

Bài báo nghiên cứu

**DÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KIỂM SOÁT SINH HỌC BỆNH RỤNG LÁ
CORYNESPORA BẰNG VI KHUẨN *Bacillus* sp. S29
TỪ IN-VITRO, EX – VIVO ĐẾN QUY MÔ VƯỜN ƯƠM**

Nguyễn Văn Minh^{1*}, Lê Thanh Quỳnh Như¹, Nguyễn Thành Danh¹,
Nguyễn Anh Nghĩa², Dương Nhật Linh, Trần Thị Ái Ni³,
Nguyễn Bảo Quốc⁴, Lý Văn Dương⁵, Trịnh Ngọc Nam⁶, Nguyễn Thanh Duy⁷

¹Khoa Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam

³Công ty TNHH MIDOLI, Việt Nam

⁴Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông lâm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁵Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Bình Phước, Việt Nam

⁶Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁷Đại học San Francisco, Hoa Kỳ

*Tác giả liên hệ: Nguyễn Văn Minh – Email: minh.nv@ou.edu.vn

Ngày nhận bài: 04-4-2020; ngày nhận bài sửa: 27-7-2020, ngày chấp nhận đăng: 22-9-2020

TÓM TẮT

Nghiên cứu này, nhằm đánh giá khả năng kiểm soát sinh học bệnh rụng lá *Corynespora* trên cây cao su do nấm *Corynespora cassiicola* gây ra bằng vi khuẩn *Bacillus* sp. S29 từ in vitro đến quy mô vườn ươm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, dịch nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* sp. S29 có khả năng ức chế nấm *C. cassiicola* trong đĩa petri ở điều kiện in vitro và trên lá cao su trong điều kiện ex vivo. Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. S29 được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử kết hợp với các thử nghiệm sinh hóa đặc trưng cho kết quả tương đồng với loài *B. subtilis*. Kết quả trên quy mô vườn ươm cũng cho thấy dịch lên men *B. subtilis* S29 có khả năng kiểm soát sinh học nấm *C. cassiicola* tốt, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với nghiệm thức đối chứng sau 3 lần xử lý. Qua đó cho thấy, chủng *B. subtilis* S29 có tiềm năng giúp phòng trừ sinh học bệnh rụng lá cao su.

Từ khóa: *Bacillus subtilis* S29; *Corynespora cassiicola*; ex-vivo; quy mô vườn ươm

1. Giới thiệu

Bệnh rụng lá cao su do nấm *Corynespora cassiicola* gây ra bắt đầu xuất hiện tại Việt Nam vào năm 1999, bệnh bộc phát mạnh trên dòng vô tính (dvt) RRIC 104 và một số dòng vô tính khác RRIV 2; RRIV 3; PB 260 và RRIC 110 gây ảnh hưởng đến sức sống và sản lượng mủ.

Cite this article as: Nguyen Van Minh, Le Thanh Quynh Nhu, Nguyen Thanh Danh, Nguyen Anh Nghia, Duong Nhat Linh, Tran Thi A Ni, Nguyen Bao Quoc, Ly Van Duong, Trinh Ngoc Nam, & Nguyen Thanh Duy (2020). The biocontrol of *Corynespora cassiicola* causing the corynespora leaf fall (CLF) disease on rubber tree by *Bacillus* sp. S29 from in vitro, ex-vivo to nursery scale. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 17(9), 1610-1620.

Hiện nay, việc đối phó với nấm bệnh *C. cassiicola* chủ yếu sử dụng biện pháp hóa học để kiểm soát, điều này đã gây nên không ít tác hại đối với môi trường, suy thoái đất và dẫn đến hiện tượng kháng thuốc ở cây cao su (Zhao et al., 2010) hoặc ảnh hưởng đến sức khỏe người trồng. Để khắc phục những nhược điểm này, biện pháp sinh học đang được các nhà khoa học đầu tư nghiên cứu, ứng dụng và khuyến khích sử dụng. Một trong những đối tượng vi sinh vật có nhiều nghiên cứu và lựa chọn là vi khuẩn *Bacillus*. Chúng có khả năng tạo enzym ngoại bào, tiết ra các hợp chất kháng nấm kháng khuẩn an toàn cho con người và môi trường. Trong những năm gần đây, các loài vi khuẩn *Bacillus* đã được chú ý nhiều trong việc dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học nhiều loại nấm bệnh (Zhao et al., 2013; To et al., 2014). Năm 2014, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã xác định được hai chủng vi khuẩn nội sinh cây cao su *Bacillus* sp. T9 và *Bacillus* sp. T16 có khả năng diệt vi nấm *C. cassiicola* ở nồng độ dịch nguyên (Nguyen et al., 2014). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá khả năng kiểm soát sinh học bệnh rụng lá *Corynespora* bằng vi khuẩn *Bacillus* sp. S29 từ *in-vitro*, *ex – vivo* đến quy mô vườn ươm.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. S29 phân lập từ vùng đất trồng cao su tại huyện Chơn Thành, tỉnh Bình Phước. Chủng nấm *C. cassiicola* gây bệnh trên cây cao su phân lập tại thị xã Đồng Xoài, tỉnh Bình Phước. Hai chủng này được cung cấp bởi Phòng Thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh.

Vườn nhân Trại thực nghiệm Cao su Lai Khê, Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam, xã Lai Hưng, huyện Bàu Bàng, tỉnh Bình Dương. Dòng cao su vô tính thí nghiệm: RRIV 4.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Lên men chủng *Bacillus* sp. S29

Chủng *Bacillus* sp. được hoạt hóa qua đêm trong 5mL môi trường Nutrient broth, lắc 200rpm ở 37°C. Nhân giống cấp 1: bổ sung 10% thể tích dịch khuẩn *Bacillus* sp. S29 đã hoạt hóa vào 100ml môi trường tối ưu hóa chủng S29: tinh bột: 20,15 g/ L, pepton 26,15 g/ L, KH₂PO₄ 0,71 g/ L, MgSO₄ 1,05 g/ L. Nuôi cấy lắc 200 vòng/ phút ở 37°C/48 giờ. Tiến hành nhân giống cấp 2 bằng cách bổ sung 10% thể tích dịch khuẩn nhân giống cấp 1 vào 3L môi trường tối ưu hóa. Lên men bằng nồi lên men Bioflo 110 trong 54 giờ (tốc độ cánh khuấy: 200 vòng/phút, DO: 100%, pH: 7, nhiệt độ: 30°C) và thu dịch nuôi cấy.

2.2.2. Khảo sát hoạt tính kháng nấm *C. cassiicola* của dịch lên men

Dịch lên men được tiến hành li tâm ở 13.000 vòng/ phút trong 10 phút. Dịch nổi được lọc qua màng lọc 0,2µm. Khảo sát tác động kháng nấm của dịch lọc bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch.

2.2.3. Đánh giá khả năng gây bệnh của nấm *C. cassiicola* trên lá cắt rời (*ex - vivo*)

Chọn lá cao su 10-15 ngày tuổi, không bị nhiễm bệnh, lau sạch bằng bông thấm cồn 70°, sau đó rửa với thuốc chống mốc sodium benzoate trong 30 giây và rửa lại 3 lần với nước cất. Thấm khô rồi đặt úp lá vào hộp nhựa có đặt bông thấm đã được làm ẩm bằng nước cất vào đáy hộp, đặt tiếp 2 ống nhựa và một lớp lưới sắt lên trên (ống nhựa và lưới sắt này giúp cho lá không tiếp xúc trực tiếp với bông ướt). Nhỏ dịch nấm có mật độ 10^6 CFU/mL lên hai bên gân chính của lá, mỗi bên 4 giọt (1 giọt = 20 μ l). Theo dõi 3 lần vào các thời điểm 5, 7 và 9 ngày sau khi lây nhiễm để đánh giá cấp bệnh theo phương pháp của Nguyen và cộng sự (2008).

2.2.4. Phân tích tế bào xâm nhiễm

Mẫu lá sau khi gây nhiễm nấm bệnh được cắt thành lát nhỏ khoảng 0,5-1,0 cm ở các khoảng thời gian: sau 2 ngày, sau khi xuất hiện tơ nấm (biểu hiện bệnh cấp 4). Sử dụng hỗn hợp acid lactic/phenol/glycerol/nước cất/ethanol theo tỉ lệ 1:1:1:1:8, đun đến khi lá chuyển sang màu trắng rồi đưa qua nước cất. Mẫu lá được quan sát dưới kính hiển vi với vật kính 10X và 40X để đánh giá mức độ xâm nhiễm. (Purwantara et al., 1987).

2.2.5. Đánh giá hiệu quả kiểm soát nấm *C. cassiicola* trên lá cắt rời (*ex- vivo*)

Nhỏ 20 μ L dịch bào tử nấm (10^6 CFU/mL) lên hai bên gân chính của lá, mỗi bên 4 giọt. Theo dõi mẫu lá ở nhiệt độ phòng. Sau 6 ngày gây nhiễm, tiến hành phun 20 μ L dịch lọc vi khuẩn *Bacillus* sp. S29 lên vị trí nhỏ dịch nấm và quan sát ở các ngày thứ 7, ngày thứ 9. Mẫu lá làm đối chứng được phun 20 μ L NaCl 0,85% có chứa 0,05% Tween 80. Các mẫu lá trong thí nghiệm được tiến hành phân tích tế bào xâm nhiễm. Thí nghiệm được thực hiện với 10 lần lặp lại. Xử lý thống kê ANOVA một yếu tố bằng phần mềm Statgraphics Plus 3.0.

2.2.6. Định danh chủng vi khuẩn tiềm năng

Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. S29 được định danh bằng phương pháp phân tích trình tự 16S rDNA và so sánh sự tương đồng trên Genbank. Sản phẩm PCR 16S rDNA của *Bacillus* sp. được gửi dịch vụ định danh sinh học phân tử ở Công ty Macrogen, Hàn Quốc kết hợp các kiểm chứng về hình thái, thử nghiệm sinh hóa (Ruiz-Garcia et al., 2005).

2.2.7. Đánh giá hiệu quả kiểm soát nấm *C. cassiicola* trên quy mô vườn ươm

Thí nghiệm được bố trí gồm 3 nghiệm thức, thí nghiệm được lặp lại 3 lần, 5 chồi/ô cơ sở; 15 chồi/nghiệm thức. Cây cao su thử nghiệm được chọn có lá từ 7-12 ngày tuổi, không bệnh và sau đó được lây bệnh nhân tạo bằng cách phun dịch bào tử nấm *C. cassiicola*, phun ướt đều toàn bộ tán lá thử nghiệm (cả mặt trên và mặt dưới lá). Sau khi lá cây có triệu chứng nhiễm bệnh, tiến hành phun xử lý bệnh như các nghiệm thức được trình bày ở Bảng 1, phun 3 lần với chu kỳ 7 ngày/lần. Ghi nhận cấp bệnh một lần trước khi tiến hành chủng dịch bào tử *C. cassiicola* và 3 lần tiếp theo, vào thời điểm 6 ngày sau mỗi đợt phun xử lý. Quan trắc cấp bệnh trên 5 lá chét giữa ở mỗi chồi và đánh giá cấp bệnh theo hướng dẫn của Quy trình kỹ thuật (Vietnam Rubber Group, 2012).

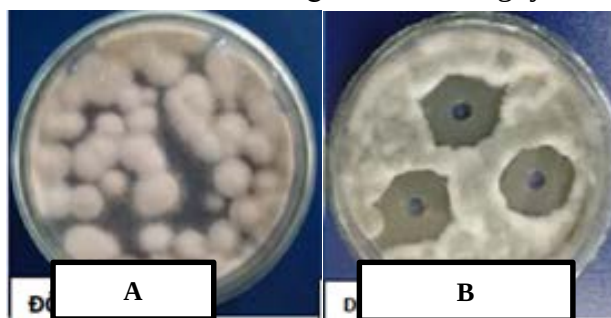
Bảng 1. Bố trí nghiệm thức trên quy mô vườn ươm

Nghiệm thức (NT)	Nội dung
NT 1 (Đối chứng)	Phun chất bám dính BDNH 2000 nồng độ 0,2% lên lá cây
NT2	Phun dịch lên men vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. S29 + 0,2% BDNH 2000
NT 3	Phun dịch lên men vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. S29+ 0,2% BDNH 2000, phun lần đầu lên lá và đất chung quanh gốc cây

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khảo sát khả năng kháng nấm *C. cassiicola* của dịch nuôi cấy *in-vitro*

Sau khi lên men 54 giờ nổi lên men Bioflo 110, tiến hành thu dịch nuôi cấy. Dịch nuôi cấy được nhỏ vào lỗ thạch sau khi đã nuôi cấy nấm *C. cassiicola* 2 ngày. So với đĩa đối chứng ở Hình 2A, dịch lên men sau khi li tâm loại bỏ sinh vẩn cho vòng kháng nấm xung quanh lỗ thạch với đường kính vòng kháng nấm là $25,73 \pm 0,40\text{mm}$ (Hình 1B). Trong khi đĩa đối chứng nấm bệnh *C. cassiicola* mọc sát lỗ thạch (Hình 1A). Như vậy cho thấy, dịch lọc nuôi cấy chủng *Bacillus* sp. S29 trong môi trường tối ưu có khả năng ức chế sự phát triển của chủng nấm *C. cassiicola* ở nồng độ dịch lọc nguyên trong điều kiện *in vitro*.

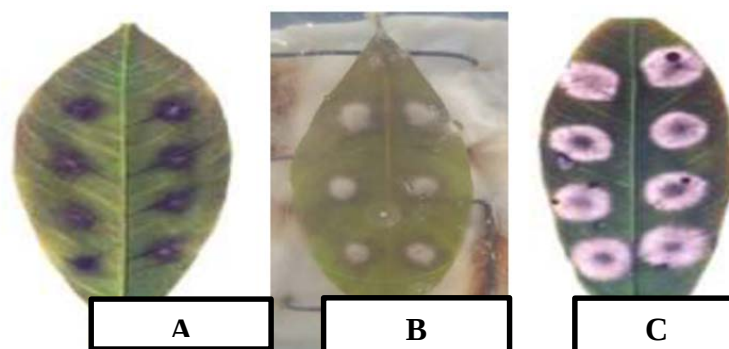


Hình 1. Thử nghiệm kháng nấm *C. cassiicola* của dịch lọc *Bacillus* sp. S29 sau 5 ngày cấy nấm bệnh

(A) *C. cassiicola* (đĩa đối chứng), (B) Dịch lọc vi khuẩn

3.2. Đánh giá khả năng gây bệnh của nấm *C. cassiicola* trên lá cắt rời (*ex-vivo*)

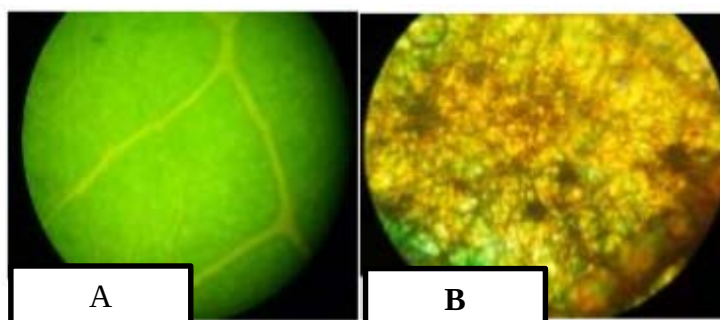
Sau 8 ngày gây nhiễm nấm bệnh trên lá cây cao su, mức độ gây nhiễm được đánh giá thuộc cấp 4 (Hình 2B), vết bệnh lớn hơn, vết bệnh nhìn thấy to rõ và xuất hiện sợi nấm xung quanh vị trí nhỏ dịch nấm và gần tương đồng với mẫu lá đối chứng ở mức độ 4 (Hình 2C). Như vậy, nấm *C. cassiicola* phân lập có khả năng gây bệnh trên lá cao su ở cấp độ 4 trong điều kiện *ex vivo*.



Hình 2. Thử nghiệm khả năng gây bệnh của nấm *C.cassiicola* trên lá cắt rời sau 8 ngày
(A) Đối chứng cấp độ 3,

(B) Thí nghiệm lá cao su gây nhiễm đạt cấp độ 4, (C) Đối chứng cấp độ 4

Kết quả phân tích tính xâm nhiễm của nấm *C. cassiicola* trên các mẫu lá bệnh được thể hiện ở Hình 5. Đối với mẫu lá đối chứng, tế bào của lá cây cao su không thấy xuất hiện nấm bệnh và tế bào không bị tổn hại (Hình 3A). Đối với mẫu lá ở mức độ bệnh cấp 4, các sợi nấm nhìn rất rõ và to, tế bào lá cây cao su bị nấm đâm xuyên và tạo thành những vết sẫm màu (Hình 3B).

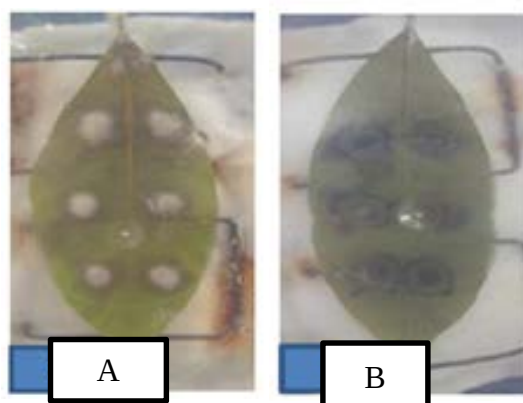


Hình 3. Kết quả phân tích tính xâm nhiễm của nấm *C.cassiicola*
trên mẫu lá bệnh cấp độ 4

(A) Lá đối chứng, (B) Lá bệnh cấp độ 4

3.3. **Đánh giá hiệu quả kiểm soát nấm *C. cassiicola* trên lá cắt rời (ex-vivo)**

So với nghiệm thức đối chứng (Hình 4A), sau 2 ngày tơ nấm mọc lan ra. Những ngày sau đó (ngày thứ 10 và 12) tơ nấm mọc đầy vị trí cây. Đối với nghiệm thức dịch lọc, sau 2 ngày tơ nấm tại tâm dịch nguyên có hiện tượng giảm dần, những ngày sau đó (ngày 10 và 12) tơ nấm giảm đi nhiều so với đối chứng (Hình 4B). Kết quả khả năng kiểm soát nấm *C. cassiicola* trong điều kiện ex vivo của vi khuẩn *Bacillus* sp. S29 được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 6.



Hình 4. Thử nghiệm khả năng kháng nấm *C. cassiicola* trên lá cao su tách rời của chủng *Bacillus* sp. S29 sau 6 ngày gây nhiễm. (A) Lá nhiễm nấm *C. cassiicola*, không phun dịch lọc vi khuẩn (Đối chứng), (B) Lá nhiễm nấm *C. cassiicola*, được phun dịch lọc vi khuẩn *Bacillus* sp. S29

Bảng 2. Kết quả ức chế *C. cassiicola* ở điều kiện ex-vivo của chủng *Bacillus* sp. S29

		Thời gian phun dịch vi khuẩn		
		Ban đầu	Sau 24h	Sau 72h
Dịch lọc	ĐKTB	14,50 ± 0,45 ^b	15,50 ± 0,55 ^{ab}	15,35 ± 0,25 ^b
	CB TB	4	4	4
Đối chứng	ĐKTB	12,25 ± 0,33 ^a	16,00 ± 0,41 ^a	20,55 ± 1,55 ^a
	CB TB	3	4	4

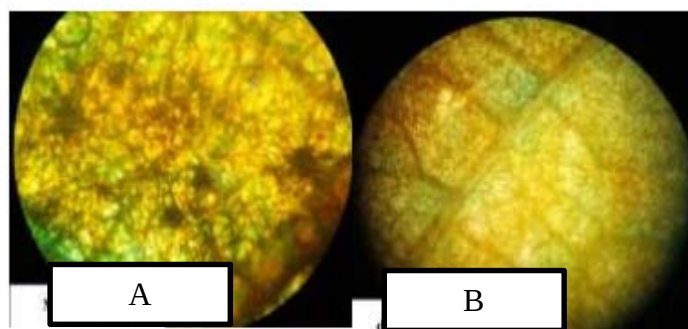
ĐKTB: đường kính trung bình (mm)

CB TB: cấp bệnh trung bình.

Trong cùng một cột, các trị số có cùng mẫu tự không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử Duncan.

3.4. Phân tích tính xâm nhiễm của nấm *C. cassiicola* trên lá sau khi xử lý dịch lọc vi khuẩn *Bacillus* sp. S29

Các mẫu lá sau khi gây nhiễm ở cấp 4, mẫu đã được xử lý bằng dịch kháng nấm và mẫu lá không xử lý làm đối chứng được thực hiện phân tích tế bào xâm nhiễm. Đối với mẫu lá ở mức độ bệnh cấp 4 không xử lý dịch lọc vi khuẩn, các sợi nấm nhìn rất rõ và to, tế bào lá cây cao su bị nấm đâm xuyên và tạo thành những vết sẫm màu (Hình 5A). Đối với mẫu lá ở mức độ bệnh cấp 4 đã được xử lý bằng dịch lọc vi khuẩn, các sợi nấm không xuất hiện trong tế bào lá cao su, những chỗ nấm đâm xuyên gây bệnh từ màu sẫm chuyển sang màu sáng hơn (Hình 5B). Như vậy, dịch lọc vi khuẩn *Bacillus* sp. S29 có khả năng ức chế nấm *C. cassiicola* trong điều kiện ex vivo.

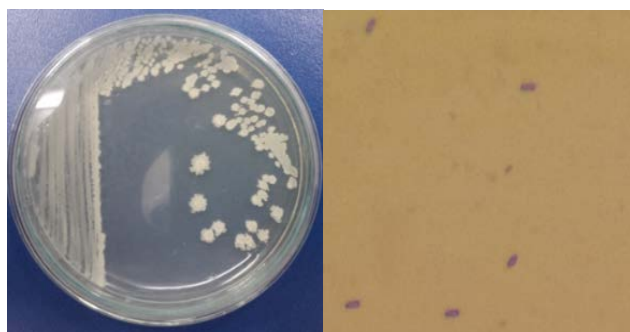


Hình 5. Kết quả phân tích tính xâm nhiễm của nấm *C. cassiicola* trên mẫu lá bệnh sau khi xử lí bằng dịch kháng nấm. (A) Mẫu lá bệnh cấp độ 4, (B) Mẫu lá được xử lí bằng dịch kháng nấm

3.5. Định danh chủng vi khuẩn tiềm năng

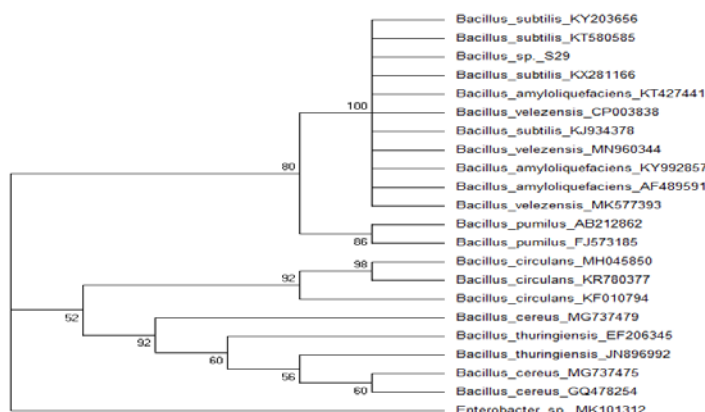
Để an toàn trong việc ứng dụng chủng *Bacillus* sp. S29 ra thực tế, chủng *Bacillus* sp. S29 đã được định danh.

Kết quả kiểm tra hình thái đại thể, vi thể chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. S29 cho thấy: Hình trực, xếp riêng lẻ, Gram (+), có bào tử, catalase dương tính. Khuẩn lạc màu trắng đục, bờ tròn viền răng cưa, bề mặt khô. Hình 6 thể hiện kết quả đại thể, vi thể chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. S29



Hình 6. Hình ảnh đại thể, vi thể của vi khuẩn *Bacillus* sp. S29

Dựa vào kết quả trình tự nhận được, kết quả tìm kiếm trên GenBank (NCBI), phân tích cây phả hệ phân tử đã xác định được chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. S29 có chỉ số tương đồng (Ident) đạt 100%, độ bao phủ 100%, giá trị mong đợi E-value 0.0 và giá trị bootstrap đạt 100% với đồng 3 loài *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* và *Bacillus velezensis* (Hình 7).



Hình 7. Cây phả hệ phân tử của chủng *Bacillus* sp. S29

Bảng 3. Kết quả định danh sinh hóa

STT	Thử nghiệm sinh hóa	<i>Bacillus</i> sp. S29
1	Lactose	-
2	Phân giải Tween 20	-
3	Phân giải Tween 80	+
4	Phân giải arginine	+
5	ONPG	+
Tên loài		<i>Bacillus subtilis</i>

Từ kết quả giải trình tự kết hợp với kết quả xác định bằng hình thái (Hình 8) và thử nghiệm sinh hóa (Bảng 3) nhằm phân biệt các loài, chúng tôi kết luận chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. S29 có kết quả định danh phù hợp với loài *B. subtilis*. *B. subtilis* là loài vi khuẩn thuộc danh mục vi khuẩn an toàn theo GRAS (Generally Recognized as Safe) của FDA (GRAS, 2018). Do vậy, *B. subtilis* đã được ứng dụng nhiều trong y dược và thực phẩm, nông nghiệp. Chủng *B. subtilis* S29 trong nghiên cứu này được tiếp tục các nghiên cứu tiếp theo tiến tới thí nghiệm thực tế ở vườn ươm.

3.6. Đánh giá hiệu quả kiểm soát nấm *C. cassiicola* trên quy mô vườn ươm

Chỉ số bệnh (CSB) là chỉ tiêu quan trọng dùng để đánh giá bệnh hại trên các loại cây trồng, CSB nói lên mức độ của bệnh. Khi bắt đầu thí nghiệm, những chồi được chọn để bố trí thí nghiệm ở giai đoạn lớn hơn giai đoạn nhú chân chim và chưa thấy xuất hiện triệu chứng của bệnh rụng lá *Corynespora*. Kết quả sau quá trình làm thí nghiệm, diễn biến CSB thể hiện ở Bảng 4.

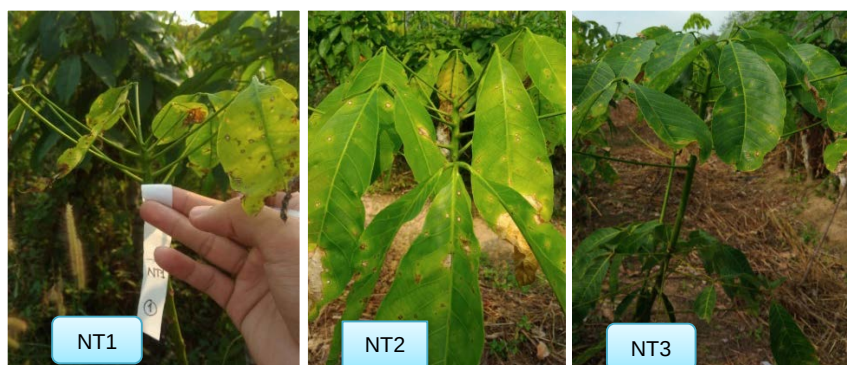
Bảng 4. Diễn biến của chỉ số bệnh sau các lần xử lý

Thử nghiệm	Trước khi xử lý bệnh	Chỉ số bệnh (%) sau xử lý		
		Lần 1	Lần 2	Lần 3
NT 1 (Đối chứng)	16,53 ± 1,64 ^a	37,87 ± 2,10 ^a	71,47 ± 12,81 ^a	88,53 ± 4,73 ^a
NT 2	17,33 ± 0,75 ^a	38,93 ± 8,89 ^a	55,47 ± 14,55 ^b	71,73 ± 10,94 ^b
NT 3	17,87 ± 0,38 ^a	38,67 ± 3,29 ^a	56,00 ± 4,57 ^b	65,87 ± 5,85 ^b
CV%	3,35	7,17	10,03	6,62

Trong cùng một cột số liệu, các giá trị trung bình có cùng mẫu tự thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$ qua phép thử Duncan.

Với hai lần quan trắc đầu tiên, cho thấy nghiệm thức 1 có CSB cao nhất (71,466%) khác biệt có ý nghĩa so với hai nghiệm thức còn lại. Nghiệm thức 2, nghiệm thức 3 lần lượt có CSB là 55,467%, 56% thấp hơn nghiệm thức 1. Quan sát trên lá sau khi xử lý lần 2, ở nghiệm thức 1 lá đã bắt đầu rụng, bệnh đã đạt tới cấp 5.

Ở lần quan trắc thứ 3: Nghiệm thức 1 có CSB cao nhất (88,533%) khác biệt rất có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại. Nghiệm thức 2, nghiệm thức 3 có CSB lần lượt là 71,733%, 65,867% thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức 1. Quan sát trên lá sau khi xử lý lần 3, ở nghiệm thức 1 lá đã rụng hết, bệnh đã đạt tới cấp 5.



Hình 8. Hình ảnh các nghiệm thức sau lần xử lý thứ ba. (NT1) Chỉ phun bào tử nấm *C. cassiicola* (đối chứng), (NT2) phun dịch vi khuẩn *B. subtilis* S29 lên lá, (NT3) phun dịch vi khuẩn *B. subtilis* S29 lên lá và tưới gốc

Qua đó cho thấy sau 3 lần xử lý thì chế phẩm vi khuẩn *Bacillus subtilis* S29 có khả năng kiểm soát bệnh rụng lá *Corynespora*. Nghiệm thức phun chế phẩm lên lá so với nghiệm thức vừa phun chế phẩm lên lá vừa tưới chế phẩm xuống gốc thì không có sự khác biệt.

Thuốc trị nấm hóa học Vixazol 275SC đang được sử dụng trong điều trị bệnh rụng lá *Corynespora*, tuy nhiên có chứa gốc Carbendazim có khả năng gây ung thư cho người sử dụng nên theo quyết định số 03/QĐ-BNN-BVTV thì thuốc này nằm trong danh mục thuốc bị cấm. Hiện nay, các nhà hóa học phải tìm hợp chất khác thay thế hoạt chất Carbendazim này, tuy nhiên thì việc sử dụng thuốc hóa học vẫn gây hại cho môi trường và người sử dụng. Do đó việc sử dụng chế phẩm sinh học vẫn là một giải pháp tốt và hiệu quả vì nó vừa an toàn cho người sử dụng vừa thân thiện với môi trường.

4. Kết luận

Ở nghiên cứu này, chúng tôi thu được dịch nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* sp. S29 có khả năng ức chế nấm *C. cassiicola* trong đĩa petri ở điều kiện *in vitro* và trên lá cao su trong điều kiện *ex vivo*. Chủng vi khuẩn này đã được xác định thuộc *B. subtilis*, là chủng vi sinh thuộc nhóm an toàn theo danh mục GRAS của FDA nên có thể ứng dụng sản xuất chế phẩm sinh học. Dịch nuôi cấy *B. subtilis* S29 được xác định là có khả năng kiểm soát bệnh rụng lá *Corynespora* trên cây cao su ở quy mô vườn ươm.

- ❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.
- ❖ **Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này là một phần nội dung trong đề tài nghiên cứu khoa học cấp tỉnh Bình Phước – “Nghiên cứu sản phẩm vi khuẩn *Bacillus* spp. tự do và nội sinh trong cây cao su từ quy mô ex vivo đến in vivo nhằm phòng trừ sinh học bệnh rụng lá cây cao su *Corynespora* tại Bình Phước” theo Hợp đồng số 217/ HĐ – SKHCN ngày 14 tháng 3 năm 2017 giữa Sở Khoa học và Công nghệ Bình Phước và Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, do Thạc sĩ Nguyễn Văn Minh làm chủ nhiệm. Chúng tôi xin cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Bình Phước đã tài trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Generally Recognized as Safe (GRAS) (2018). Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food (Partial List), Retrieved April 20, 2020, from <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/microorganisms-microbial-derived-ingredients-used-food-partial-list>
- Nguyen, V. M., Mai, H. P., Vo, N. Y. N., Duong, N. L., & Nguyen, A. N. (2014). Sang loc vi sinh vat noi sinh cay cao su co kha nangkiem soat sinh hoc vi nam *Corynespora cassicola* [Screening of endophytes from rubber trees (*Hevea brasiliensis*) for biological control of *Corynespora cassicola*]. *Journal of Biology*, 36(1se), 173-179. doi: 10.15625/0866-7160/v36n1se.4390
- Nguyen, A. N., Jugah, K., Sunderasan, E., Mohd, P. A., Adam, M., & Suhaimi, N. (2008). Morphological and inter simple sequence repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. *Mycopathologia*, 166(4), 189-201. doi: 10.1007/s11046-008-9138-8
- Purwantara, A. A (1987). Histological study of Hevea leaves infected by *Corynespora cassicola* (Berk. & Curt.) Wei. *Menara Perkebunan*, 55, 47-4900.
- To, H. S., Nguyen, T. D. T., Huynh, T. T. N., Vo, N. Y. N., Duong, N. L., & Nguyen, V. M. (2013). Sang loc *Bacillus* co kha nangkiem soat sinh hoc nam *Corynespora cassicola* [Screening of *Bacillus* spp for biocontrol *Corynespora cassicola* and stimulate plant growth]. *National Biotechnology Conference 2013*, 2, 513-517.
- Ruiz, -G. C., Bejar, V., Martinez-Checa, F., Llamas, I., & Quesada, E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 191-195. doi:10.1099/ijs.0.63310-0
- Vietnam Rubber Group (2012), Quy trình kĩ thuật cây cao su [Rubber tree technical process]. *Vietnam Rubber Group*, 92-93.
- Zhao, Z. Z., Wang, Q., Wang, K. B. K., Liu, C. H., & Gu, Y. (2010). Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology*, 101, 292-297. doi: 10.1016/j.biortech.2009.07.071
- Zhao, X., Han Y., Tan, X., Wang, J., & Zhou, Z. (2014). Optimization of Antifungal Lipopeptide Production from *Bacillus* sp. BH072 by Response Surface Methodology. *Journal of Microbiology*, 1-9. doi:10.1007/s12275-014-3354-3

THE BIOCONTROL OF *Corynespora cassiicola* CAUSING THE CORYNESPORA LEAF FALL (CLF) DISEASE ON RUBBER TREE BY *Bacillus* sp. S29 FROM IN VITRO, EX-VIVO TO NURSERY SCALE

**Nguyen Van Minh^{1*}, Le Thanh Quynh Nhu¹, Nguyen Thanh Danh¹,
Nguyen Anh Nghia², Duong Nhat Linh, Tran Thi A Ni³,
Nguyen Bao Quoc⁴, Ly Van Duong⁵, Trinh Ngoc Nam⁶, Nguyen Thanh Duy⁷**

¹ Faculty of Biotechnology, Ho Chi Minh City Open University, Vietnam

² Department of Plant Protection, Rubber Research Institute of Vietnam, Vietnam

³ MIDOLI Co., Ltd, Vietnam

⁴ Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University, Vietnam

⁵ Department of Science and Technology of Binh Phuoc Province, Vietnam

⁶ Institute of Biotechnology and Environment, Industry University of Ho Chi Minh City, Vietnam

⁷ University of San Francisco, USA

*Corresponding author: Nguyen Van Minh – Email: minh.nv@ou.edu.vn

Received: April 04, 2020; Revised: July 27, 2020; Accepted: September 10, 2020

ABSTRACT

This study aims at evaluating the biological controlling of *Corynespora* leaf fall disease in rubber trees caused by *Corynespora cassiicola* by *Bacillus* sp. S29 bacteria from in-vitro to scale greenhouse. The fermented *Bacillus* sp. S29 was able to control *C. cassiicola* biologically at the in vitro and on rubber leaves at the ex-vivo level. The *Bacillus* sp. S29 was identified by the combination of molecular biology and several analyses of biochemical methods. The result was that the *Bacillus* sp. S29 was similar with *B. subtilis*. At the scale greenhouse, *B. subtilis* S29 was also able to control *C. cassiicola* biologically. It is concluded that the *B. subtilis* S29 can potentially help to prevent *Corynespora* leaf fall disease in rubbers.

Keywords: *Bacillus subtilis* S29; *Corynespora cassiicola*; ex-vivo; nursery scale