

NGHIÊN CỨU VI SINH VẬT NỘI SINH VÀ CÁC HỢP CHẤT HÓA HỌC CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM GÂY BỆNH Ở CÁC DÒNG KEO TAI TƯỢNG KHẢO NGHIỆM TẠI THỪA THIÊN HUẾ

Phạm Quang Thu, Nguyễn Hoàng Nghĩa, Trần Xuân Hưng, Nguyễn Văn Nam

Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Keo tai tượng (*Acacia mangium*) là loài cây trồng rừng quan trọng để cung cấp gỗ cho sử dụng trong nước và xuất khẩu. Bệnh phần hồng do nấm *Corticium salmonicolor* và bệnh chết héo do nấm *Ceratocystis* sp. được xác định là những bệnh hại chính cho Keo tai tượng ở Thừa Thiên Huế. Nghiên cứu các vi sinh vật nội sinh và các hợp chất hóa học có hoạt tính ức chế nấm gây bệnh ở các dòng Keo tai tượng là cơ sở cho việc chọn giống kháng bệnh. Chính vì vậy, một khu khảo nghiệm 35 dòng Keo tai tượng được thiết lập tại Thừa Thiên Huế năm 2009 nhằm tuyển chọn các dòng kháng bệnh. Mẫu cành nhỏ (đường kính khoảng 1cm, chiều dài khoảng 10cm), mẫu lá (khoảng 1kg) của cây đại diện cho mỗi dòng được thu thập tại hiện trường để phân lập nấm và vi khuẩn nội sinh và chiết xuất các hợp chất hóa học bằng dung môi methanol và methylene chloride. Đã phân lập được 8 chủng vi khuẩn và 13 chủng vi nấm từ 35 dòng Keo tai tượng trong đó có 2 chủng vi khuẩn và 13 chủng nấm có hoạt tính ức chế nấm *Ceratocystis* sp. và chỉ có 8 chủng (1 chủng vi khuẩn và 7 chủng nấm) có hoạt tính ức chế nấm *Corticium salmonicolor*. Cặn dịch chiết từ lá bằng dung môi methanol hoặc dung môi methylene chloride của 26 trên 35 dòng Keo tai tượng ức chế ở mức độ mạnh (ức chế 40-60%) và mức độ rất mạnh (ức chế >60%) đối với nấm *Ceratocystis* sp.; chỉ có 16 dòng ức chế ở mức độ mạnh và rất mạnh đối với nấm *Corticium salmonicolor*. Tổng hợp từ khả năng ức chế nấm gây bệnh của vi sinh vật nội sinh và các hợp chất hóa học tách chiết từ dung môi methanol hoặc từ dung môi methylene chloride, có tổng số 28 trên 35 dòng Keo tai tượng có khả năng ức chế được cả hai loại nấm gây bệnh *Ceratocystis* sp. và *Corticium salmonicolor* ở mức độ mạnh và rất mạnh, gồm các dòng: AMD01, AMD02, AMD04, AMD05, AMD06, AMD07, AMD08, AMD09, AMD10, AMD11, AMD12, AMD13, AMD14, AMD15, AMD16, AMD18, AMD19, AMD20, AMD22, AMD24, AMD25, AMD27, AMD29, AMD31, AMD32, AMD33, AMD34 và AM35. Khả năng kháng bệnh của các dòng Keo tai tượng đối với 2 loài nấm gây bệnh còn đang tiếp tục theo dõi ở hiện trường.

Từ khóa: Keo tai tượng, Vi sinh vật nội sinh, Hợp chất ức chế nấm, Kháng bệnh, *Ceratocystis* sp., *Corticium salmonicolor*.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Keo tai tượng (*Acacia mangium*) là loài cây nhập nội được đưa vào trồng ở nước ta từ những năm đầu của thập niên 80. Chỉ trong một thời gian ngắn, sau khi các thí nghiệm về khảo nghiệm xuất xứ và các thí nghiệm về biện pháp kỹ thuật gây trồng có kết quả, Keo tai tượng đã được trồng phổ biến ở hầu hết các tỉnh trong cả nước (Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2003). Keo tai tượng là loài cây gỗ lớn, mọc nhanh, gỗ dễ gia công nên rất được ưa chuộng để đóng đồ gia dụng, làm nhà, ván dăm, làm bột giấy vv... Trong những năm gần đây, diện tích rừng trồng Keo tai tượng chiếm một tỷ trọng lớn trong tổng diện tích rừng trồng của Việt Nam. Tuy nhiên, trước sự gia tăng nhanh về mặt diện tích, các rừng trồng keo đã xuất hiện nhiều bệnh, gây khó khăn không nhỏ cho một số địa phương trong cả nước. Điển hình ở một số nơi như Bầu Bàng (Bình Dương) một số dòng Keo lai đã bị mắc bệnh phần hồng với tỷ lệ và mức độ bị bệnh khá cao, gây nhiều thiệt hại cho sản xuất. Tại Đa Têh (Lâm Đồng), Keo tai tượng trồng thuần loài với tổng diện tích hơn 400 ha đã có 118,5 ha bị bệnh với tỷ lệ từ 7 đến 59 % trong đó có một số diện tích bị hại rất nặng (Phạm Quang Thu, 2002). Tại Kon Tum, năm 2001 có khoảng 1000 ha rừng Keo lai 2 tuổi

bị nhiễm bệnh loét thân, thối vỏ và dẫn đến khô ngọn, với tỷ lệ bị bệnh khác nhau ở các địa phương. Tỷ lệ bị bệnh nặng nhất ở Ngọc Tụ, Ngọc Hồi (Kon Tum) lên đến 90% cây bị chết ngọn.

Trong nghiên cứu về cơ chế kháng bệnh của thực vật, các nhà khoa học đã khẳng định rằng thực vật khi bị mầm bệnh xâm nhiễm đã hình thành phản ứng chống lại sự xâm nhiễm đó (Hammerschmidt, 2007). Để chứng minh cho điều này khi tiêm vào cây một số hợp chất hóa học có nguồn gốc sinh học hay không phải sinh học cũng hình thành tính kháng bệnh giả trong thực vật. Tính kháng bệnh do các yếu tố bên ngoài (Induced Disease Resistance) của thực vật được chia làm 2 dạng: kháng hệ thống mắc phải dựa vào axit salicylic (Systemic Acquired Resistance, SAR) và kích kháng hệ thống dựa vào axit jasmonic và ethylene (Induced Systemic Resistance, ISR) (Walling, 2001). Đối với cách thức kháng hệ thống mắc phải dựa trên axit salicylic là các hợp chất hóa học được cây tổng hợp hay tích lũy để chống lại sự xâm nhiễm của mầm bệnh còn đối với phương thức kích kháng hệ thống dựa trên axit jasmonic và ethylene là sản phẩm của quá trình trao đổi chất thứ cấp từ vi sinh vật sống nội sinh. Như vậy, nghiên cứu về sự ức chế nấm gây bệnh của vi sinh vật nội sinh các dòng Keo tai tượng và các hợp chất hóa học được tách chiết từ 2 loại dung môi hữu cơ có khả năng ức chế sự phát triển của nấm gây bệnh làm sáng tỏ cơ chế kháng bệnh của các dòng Keo tai tượng. Kết quả nghiên cứu này là tiền đề, là cơ sở để tiến hành chọn giống kháng bệnh.

VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Mẫu cành và lá của 35 dòng vô tính Keo tai tượng khảo nghiệm tại Thừa Thiên Huế để phân lập vi nấm nội sinh và vi khuẩn nội sinh và chiết xuất các hợp chất hóa học bằng dung môi hữu cơ. Dung môi hữu cơ được sử dụng là methanol (CH_3OH) viết tắt là ME, và methylene chloride (CH_2Cl_2) viết tắt là MC.

Thu thập các mẫu bệnh của khu khảo nghiệm, phân lập và xác định tên được thực hiện tại Phòng thí nghiệm, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam, 2 loài nấm gây bệnh chính cho Keo tai tượng ở khu vực là Nấm *Ceratocytis* sp. gây bệnh chết héo và nấm *Corticium salmonicolor* gây bệnh phần hồng làm loét thân, cành, gây chết và đổ gãy ở vị trí nấm xâm nhiễm.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân lập các chủng vi sinh vật nội sinh

Phương pháp phân lập vi khuẩn nội sinh: Lấy cành các dòng vô tính Keo tai tượng đã được chọn cắt thành từng đoạn nhỏ khoảng dài 7- 8 cm, đường kính cành 0,8-1cm, khử trùng bằng cồn 75% trong 1 phút. Lấy ra hơ nhanh qua đèn cồn, sau đó cắt thành các lát mỏng có kích thước 0,5 - 1,0 (cm), cắt sâu đến phần lõi gỗ. Sau khi cắt xong cân mỗi phần 1 gam rồi cho vào ống nghiệm có chứa môi trường PBS (NaCl : 8,5 gam; KH_2PO_4 : 6,8 gam; NaOH : 1,16 gam; Nước cất: 1000 ml; pH: 7) để qua đêm. Phân lập vi khuẩn theo phương pháp pha loãng tới hạn. Lấy 0,1ml ở nồng độ 10^{-5} cho vào hộp lồng chứa môi trường PDA (Khoai tây: 200 gam; D-Glucose: 20 gam; Agar: 15-18 gam; Nước cất: 1000ml) và trang đều trên mặt thạch, nuôi ở nhiệt độ 28°C . Theo dõi sự xuất hiện của các khuẩn lạc đếm số lượng vi khuẩn có trong hộp lồng. Dùng que cấy tách ra từng chủng vi khuẩn khác nhau ra các hộp lồng có chứa môi trường PDA (mỗi hộp một loại vi khuẩn), mỗi chủng cấy 2 hộp lồng, ghi rõ ký hiệu. Bước đầu nhận dạng các loại vi khuẩn khác nhau dựa vào đặc điểm hình thái, màu sắc, kích thước của khuẩn lạc. Theo dõi sự phát triển của vi khuẩn, đánh giá khả năng sinh trưởng và mô tả đặc điểm của từng chủng vi khuẩn.

Phương pháp phân lập nấm nội sinh: Mẫu lấy về chọn những thân cành khoẻ, tươi và không bị bệnh tiến hành rửa sạch bằng nước cất vô trùng, sau đó khử trùng bề mặt bằng cồn 70% rồi rửa lại 2 - 3 lần bằng nước cất vô trùng. Sau khi đã khử trùng mẫu xong thì cắt thành từng đoạn nhỏ 5 - 7cm rồi đặt vào các hộp lồng chứa môi trường PDA đã được hấp khử trùng. Đặt các

hộp lồng đã cấy mẫu này trong tủ định ôn ở nhiệt độ 28⁰C trong khoảng 2 - 3 ngày để cho sợi nấm phát triển mọc trên môi trường. Khi nấm đã mọc tiến hành tách nấm và cấy sang các hộp lồng khác có chứa PDA, lặp lại cho tới khi được sợi nấm thuần khiết.

Phương pháp đánh giá hiệu lực kháng nấm bệnh của các chủng vi sinh vật nội sinh

Đánh giá hiệu lực nấm và vi khuẩn nội sinh bằng phương pháp nuôi cấy trên cùng hộp lồng giữa vi sinh vật nội sinh với các nấm gây bệnh thử nghiệm. Cây vi sinh vật nội sinh vào giữa hộp lồng có chứa môi trường PDA, sau đó cấy nấm gây bệnh ở 3 góc của hộp lồng. Hiệu lực được xác định bằng đường kính vùng ức chế (D) được tính bằng mm từ mép khuẩn lạc vi sinh vật nội sinh tới mép của khuẩn lạc nấm gây bệnh. Hiệu lực kháng nấm bệnh của các chủng vi sinh vật nội sinh phân thành 5 cấp như sau:

Hiệu lực ức chế rất mạnh (++++):	Đường kính vùng ức chế ≥ 20 mm
Hiệu lực ức chế mạnh (+++):	Đường kính vùng ức chế ≥ 10 mm và < 20 mm
Hiệu lực ức chế trung bình (++):	Đường kính vùng ức chế ≥ 5 mm và < 10 mm
Hiệu lực ức chế yếu (+):	Đường kính vùng ức chế ≥ 1 mm và < 5 mm
Không có hiệu lực (-):	Đường kính vùng ức chế < 1 mm

Phương pháp tách chiết các lớp chất hóa học với dung môi ME và dung môi MC

Mỗi mẫu lá phơi khô, nghiền nhỏ, mỗi loại dung môi cân 15g ngâm trong 150ml dung môi MC và ME, trong 48 giờ, rồi dùng giấy lọc lọc bỏ cặn, sau đó đem cô quay. Dịch chiết sau khi cô quay đem cân tính trọng lượng và hòa tan bằng dung môi MC và ME với tỷ lệ 1g dịch chiết với 10 ml dung môi.

Phương pháp đánh giá khả năng ức chế nấm gây bệnh

Đánh giá hiệu lực ức chế nấm gây bệnh được tiến hành riêng cho từng loại cặn dịch chiết. Cặn dịch chiết của 35 dòng Keo tai tượng được pha loãng theo tỷ lệ 1 gram cặn với 10 ml dung môi, lấy 500 μ l pha với 15 ml môi trường PDA cho một đĩa Petri, mỗi công thức thí nghiệm làm với 10 hộp lồng và 3 lần lặp, công thức đối chứng 500 μ l dung môi tương ứng với cặn dịch chiết và 15 ml môi trường PDA. Cây nấm bệnh cần thử vào chính giữa hộp lồng, nuôi ở nhiệt độ 25⁰C, sau 10 ngày đo đường kính khuẩn lạc ở công thức thí nghiệm và đối chứng. Khả năng ức chế nấm gây bệnh được đánh giá theo Singh và Tripathi (1999) bằng công thức sau:

$$\text{Đối với dịch chiết ME: } P_{me} \% = \frac{D_{dc_1} - D_{me}}{D_{me}} \times 100\%$$

$$\text{Đối với dịch chiết MC: } P_{mc} \% = \frac{D_{dc_2} - D_{mc}}{D_{mc}} \times 100\%$$

Trong đó: **P_{me}**, **P_{mc}** là khả năng kháng nấm của các hợp chất hóa học tách chiết bằng dung môi ME, dung môi MC được tính bằng tỷ lệ %; **D_{dc₁}**, **D_{dc₂}** là đường kính vòng nấm gây bệnh ở công thức đối chứng có dung môi ME, dung môi MC; **D_{me}**, **D_{mc}** là đường kính vòng nấm công thức thí nghiệm với cặn dịch chiết dung môi ME, dung môi MC. Căn cứ vào trị số P% đánh giá khả năng ức chế nấm theo Phạm Quang Thu và đồng tác giả (2011).

Hiệu lực ức chế rất mạnh (++++):	Trị số P _{me} hoặc P _{mc} $\geq 60\%$
Hiệu lực ức chế nấm mạnh (+++):	Trị số P _{me} hoặc P _{mc} $\geq 40\%$ và $< 60\%$
Hiệu lực ức chế trung bình (++):	Trị số P _{me} hoặc P _{mc} $\geq 20\%$ và $< 40\%$
Hiệu lực ức chế yếu (+):	Trị số P _{me} hoặc P _{mc} $< 20\%$

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân lập và đánh giá hiệu lực ức chế nấm gây bệnh của các chủng vi sinh vật nội sinh từ các dòng Keo tai tượng

Từ 35 dòng Keo tai tượng đã phân được 8 chủng vi khuẩn nội sinh (KC1, KC2, KC3, KC4, KC5, KC6, KC7, KC8) và 13 chủng nấm nội sinh (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13) dựa vào đặc điểm hình thái, màu sắc, cách mọc và độ dày của khuẩn lạc. Từ 8 chủng vi khuẩn nội sinh và 13 chủng nấm nội sinh thu được tiến hành đánh giá hiệu lực ức chế với 2 loại nấm gây bệnh chủ yếu trên Keo tai tượng là nấm *Ceratocystis* sp. gây bệnh chết héo mới xuất hiện và gây hại cho các loài keo gây trồng ở Việt Nam và nấm *Corticium salmonicolor* gây bệnh phấn hồng. Cả hai loài nấm này đều là các loài nấm nguy hiểm cho Keo tai tượng ở Thừa Thiên Huế. Kết quả đánh giá hiệu lực ức chế nấm gây bệnh của các chủng vi khuẩn nội sinh được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1: Kết quả đánh giá hiệu lực ức chế nấm gây bệnh của các chủng vi khuẩn nội sinh

TT	Ký hiệu chủng VSV nội sinh	Nấm bệnh <i>Ceratocystis</i> sp.		Nấm bệnh <i>Corticium salmonicolor</i>	
		Đường kính vùng ức chế (mm)	Hiệu lực ức chế	Đường kính vùng ức chế (mm)	Hiệu lực ức chế
1	KC1	8,7	++	0	-
2	KC2	26,3	++++	13,3	+++
3	KC3	12,7	+++	8,3	++
4	KC4	9,3	++	2,3	+
5	KC5	7,3	++	0	-
6	KC6	8,7	++	0,8	-
7	KC7	2,3	+	0	-
8	KC8	0,7	-	0	-
9	C1	31,7	++++	24,3	++++
10	C2	24	++++	23,7	++++
11	C3	18,6	+++	0	-
12	C4	27,3	++++	25,7	++++
13	C5	21,7	++++	0	-
14	C6	18,3	+++	0	-
15	C7	14,3	+++	0	-
16	C8	12,7	+++	13,3	+++
17	C9	21,3	++++	0	-
18	C10	10,3	+++	0	-
19	C11	23	++++	20,3	++++
20	C12	26,3	++++	13,7	+++
21	C13	24,3	++++	17	+++

Kết quả ở bảng trên cho thấy các chủng nấm nội sinh có hiệu lực ức chế nấm gây bệnh mạnh hơn và số lượng chủng có hiệu lực cao nhiều hơn so với vi khuẩn nội sinh. Đối với nấm *Ceratocystis* sp. có 15/21 chủng vi sinh vật nội sinh có khả năng ức chế ở mức độ mạnh và rất mạnh (ảnh 1), trong khi đó chỉ có 8 trên tổng số 21 chủng ức chế nấm *Corticium salmonicolor* ở mức độ mạnh và rất mạnh.

Kết quả đánh giá khả năng ức chế nấm gây bệnh các hợp chất hóa học có trong lá của các dòng Keo tai tượng

Cận dịch chiết thu được từ các dòng Keo tai tượng được tiến hành đánh giá khả năng ức chế 2 loại nấm gây bệnh là nấm *Ceratocystis* sp. và nấm *Corticium salmonicolor*. Theo dõi tốc độ mọc của nấm trên từng loại môi trường (Môi trường có cận dịch chiết và môi trường đối chứng). Qua công thức đánh giá khả năng kháng nấm của (Singh và Tripathi, 1999) sau khi xác định được

chỉ số P% (tỷ lệ phần trăm ức chế nấm) của cặn dịch chiết trên 2 loại dung môi đối với các dòng Keo tai tượng được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: Kết quả đánh giá khả năng ức chế nấm gây bệnh của các chất hóa học trong lá các dòng Keo tai tượng

TT	Ký hiệu dòng	Hiệu lực ức chế nấm gây bệnh <i>Ceratocystis sp.</i>				Hiệu lực ức chế nấm gây bệnh <i>Corticium salmonicolor</i>			
		Cặn dịch chiết CH ₃ OH (Pme%)	Hiệu lực ức chế	Cặn dịch chiết CH ₂ Cl ₂ (Pmc%)	Hiệu lực ức chế	Cặn dịch chiết CH ₃ OH (Pme%)	Hiệu lực ức chế	Cặn dịch chiết CH ₂ Cl ₂ (Pmc%)	Hiệu lực ức chế
1	AMD01	66,78	++++	63,06	++++	64,09	++++	39,90	++
2	AMD02	36,01	++	61,91	++++	5,42	+	28,44	++
3	AMD03	33,69	++	18,59	+	29,98	++	33,58	++
4	AMD04	63,96	++++	7,44	+	28,23	++	41,26	+++
5	AMD05	36,03	++	21,04	++	79,96	++++	18,66	+
6	AMD06	71,11	++++	13,20	+	81,87	++++	17,51	+
7	AMD07	49,72	+++	75,44	++++	7,15	+	39,56	++
8	AMD08	49,72	+++	67,25	++++	59,17	+++	13,30	+
9	AMD09	55,08	+++	15,29	+	30,40	++	21,85	++
10	AMD10	60,26	++++	11,92	+	33,06	++	42,08	+++
11	AMD11	41,58	+++	72,77	++++	47,18	+++	20,55	++
12	AMD12	49,72	+++	68,11	++++	78,11	++++	21,69	++
13	AMD13	46,72	+++	13,75	+	34,45	++	32,83	++
14	AMD14	61,47	++++	51,92	+++	79,89	++++	46,71	+++
15	AMD15	20,42	++	26,40	++	12,57	+	33,32	++
16	AMD16	24,95	++	10,38	+	25,93	++	22,45	++
17	AMD17	43,92	+++	65,78	++++	11,29	+	23,27	++
18	AMD18	40,51	+++	9,39	+	22,21	++	24,42	++
19	AMD19	50,69	+++	78,10	++++	11,15	+	58,22	+++
20	AMD20	42,22	+++	19,18	+	72,59	+++	17,80	+
21	AMD21	23,32	++	34,21	++	37,25	++	23,36	++
22	AMD22	20,21	++	22,56	++	60,59	++++	27,81	++
23	AMD23	31,67	++	68,06	++++	9,26	+	31,52	++
24	AMD24	71,11	++++	58,72	+++	71,39	++++	13,47	+
25	AMD25	46,72	+++	43,50	+++	27,23	++	16,15	+
26	AMD26	46,37	+++	78,50	++++	19,77	+	21,78	++
27	AMD27	72,16	++++	18,37	+	67,33	++++	23,05	++
28	AMD28	64,42	++++	37,94	++	35,06	++	31,90	++
29	AMD29	73,41	++++	55,19	+++	13,33	+	31,23	++
30	AMD30	28,30	++	33,26	++	24,09	++	33,43	++
31	AMD31	92,21	++++	55,05	+++	64,95	++++	25,19	++
32	AMD32	18,74	+	14,92	+	37,82	++	20,93	++
33	AMD33	22,51	++	3,88	+	54,70	+++	32,70	++
34	AMD34	14,18	+	63,03	++++	44,09	+++	11,94	+
35	AMD35	18,84	+	47,93	+++	47,09	+++	57,08	+++

Kết quả ở bảng trên cho thấy cận dịch chiết methanol và methylene chloride từ lá các dòng Keo tai tượng khảo nghiệm tại Thừa Thiên Huế có sự khác nhau giữa các dòng về hoạt tính ức chế nấm và khác nhau đối với các loại nấm gây bệnh. Đối với nấm *Ceratocystis* sp. có 26 dòng trong tổng số 35 dòng có hoạt tính ức chế nấm gây bệnh ở mức độ mạnh (có trị số ức chế P từ 40% đến 60%) và hoạt tính ức chế nấm rất mạnh (có trị số ức chế P > 60%) từ cận dịch chiết methanole hoặc từ cận dịch chiết methylene chloride (ảnh 2 và ảnh 3). Đối với nấm *Corticium salmonicolor*, có 18 dòng trong tổng số 35 dòng có hoạt chất ức chế ở mức độ mạnh và rất mạnh từ cận dịch chiết bằng hai loại dung môi. Hầu hết các hoạt chất ức chế nấm gây bệnh từ lá của các gia đình Keo tai tượng đều nằm trong dung môi hữu cơ methanole, số lượng các dòng có cận dịch chiết có hiệu lực ức chế nấm gây bệnh từ dung môi methylene chloride là ít hơn.



Ảnh 1: Vi khuẩn nội sinh ức chế nấm *Ceratocystis* sp.



Ảnh 2: Nấm *Ceratocystis* sp. bị ức chế với cận dịch chiết methanol



Ảnh 3: Nấm *Ceratocystis* sp. nuôi cấy trên môi trường đối chứng có dung môi methanol

Kết quả đánh giá tổng hợp khả năng ức chế nấm gây bệnh từ vi sinh vật nội sinh và các hợp chất hóa học có trong lá của các dòng Keo tai tượng

Tổng hợp hiệu lực ức chế nấm bệnh của các chủng vi sinh vật nội sinh và khả năng ức chế sự phát triển nấm bệnh từ cận dịch chiết methanol hoặc cận dịch chiết methylene chloride của các dòng Keo tai tượng khảo nghiệm tại Thừa Thiên Huế được trình bày tại bảng 3.

Bảng 3: Kết quả đánh giá hiệu lực kháng nấm gây bệnh của vi sinh vật nội sinh và các chất hóa học trong lá các dòng Keo tai tượng

TT	Ký hiệu dòng Keo tai tượng	Hiệu lực ức chế nấm <i>Ceratocystis</i> sp.		Hiệu lực ức chế nấm <i>Corticium salmonicolor</i>	
		Vi sinh vật nội sinh ức chế nấm gây bệnh	Hợp chất hóa học ức chế nấm gây bệnh	Vi sinh vật nội sinh ức chế nấm gây bệnh	Hợp chất hóa học ức chế nấm gây bệnh
1	AMD01	+++	++++	++	++++
2	AMD02	++++	++++	+++	++
3	AMD03	++++	++	-	++
4	AMD04	++	++++	+	+++
5	AMD05	+++	++	++	++++
6	AMD06	+++	++++	+++	++++
7	AMD07	++++	++++	++++	++
8	AMD08	+++	++++	++	+++
9	AMD09	++++	+++	++++	++
10	AMD10	+++	++++	++	+++

11	AMD11	++++	++++	++++	+++
12	AMD12	+++	++++	++	++++
13	AMD13	++++	+++	++++	++
14	AMD14	-	++++	-	++++
15	AMD15	++++	++	++++	++
16	AMD16	++++	++	++++	++
17	AMD17	++++	++++	-	+
18	AMD18	++++	+++	++++	++
19	AMD19	++++	++++	++++	+++
20	AMD20	++++	+++	++++	+++
21	AMD21	++++	++	-	++
22	AMD22	++++	++	++++	++++
23	AMD23	++++	++++	-	++
24	AMD24	++++	++++	-	++++
25	AMD25	++++	+++	++++	++
26	AMD26	-	++++	-	++
27	AMD27	++++	++++	++++	++++
28	AMD28	++++	++++	-	++
29	AMD29	++++	++++	+++	++
30	AMD30	++	++	-	++
31	AMD31	++	++++	-	++++
32	AMD32	++++	+	+++	++
33	AMD33	++++	++	++++	+++
34	AMD34	++++	++++	+++	+++
35	AMD35	-	+++	-	+++

Kết quả nghiên cứu ở bảng trên cho thấy hầu hết các dòng Keo tai tượng phân lập được vi sinh vật nội sinh có hoạt tính ức chế nấm gây bệnh thì đều chứa các hợp chất hóa học được tách chiết từ dung môi methanol hoặc dung môi methylene chloride cũng có hoạt tính ức chế nấm gây bệnh.

Trong tổng số 35 dòng Keo tai tượng khảo nghiệm tại Thừa Thiên Huế có 29 dòng phân lập được nấm hoặc vi khuẩn nội sinh có hoạt tính ức chế sự phát triển của nấm *Ceratocystis* sp. gây bệnh chết héo Keo tai tượng ở mức độ mạnh và rất mạnh, trong khi đó chỉ có 26 dòng có cận dịch chiết ức chế nấm *Ceratocystis* sp. ở mức độ mạnh và rất mạnh và trong số này chỉ có 21 dòng có hoạt tính ức chế nấm gây bệnh từ vi sinh vật nội sinh và từ cận dịch chiết trùng nhau. Còn lại 8 dòng Keo tai tượng có vi sinh vật nội sinh ức chế nấm *Ceratocystis* sp. nhưng cận dịch chiết lại không có hoạt tính ức chế nấm. Điều này có thể được giải thích rằng vi sinh vật nội sinh thể hiện hoạt tính ức chế nấm gây bệnh bằng các chất hóa học bay hơi (volatile compounds) hoặc các hợp chất hóa học có phân tử lượng lớn không tan trong dung môi methanol và dung môi methylene chloride, có thể tan trong các loại dung môi khác như butanol hoặc tan trong nước.

Cũng có cận dịch chiết của 5 dòng Keo tai tượng có hoạt tính ức chế nấm nhưng không phân lập được chủng vi sinh vật nội sinh nào có hoạt tính ức chế nấm. Điều này có thể có sơ xuất trong quá trình phân lập, chỉ tiến hành phân lập vi khuẩn và nấm hoặc các hợp chất hóa học có trong cận dịch chiết methanol và methylene chloride từ nguồn khác không phải là vi sinh vật nội sinh.

Cũng tương tự như vậy, có 18 trên 35 dòng Keo tai tượng phân lập được vi nấm và vi khuẩn có khả năng ức chế nấm *Corticium salmonicolor* gây bệnh phần hồng ở mức độ mạnh và rất mạnh, cũng có 18 dòng Keo tai tượng có cận dịch chiết methanol và methylene chloride ức

chế nấm gây bệnh ở mức độ mạnh và rất mạnh và trong số này chỉ có 8 dòng có sự trùng lặp về hoạt tính ức chế nấm của vi sinh vật nội sinh và cạnh dịch chiết. Như vậy còn 10 dòng Keo tai tượng có vi sinh vật nội sinh ức chế nấm nhưng cạnh dịch chiết lại không có hoạt tính ức chế nấm và cũng có 7 dòng Keo tai tượng cạnh dịch chiết có hoạt tính ức chế nấm nhưng không phân lập được chủng vi sinh vật nội sinh nào có hoạt tính ức chế nấm.

Như vậy có thể cho rằng các hợp chất hóa học có hoạt tính ức chế sự phát triển nấm gây bệnh có thể được sản sinh từ quá trình trao đổi chất của vi sinh vật nội sinh hoặc cũng có thể từ nguồn nào khác mà nghiên cứu này chưa tìm được. Các hợp chất hóa học này là hàng rào bảo vệ cây chủ chống lại sự xâm nhiễm của nấm gây bệnh. Tổng hợp từ khả năng ức chế nấm gây bệnh của vi sinh vật nội sinh và các hợp chất hóa học tách chiết từ dung môi methanol hoặc từ dung môi methylene chloride, có tổng số 28 trên 35 dòng Keo tai tượng có khả năng ức chế được hai loại nấm gây bệnh *Ceratocystis* sp. và *Corticium salmonicolor* ở mức độ mạnh và rất mạnh, đó là các dòng: AMD01, AMD02, AMD04, AMD05, AMD06, AMD07, AMD08, AMD09, AMD10, AMD11, AMD12, AMD13, AMD14, AMD15, AMD16, AMD18, AMD19, AMD20, AMD22, AMD24, AMD25, AMD27, AMD29, AMD31, AMD32, AMD33, AMD34 và AM35.

Kết hợp với chỉ tiêu sinh trưởng và kết quả phân cấp bệnh tại hiện trường đối với các dòng trong khu khảo nghiệm, kết quả nghiên cứu này là cơ sở cho việc chọn các dòng Keo tai tượng sinh trưởng nhanh và kháng bệnh gây trồng ở Thừa Thiên Huế.

KẾT LUẬN

Phân lập được 8 chủng vi khuẩn nội sinh và 13 chủng vi nấm nội sinh từ 35 dòng Keo tai tượng khảo nghiệm tại Thừa Thiên Huế, trong đó có 15 chủng gồm vi khuẩn và nấm nội sinh trên tổng số 21 chủng có hoạt tính ức chế nấm *Ceratocystis* sp. ở mức độ mạnh và rất mạnh và chỉ có 8 trên tổng số 21 chủng ức chế nấm *Corticium salmonicolor* ở mức độ mạnh và rất mạnh.

Cạnh dịch chiết từ lá bằng dung môi hữu cơ methanol và methylene chloride của các dòng Keo tai tượng cũng có hiệu lực ức chế sự phát triển của nấm gây bệnh khác nhau. Có 26 dòng trên tổng số 35 dòng Keo tai tượng có hợp chất hóa học từ cạnh dịch chiết methanole hoặc từ cạnh dịch chiết methylene chloride ức chế nấm *Ceratocystis* sp. ở mức độ mạnh và rất mạnh và có 18 dòng Keo tai tượng có cạnh dịch chiết ức chế nấm *Corticium salmonicolor* gây bệnh phần hồng ở mức độ mạnh và rất mạnh.

Tổng hợp từ khả năng ức chế nấm gây bệnh của vi sinh vật nội sinh và các hợp chất hóa học tách chiết từ dung môi methanol hoặc từ dung môi methylene chloride, có tổng số 28 trên 35 dòng Keo tai tượng có khả năng ức chế được hai loại nấm gây bệnh *Ceratocystis* sp. và *Corticium salmonicolor* ở mức độ mạnh và rất mạnh, gồm các dòng: AMD01, AMD02, AMD04, AMD05, AMD06, AMD07, AMD08, AMD09, AMD10, AMD11, AMD12, AMD13, AMD14, AMD15, AMD16, AMD18, AMD19, AMD20, AMD22, AMD24, AMD25, AMD27, AMD29, AMD31, AMD32, AMD33, AMD34 và AM35

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2003. Phát triển các loài keo Acacia ở Việt Nam, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
2. Phạm Quang Thu, 2002. Một số biện pháp phòng trừ, quản lý bệnh hại Keo tai tượng ở Lâm trường Đa Têh- Lâm Đồng. Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn – Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Số 6, trang 532-533.
3. Phạm Quang Thu, Nguyễn Hoàng Nghĩa, Nguyễn Văn Nam, 2011. Nghiên cứu các hợp chất hóa học kháng nấm gây bệnh trong lá các gia đình Keo lá tràm khảo nghiệm tại Thừa Thiên Huế, Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam, số 4/2011.

4. Hammerschmidt, R. 2007. Introduction: definitions and some history. Pp. 1-8 in D. Walters, A. Newton, and G. Lyon, eds. Induced resistance for plant defense: A sustainable approach to crop protection. Oxford, UK: Blackwell publishing.
5. Singh, J and Tripathi, N.N. (1999). Inhibition of storage fungi of blackgram (*Vigna mungo*) by some essential oils. Flavour and Fragrance Journal 14: 1-4.
6. Walling, L. L. 2001. Induced resistance: from the basic to the applied. Trends in Plant Science 6:445-447.

SURVEILLANCE OF ANTAGONISTIC ENDOPHYTES AND ANTIFUNGAL COMPOUNDS OF ACACIA MANGIUM CLONES TRIALED IN THUA THIEN HUE PROVINCE

Pham Quang Thu, Nguyen Hoang Nghia, Tran Xuan Hung and Nguyen Van Nam

SUMMARY

Acacia mangium is an increasingly important plantation species in Vietnam providing industrial wood for domestic and export markets. Pink disease caused by *Corticium salmonicolor* and crown wilt caused by *Ceratocystis* sp. are serious threats to plantation productivity in Thua Thien Hue. Surveillance of antagonistic endophytes and antifungal compounds in *A. mangium* has potential for the initial screening for resistance to these pathogens. Therefore, a clonal *A. mangium* trial planted in Thua Thien Hue province in 2009 was used to identify potential resistant lines. Small twig samples (1 cm in diameter and about 10 cm in length) and phyllode samples (about 1 kg) from one tree representative of each of the 35 clones in the field trial were collected for isolating fungal and bacterial endophytes and for extracting chemical compounds using methanol and ethylene chloride as solvents. Eight bacterial strains and 13 fungal strains were isolated, in which 13 fungal strains and 2 bacterial strains showed antifungal activities to *Ceratocystis* sp. and only 8 strains (7 fungal strains and 1 bacterial strain) expressed antifungal activities to *Corticium salmonicolor* in vitro. Using the phyllodes extract residue, 26 *A. mangium* clones showed high (40 – 60% suppression of diameter growth) or very high (>60%) antifungal activities to *Ceratocystis* sp.; and 18 clones showed high or very high antifungal activities to *Corticium salmonicolor*. Combining the endophytes and residue results, 28 of the *A. mangium* clones (AMD01, AMD02, AMD04, AMD05, AMD06, AMD07, AMD08, AMD09, AMD10, AMD11, AMD12, AMD13, AMD14, AMD15, AMD16, AMD18, AMD19, AMD20, AMD22, AMD24, AMD25, AMD27, AMD29, AMD31, AMD32, AMD33, AMD34 and AM35) showed promising antifungal activity to the 2 pathogens tested. Work is in progress to determine the resistance levels of the acacia clones to the two pathogens in the field.

Key words: *Acacia mangium*, Antifungal compounds, *Ceratocystis* sp., *Corticium salmonicolor*, endophytes, Disease resistance.

Người thẩm định: TS. Phạm Văn Mạch