	$0,00 \pm 0,00$ a	$0,00 \pm 0,00$ a
ĐN9N2 + <i>C. cassiicola</i>	$5,53.10^1 \pm 12,33$ a	$3,44 \pm 2,51$ a	$0,00 \pm 0,00$ a	$0,00 \pm 0,00$ a
BD1N1 + ĐN5N1 + <i>C. cassiicola</i>	$9,44.10^1 \pm 56,51$ a	$5,11 \pm 2,06$ a	$0,00 \pm 0,00$ a	$0,00 \pm 0,00$ a
BD1N1 + ĐN9N2 + <i>C. cassiicola</i>	$2,79.10^1 \pm 10,32$ a	$2,89 \pm 1,50$ a	$0,00 \pm 0,00$ a	$0,00 \pm 0,00$ a
ĐN5N1 + ĐN9N2 + <i>C. cassiicola</i>	$6,89.10^1 \pm 6,76$ a	$4,33 \pm 2,04$ a	$0,00 \pm 0,00$ a	$0,00 \pm 0,00$ a
BD1N1 + ĐN5N1 + ĐN9N2 + <i>C. cassiicola</i>	$1,33.10^1 \pm 2,85$ a	$3,78 \pm 2,32$ a	$0,00 \pm 0,00$ a	$0,00 \pm 0,00$ a

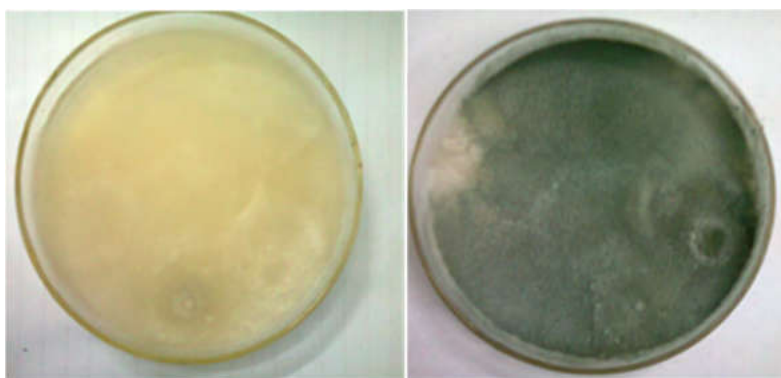
Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau khác nhau có sự khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$)

Khả năng ức chế nấm bệnh *C. cassiicola* của 3 chủng vi sinh vật tuyển chọn trên môi trường PGA lỏng trong phòng thí nghiệm được thể hiện qua mật độ nấm bệnh khi quan sát theo thời gian. Mật độ nấm bệnh càng giảm thì khả năng đối kháng với nấm bệnh của chủng vi nấm phân lập được càng cao.

Bảng 4 cho thấy, chỉ sau 2 ngày các công thức có sử dụng các chủng vi nấm đối kháng có mật độ thấp hơn hẳn và có ý nghĩa thống kê so với công thức đối chứng không xử lí ở tất cả các thời điểm theo dõi. Ở công thức đối chứng, mật độ nấm bệnh *C. cassiicola* tăng lên rõ rệt theo thời gian tại các thời điểm quan sát, còn ở các công thức còn lại có xử lí hỗn hợp vi nấm đối kháng với nấm *C. cassiicola* thì mật độ nấm bệnh giảm đi rõ rệt thậm chí không còn xuất hiện ở các nghiệm thức sau 6 và 8 ngày

theo dõi. Mật độ nấm bệnh ở các công thức có vi nấm phân lập giảm từ 98,91 đến 99,96 % so với công thức đối chứng sau 2 ngày, giảm từ 99,997 đến 99.9997% so với công thức đối chứng sau 4 ngày và sau 6 đến 8 ngày thì tỉ lệ này là 100% ở tất cả các nghiệm thức. Điều này chứng tỏ khả năng đối kháng của các chủng vi nấm được lựa chọn rất tốt và sự khác biệt về khả năng đối kháng với nấm bệnh ở các chủng vi nấm phân lập là không đáng kể.

Trong các công thức xử lí vi sinh vật đối kháng thì công thức 2 (Chủng BD1N1 + *C. cassiicola*) tỏ ra có hiệu quả đối kháng với nấm bệnh *C. cassiicola* mạnh nhất ở các thời điểm theo dõi (sau 2 ngày chỉ còn $1,6.10^1$ (CFU), sau 4 ngày chỉ còn 1,67 (CFU) và biến mất hoàn toàn sau 6 ngày theo dõi).



Hình 5. Bào tử nấm *C. cassiicola* ở nghiệm thức có bổ sung vi nấm đối kháng quan sát sau 2 ngày và 3 ngày sau khi khảo sát trên đĩa thạch môi trường PGA

Khi quan sát mật độ vi nấm sau 4 ngày nuôi cấy, kết quả thu nhận được thể hiện qua bảng 5

Khi kiểm tra mật độ các chủng nấm đối kháng sau 4 ngày theo dõi (bảng 5) ta thấy ở các công thức thì mật độ nấm đối kháng đều tăng lên sau 4 ngày nuôi cấy so với mật độ bổ sung ban đầu (1.10^3 CFU) với tất cả các nghiệm thức có bổ sung vi nấm đối kháng, còn ở nghiệm thức đối chứng (không bổ sung vi nấm đối kháng) thì không có sự xuất hiện của nấm khác ngoài *C. cassiicola*. Điều này cho thấy khả năng phát triển của các chủng vi nấm thí nghiệm đối kháng rất tốt và nấm bệnh *C. cassiicola* không có khả năng cạnh tranh và ức chế các chủng vi nấm được phân lập.

Tuy nhiên ở công thức 2 (Chủng BD1N1 + *C. cassiicola*) thể hiện mật độ lớn nhất ($1,03.10^6$ CFU) và khác biệt về ý nghĩa thống kê so với các công thức còn lại.

Bảng 5. Mật độ vi nấm phân lập được khi nuôi cấy đối kháng trên môi trường PGA lỏng sau 4 ngày nuôi cấy

Công thức	Mật độ <i>Trichoderma</i> khảo sát sau 4 ngày cấy đối kháng
<i>C. cassiicola</i>	0.00 ± 0.00 a
BD1N1 + <i>C. cassiicola</i>	1,03. 10⁶ ± 5,7.10⁵ b
ĐN5N1+ <i>C. cassiicola</i>	1,67.10 ⁵ ± 2,5.10 ⁴ a
ĐN9N2 + <i>C. cassiicola</i>	1,34. 10 ⁵ ± 8,28.10 ⁴ a
BD1N1 + ĐN5N1 + <i>C. cassiicola</i>	1,41.10 ⁵ ± 1,14.10 ⁵ a
BD1N1 + ĐN9N2 + <i>C. cassiicola</i>	1,63.10 ⁴ ± 7,46.10 ³ a
ĐN5N1 + ĐN9N2 + <i>C. cassiicola</i>	2,07.10 ⁵ ± 1,23.10 ⁵ a
BD1N1 + ĐN5N1 + ĐN9N2 + <i>C. cassiicola</i>	3,46.10 ⁵ ± 1,46.10 ⁵ a

Kết hợp cả 2 chỉ tiêu theo dõi ta đều thấy được khả năng đối kháng và tốc độ phát triển lớn nhất khi thực hiện đối kháng trong môi trường lỏng thể hiện ở công thức 2 (Chủng BD1N1 + *C. cassiicola*). Như vậy, công thức xử lý riêng lẻ nấm đối kháng với nấm bệnh cho ra kết quả tốt nhất.

4. Kết luận

Đã phân lập và làm thuần được 17 chủng vi nấm từ 20 mẫu đất. 100% các chủng phân lập được đều có khả năng đối kháng với nấm *C. cassiicola*. Mức độ đối kháng của các chủng vi nấm phân lập được biến động tùy theo từng chủng và tăng lên theo thời gian quan sát. Cả 3 chủng BD1N1, ĐN9N2, ĐN5N1 có khả năng đối kháng mạnh, cả 3 chủng này đều thuộc chủng *Trichoderma* sp.. Trong đó chủng BD1N1 là chủng có khả năng đối kháng mạnh nhất và có tiềm năng ứng dụng tốt nhất.

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*, kì 1 + 2, tháng 2/2006, tr. 50 -52.
2. Nguyễn Thị Huệ (1997), *Cây cao su – Kiến thức tổng quát và kỹ thuật nông nghiệp*, Nxb Trẻ.
3. Phạm Thị Minh Kiều (2009), *Tuyển chọn dòng vi khuẩn đối kháng và xác định các điều kiện nhân sinh khối dòng vi khuẩn chọn lọc*, Luận văn Thạc sĩ, Trường Đại học Cần Thơ.
4. Ramezani H, (2008), *Biological Control of Root-Rot of Eggplant Caused by Macrophomina phaseolina*, *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 4 (2): 218-220.
5. Gowda P. Y., Nambiar K. K. N., (1991), “In vitro interaction of antagonistic fungi with *Thielaviopsis paradoxa*, the pathogen of coconut stem bleeding disease”, *Journal of Plantation Crops*, Vol. 18(Supplement), pp. 233-238.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 09-8-2015; ngày phân biện đánh giá: 04-9-2015;
ngày chấp nhận đăng: 24-9-2015)