

- môi trường phân lập nấm *Phytophthora* spp. Gây bệnh trên cây cao su. Tạp chí BVTV-Số 2/20011.
2. Erwin C, Ribeiro O.K (1996). “*Phytophthora diseases worldwide*”, APS Press, St Paul, MN, USA. 562 pp
3. Guest, D.I., Pegg, K.G. and Wilely, A.vW. (1995). *Control of Phytophthora diseases of tree crops using trunk-injected phosphonates*. Horticultural Reviews, 17, 299-330.
4. Hamm B.P. and Hansen M.E. (1987). *Identification of Phytophthora spp. Known to Attact Conifers in the Pacific Northwest*. Northwest Science Vol 61 No2, p103-109.
5. Bộ Nông nghiệp và PTNT (2003). *Đánh giá hiệu lực phòng trừ bệnh chảy gôm trên cây có múi*. Tiêu chuẩn ngành 10 TCN 579:2003.
- Ngày nhận bài: 7/2/2015
Người phản biện: TS. Nguyễn Văn Văn
Ngày phản biện: 4/3/2015
Ngày duyệt đăng: 14/3/2015

KẾT QUẢ PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG PHỤC VỤ SẢN XUẤT CHẾ PHẨM SINH HỌC PHÒNG TRỪ NẤM GÂY BỆNH PHẤN TRẮNG TRÊN MỘT SỐ CÂY TRỒNG

Lê Thị Thanh Tâm¹, Phạm Ngọc Dung¹,
Nguyễn Văn Liêm¹

ABSTRACT

Results of identification and selection antagonistic bacteria for bioproduction in prevention powdery mildews on sereval crops

Using PCR technique for cloning 16S rRNA by two universal primers 27 F and 1527R (Lane, 1991) and analysing phylogeny tree NJ by MEGA 5.2 with 2000 replications for bootstrap test, the endobacteria from rubber tree leave, *Bacillus amyloliquefacien*, isolate 2.3, 1127bps and soil bacteria, *B. amyloliquefacien*, isolate 1, 1469bps and *B. thuringiensis* (belonging to *B. cereus*), isolate 12, 1541bps were identified with 100% bootstrap value supports. In *in vitro* tests indicated that endobacteria isolate No. 2.3, *B. Amyloliquefacien*, has the highest ability in decreasing the rate of powdery mildew conidial germination on mandarine and soybean leaves (6.2±0.4%), (3.9±0.3%) respectively in comparison with the control, over 40%. This bacterial was chosen as bioagent to produce bioproduct (BA1). In glass-house trial, BA1 with 10⁸cfu/ml at 5% concentration had reduced more than 80% of diseased incidence when compared with the control and the efficacy was stable up to 30 days after application. For prevention, spraying on soybean leaves 1 month earlier before the disease occurrence, BA1 also provided good efficacy with concentration from 3-4%.

Key words: Bacillus amyloliquefaciens, 16 S rRNA, endobacteria, soybean, mandarine, bio-agent, bio-product.

I. DẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, nấm bệnh phấn trắng (PT) gây thiệt hại nghiêm trọng trên nhiều cây trồng có giá trị kinh tế như cây cao su, cây quýt, cây xoài, cây đậu tương... Bệnh PT làm giảm sản lượng mủ cao su tới 30-

35% (Phan Thành Dũng, 2004). Bệnh gây hại trên xoài làm giảm 40% năng suất quả (Lê Văn Quân, 2008). Hiện nay, bệnh PT làm thiệt hại đáng kể đến năng suất đậu tương trên nhiều giống mới có năng suất cao như giống DT26 (Vũ Triệu Mân, 2007). Theo nghiên cứu của Bộ môn Bệnh cây,

¹ Viện Bảo vệ Thực vật.

Viện BVTV, năm 2014, tác nhân gây bệnh PT trên cây đậu tương (*Glycin max*) thuộc chi *Erysiphe*, loài *E. glycines*, trong khi tác nhân gây bệnh PT trên cây quýt (*Citrus reticulata*) thuộc chi *Erysiphe*, loài *E. quercicola*.

Trong thực tiễn, việc phòng trừ sâu bệnh nói chung và bệnh PT nói riêng trên các loại cây trồng ở nước ta vẫn đang phải dựa vào biện pháp hóa học là chủ yếu. Trong bối cảnh hiện nay khi Việt Nam đã là một thành viên của Tổ chức Thương mại Thế giới (WTO) thì việc sử dụng thuốc hóa học quá nhiều để phòng trừ bệnh gây ảnh hưởng lớn đến chất lượng quả, sức khỏe của người sản xuất và tiêu dùng, làm tăng dư lượng thuốc trong sản phẩm nên không xuất khẩu được đang là một thách thức lớn cần được giải quyết. Vì vậy, việc ưu tiên áp dụng các biện pháp canh tác và sinh học trong quản lý chúng sẽ có ý nghĩa to lớn trong việc đáp ứng các yêu cầu trong sản xuất nông sản hàng hóa an toàn phục vụ tiêu dùng nội địa và xuất khẩu của nước ta.

Bài báo này cung cấp các kết quả phân lập, tuyển chọn vi sinh vật (VSV) có tiềm năng đối kháng với nấm bệnh PT, nhằm phục vụ cho nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh PT trên đồng ruộng Việt Nam.

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập các nguồn VSV đối kháng nấm phân trắng từ đất vùng rễ và lá cây.
- Xác định đặc tính sinh hóa và khả năng phân giải cơ chất của các VSV có tiềm năng đối kháng.
- Phân loại, định danh VSV có tiềm năng đối kháng được phân lập từ đất vùng rễ và lá cây.
- Xác định khả năng đối kháng của VSV phân lập từ đất vùng rễ và lá cây.

- Nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học có khả năng phòng trừ bệnh phân trắng

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- *Phương pháp phân lập nguồn vi khuẩn đối kháng*: Theo phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học của Nguyễn Lân Dũng và cs. (1972) và Phương pháp của Viện BVTV (1997, 1998).

- *Phương pháp hóa sinh xác định đặc tính sinh hóa và khả năng phân giải cơ chất của các VSV có tiềm năng đối kháng*: Theo phương pháp của Đại học Quốc gia, 2000.

- *Phương pháp phân loại, định danh VSV có tiềm năng đối kháng được phân lập từ đất và lá cây*: VSV đối kháng được tinh chiết DNA bằng QUIAgel Blood and Tissue Kit, thực hiện phản ứng PCR nhân vùng gen 16S rRNA bằng hai cặp mồi chung 27 F và 1527R (Lane, 1991) với chu kỳ nhiệt: 94⁰C trong 3 phút, 30 chu kỳ trong đó mỗi chu kỳ gồm 94⁰C trong 30s, 50⁰C trong 30s, 72⁰C trong 1 phút 40s, chu kỳ mở rộng cuối 72⁰C trong 10 phút, giữ ở 4⁰C (Taq polymerase, Fementas). Mẫu được tinh chiết bằng QUIAgel Extraction Kit và gửi đi đọc trình tự bởi First Base Co. (Singapore/Malaysia). Dựa trên trình tự thu được, kết quả tìm kiếm trên Ngân hàng Gen và phân tích cây phả hệ NJ (Neighbor Joining) bằng phần mềm MEGA 5.2 với 2000 lần lặp cho bootstrap, xác định chính xác tên loài VSV có tiềm năng đối kháng.

- *Phương pháp xác định khả năng đối kháng của VSV phân lập từ đất vùng rễ và lá cây*: Sử dụng dịch chiết nội bào bằng kỹ thuật sonication theo phương pháp của Đại học Tokushima, Nhật bản hoặc dịch chiết ngoại bào của VSV nuôi cấy.

- *Phương pháp xác định hiệu lực chế phẩm sinh học thử nghiệm*:

+ Chế phẩm sinh học thử nghiệm BA1 (*B. amyloliquifaciens* nội sinh) dạng lỏng

phun lên lá được đánh giá cho phòng trừ nấm bệnh PT (*E. glycines*) trên cây đậu tương (*G. max*) trồng trong nhà lưới.

+ Phương pháp đánh giá nguồn bệnh PT và lây nhiễm bệnh PT nhân tạo trên cây đậu tương: Vì nấm bệnh PT ký sinh chuyên tính không nuôi cấy được, nên trực tiếp dùng bút lông quét bào tử nấm PT trên lá cây bệnh thu thập ngoài đồng ruộng, sau khi quan sát đặc điểm hình thái bào tử và sợi nấm dưới kính hiển vi (KHV), lên lá cây khô, trong điều kiện ẩm độ 90%, nhiệt độ 25°C. Sau 10 ngày, nấm bệnh xuất hiện trên cây chùng nhiễm (cây đối chứng trong công thức không xử lý chế phẩm) có đặc điểm hình thái giống như trên cây đậu tương ban đầu dùng làm nguồn lây nhiễm và có kết quả PCR là *E. glycines* (nghiên cứu của Bộ môn Bệnh cây, Viện BVTV, 2014) đáp ứng đầy đủ chu trình Kock.

+ Phương pháp tính tỷ lệ bệnh (TLB) và chỉ số bệnh (CSB) theo Tiêu chuẩn Bảo vệ thực vật tập I, II.

+ Phương pháp đánh giá cấp bệnh phần trắng: Vì cây đậu tương bị phần trắng chủ yếu trên lá nên áp dụng cách phân cấp bệnh trong nghiên cứu này theo phương pháp nghiên cứu bảo vệ thực vật của Viện Bảo vệ Thực vật (Đặng V.T. Thanh; Hà Minh Trung, 1997): Cấp 1: < 5% diện tích lá có vết bệnh; Cấp 2: 5-10% diện tích lá có vết bệnh; Cấp 3: 10-15% diện tích lá có vết bệnh; Cấp 4: 15-20% diện tích lá có vết bệnh; Cấp 5: > 20% diện tích lá có vết bệnh.

+ Tính hiệu quả phòng trừ theo công thức Abbott trong phòng thí nghiệm và công thức Hederson-Tilton trong nhà lưới theo Tuyên tập Tiêu chuẩn nông nghiệp Việt Nam và Phân bón của tập III, 2001.

- *Phương pháp xử lý số liệu*: Kết quả được phân tích thống kê dùng ANOVA và test Duncan với mức ý nghĩa P= 0.05, sử dụng phần mềm SAS. 9.1.3 PORTABLE

FOR WINDOWS. Số liệu cũng được xử lý thống kê bằng Excel.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả phân lập nguồn vi khuẩn có tiềm năng đối kháng

Đã phân lập được 14 isolate vi sinh vật (VSV) từ các nguồn đất vùng rẫy của một số loại cây (mướp đắng, đậu đỗ, dưa chuột, xoài, cam, bưởi và quýt) ở Hà Nội và Lạng Sơn và 11 isolate VSV từ lá cây cao su ở Lạng Sơn, Lai Châu và Bình Phước có tiềm năng đối kháng với nấm PT (bảng 1).

Bảng 1. Nguồn VSV có tiềm năng đối kháng với nấm bệnh PT được phân lập từ đất và lá cây (Viện BVTV, 2014)

STT	Nguồn gốc phân lập	Địa điểm	Số isolate
1	Đất vườn mướp đắng	Hà Nội	2
2	Đất ruộng đậu đỗ	Hà Nội	3
3	Đất dưa chuột	Hà Nội	3
4	Đất vườn xoài	Hà Nội	2
5	Đất vườn cam, bưởi	Hà Nội	2
6	Đất vườn quýt	Lạng Sơn	2
<i>Tổng số</i>	<i>14 VSV phân lập từ đất</i>		
7	Lá cây cao su	Lạng Sơn	3
8	Lá cây cao su	Lai Châu	6
9	Lá cây cao su	Bình Phước	2
<i>Tổng số</i>	<i>11 VSV phân lập từ lá cây</i>		

2. Kết quả xác định đặc tính sinh hóa và khả năng phân giải cơ chất của các VSV có tiềm năng đối kháng

- *Kết quả xác định đặc tính sinh hóa*

Kết quả thử đặc tính khử nitrat, phân giải nguồn cacbon, tính yếm khí của các VSV đối kháng được trình bày trong Bảng 2, cho thấy cả 2 nhóm VSV đối kháng được phân lập từ đất và lá đều có khả năng đồng hóa các nguồn cacbon từ trong tự

nhiên như Tinh bột, Saccarose, hay có thể sống trong điều kiện môi trường Manitol, Glucose. Các nguồn VSV này đều yếm khí.

Bảng 2. Một số đặc tính sinh hóa của các VSV có tiềm năng đối kháng với nấm phân trắng (Viện BVTV, 2014)

STT	Ký hiệu isolate VSV	Khả năng		
		Phân giải nitrat	Đồng hóa nguồn cacbon	Sinh trưởng trong điều kiện yếm khí
<i>VSV phân lập từ đất</i>				
1	1	+++	+++	+++
2	2	+++	+++	+++
3	3	+++	+++	+++
4	4	+++	+++	+++
5	5	+++	+++	+++
6	6	+++	+++	+++
7	7	+++	+++	+++
8	8	+++	+++	+++
9	9	+++	+++	+++
10	10	+++	+++	+++
11	11	+++	+++	+++
12	12	+++	+++	+++
13	13	+++	+++	+++
14	14	+++	+++	+++
<i>VSV phân lập từ lá</i>				
1	1.1	+++	+++	+++
2	1.2	+++	+++	+++
3	1.3	+++	+++	+++
4	1.4	+++	+++	+++
5	2.1	+++	+++	+++
6	2.2	+++	+++	+++
7	2.3	+++	+++	+++
8	2.4	+++	+++	+++
9	2.5	+++	+++	+++
10	4.1	+++	+++	+++
11	2-New	+++	+++	+++

Ghi chú: (+++) = có khả năng phân giải tốt.

- *Kết quả thử khả năng phân giải cơ chất của các VSV có tiềm năng đối kháng*

Kết quả thí nghiệm cho thấy VSV phân lập từ đất vùng rẫy có khả năng phân giải

Cellulose, Chitin, Beta-Glucan với đường kính khoảng 3 cm; VSV phân lập từ lá có khả năng phân giải Cellulose, Chitin, Beta-Glucan với đường kính khoảng 5 cm (bảng 3).

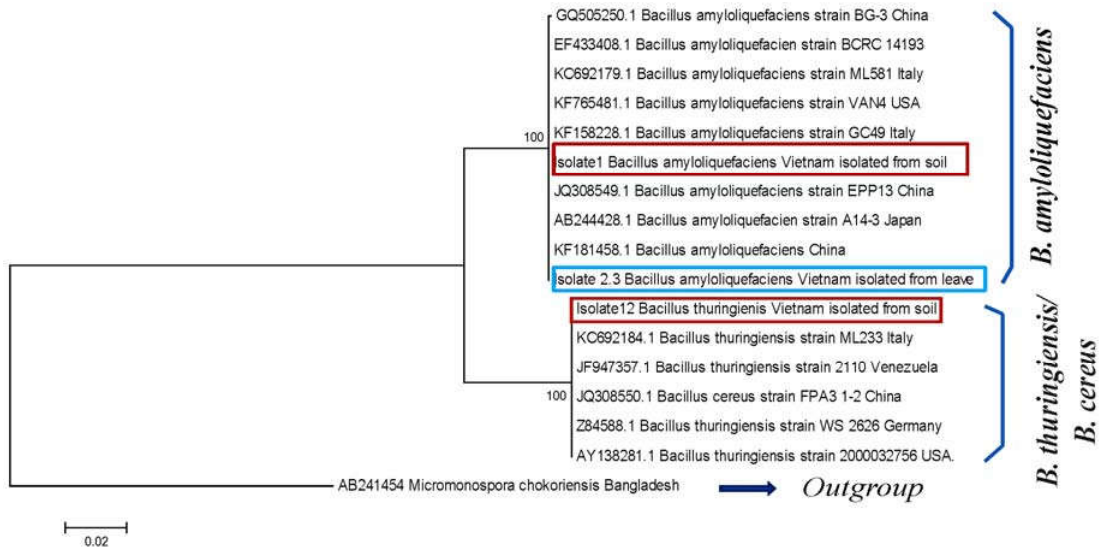
Bảng 3. Khả năng tiết enzyme ngoại bào phân giải cơ chất (Chitin/Beta-Glucan/Cellulo) trong môi trường của các VSV có tiềm năng đối kháng, phân lập từ đất vùng rẫy và lá cây (Viện BVTV, 2014).

STT	Ký hiệu isolate VSV	Khả năng tiết enzyme ngoại bào phân giải cơ chất		
		Chitin	Beta-Glucan	Cellulo
Đường kính vòng phân giải (cm)				
<i>VSV phân lập từ đất</i>				
1	1	4,1±0,1	2,9±0,2	3,7±0,2
2	2	1,9±0,3	3,1±0,1	3,9±0,3
3	3	1,2±0,2	2,9±0,1	4,0±0,1
4	4	1,8±0,3	2,9±0,1	4,1±0,1
5	5	0,0	1,4±0,1	3,2±0,1
6	6	2,1±0,4	3,5±0,1	3,6±0,1
7	7	3,1±0,3	6,0±0,2	5,7±0,2
8	8	1,7±0,1	2,7±0,2	4,1±0,3
9	9	1,6±0,1	2,9±0,5	3,6±0,2
10	10	1,7±0,2	3,2±0,2	3,9±0,5
11	11	4,2±0,2	3,2±0,1	4,0±0,3
12	12	3,7±0,1	6,1±0,4	5,6±0,2
13	13	1,7±0,1	3,0±0,2	3,6±0,2
14	14	4,8±0,2	4,5±0,2	6,1±0,2
<i>VSV phân lập từ lá</i>				
1	1.1	4,2±0,1	4,9±0,3	5,2±0,2
2	1.2	3,6±0,4	5,4±0,3	5,2±0,1
3	1.3	4,1±0,2	5,2±0,1	6,1±0,2
4	1.4	4,6±0,5	4,9±0,2	6,3±0,2
5	2.1	4,1±0,2	4,9±0,1	6,0±0,2
6	2.2	4,1±0,2	5,3±0,2	5,7±0,2
7	2.3	4,5±0,2	5,3±0,2	5,9±0,2
8	2.4	3,4±0,2	5,0±0,1	0,0
9	2.5	3,8±0,2	5,3±0,2	5,9±0,2
10	4.1	4,1±0,1	5,3±0,2	6,1±0,3
11	2-New	3,8±0,2	4,3±0,1	5,5±0,4

3. Kết quả định danh các VSV có tiềm năng đối kháng

Đã chọn và giải mã trình tự vùng 16S rRNA của 5 nguồn VSV phân lập từ đất vùng rẫy và 5 nguồn VSV phân lập từ lá. Dựa trên trình tự thu được, kết quả tìm kiếm trên Ngân hàng Gen và phân tích cây phả hệ

(hình 1) đã chọn ra được isolate 2.3, thuộc nhóm VSV nội sinh có ích trên lá, *Bacillus amyloliquefacien* có đoạn đọc trình tự 1127bps và isolate 1, *B. amyloliquefacien*, có đoạn đọc trình tự 1469bps, cùng isolate 12, *B. thuringiensis* (thuộc nhóm *B. cereus*), có đoạn đọc trình tự 1541bps thuộc nhóm VSV phân lập từ đất vùng rẫy.



Hình 1: Cây phả hệ NJ (Neighbor Joining), MEGA 5.2 phân loại các mẫu vi khuẩn có tiềm năng đối kháng với nấm bệnh PT được phân lập từ đất vùng rễ và lá (Viện BTVT, 2014)

Ghi chú: Thanh bar là số thay thế nucleotide. Các số trên mỗi nốt là giá trị bootstrap tính theo % (2000 lần lặp)

4. Kết quả xác định khả năng đối kháng của VSV phân lập từ đất và lá cây

Các VSV có tiềm năng đối kháng với nấm PT là những VSV có khả năng tiết ra các enzym ngoại bào *chitinase*, *beta-glucanase*, *cellulose*. Vì nấm PT ký sinh chuyên tính trên cây ký chủ và không nuôi cấy được trên môi trường nhân tạo nên áp dụng phương pháp ly tâm dịch vi khuẩn nuôi cấy hoặc phá vỡ màng tế bào VSV có tiềm năng đối kháng bằng kỹ thuật sonication để giải phóng ra enzyme tổng số trong đó có 3 loại enzym được nhắc đến ở trên. Sau đó tiến hành cho các bào tử nấm PT nảy mầm trên vỏ củ hành, ngâm trong dung dịch chứa các nồng độ enzym khác nhau so với đối chứng (bào tử nấm PT mọc trên vỏ củ hành ngâm

trong nước cất). Thí nghiệm được thực hiện với nấm PT (*E. quercicola*) gây hại trên lá cây quýt Bắc Sơn, Lạng Sơn và nấm PT (*E. glycines*) gây hại trên lá cây đậu tương (Vĩnh Phúc).

* Kết quả xác định khả năng đối kháng của VSV phân lập từ đất và lá cây cho bào tử vô tính nấm PT gây hại trên cây quýt.

Kết quả thí nghiệm cho thấy ở công thức 50% Volume (V), *B. amyloliquefacien* nội sinh phân lập từ lá, có khả năng làm giảm tỷ lệ nảy mầm của bào tử PT trên lá quýt cao nhất ($6,2 \pm 0,4$), tiếp đến là *B. amyloliquefacien* phân lập từ đất vùng rễ ($12,5 \pm 0,7$) và sau cuối cùng là *B. thuringiensis* ($16,4 \pm 0,3$) so với tỷ lệ nảy mầm của đối chứng (50,5-55,5%) (bảng 4).

Bảng 4. Khả năng làm giảm tỷ lệ nảy mầm của bào tử vô tính nấm PT trên lá quýt Lạng Sơn của VSV có tiềm năng đối kháng (Viện BVTV, 2014)

Công thức (% V)	Tỷ lệ nảy mầm của bào tử vô tính nấm PT (%) trong dịch chiết VSV có tiềm năng đối kháng		
	<i>B. amyloliquefacien</i> phân lập từ lá	<i>B. amyloliquefacien</i> phân lập từ đất	<i>B. thuringiensis</i> phân lập từ đất
0 (Đối chứng nước cất)	50,7±0,7	50,5±0,6	55,5±1,2
10	40,8±0,4	47,6±0,6	47,9±0,4
20	33,0±0,5	37,6±0,2	36,2±0,9
30	25,9±0,4	31,9±0,3	30,4±0,9
40	14,5±0,3	27,2±0,3	23,5±0,4
50	6,2±0,4	16,4±0,3	12,5±0,7

* Kết quả xác định khả năng đối kháng của VSV phân lập từ đất vùng rễ và lá cho bào tử vô tính nấm PT gây hại trên cây đậu tương.

Bảng 5. Khả năng làm giảm tỷ lệ nảy mầm của bào tử vô tính nấm PT trên cây đậu tương ở Vĩnh Phúc của VSV có tiềm năng đối kháng (Viện BVTV, 2014)

Công thức (% V)	Tỷ lệ nảy mầm của bào tử vô tính nấm PT (%) trong dịch chiết VSV có tiềm năng đối kháng		
	<i>B. amyloliquefacien</i> phân lập từ lá	<i>B. amyloliquefacien</i> phân lập từ đất	<i>B. thuringiensis</i> phân lập từ đất
0 (Đối chứng nước cất)	43,0±0,5	43,4±0,8	41,25±0,9
10	32,6±0,8	40,8±1,0	33,6±0,2
20	26,0±0,5	33,1±0,8	27,8±0,6
30	17,6±0,6	23,1±0,7	21,2±0,4
40	9,8±0,7	19,6±0,6	16,2±0,2
50	3,9±0,3	12,1±0,4	9,0±0,5

Kết quả thí nghiệm cho thấy, ở công thức 50% V, *B. amyloliquefacien* nội sinh phân lập từ lá, có khả năng làm giảm tỷ lệ nảy mầm của bào tử vô tính nấm PT trên lá đậu tương cao nhất (3,9±0,3), tiếp đến là *B. thuringiensis* (9,0±0,5) và sau cuối cùng là *B. amyloliquefacien* phân lập từ đất vùng rễ (12,1±0,4) so với tỷ lệ nảy mầm của đối chứng (41,25-43,4%) (bảng 5).

Kết quả của hai thí nghiệm trên là cơ sở để xác định khả năng đối kháng của VSV phân lập từ đất vùng rễ và lá với nấm PT trong phòng thí nghiệm (PTN). Vi khuẩn nội sinh *B. amyloliquefacien* phân lập từ lá

được chọn để sản xuất chế phẩm sẽ được thử nghiệm trên lá cây bị bệnh PT trong thí nghiệm nhà lưới tại Viện BVTV. Chế phẩm *B. amyloliquefacien* nội sinh (ký hiệu BA1, nồng độ 10⁸cfu/ml) dạng lỏng có thành phần chính gồm nước cất khử trùng, glycerol, vi khuẩn, peptone, chất bám dính cùng các phụ gia khác.

5. Kết quả xác định hiệu lực chế phẩm sinh học thử nghiệm trên cây đậu tương trong nhà lưới

Đánh hiệu lực phòng trừ nấm PT trên cây đậu tương của chế phẩm BA1 cho thấy chế phẩm này có thể phòng trừ bệnh PT

trên đậu tương trong nhà lưới, nhưng ở các nồng độ khác nhau cho mức độ phòng trừ khác nhau. Chế phẩm sinh học ở nồng độ 5% cho kết quả tốt nhất sau 14 ngày đạt 80% và sau 30 ngày đạt 81,82%, với CSB

giảm dần. Trong trường hợp phun phòng trước nửa tháng tới 1 tháng trước khi bệnh xuất hiện trên lá cây đậu tương thì BA1 cho kết quả tốt với các nồng độ từ 3-4% (bảng 6).

Bảng 6. Hiệu lực phòng trừ nấm bệnh PT cây đậu tương trong nhà lưới của chế phẩm sinh học BA1 làm từ *B. amyloliquefacien* nội sinh (Viện BVTV, 2014)

Nồng độ của BA1 (%)	Sau 14 ngày		Hiệu lực phòng trừ (%)	Sau 30 ngày		Hiệu lực phòng trừ (%)
	TLB	CSB		TLB	CSB	
	(%)	(%)		(%)	(%)	
1%	16,67	6,4	50	13	3,5	63,64
2%	16,67	5,6	50	10	3,3	72,73
3%	10	5,3	70	6,67	3	81,82
4%	10	4	70	6,67	3	81,82
5%	6,67	4	80	6,67	2	81,82
Đối chứng	33,33	10,4	-	36,67	12,4	-

IV. KẾT LUẬN

- Đã phân lập được 14 isolate VSV từ đất vùng rẫy và 11 isolate VSV từ lá cây có tiềm năng đối kháng với nấm bệnh PT trên lá cây đậu tương và lá cây quýt.

- Giải mã trình tự vùng 16S rRNA của 5 nguồn VSV phân lập từ đất vùng rẫy và 5 nguồn VSV phân lập từ lá, đã chọn ra được isolate 2.3, thuộc nhóm VSV nội sinh có ích trên lá, *Bacillus amyloliquefacien* và isolate 1, *B. amyloliquefacien*, cùng isolate 12, *B. thuringiensis* thuộc nhóm VSV phân lập từ đất vùng rẫy.

- Chế phẩm *B. amyloliquefacien* nội sinh, BA1, nồng độ CFU 10^8 /ml, ở nồng độ 5% cho hiệu quả phòng trừ nấm PT (*E. glycines*) trên đậu tương sau 14 ngày xử lý đạt 80% và sau 30 ngày đạt 81,82%. Trong trường hợp phun phòng trước nửa tháng tới 1 tháng trên lá cây đậu tương thì BA1 cho hiệu quả tốt ở các nồng độ từ 3-4%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đặng Vũ Thị Thanh; Hà Minh Trung (1997). *Phương pháp điều tra bệnh hại cây*

trồng nông nghiệp. Phương pháp nghiên cứu Bảo vệ thực vật. Quyển I, 1997.

2. Nguyễn Lân Dũng và cs. (1972). *Phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*.
 3. *Tiêu chuẩn Bảo vệ thực vật* tập I, II.
 4. *Tuyển tập Tiêu chuẩn nông nghiệp Việt Nam và Phân bón* của tập III, 2001.
 5. Feng Xia Li, Hui Quan Ma, Jing Liu and Chao Zhang (2012). *Antagonistic Effects of Bacillus cereus Strain B-02 on Morphology, Ultrastructure and Cytophysiology of Botrytis cinerea*. Polish Journal of Microbiology, Vol. 61, No 2, 119-128.
 6. Lane DJ (1991). *16S/23S rRNA sequencing*. In: *Stackebrandt et al.(eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematic*. John Wiley and Sons, New York, pp. 115-175
 7. Osman, Mohamed Salia; Sivakumar, Dharini; Korsten, Lise (2010). *Effect of biocontrol agent Bacillus amyloliquefaciens and 1-methyl cyclopropene on the control of postharvest diseases and maintenance of fruit quality*. URI: <http://hdl.handle.net/2263/15130>
 8. Tamura K and Nei M (1993). *Estimation of the number of nucleotide substitutions in the*

- control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
9. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011). *MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
10. Wang, K., Yan, P.S., Ding, Q.L., Wu, Q.X., Wang, Z.B. and Peng, J. (2013). *Diversity of culturable root-associated/endophytic bacteria and their chitinolytic and aflatoxin inhibition activity of peanut plant in China. World J. Microbiol. Biotechnol.* 29 (1),

Ngày nhận bài: 7/2/2015

Người phản biện: GS.TS. Nguyễn Văn Tuất

Ngày phản biện: 5/3/2015

Ngày duyệt đăng: 14/3/2015

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SỬ DỤNG THAN SINH HỌC ĐỂ THAY THẾ PHẦN CHUỒNG VÀ PHẦN VÔ CƠ TRONG SẢN XUẤT LÚA

Nguyễn Hồng Sơn¹, Nguyễn Thị Nguyệt Thu²

ABSTRACT

Production and application of biochar is a new technique in agriculture aiming to improve soil fertility and to ensure sustainable production. However, there has been a little systematic research on this issue. A number of authors have studied on potentiality of biochar to increase rice productivity and to improve soil quality, but not concerned to the possibility to alternative organic and inorganic fertilizers in rice production. This article analyzes the effects of biochar on the growth, development, productivity, economic efficiency and the ability to renovate soil quality when using biochar to alternative organic and a part of inorganic fertilizer in rice production. The results showed that when using biochar and organic fertilizer, the rice growth indicators such as plant height, number of tillers/hill, leaf number /hill, leaf area index, the weight of dry matter, effective tillers and grains were significantly higher than single use of N, P, K, hence productivity was significantly increased. Level of damage caused by insect and disease pest such as rice leaf folders, rice blast, sheath blight were also reduced. Except for three indicators of soil properties such as Ca^{++} , Mg^{++} and K^+ , other important parameters such as soil density, soil porosity, pH_{KCl} , organic carbon OC%, N %, P_2O_5 , K_2O , CEC are markedly improved. However, due to the low price of rice, the value-added income from the increase of rice yield are not enough to compensate the extra cost of biochar use, so the net profit and Marginal Benefit Cost Ratio (MBCR) were lower than single use of N, P, K.

Key words: Biochar, rice, manure, Nitro, Phosphatate, Potassium.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Than sinh học (TSH) được mệnh danh là “vàng đen” trong nông nghiệp. Với hàm lượng carbon cao và đặc tính xốp, than sinh học có thể giúp đất giữ nước, dưỡng chất và bảo vệ vi khuẩn có lợi cho đất, qua đó góp phần tăng sản lượng cây trồng. Bên cạnh đó, TSH còn đóng vai trò như bể chứa carbon tự nhiên - cô lập và nhốt khí CO_2

trong đất (Bhaskar Reddy, 2008). Mặc dù người dân Việt Nam đã biết sử dụng phương pháp đốt yếm khí để sản xuất than hoa, đốt trấu để bón ruộng nhưng những nghiên cứu một cách hệ thống sản xuất và ứng dụng TSH vẫn còn là một lĩnh vực mới mẻ. Gần đây, Viện Môi trường Nông nghiệp đã tiến hành một số đề tài nghiên cứu công nghệ sản xuất than sinh học từ các nguồn phế, phụ phẩm khác nhau. Kết quả cho thấy trữ lượng cacbon chứa trong than

¹ Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.

² Trạm Khuyến Nông Yên Định, Thanh Hóa.