HỘI THẢO QUỐC GIA

BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM

Lần thứ 19

Tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam

23 - 25/10/2020

The 19th National Conference of the Vietnamese Phytopathological Society
V.P.S. October 23 - 25, 2020

Các đại biểu dự Đại hội nhiệm kỳ 2019 - 2024
Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam ngày 3/8/2019

Toàn cảnh Hội trường Đại hội nhiệm kỳ 2019 - 2024 Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam
tại Viện KHKT Nông nghiệp miền Nam (121 Nguyễn Bỉnh Khiêm, phường Đa Kao, quận 1, TP. Hồ Chí Minh)

63 – 630
NN – 2020 – 1/182 –20

ISBN 978-604-60-3239-7

Sách không bán

2020

HỘI THẢO QUỐC GIA BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM LẦN THỨ 19

VIETNAMESE PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY
(HỘI NGHIÊN CỨU BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM)

HỌC VIỆN NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM ★ 1956 ★

HỘI THẢO QUỐC GIA

BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM

ISBN 978-604-60-3239-7

Lần thứ 19

Tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam

23 - 25/10/2020

The 19th National Conference of the Vietnamese Phytopathological Society
V.P.S. October 23 - 25, 2020

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP

HỘI NGHIÊN CỨU BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM
(V.P.S)

HỘI THẢO QUỐC GIA
BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM

Lần thứ 19 tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam
23 - 25/10/2020

The 19th National Conference of the Vietnamese Phytopathological Society
V.P.S., October 23 - 25, 2020

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
HÀ NỘI - 2020

Chủ trì Hội thảo

GS.TS. VŨ TRIỆU MÂN
GS.TS. NGUYỄN THƠ
GS.TS. BÙI CHÍ BỬU
TS. TRỊNH XUÂN HOẠT
PGS.TS. NGUYỄN ĐẮC KHOA
TS. HÀ MINH THANH
PGS.TS. TRẦN THỊ THU HÀ
PGS.TS. HÀ VIẾT CƯỜNG

Ban Biên tập: GS.TS. Vũ Triệu Mân (Trưởng ban)
PGS.TS. Nguyễn Đắc Khoa
ThS. Phạm Thanh Thủy

HOẠT ĐỘNG CỦA HỘI NGHIÊN CỨU BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM TỪ ĐẠI HỘI THÀNH LẬP 3/8/2019

GS.TS. Vũ Triệu Mân
Chủ tịch Hội

THÀNH LẬP HỘI CÓ TƯ CÁCH PHÁP NHÂN - MỘT BƯỚC TIẾN VƯỢT BẬC CỦA HỘI CHÚNG TA

Hội chúng ta được Hội Các ngành Sinh học Việt Nam, Liên hiệp Các Hội Khoa học và Kỹ thuật Việt Nam và Bộ Nội vụ cho phép nên đã làm thủ tục tách ra thành một Hội có tư cách pháp nhân từ năm 2018. Ngày 28/4/2020 Bộ Nội vụ đã có quyết định công nhận Điều lệ của Hội và ngày 7/5/2020 Bộ Công an đã cấp dấu. Như vậy từ nay Hội có thể tự độc lập hoạt động đối nội và đối ngoại, in, xuất bản và phát hành báo chí, tài liệu chuyên môn, thành lập các đơn vị nghiên cứu của Trung ương Hội và tổ chức các Hội cấp tỉnh, thành phố. Ngày 3/8/2019 Đại hội toàn quốc họp tại thành phố Hồ Chí Minh đã bầu Ban Chấp hành mới gồm 42 Ủy viên, có 9 ủy viên Thường vụ. Danh sách Ban Thường vụ, gồm:

GS.TS. Vũ Triệu Mân (Chủ tịch Hội)

6 Phó Chủ tịch Hội là:

GS.TS. Nguyễn Thơ

GS.TS. Bùi Chí Bửu

GS.TS. Bùi Cách Tuyến

PGS.TS. Chu Hoàng Hà (hiện là Phó Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam kiêm Viện trưởng Viện Công nghệ sinh học)

GS.TS. Nguyễn Văn Tuất

TS. Hoàng Trung (hiện là Cục trưởng cục Bảo vệ thực vật - Bộ Nông nghiệp và PTNT)

TS. Trịnh Xuân Hoạt (hiện là Phó Viện trưởng Viện Bảo vệ thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam) - Tổng thư ký kiêm Chánh văn phòng của Hội

PGS.TS. Phạm Văn Dư -Trưởng ban kiểm tra của Hội

Ngoài danh sách trên Ban Thường vụ đề cử TS. Hà Minh Thanh là Phó Trưởng Ban Kiểm tra của Hội, PGS.TS. Hà Viết Cường là Phó Chánh văn phòng Hội ở phía Bắc, PGS.TS. Nguyễn Đắc Khoa là Phó Tổng thư ký Hội, ThS. Chu Trung Kiên là Phó Chánh văn phòng của Hội ở phía Nam.

DANH SÁCH TRÚNG CỬ VÀO BAN CHẤP HÀNH HỘI

TT	Họ và tên	Trú quán/Địa chỉ liên lạc	Trình độ chuyên môn	Cơ quan công tác
1	Vũ Triệu Mân	Căn hộ 1202, tòa nhà 24T1 Hoàng Đạo Thúy, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, TP. Hà Nội	GS.TS.	Học viện Nông nghiệp Việt Nam, Gia Lâm, Hà Nội
2	Nguyễn Văn Tuất	Lô 30, Tập thể Khí tượng Thủy văn, thôn Hoàng 5, Cổ Nhuế, Bắc Từ Liêm, TP. Hà Nội	GS.TS.	Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Thanh Trì, Hà Nội
3	Nguyễn Thơ	Căn hộ A502, Chung cư Đất Phương Nam, 241 Chu Văn An, P12, Bình Thạnh, TP. Hồ Chí Minh	GS.TS.	Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh
4	Bùi Cách Tuyến	11 Lý Văn Phức, phường Tân Định, quận 1, Tp. Hồ Chí Minh	GS.TS.	Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh
5	Bùi Chí Bửu	13D- 4 Sky-Garden 3, Khu Đô thị Phú Mỹ Hưng, quận 7, TP. Hồ Chí Minh	GS.TS.	Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam
6	Chu Hoàng Hà	Số 9 phố Đội Cung, phường Lê Đại Hành, Hai Bà Trưng, TP. Hà Nội	PGS.TS.	Phó Giám đốc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam kiêm Viện trưởng Viện Công nghệ sinh học
7	Hoàng Trung	149 Hồ Đắc Di, Đống Đa, TP. Hà Nội	TS.	Cục trưởng Cục Bảo vệ thực vật
8	Phạm Văn Dư	Số 4 đường 25A, phường Bình Trị Đông B, quận Bình Tân, TP. Hồ Chí Minh	PGS. TS.	Cục Trồng trọt, Bộ Nông nghiệp và PTNT
9	Lê Văn Thiệt	28 Mạc Đĩnh Chi, quận 1, TP. Hồ Chí Minh		Phó Cục trưởng Cục Bảo vệ thực vật phụ trách phía Nam
10	Nguyễn Anh Nghĩa	236 Bis Nam Kỳ Khởi Nghĩa, quận 3, TP. Hồ Chí Minh	TS.	Phó Viện trưởng Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam
11	Nguyễn Đắc Khoa	5 Bis Châu Văn Liêm, quận Ninh Kiều, TP. Cần Thơ	PGS.TS.	Giám đốc Trung tâm Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ
12	Võ Thị Thu Oanh	14 đường 22, khu phố 3, phường Linh Chiểu, quận Thủ Đức, TP. Hồ Chí Minh	TS.	Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

TT	Họ và tên	Trú quán/Địa chỉ liên lạc	Trình độ chuyên môn	Cơ quan công tác
13	Hà Viết Cường	Khu tập thể Học viện Nông nghiệp Việt Nam (thư gửi đến Bộ môn Bệnh cây, Khoa Nông học, HVNNVN)	PGS.TS.	Học viện Nông nghiệp Việt Nam, Gia Lâm, Hà Nội
14	Hà Minh Thanh	Số 28, TT6K, Xuân Phương, phường Xuân Phương, Nam Từ Liêm, Hà Nội	TS.	Viện phó Viện Bảo vệ thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam
15	Nguyễn Văn Nam	75/9 Nguyễn Lương Bằng, TP. Buôn Ma Thuột, Đắk Lắk	PGS.TS.	Phó Hiệu trưởng Trường Đại học Tây Nguyên
14	Nguyễn Vĩnh Trường	362 đường Chi Lăng, TP. Huế, Thừa Thiên Huế	PGS.TS.	Trường Đại học Nông Lâm Huế, 24 Phùng Hưng, TP. Huế, Thừa Thiên Huế
16	TrầnThị Thu Hà	39/250 Phan Bội Châu, phường Trường An, TP. Huế, Thừa Thiên Huế	PGS.TS.	Phó Chủ nhiệm Khoa, Trường Đại học Nông Lâm Huế
17	Nguyễn Thị Mão	Xóm 10, xã Quyết Thắng, TP. Thái Nguyên, Thái Nguyên	PGS.TS.	Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên
18	Trịnh Xuân Hoạt	P 201, chung cư An Lạc, tổ 13, phường Cầu Diễn, Nam Từ Liêm, Hà Nội	TS.	Phó Viện trưởng Viện Bảo vệ thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam
19	Mai Văn Hào	139 sec I -7 đường Lý Chính Thắng, P7, quận 3, TP. Hồ Chí Minh	TS.	Viện trưởng Viện Nghiên cứu Bông Nha Hố, Ninh Sơn, Ninh Thuận
20	Nguyễn Văn Hòa	51 Hồ Bé, khu phố 12, phường 6, TP. Mỹ Tho, Tiền Giang	PGS.TS.	Phó Viện trưởng Viện Cây ăn quả miền Nam, Mỹ Tho, Tiền Giang
21	Nguyễn Thị Ngọc Trúc	Ấp Đông, xã Long Định, huyện Châu Thành, Tiền Giang	TS.	Viện Cây ăn quả miền Nam, Mỹ Tho, Tiền Giang
22	Đặng Vũ Thị Thanh	Số 48, ngách 4, ngõ 5, Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, TP. Hà Nội	TS.	Viện Bảo vệ thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam
23	Nguyễn Văn Thiệp	Xã Phú Hộ, thị xã Phú Thọ, tỉnh Phú Thọ	TS.	Viện KHKT Nông Lâm nghiệp miền núi phía Bắc, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

TT	Họ và tên	Trú quán/Địa chỉ liên lạc	Trình độ chuyên môn	Cơ quan công tác
24	Vũ Thị Bích Hậu	Phòng số 38, chung cư Hòa Thuận, 598 đường Hoàng Diệu, TP. Đà Nẵng	TS.	Phó Giám đốc Sở Khoa học Công nghệ, TP. Đà Nẵng
25	Chu Trung Kiên	59/9 đường 48, phường Hiệp Bình Chánh, quận Thủ Đức, TP. Hồ Chí Minh	ThS.	Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam
26	Lê Khắc Hoàng	29 đường 3 Jamona City, Đào Chi, quận 7, TP. Hồ Chí Minh	TS.	Trường Đại học Nông Lâm, TP. Hồ Chí Minh
27	Phạm Xuân Hội	Nhà số1 dãy A4, ngõ 126 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, TP. Hà Nội	PGS.TS.	Viện trưởng Viện Di truyền nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam
28	Đào Thị Lan Hoa	75/9 Nguyễn Lương Bằng, Buôn Ma Thuột, Đắk Lắk	ThS.	Viện KHKT Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam
29	Đinh Quốc Hòa	79/7 Lê Hoàng Phái, phường 17, quận Gò Vấp, TP. Hồ Chí Minh	ThS.	Giám đốc Công ty Nông Việt
30	Nguyễn Thanh Thủy	Số 58 Nguyễn Bỉnh Khiêm, phường Đa Kao, quận 1, TP. Hồ Chí Minh	KS	Giám đốc Công ty VINAXANH
31	Nguyễn Thị Thu Nga	1B đường 30/4, phường An Lạc, TP. Cần Thơ	TS	Trường Đại học Cần Thơ
32	Nguyễn Thị Kiều	Số 23 Lê Chân, KDC 91 B, Ninh Kiều, TP. Cần Thơ	KS	Phó Giám đốc Sở Nông nghiệp và PTNT Cần Thơ
33	Nguyễn Thị Phong Lan	Tập thể Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long, xã Tân Thanh, huyện Thới Lai, TP. Cần Thơ	TS	Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long, Ô Môn, Cần Thơ
34	Nguyễn Thị Thanh Xuân	Phòng 8 D3, đường Võ Thị Sáu, TP. Long Xuyên, An Giang	PGS.TS.	Phó Chủ nhiệm Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học An Giang
35	Võ Thị Dung	Khối 7, phường Quán Hầu, TP. Vinh, Nghệ An	ThS.	Phó Chủ nhiệm Khoa Nông Lâm Ngư, Trường Đại học Kinh tế Nghệ An

TT	Họ và tên	Trú quán/Địa chỉ liên lạc	Trình độ chuyên môn	Cơ quan công tác
36	Trần Nguyễn Hà	NQ 1918 Vinhome Harmony, Long Biên, Hà Nội	TS.	Chủ nhiệm Khoa Sư phạm Kỹ thuật, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
37	Nguyễn Đức Bách	Số 28, đường Lệ Mật, phường Việt Hưng, quận Long Biên, TP. Hà Nội	PGS.TS.	Chủ nhiệm Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
38	Nguyễn Xuân Hồng	Số 8, ngõ 68, đường Vạn Phúc, quận Hà Đông, TP. Hà Nội	PGS.TS.	Phó Chủ tịch Hội Làm vườn Việt Nam
39	Trịnh Quang Pháp	Số 105, ngách 291/42, Khương Trung, Thanh Xuân, Hà Nội	TS.	Bộ môn Tuyến trùng, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
40	Nguyễn Văn Biếu	Số 10, ngách 100/74, phố Tây Sơn, Đống Đa, Hà Nội	TS.	Tổng Thư ký Hội Các Ngành Sinh học Hà Nội
41	Nguyễn Danh Vàn	C0121 Ngô Tất Tố, P19, quận Bình Thạnh, TP. Hồ Chí Minh	ThS.	Trung tâm KDTV Sau nhập khẩu II
42	Nguyễn Thanh Hiền	2/39B Tân Lập, xã Tân Thới Nhì, huyện Hóc Môn, TP. Hồ Chí Minh	KS.	Phó Giám đốc Trung tâm Nông nghiệp Công nghệ cao

DANH SÁCH TRÚNG CỬ BAN KIỂM TRA CỦA HỘI

1	Phạm Văn Dư	Số 4, đường 25A, phường Bình Trị Đông B, quận Bình Tân, TP. Hồ Chí Minh	PGS.TS.	Cục Trồng trọt, Bộ Nông nghiệp và PTNT
2	Hà Minh Thanh	Số 28, TT6 K, Xuân Phương, phường Xuân Phương, Nam Từ Liêm, TP. Hà Nội	TS.	Phó Viện trưởng Viện Bảo vệ thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam
3	Trần Thị Thu Hà	39/250 Phan Bội Châu, phường Trường An, TP. Huế, Thừa Thiên Huế	PGS.TS.	Phó Chủ nhiệm Khoa, Trường Đại học Nông Lâm Huế
4	Võ Thị Thu Oanh	14 đường 22, khu phố 3, phường Linh Chiểu, quận Thủ Đức, TP. Hồ Chí Minh	TS	Trường ĐH Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

Hiện nay Hội là tập hợp 726 Hội viên gồm nhiều ngành khoa học khác nhau như: Bệnh cây, Công nghệ sinh học, Di truyền tính chống bệnh, Côn trùng môi giới truyền bệnh, Biện pháp canh tác, Biện pháp sinh học, Hóa học phòng chống bệnh và bảo vệ môi trường, Hiệu quả kinh tế phòng chống bệnh,... Hiện có 7 trường đại học và 17 viện nghiên cứu đã tham gia Hội.

Biến đổi khí hậu đang gây nguy hiểm nhất tới cuộc sống của con người. Vì vậy cây xanh trở nên quan trọng nhất, cây giúp điều hòa khí hậu đồng thời cung cấp một nguồn thức ăn khổng lồ cho con người và sinh vật trên trái đất. Nếu mất cây xanh cả con người và các sinh vật sẽ không còn. Bệnh hại cây hiện nay là nguyên nhân gây hại nguy hiểm nhất với cây xanh. Nhận thức rõ điều này hàng trăm Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật đã được thành lập ở các nước, đặc biệt Hội phát triển mạnh và rất đông hội viên ở các nước như Nga. Thụy Điển, Anh, Mỹ, Đức, Pháp, Nhật Bản, Canada, Úc, Hà Lan..., các nước Bắc Âu, Ấn Độ, Trung Quốc.

Hội của chúng ta hiện nay đã có con dấu, có tài khoản riêng đó là:

Tên Tài khoản: Hội Nghiên cứu Bệnh hại thưc vật Việt Nam

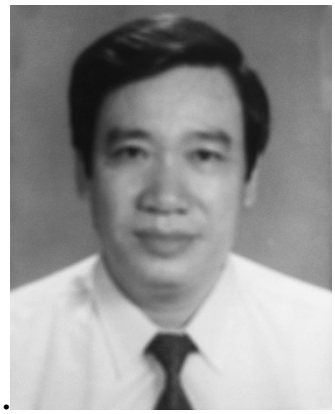
Số Tài khoản: 125-10-00-183200-1

Tại Ngân hàng Đầu tư và Phát triển Việt Nam (BIDV), chi nhánh Đông Đô, 24T1 Hoàng Đạo Thúy, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội.

Bước đầu hoạt động còn khó khăn nhưng Hội sẽ nhanh chóng vươn lên thành đơn vị có hoạt động năng động, đóng góp quan trọng vào việc bảo vệ mùa màng trong nước, phấn đấu có vị thế trong khu vực và thế giới. Trở thành Hội có tư cách pháp nhân đầu tiên trong 16 Hội thuộc Hội Các Ngành Sinh học Việt Nam là một thắng lợi lớn của Hội chúng ta, nhưng Hội cũng nhận thêm nhiều trách nhiệm nặng nề. Nhiệm vụ trước mắt là Hội cần soạn thảo đầy đủ các văn bản, quy định về các vấn đề liên quan thường xuyên đến hoạt động của Hội. Xây dựng hệ thống tổ chức gồm Trung ương Hội, hệ thống các Văn phòng đại diện, Viện, Trung tâm và sắp xếp lại hệ thống cán bộ Hội từ Trung ương Hội đến cơ sở. Đặc biệt chú ý xây dựng các Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật cấp tỉnh. Hiện nay đã có nhiều đơn vị góp kinh phí làm thẻ nhưng do việc chuẩn bị Đại hội đại biểu và Hội thảo lần này Hội chưa thực hiện cấp thẻ ngay cho các Hội viên được. Sau Hội nghị này sẽ ấn định thời gian cấp thẻ và có thông báo sau.

Do dịch Covid 19 gây ra sự đình trệ về các hoạt động kinh tế và đời sống nên hoạt động của Hội chúng ta vào lúc này là vô cùng khó khăn. Ban Chấp hành Hội kêu gọi toàn thể Hội viên của Hội cùng đoàn kết, sáng tạo vượt qua mọi trở ngại vươn lên giành nhiều thành công mới trong mọi hoạt động khoa học nghiên cứu, ứng dụng, thiết thực phục vụ sản xuất, đời sống và giúp cho Chi hội cơ sở khôi phục hoạt động nhanh chóng, toàn Hội chúng ta cùng tiến lên giành thắng lợi mới trong nhiệm kỳ quan trọng này, thời đại đổi mới, thời đại 4.0 của thế giới. Vừa qua Hội chúng ta có một mất mát lớn đó là sự ra đi đột ngột của GS.TS. Phạm Văn Biên, là một trong những thành viên sáng lập và là Phó Chủ tịch Hội trong nhiệm kỳ đầu tiên 2001 - 2005 của Hội. Chúng tôi đề nghị toàn thể các đại biểu giành một phút mặc niệm để tưởng nhớ GS.TS. Phạm Văn Biên, người bạn, người đồng chí thân thiết của chúng ta.

TƯỞNG NHỚ GS.TS. PHẠM VĂN BIÊN
NGUYÊN PHÓ CHỦ TỊCH HỘI NGHIÊN CỨU BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM
- NGƯỜI BẠN, NGƯỜI ĐỒNG CHÍ THÂN THIẾT CỦA CHÚNG TA



GS.TS. Phạm Văn Biên đã đột ngột vĩnh biệt chúng ta hồi 11g30 ngày 14 tháng 1 năm 2020 (tức ngày 20 tháng chạp năm Kỷ Hợi) hưởng thọ 74 tuổi để lại niềm tiếc thương vô hạn cho gia đình, bạn bè, đồng chí của anh. GS. Pham Văn Biên sinh ngày 18/9/1945 tại quê hương xã Kim Bình, huyện Kim Bảng, tỉnh Hà Nam. Là con một gia đình nghèo nhưng rất coi trọng việc học, gia đình đã cho anh lên Hà Nội học Trường cấp I Ngô Sĩ Liên và cấp II, III Trưng Vương. Anh đã thi đỗ vào Trường Đại học Nông nghiệp I Hà Nội và tốt nghiệp năm 1968 với kết quả xuất sắc. Ra trường anh đi chỉ đạo sản xuất nông nghiệp từ tháng 11/1968 đến tháng 12/1969. Cùng ăn, cùng ở, cùng làm với nông dân anh càng thông cảm và thêm quyết tâm học tập để góp phần thay đổi quê hương và nông thôn Việt Nam. Do những kết quả học tập và rèn luyện thực tế tốt, năm 1970 anh đã trở thành giảng viên đại học tại Trường Đại học Nông nghiệp II. Ở trường, anh đã cùng đồng nghiệp và các sinh viên vượt qua nhiều khó khăn trong bom đạn chiến tranh phá hoại miền Bắc của Mỹ lúc ấy để hoàn thành tốt nhiệm vụ giảng dạy. Sau chiến thắng 30/4/1975 đất nước thống nhất, anh được vinh dự sang học tập tại thành phố Ki-ép Liên Xô và đã hoàn thành luận văn Phó Tiến sĩ chuyên ngành Bệnh cây, ngành Bảo vệ thực vật vào năm 1979 (nay là luận văn Tiến sĩ). Trở về nước anh trở thành cán bộ nghiên cứu của Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. Anh lần lượt đảm nhiệm các chức vụ Phó Bộ môn rồi Trưởng Bộ môn Trồng trọt tổng hợp, Trưởng Bộ môn Bảo vệ thực vật, Phó Viện trưởng (1981 - 1993), Viện trưởng Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam (1993 - 2006). Là nhà khoa học có nhiều đóng góp cho Viện Khoa học Kỹ thuật miền Nam và sản xuất. Anh là Chủ tịch nhiều Hội đồng Khoa học cấp nhà

nước, cấp bộ, cấp tỉnh và thành phố, là người đào tạo nhiều tiến sĩ, thạc sĩ và sinh viên tốt iệp đại học. Anh còn là nhà hoạt động xã hội xuất sắc từ khi đi học: là Hội phó Hội Lưu học sinh thành phố Ki-ép, là Đại biểu Hội đồng nhân dân thành phố Hồ Chí Minh, Ủy viên Ủy ban Mặt trận Tổ quốc thành phố hai nhiệm kỳ (2009 - 2019). Là Đảng viên có 45 năm tuổi Đảng anh đã nhận nhiều công tác như Bí thư Đảng ủy Viện Khoa học Kỹ thuật miền Nam, Ủy viên Ban Chấp hành Đảng bộ khối cơ sở Bộ Nông nghiệp và PTNT tại TP. Hồ Chí Minh.

Với những thành tích trên anh đã nhận nhiều bằng khen các cấp, Huân chương Lao động do nhà nước trao tặng. Đặc biệt anh là thành viên sáng lập tích cực và là Phó Chủ tịch của Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam cùng với các anh GS.TS. Bùi Cách Tuyến, GS.TS. Nguyễn Văn Tuất, PGS.TS. Nguyễn Văn Viết và tôi tham gia Ban Lãnh đạo khóa đầu tiên của Hội (2001 - 2005). Tôi gọi GS.TS. Phạm Văn Biên là anh vì tuy đã hơn 70 tuổi đời nhưng anh vẫn yêu đời, tươi trẻ như tuổi thanh niên. Đối với chúng tôi anh đã để lại nụ cười thân ái, lạc quan động viên toàn Hội phấn đấu vươn lên đoàn kết giành nhiều thành công mới trong sự nghiệp xây dựng và phát triển Hội, đóng góp cho công cuộc đổi mới đất nước và hình ảnh của anh sẽ mãi còn với sự nghiệp của Hội chúng ta.

Chủ tịch Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam

GS.TS. Vũ Triệu Mân

CANH TÁC VÀ QUẢN LÝ DỊCH HẠI THEO HƯỚNG HỮU CƠ SINH HỌC, THAY ĐỔI TẬP QUÁN LẠM DỤNG HÓA HỌC

Nguyễn Thơ

Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam

ABSTRACT

Cultivation and pest management on the base of using bio-organic matters and less chemical use for increasing soil fertility

The crop production in Vietnam so far has mainly used chemical fertilizers, plant protection drugs and herbicides, Hence, this cultivation modality has resulted in negative consequences such as the decrease of biological diversity in soil, soil degradation, the reduction of beneficial microorganisms, while harmful microogranisms increase more and more causing various destructive soil-borne diseases in several major crops like coffe, black pepper and fruit trees. Besides, the abuse of chemicals in agricultural production has caused environmental pollution and unsafe product. To overcome this damaging situation, it is essential to transform intensely the cultivation modality from the predominant use of chemicals to the bio-organic fertilizers and biological plant production drugs would help restore, improve soil fertility and biological diversity, simultaneously manage diseases efficiently, contributing to sustainable production and safe products.

Keywords: *Cultivation, biological diversity, bio-organic, disease management, siolmicroorganisms.*

Sản xuất nông nghiệp nước ta thâm canh dựa trên cơ sở hóa học là chính. Phương thức sản xuất đó trong nhiều năm, dần dẫn đến lạm dụng phân bón, thuốc bảo vệ thực vật. Bên cạnh mặt tích cực, nền nông nghiệp hóa học tồn tại trong thời gian dài đã dẫn đến hệ lụy nặng nề: Đất đai bị thoái hóa nghiêm trọng, kém đa dạng sinh học, nhất là trong đất; Cây trồng ngày càng nhiều sâu bệnh, việc quản lý dịch hại ngày càng kém hiệu quả; Chất lượng nông sản thấp, không sạch (không an toàn). Việc lạm dụng hóa học đã làm cho sản xuất nông nghiệp nước ta kém bền vững, hiệu quả kinh tế thấp, nhất là đất đai ngày càng thoái hóa, cạn kiệt.

Cách khắc phục hiện nay, không có con đường nào khác, phải thay đổi tập quán, không lạm dụng hóa học, canh tác

Người phản biện: TS. Nguyễn Đăng Nghĩa.

tập trung theo hướng hữu cơ và sinh học. Đương nhiên, sản xuất nông nghiệp vẫn còn phải sử dụng hóa học, nhưng phải sử dụng hữu cơ là chính (organic based). Tùy theo điều kiện đất đai của từng vùng, việc tăng cường sử dụng phân hữu cơ và sinh học nhằm mục đích cải tạo đất, quản lý dịch hại có hiệu quả và sản xuất nông sản có chất lượng sạch, an toàn. Đây là vấn để có tầm ảnh hưởng rất quan trọng trên ba mặt:

- Cải tạo, làm tăng độ phì của đất, trong tình hình hiện nay đất đang bị thoái hóa nghiêm trọng.

- Quản lý dịch hại hiệu quả và bền vững.

- Sản xuất nông sản sạch (nông sản an toàn), có chất lượng cao.

Dưới đây chúng tôi trao đổi một số vấn đề về mối quan hệ giữa hữu cơ, vi sinh vật, sức khỏe của đất và sức khỏe cây trồng.

I. THỰC TRẠNG ĐẤT ĐAI VÀ DỊCH HẠI CÂY TRỒNG CÓ NGUỒN TỪ TRONG ĐẤT (SOIL BORN DISEASE)

Theo kết quả điều tra cho thấy, sản xuất của cả nước đã bón bình quân trên 1 tấn phân hóa học cho một héc-ta (chủ yếu là phân đạm). Trong trường hợp thâm canh cao, như sản xuất hồ tiêu, cây ăn trái, lượng phân bón còn cao hơn nhiều. Ngoài lượng phân bón quá lớn, với quan điểm sai lầm: diệt sạch sâu bệnh hại và cỏ dại, người sản xuất sử dụng số lượng lớn thuốc hóa học bảo vệ thực vật, nhất là thuốc trừ cỏ. Tình hình lạm dụng hóa học trong nông nghiệp như trên đã và đang diễn ra trong thời gian dài đã đem lại hậu quả nghiêm trọng:

- Nhiều vùng đất bị ngộ độc, nguồn nước, môi trường sống nhiều vùng nông thôn bị ô nhiễm do dư lượng hóa chất.

- Đất bị thoái hóa nghiêm trọng vì rửa trôi. Tính chất của đất: chua, độ mùn thấp, không có cấu tượng, yếm khí.

- Đất kém đa dạng sinh học, nghèo vi sinh vật có ích (Lợi khuẩn - Probiotic), số lượng vi sinh vật gây bệnh hại cho cây trồng cao.

Từ tình hình đó, hàm lượng hữu cơ trong đất ngày càng nghèo kiệt, đất thoái hóa, giảm đa dạng hóa sinh hoc nghiêm trọng. Các loại ví sinh vật (VSV) gây bệnh tích lũy trong đất như: nấm, vi khuẩn, tuyến trùng gây bệnh cho cây trồng có nguồn từ trong đất ngày càng phổ biến. Chúng gây ra nhiều bệnh quan trọng trên nhiều cây trồng như hồ tiêu, cà phê, ca cao và cây ăn quả, rất khó phòng trị. Các cây ngắn ngày như rau, đậu cũng bị bệnh nặng bởi các VSV có nguồn bệnh từ trong đất. Ngoài ra, cũng có nhiều loại VSV đất tạo độc tố (*Mycotoxin*) trong nông sản. Trong đó, nặng nhất có độc tố vi nấm trên hạt đậu phộng do nấm *Aspergillus* và độc tố trên trái cây do nấm *Alternaria* gây ra.

Đối với những loại bệnh nói trên, việc phun thuốc lên cây để phòng trừ rất kém hiệu quả vì nguồn bệnh chủ yếu nằm trong đất. Việc đổ thuốc vào đất để trừ bệnh càng nguy hại, vì không biết ổ bệnh nằm ở đâu, nên phải đổ thuốc tràn lan, làm ô nhiễm môi trường đất.

Những tồn tại về thoái hóa đất, dịch hại ngày càng tăng, ngày càng sinh ra nhiều vấn đề nan giải, làm cho hiệu quả của các biện pháp đầu tư thâm canh ngày càng thấp và tốn kém. Do chạy theo lợi

nhuận tối đa, người sản xuất càng phải đầu tư lớn hơn theo kiểu *"khát nước"* tác hại ngày càng lớn, nếu không kịp thời sửa chữa sẽ đi đến bế tắc trong sản xuất bền vững.

Tây Nguyên là một trong những vùng đất tốt nhất của Việt Nam. Đất rất màu mỡ nhưng hiện nay đất bị chua, nghèo dinh dưỡng, kèm theo các loại nấm, tuyến trùng gây bệnh phát triển rất mạnh. Nhiều loại dịch hại ngày càng trở nên nặng nề cho cây trồng có giá trị kinh tế cao như: cà phê, hồ tiêu, cây ăn quả, cây dược liệu.

Như phân tích, thực trạng đất càng thoái hóa, cây trồng bị dịch hại ngày càng nặng. Sức sống của đất chủ yếu phụ thuộc vào sự hoạt động của quần thể VSV. Vậy làm gì để VSV hoạt động được tốt trong đất. Vấn đề này có thể trao đổi ở những nội dung tiếp sau.

II. SỰ TÁC ĐỘNG CỦA QUẦN THỂ VSV TRONG ĐẤT

Đất là cơ thể sống. Cuộc sống của đất chủ yếu phụ thuộc vào hoạt động của quần thể VSV.

VSV đất có thể chia ra làm 4 loại chính:

- VSV có hại, chủ yếu là VSV gây bệnh cho cây trồng.

- VSV có ích (tạo dinh dưỡng cho đất, cho cây trồng, chung sống và bảo vệ cây trồng).

- VSV đối kháng, diệt trừ VSV gây bệnh cho cây trồng.

- VSV trung tính (không có lợi, không gây hại).

Sau đây, chúng ta trao đổi một số tính chất của từng loại VSV.

Đặc điểm của VSV có hại, tác nhân gây bệnh cho cây trồng có nguồn từ trong đất

- Tác nhân gây bệnh cho cây trồng là do các vi sinh vật (VSV) có hại. Hầu hết các VSV (nấm, vi khuẩn) và tuyến trùng gây bệnh hại cây trồng có nguồn từ trong đất đều có khả năng sống theo kiểu vừa hoại sinh (saprophyte) vừa ký sinh (parasite). Vì vậy nguồn thức ăn của chúng rất phong phú, có thể lấy cả từ đất và từ cây trồng. Khi đất bị thoái hóa, nghèo dinh dưỡng chúng chuyển sang sống và lấy thức ăn từ cây trồng.

- Sự phát triển của các loại VSV gây bệnh cho cây trồng có nhiều dạng cơ thể như: bào tử, quả thể, dạng sợi tồn tại trong xác thực vật rất bền vững, có tính chống chịu rất cao. Vì vậy VSV gây bệnh cây trồng có thể tích lũy, tồn tại lâu đài trong đất. Khi trên vườn cây đã có bệnh cây trồng chết hết thì chúng tiếp tục tồn tại trong đất.

- Các VSV có hại trong đất thường phối hợp với nhau gây bệnh cho cây trồng cùng một lúc, cho nên thường gây cho cây bệnh lúc đầu nhẹ sau nặng dần rồi chết.

- VSV, tuyến trùng trong đất thường gây bệnh phá hại bộ rễ là chính, rất khó thấy sớm triệu chứng, khi thấy biểu hiện bệnh trên cây (vàng lá, héo, chết cây) thì bệnh đã nặng, rất khó phòng trị.

Từ những đặc điểm nói trên, việc trừ bệnh cho cây trồng có nguồn từ trong đất là chậm và rất khó khăn.

Đặc điểm của VSV có ích, VSV đối kháng và VSV trung tính

Một điều rất may mắn cho tự nhiên là số lượng của VSV có ích, VSV đối kháng và VSV trung tính trong đất là rất lớn, chúng được gọi là lợi khuẩn (probiotic).

Những hoạt động sinh trưởng và phát triển của cây trồng đều liên quan chặt chẽ với hoạt động của VSV có ích và đối kháng, nhiều điều trong mối quam hệ đó chúng ta chưa hiểu hết. Một số hiểu biết cụ thể của lợi khuẩn có thể như sau:

Những hoạt động thường thấy của VSV có ích:

- Tất cả xác bã động thực vật trên trái đất đều được phân hủy đến sản phẩm cuối cùng là acid hữu cơ và các chất khoáng, từ đó tạo ra độ phì của đất và là thức ăn cho sinh vật đất và cây trồng.

- VSV có ích làm công việc cố định đạm, phân giải lân dễ tiêu, tạo những hợp chất hormone, kháng sinh, các vitamin làm thức ăn và bảo vệ cho cây trồng.

- Nhiều loại VSV có ích cộng sinh và trực tiếp nuôi và bảo vệ cây trồng.

VSV đối kháng:

- Trong chuỗi thức ăn của tự nhiên, VSV đối kháng luôn sử dụng VSV có hại làm thức ăn, chúng giết chết VSV gây bệnh và bảo vệ cây trồng.

- Mặc khác, VSV đối kháng còn tạo ra những hợp chất kháng sinh, enzymes để khống chế sâu bệnh hại cây trồng.

- Nhiều trường hợp VSV đối kháng còn kích thích cho cây có khả năng kháng bệnh.

VSV trung tính:

- Trong đất còn có một số lượng lớn VSV không có lợi nhưng cũng cũng không gây hại gì cho cây trồng, thường gọi đó là những VSV trung tính.

- Nhưng VSV trung tính có đặc điểm thay đổi tính chất rất mạnh. Nếu môi trường đất tốt (có độ phì) chúng chuyển thành VSV có ích, ngược lại đất nghèo cạn kiệt chúng chuyển thành VSV có hại.

Sự đa dạng sinh học đất, phong phú nhất là quần thể VSV. Như trên đã nêu, nếu đảm bảo sự cân bằng sinh thái tốt thì quần thể VSV có ích, trung tính và đối kháng bao giờ cũng lớn hơn gấp nhiều lần áp đảo số lượng VSV có hại. Trong điều kiện đó, sẽ luôn có lợi cho cây trồng:

- Các VSV có ích chế biến thức ăn, tạo dinh dưỡng nuôi cây trồng.

- Quần thể VSV có ích, trung tính và đối kháng sẽ đủ sức khống chế VSV có hại. Đồng thời chúng kích thích cho cây trồng có tính kháng sâu bệnh, sinh trưởng khỏe mạnh, tạo năng suất cao và chất lượng tốt.

Để có được sự đa dạng sinh học có lợi, quần thể VSV phát triển phong phú, đất phải tốt. Nghĩa là đất phải có độ phì, hay nói cách khác đất phải giàu hữu cơ.

III. MỐI QUAN HỆ CỦA HỮU CƠ (ĐỘ PHÌ) TRONG ĐẤT VỚI VSV ĐẤT VÀ SỨC KHỎE CỦA CÂY TRỒNG

Đất có độ phì, phải có nhiều mùn, thành phần chính của mùn là acid hữu cơ, sản phẩm được VSV có ích phân giải cuối cùng từ xác bã động thực vật.

Vai trò của hữu cơ trong đất tóm tắt như sau:

- Mùn sẽ làm cho đất có cấu tượng (structure), đất sẽ thoáng, háo khí.

- Thoát nước tốt. Hạn chế rửa trôi, đất không bị chua, dinh dưỡng cân đối. Đó là điều kiện quan trọng cho VSV và cây trồng phát triển.

- Cấu tượng đất là nơi cư trú lý tưởng của VSV và là điều kiện sống tốt cho cây trồng.

- Các acid hữu cơ, protein, enzyme, vitamin, vi lượng được phân giải ra từ xác bã động thực vật là thức ăn quan trọng của VSV và cây trồng.

Sau đây, có thể tham khảo một ví dụ về đa dạng sinh học của đất giàu hữu cơ của rừng nguyên sinh.

Theo Juan Jose Hernandez Seg(2011),(www.youtube.com/watch?v = p-k_aU_AHj8). Trong môi trường đất rừng nguyên sinh, sinh thái tự nhiên chưa bị phá vỡ, giàu hữu cơ, sự đa dạng sinh học rất phong phú. Khối lượng của các loài sinh vật sống và chết trên một ha đất với chiều sâu 20 cm có:

1) Các loại động vật sống (không phải vi sinh vật) và rễ cây có 15.000 kg/ha.

2) Côn trùng (insectos): 1000 kg/ha.

3) Trùn đất (lombriceos): 500 kg/ha.

4) Tuyến trùng (nematodeos): 50 kg/ha.

5) Động vật giáp xác (crustaceos): 40 kg/ha.

6) Loài gặm nhấm và rắn (roedores y culebras): 20 kg/ha.

7) Xác động vật chết: 4000 kg/ha.

8) Những vi sinh vật sống (microorganismos vivos) như:

+ Vi khuẩn (bacterias): 3000 kg/ha.

+ Nấm (hongos): 3000 kg/ha.

+ Xạ khuẩn (actinomicetos): 1500 kg/ha.

+ Nguyên sinh động vật (protozoos): 100 kg/ha.

+ Rong tảo (algas): 100 kg/ha.

+ Chất hữu cơ đã phân hủy (materiales organicos muertos): 150 kg/ha.

Tổng cộng: 178330 kg/ha (những số liệu trên đây chỉ mang tính tham khảo).

Từ tài liệu trên cho thấy sự sống trong đất tự nhiên là rất phong phú và đa dạng. Chính sự đa dạng sinh học trong đất đã bảo vệ và giúp cho cây trồng khỏe mạnh, kháng lại dịch hại có hiệu quả. Ngoài ra, với khối lượng sinh vật 178 tấn/ha, sau khi chúng chết đi, sẽ để lại lượng phân bón hữu cơ sinh học khổng lồ có chất lượng rất cao, là một điều kiện rất tốt cho cây trồng phát triển, đâu cần đến kilogram phân hóa học nào. Đây là bài học quý giá của tự nhiên cho con người.

Trong sự đa dạng sinh học của đất, quan trọng nhất là sự phong phú của VSV, có tính quyết định cho sự sống của đất. Ta hãy phân tích vài khía cạnh hoạt động quan trọng của VSV đất.

Arden B. Andersen (1992, 2000), VSV có vai trò rất quan trọng trong đời sống của đất. Quần thể VSV chính của đất có các loại: vi nấm, vi khuẩn, virus, tảo và tuyến trùng. Trong đó phần lớn chúng là những VSV có ích (*VSV tạo dinh dưỡng để nuôi cây*), VSV trung tính (*VSV không có lợi và cũng không có hại*) và VSV đối kháng (*VSV tiêu diệt những VSV gây bệnh cây trồng*). Trong đất chỉ có một số rất ít là VSV có hại, gây bệnh

cho cây trồng, một số VSV khác, chúng tạo ra độc tố trong nông sản, gây bệnh cho người và gia súc. Nếu VSV có ích phát triển mạnh, chúng sẽ nuôi cây khỏe, làm tăng sức đề kháng sâu bệnh. Các VSV đối kháng sẽ khống chế nguồn VSV gây bệnh và VSV sinh ra độc tố trong đất.

VSV có ích và đối kháng thích sống trong đất tốt, có nhiều hữu cơ, đất có pH trung tính và háo khí. Đặc biệt, hợp chất hữu cơ là nguồn thức ăn quan trọng cho VSV có ích và đối kháng. Trong điều kiện đất tốt, VSV trung tính sẽ biến đổi thành VSV có ích và ngược lại. Mặc khác, kết quả nhiều nghiên cứu cho thấy, trên một héc-ta đất có đến hàng tấn VSV, đời sống của chúng rất ngắn, sinh sản và chết đi liên tục. Khi chết chúng để lại nguồn thức ăn hữu cơ cực kỳ lớn cho cây trồng, đấy là một kiểu sản xuất phân hữu cơ tại chỗ.

Khi đất suy thoái, nghèo hữu cơ, thừa đạm hóa học (có lúc vì bón quá liều lượng trong nhiều ngày gây cho đất bị ngộ độc hóa học), dư lượng hóa chất độc hại, pH thấp, quần thể VSV có ích và đối kháng kém phát triển, VSV trung tính sẽ biến đổi thành VSV gây hại. Vì vậy, VSV gây bệnh sẽ phát triển tự do vì chúng không còn bị khống chế hữu hiệu của VSV có ích. Mặc khác, đất xấu làm cây kém phát triển, sức đề kháng kém.

Trong lúc đó VSV gây bệnh lại sinh sống và lấy thức ăn từ cây trồng. Cho nên, khi đất bị thoái hóa, không ảnh hưởng gì đến đời sống của VSV có hại. Trái lại, đất càng cằn cỗi thì chúng phá hại cây trồng nặng thêm.

Đó là nguyên nhân làm cho dịch hại trên cây trồng ngày càng nặng, mặc dầu hiện nay không thiếu thuốc BVTV hóa học.

Theo kinh nghiệm cho thấy, khi chúng ta sử dụng VSV đối kháng, ví dụ như nấm *Trichoderma* đưa vào đất để trừ bệnh, thì đồng thời phải bón đầy đủ phân hữu cơ (*làm thức ăn cho nấm Trichoderma*) thì chúng mới hoạt động và phòng trừ bệnh có hiệu quả.

Nói đến độ phì của đất, nông dân đã có kinh nghiệm "*Đất có giun (trùn) là đất tốt*". Sau đây, tham khảo một số nhận xét.

Loài giun (trùn) (earthworm) và độ phì của đất

Theo Russell, đất có được bón phân hữu cơ từ nguồn phân bò, nguồn phế thải của cây trồng, có tác dụng chi phối đến sự sống sinh vật đất, nhất là loài giun đất. Giun phát triển được trong đất nhờ có hữu cơ, đất có độ phì. Tác giả đã tính, trong đất không bón phân chuồng có 32.000 cá thể giun/ha, nếu đất có bón phân chuồng đầy đủ thì lượng giun đạt tới 2.240.000 con/ha.

Lutz và Chandler cho biết, trong đất bình thường số lượng giun dao động từ 617.000 đến 2.240.000 giun/ha. Theo tính toán của Russell, giả sử mỗi con giun có trọng lượng bằng 0,5 g, tương ứng khoảng 16 kg và 1120 kg sinh khối giun/ha.

Giun di chuyển trong đất sẽ làm cho đất tơi xốp, háo khí. Nông dân thường gọi "Con giun là trai cày của đất". Đất có nhiều giun là đất tốt, có nhiều mùn, chắc chắn sẽ có nhiều VSV. Đất có nhiều giun, trên mặt đất sẽ có nhiều phân giun (nhất là sau trời mưa). Vì thế, nông dân thường dễ nhận biết, đất có nhiều phân giun là

đất tốt. Ở khía cạnh khác, có thể xác định: *Giun là sinh vật chỉ thị cho đất tốt.*

Theo Saburo Matsui (2018), để đất tốt, trong đất phải có nhiều xác bã hữu cơ, làm nguyên liệu cho vi sinh vất phân hủy thành tập hợp acid humid, đó là thành phần cơ bản để tạo thành mùn trong đất. Trong tập hợp mùn phải gồm có cát, hạt limon (hạt cát có kích thước rất mịn) được kết dính lại bởi acid humid. Trong mùn có tập hợp vi sinh vật gồm vi khuẩn, nấm, tuyến trùng và giun (trùn). Trong đất tốt phải có khoản 5 tỷ vi khuẩn có ích trên một gam đất.

Với những quan điểm như đã nói trên, các hợp chất hữu cơ có vai trò quan trọng cho đời sống của VSV đất. Mối quan hệ hũu cơ - vi sinh vật đất là cơ sở hoạt động sống của đất, từ đó tạo dựng nuôi dưỡng cây trồng khỏe mạnh, hay còn gọi *"Đất khỏe, Cây trồng khỏe"*. Vai trò hữu cơ trong đất là rất quan trong, vậy bằng biện pháp nào để có nhiều hữu cơ bón cho đất.

IV. BIỆN PHÁP TRẢ HỮU CƠ LẠI CHO ĐẤT

Trong nông nghiệp đang rất thiếu phân bón hữu cơ. Tuy mọi sinh vật đều sinh ra từ đất, đó chính là hữu cơ, hay nói cách khác, hữu cơ sinh ra từ đất. Con người đã sai lầm, lấy hữu cơ của đất, nhưng trả lại đất bằng hóa học là chính, làm cho đất bị mất cân bằng và thoái hóa nặng nề. Nay phải đưa ra khẩu hiệu: *Trả hữu cơ lại cho đất.* Đồng thời không làm bất cứ điều gì có hại cho đất vì mất hữu cơ, dầu cho đó là biện pháp có lợi trước mắt.

Để trả hữu cơ lại cho đất, người nông dân có nhiều kinh nghiệm, xin nêu một số biện pháp để tham khảo.

1. Không đốt đồng

Một tập quán từ ngàn xưa, đốt rừng để khai hoang, đốt đồng để làm sạch ruộng. Việc đốt bỏ, hàng năm đã tiêu hủy khối lượng cực lớn hữu cơ và làm ô nhiễm môi trường. Nay đã có chủ trương không đốt đồng, để hữu cơ lại cho đất. Đây là biện pháp trả hữu cơ lại cho đất cực kỳ quan trọng.

2. Làm đất tối thiểu

Đất nước ta có khí hậu nhiệt đới ẩm, lượng mưa lớn, việc cày bừa hàng năm đã làm trôi lượng đất mặt màu mỡ khá lớn, nhất là trên đất dốc. Nay đã có nhiều mô hình canh tác không làm đất hoặc làm đất tối thiểu, hạn chế rửa trôi, bảo vệ độ phì của đất rất tốt.

3. Không lạm dụng hóa học

Như trên đã nói, hạn chế sự lạm dụng phân hóa học, nhất là phân đạm. Không lạm dụng thuốc BVTV, nhất là thuốc trừ cỏ vì chúng đã làm cho đất bị ngộ độc và thoái hóa.

4. Phủ bổi, trồng cây phủ đất trong vườn cây

Hiện nay đã có nhiều mô hình trồng cây phủ đất hoặc phủ bổi trong vườn cây ăn quả, thay vì làm sạch cỏ bằng thuốc hóa học. Kết quả các mô hình đã chứng minh, biện pháp này đã tiết kiệm chi phí, chống ô nhiễm môi trường, chống rửa trôi đất và là biện pháp trả hữu cơ lại cho đất hữu hiệu.

5. Canh tác bón phân hữu cơ là chính (organic based)

Ngoài những biện pháp trả hữu cơ lại cho đất như đã nói trên, việc bón nhiều phân hữu cơ (tùy từng loại đất) thay thế cho phân hóa học, nhất là phân đạm hóa học. Nông nghiệp không loại trừ hóa học, nhưng bón hạn chế, bón phân hữu cơ là chính (organic based). Tùy theo từng loại đất, tính toán bón các loại phân sao cho đủ và cân đối dinh dưỡng cho đất và cây trồng.

6. Dùng các lợi khuẩn (probiotic) và VSV đối kháng trong canh tác và quản lý dịch hại

Ngoài những biện pháp trả hữu cơ lại cho đất như nêu trên, cần sử dụng các biện pháp đưa VSV có ích, hay còn gọi là lợi khuẩn (probiotic) vào đất để nuôi và bảo vệ cây trồng (nội dung này sẽ nói kỹ ở phần sau).

Việc trả hữu cơ lại cho đất có thể có nhiều biện pháp, tuy nhiên những biện pháp nói trên là cơ bản, đang thường làm và có hiệu quả.

V. ÁP DỤNG PROBIOTIC (LỢI KHUẨN), CÔNG NGHỆ CAO TRONG NÔNG NGHIỆP

Theo Saburo Matsui (2018), VSV có ích và đối kháng luôn có khắp mọi nơi, trong y tế, những loại vi khuẩn có lợi cho sức khỏe con người được gọi là lợi khuẩn (probiotic), nay khái niệm probiotic được áp dụng trong nông nghiệp. Các probiotic đang sử dụng có ba nhóm:

1) Bacillus.

2) Actinomycetous.

3) Vi khuẩn Lactic acid và yeasts.

Các probiotic có phổ tác dụng rất rộng. Ví dụ như Lacto Bacillus (Công ty Sky life, Nhật Bản) có tác dụng:

- Chế biến rác thải, xác bã động thực vật thành phân bón.

- Kích thích tính kháng, làm tăng sức khỏe và bảo vệ cây trồng.

- Tăng cường sức khỏe cho động vật (lợn, gia súc có sừng, gà vịt, tôm, cá...).

- Những tác động khác.

Tác dụng của probiotic và các enzyme có thể xử lý rơm rạ, xác thực vật mau phân hủy, sau khi trả hữu cơ lại ruộng trong thời gian ngắn, cây trồng vụ sau không bị ngộ độc hữu cơ. Chế biến xác bã động thực vật, phân gia súc bằng công nghệ probiotic được phân hủy triệt để, phân hữu cơ giàu dinh dưỡng, chất lượng cao. Bón probiotic cây trồng phát triển khỏe mạnh, tăng sức đề kháng sâu bệnh hại, hạn chế sử dụng thuốc BVTV. Thực hiện tốt nông nghiệp theo hướng hữu cơ cải tạo đất sẽ còn làm giàu lợi khuẩn bản địa.

Nông nghiệp hữu cơ ngày nay không phải là quay lại phương thức canh tác đơn giản, thô sơ xa xưa. Tất nhiên, trong canh tác hữu cơ chúng ta thừa kế những quan điểm hữu cơ truyền thống, gần gũi với tự nhiên. Nhưng những biện pháp hữu cơ sinh học nay đã được nâng lên thành công nghệ hiện đại. Sự phối hợp giữa biện pháp truyền thống với công nghệ chế biến hữu cơ, công nghệ vi sinh probiotic, kết hợp với hệ thống canh tác theo GAP là khoa hoc hiện đại nhằm phục vụ cho sản xuất an toàn và bền vững, đó thực sự là công nghệ cao trong nông nghiệp.

VI. NHỮNG MÔ HÌNH CANH TÁC THEO HƯỚNG HỮU CƠ VÀ QUẢN LÝ DỊCH HẠI TỔNG HỢP (IPM) TRONG ĐẤT

Trong tình trạng đất bị bị thoái hóa nặng nề, tùy theo từng vùng sinh thái khác nhau, cần phối hợp nhiều biện pháp tổng hợp, lấy canh tác theo hướng hữu cơ làm gốc để quản lý dịch hại, gọi là *"IPM trong đất"*.

Để trở thành chương trình nông nghiệp hữu cơ của cả nước như hiện nay, trong nhiều năm qua đã có những mô hình canh tác theo hướng hữu cơ (không phải hoàn toàn hữu cơ) trên các loại cây trồng rất có kết quả. Từ đó có thể rút ra một số kết quả như sau:

- Canh tác theo hướng hữu cơ, cây trồng khỏe mạnh, đạt năng suất khá tốt, chất lượng nông sản an toàn, sạch.

- Đất được cải tạo, tăng độ phì, pH 5,6.

- Hầu hết các mô hình đều giảm lượng phân bón hóa học, nhất là giảm phân đạm hóa học đáng kể. Không còn lạm dụng hóa học trong sản xuất.

- Nhiều mô hình giảm hẳn áp lực sâu bệnh hại. Ít trường hợp bùng phát dịch hại nặng. Hầu hết các mô hình không dùng thuốc trừ cỏ.

Giải pháp nào cho sản xuất cây có múi bền vững

Hiện nay sản xuất các loại cây có múi như cam, quýt, chanh, bưởi đang phát triển mạnh trong cả nước. Tuy nhiên, cần phải nhớ lại, thời gian trước đây (khoảng 1960 - 1970) các vùng trồng cam nổi tiếng ở các tỉnh phía Bắc đã từng bị phá sản do sự tàn phá bởi bệnh hoàng long (bệnh greening) và bệnh chết cây. Nay, sau nhiều năm, việc phát triển cây có múi mới đang được phục hồi trở lại.

Trên cây có múi có các bệnh quan trọng, đó là: bệnh greening do vi khuẩn (Liberobacteria) gây ra. Loại vi khuẩn này có đặc điểm sinh học giống như một loại virus, không thể phòng trị được bằng thuốc hóa học; bệnh thứ hai là bệnh vàng lá thối rễ do một tập hợp nấm bán ký sinh và tuyến trùng có nguồn từ trong đất, rất khó phòng trị bằng hóa học.

Việc sản xuất cây có múi đang rất có lãi, người sản xuất tập trung thâm canh để có năng suất cao, chủ yếu bằng biện pháp bón phân hóa học, có thể đến mức lạm dụng. Tình hình đó nếu kéo dài trong nhiều năm sẽ dẫn đến làm thoái hóa đất, nguồn bệnh tích lũy, cây trồng mất sức đề kháng, bệnh ngày càng nặng, tàn phá ngành sản xuất cây có múi một lần nữa, nhất là trên cây cam quýt.

Với lập luận như đã nêu trên, để trồng cây có múi bền vững, không có con đường nào khác: phải canh tác theo phương thức bảo vệ đất bằng tăng cường hữu cơ, nâng cao độ phì của đất, tăng đa dạng sinh học đất và tăng sức khỏe, khả năng đề kháng của cây để làm nền tảng cho quản lý dịch hại có hiệu quả. Đó là giải pháp khả thi và dễ làm để sản xuất cây có múi bền vững trong tương lai.

Hiện nay Nhà nước đã có chủ trương nông nghiệp hữu cơ. Theo chúng tôi nông nghiệp hữu cơ có hai phân khúc khác nhau: 1) Canh tác hoàn toàn hữu cơ (không sử dụng hóa học) làm ra nông sản hữu cơ; 2) Canh tác theo hướng hữu cơ, sử dụng hữu cơ là chính (organic based),

nhằm tăng nguồn hữu cơ cho đất để nâng cao đa dạng sinh học đất và quản lý dịch hại cây trồng hiệu quả. Biện pháp này dễ làm trên diện rộng, nhằm giải quyết những vấn đề bức xúc trong nông nghiệp: Cải tạo đất, quản lý dịch hại bền vững, sản xuất nông sản sạch (an toàn), với khẩu hiệu: ***"Trả hữu cơ lại cho đất; Đất khỏe & Cây trồng khỏe"***.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thanh Thủy (2000). Giữ gìn độ phì nhiêu của đất trong vườn cây lâu năm. Đặc san làm giàu từ trang trại. Khoa học phổ thông. Liên hiệp Các Hội Khoa học và Kỹ thuật TP. Hồ Chí Minh.
2. Arden B. Andersen (1992, 2000). Science in Agriculture, Advenced methods for sustainable farming.
3. Ismael A. Cuellar Ayala, Mario E. de Leon Ortiz, Alberto Gomez Ruiz, Dolores Pinon Gomez, Rafael Villegas Delgado, Ignacio santana Aguilar (2003). Tạp chí Hệ thống sản xuất mía bền vững của Cuba, 5/2003. Hiệp hội Mía đường Cuba.
4. (2011). www.youtube.com/watch?v = p-k_aU_AHj8, được tải lên bởi Juan Jose Hernandez Segura"El suelo tambien tiene vida_part-1.mpg", ngày 23/5/2011.
5. Nguyễn Thơ (2014). Quản lý dịch hại virus theo biện pháp sinh thái và hữu cơ sinh học. (Tuyển tập Hội thảo Quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam lần thứ 13, tại Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, 6 - 7/5/2014, (ISBN 978-604-60-1313-6).
6. Nguyễn Thơ, Nguyễn Thanh Thủy (2015). Quản lý dịch hại cây trồng có nguồn bệnh từ trong đất theo hướng hữu cơ sinh học. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Bộ Nông nghiệp và PTNT, 13/2015. ISSN 1859 - 4581.
7. Nguyễn Thơ (2015). Giải pháp giảm thiểu thuốc BVTV độc hại trong sản xuất nông nghiệp. Tạp chí Khoa học Phát triển nông thôn Việt Nam, 18/2015, ISSN 1859-4700. Hội Khoa học Phát triển nông thôn Việt Nam.
8. Nguyễn Thơ, Trần Đức Thành (2017). Hiệu quả trồng cây lạc dại *(Arachis pintoi)* trong vườn cây lâu năm. Kỷ yếu Hội thảo Khoa học "Quản lý dịch hại tổng hợp cây trồng theo hướng hữu cơ sinh học trong phát triển nông nghiệp xanh", Bộ Nông nghiệp và PTNT, Hội KHKT Bảo vệ thực vật Việt Nam tại TP. Hồ Chí Minh, ngày 21 tháng 4 năm 2017.
9. Nguyễn Thơ (2018). Canh tác và quản lý dịch hại theo hướng hữu cơ sinh học, thay đổi tập quán lạm dụng hóa học trong nông nghiệp. (Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Bộ Nông nghiệp và PTNT, 01/2018, ISSN 1859-4581).
10. Nguyễn Thơ, Vũ Triệu Mân (2018). Canh tác theo hướng hữu cơ sinh học và quản lý dịch hại tổng hợp (IPM) trong đất. Hội thảo Quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam lần thứ 17. Tại Bộ Nông nghiệp và PTNT, ngày 20/7/2018. ISBN 978-604-60-2796-6.
11. Saburo Matsui (2019) Application of probiotics principle to convert biomass into organic fertilizer. Saburo Matsui, PH.D, Emeritus Professor, Kyoto University. M36@3kankyo.co.jp

PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN Rice yellow stunt virus GÂY BỆNH VÀNG LỤI LÚA BẰNG KHÁNG HUYẾT THANH THỎ ĐẶC HIỆU PROTEIN N

Hà Viết Cường, Nguyễn Quang Bằng, Lê Thị Tuyết, Trần Nguyễn Hà, Nguyễn Đức Huy, Đỗ Tấn Dũng

Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
Tác giả liên hệ: hvcuongnh@vnua.edu.vn; 0978056254

ABSTRACT

Development of diagnostic techniques for Rice yellow stunt virus using rabbit antiserum specific to the protein N

The major aim of this work is to develop antibody-based techniques for detection of Rice yellow stunt (RYSV) in rice plant. Using previously produced antiserum that was raised in rabbit immunized with the N protein of RYSV, technical factors of the Plate Trapped Antigen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (PTA-ELISA), Dot-Immunobinding Assay (DIBA) and Tissue-Print Immunoassay (TPIA) were evaluated. The experimental results showed that: (i) the suitable antiserum dilution is 1/1000; (ii) the suitable tissues are stem, followed by leaf; (iii) the dried tissues stored at least 2 years can be used in PTA-ELISA; (iv) PTA-ELISA can detect virus from tissue pieces incubated directly in wells; (v) the membranes suitable for DIBA are Nitrocellulose (NC) and Nylon; (vi) DIBA can be done with membrane blocked for 15 minutes, incubated with the antiserum and secondary antibody for 45 minutes each; and (vii) all three assays, PTA-ELISA, DIBA and TPIA, can be used to detect specifically RYSV in rice plant.

Keywords: *Rice yellow stunt virus, DIBA, TPIA, ELISA, rice, Vietnam.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vàng lụi (hay còn gọi vàng lá di động) là bệnh virus hại lúa khắp cả nước, đặc biệt là vụ mùa ở các tỉnh miền Bắc và miền Trung Việt Nam (Hà Viết Cường *et al.*, 2010; Ta *et al.*, 2012).

Virus gây bệnh vàng lụi là Rice yellow sunt virus (RYSV), có tên cũ là Rice transitory yellowing virus (RTYV). RYSV là thành viên của chi Nucleorhabdovirus, họ Rhabdoviridae, bộ Mononegavirales (Walker *et al.*, 2018). RYSV có bộ gen RNA, sợi đơn, không phân mảnh, cực âm, kích thước ~ 14 kb, thuộc nhóm gây hại ở bó mạch phloem, lan truyền theo kiểu bền vững tái sinh (virus nhân lên trong vector) bằng 3 loài rầy xanh đuôi đen là *Nephotettix*

Người phản biện: GS.TS. Vũ Triệu Mân.

nigropictus, N. cincticeps và *N. virescens* nhưng không truyền qua trứng rầy (Inoue, 1978; Jackson *et al.*, 2005).

Chẩn đoán bệnh vàng lụi dựa vào triệu chứng dễ gây nhầm lẫn vì triệu chứng điển hình của cây bệnh là "biến vàng", một triệu chứng có thể do cả yếu tố sinh vật và phi sinh vật gây ra. Hơn nữa sự phát triển của dịch bệnh virus trên lúa nói chung và bệnh vàng lụi nói riêng phụ thuộc chủ yếu vào mật độ rầy mang virus (Ou, 1985; Hibino, 1996). Do vậy, việc chẩn đoán sớm và chính xác virus gây bệnh cả trên cây và rầy có ý nghĩa quan trọng trong việc việc áp dụng hiệu quả các biện pháp phòng chống.

Các kỹ thuật dựa trên kháng thể như thử nghiệm miễn dịch liên kết enzyme (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA), chấm thấm miễn dịch (Dot-Immunobinding Assay, DIBA) và thấm mô miễn dịch (Tissue-Print Immunoassay, TPIA) hiện vẫn được sử dụng phổ biến để chẩn đoán virus thực vật (Lima *et al.*, 2012; Abd El-Aziz, 2019). Gần đây, chúng tôi đã tạo được kháng thể đa dòng thỏ dùng kháng nguyên là protein N tái tổ hợp của RYSV được biểu hiện trong vi khuẩn *Escheria coli* và đã chứng tỏ kháng thể rất đặc hiệu, có thể phát hiện dễ dàng RYSV trong rầy xanh đuôi đen bằng kỹ thuật PTA-ELISA (Ha *et al.*, 2019).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi ứng dụng kháng huyết thanh đa dòng sẵn có đánh giá các yếu tố kỹ thuật để chẩn đoán RYSV bằng các thử nghiệm miễn dịch gồm PTA-ELISA, DIBA và TPIA. ELISA được phát triển đầu tiên bởi Clark & Adams (1977) và hiện là thử nghiệm miễn dịch phổ biến nhất trong chẩn đoán virus. ELISA có nhiều biến thể, trong đó có kiểu bẫy kháng nguyên trước (Plate Trapped Antigen - ELISA, PTA-ELISA). DIBA được áp dụng đầu tiên để phát hiện Tobaco mosaic virus (TMV) bởi Hibi & Saito (1985) và tiếp theo được áp dụng rộng rãi để chẩn đoán nhiều virus thực vật khác do nhanh, đơn giản, rẻ và nhạy hơn so với ELISA (Abd El-Aziz, 2019). DIBA có cơ chế tương tự như ELISA nhưng các loại màng như Polyvinylidene difluoride (PVDF), Nitrocellulose (NC) và Nylon được sử dụng thay vì bản nhựa ELISA và sản phẩm của phản ứng enzyme ở dạng kết tủa thay vì ở dạng hòa tan. TIBA là một biến thể của DIBA trong đó mô cây được ép trực tiếp lên màng thay vì cố định dịch nghiền cây (Abd El-Aziz, 2019).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Mẫu cây bệnh

Mẫu cây bệnh vàng lụi thu thập tại Bắc Lý - Bắc Giang, Cẩm Xuyên - Hà Tĩnh. Các mẫu được được làm khô bằng silicagel tự chỉ thị và bảo quản ở nhiệt độ phòng hoặc -20^{o}C. Mẫu cây bệnh cũng được trồng duy trì cho tới khi thí nghiệm. Các mẫu cây khỏe là các mẫu cây trồng từ hạt trong nhà lưới vì RYSV không truyền qua hạt giống.

2.2. Kháng huyết thanh

Kháng huyết thanh (KHT) thỏ được gây miễn dịch với protein N của RYSV sẵn có như mô tả bởi Ha *et al.* (2019).

2.3. Màng

Ba loại màng được sử dụng là Nitrocellulose (lỗ màng 0,45 µm, Sigma), PVDF (lỗ màng 0,45 µm, Sigma) và Nylon tích điện dương (lỗ màng 0,45 µm, Roche). Màng PVDF được hoạt hóa bằng ethanol 100 % trong 1 phút, rửa lại bằng đệm carbonate trước khi thí nghiệm.

2.4. Thử nghiệm chấm thấm miễn dịch DIBA

Màng được cắt thành các mảnh 4 × 28 mm tương đương 7 ô vuông. Các bước ủ màng (khóa màng, ủ với KHT và ủ với kháng thể thứ cấp) được thực hiện trong ống Eppendorf loại 2 mL với thể tích mỗi loại dịch 500 µL. Phản ứng DIBA được thực hiện trong điều kiện chuẩn như sau. Mô lá được nghiền với đệm Carbonate (Na_2CO_3 15mM, $NaHCO_3$ 35mM, pH 9,6) theo tỉ lệ 1:10 (khối lượng/thể tích). Dịch cây được được ly tâm để kết tủa tàn dư. Dịch được nhỏ lên màng với lượng 1 µl/chấm. Màng được khóa với skim milk 5% được chuẩn bị trong đệm TBS (Tris 150 mM, NaC l50 mM, pH 7,5) trong một 1 giờ ở 37^{o}C. Màng được rửa 3 lần với đệm TBS-T (TBS chứa Tween 20 0,05%). Màng được ủ 1 giờ ở 37^{o}C với KHT (được hòa trong đệm kháng thể (TBS-T chứa Polyvinylpyrrolidone 2% và skim milk 3%)) và được rửa 3 lần với đệm TBS-T. Màng được ủ 1 giờ ở 37^{o}C với kháng thể đơn dòng chuột liên kết Alkaline Phosphatase (AP) đặc hiệu kháng thể thỏ (A2556, Sigma) (được hòa trong đệm kháng thể theo tỉ lệ 1/35000). Màng được rửa 3 lần với đệm TBS-T. Phản ứng được phát hiện bằng dịch cơ chất 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)/nitro blue tetrazolium (NBT) (S3841, Promega).

2.5. Thử nghiệm thấm mô miễn dịch TPIA

Phản ứng TPIA được thực hiện trên màng NC với các bước tương tự như DIBA ngoại trừ ở bước cố định mẫu, gốc thân cây lúa tươi được cắt ngang bằng dao mổ và đầu vết cắt được ép trực tiếp lên màng.

2.6. Thử nghiệm ELISA bẫy kháng nguyên trước PTA-ELISA

Thử nghiệm PTA-ELISA trong điều kiện chuẩn được thực hiện như sau. Mô lá được nghiền với đệm Carbonate theo tỉ lệ 1/10 (khối lượng/thể tích). Dịch cây được nhỏ vào giếng với lượng 100 µl/giếng. Bản ELISA được ủ qua đêm ở 4^{o}C và được rửa 3 lần với đệm PBS-T (Na_2HPO_4 8 mM, NaCl 150 mM, KH_2PO_4 2 mM, KCl 3 mM, Tween 20 0,05%, pH 7,4). KHT được hòa trong đệm kháng thể (đệm PBS-T chứa PVP 2%, ovalbumin 0,2%) và được nhỏ vào giếng với lượng 100 µl/giếng. Bản ELISA được ủ 4 giờ ở 37^{o}C và được rửa 3 lần với đệm PBS-T. Kháng thể đơn dòng chuột liên kết AP đặc hiệu kháng

thể thỏ (A2556, Sigma) được hòa trong đệm kháng thể theo tỉ lệ 1/5000 và được cho vào giếng với lượng 100 µl/giếng. Bản ELISA được ủ 4 giờ ở 37^{o}C và được rửa 5 lần với đệm PBS-T. Dịch cơ chất p-nitrophenyl phosphate (SIGMAFAST, Sigma) được cố định vào giếng với lượng 100 µl/giếng. Bản ELISA được ủ 1 giờ ở 25^{o}C trong tối. Phản ứng được đo bằng máy đọc ELISA ở bước sóng 405 nm.

2.6. Thống kê

Các thống kê t-test và ANOVA một nhân tố được thực hiện bằng phần mềm SPSS ver.20.

III. KẾT QUẢ

3.1 Thử nghiệm PTA-ELISA

3.1.1. Đánh giá độ hòa loãng kháng huyết thanh và dịch cây trong phản ứng PTA-ELISA

Nhằm xác định độ nhạy của KHT, phản ứng PTA-ELISA đã được thực hiện với 6 độ hòa loãng KHT từ 1/200 đến 1/10000 trên các mẫu lúa bị bệnh vàng lụi và mẫu lúa khỏe được nghiền trong đệm carbonate với 3 độ hòa loãng 1/10, 1/20 và 1/30. Kết quả thí nghiệm (Bảng 1) cho thấy ở độ hòa loãng 1/10000, KHT vẫn có thể phát hiện RYSV trong mẫu cây bệnh được nghiền ở độ hòa loãng 1/30.

Bảng 1. PTA-ELISA đánh giá độ hòa loãng kháng huyết thanh và dịch cây

Giá trị OD (405 nm) sau 1 giờ						
Độ hòa loãng kháng huyết thanh	**Độ hòa loãng dịch cây (khối lượng/thể tích)**					
	1/10		**1/20**		**1/30**	
	Bệnh	**Khỏe**	**Bệnh**	**Khỏe**	**Bệnh**	**Khỏe**
1/200	1,938 ± 0,171	0,178 ± 0,010	1,819 ± 0,144	0,179 ± 0,002	1,875 ± 0,171	0,182 ± 0,021
1/500	1,325 ± 0,153	0,130 ± 0,007	1,307 ± 0,135	0,151 ± 0,020	1,258 ± 0,127	0,186 ± 0,097
1/1000	1,127 ± 0,189	0,128 ± 0,019	1,101 ± 0,195	0,136 ± 0,016	1,041 ± 0,175	0,143 ± 0,020
1/2000	0,961 ± 0,144	0,144 ± 0,018	0,957 ± 0,166	0,108 ± 0,008	0,928 ± 0,164	0,122 ± 0,008
1/5000	0,767 ± 0,154	0,169 ± 0,008	0,663 ± 0,121	0,164 ± 0,005	0,647 ± 0,081	0,158 ± 0,018
1/10000	0,408 ± 0,008	0,147 ± 0,025	0,442 ± 0,155	0,138 ± 0,038	0,421 ± 0,123	0,150 ± 0,017

Ghi chú: Giá trị OD trung bình của 3 mẫu ± độ lệch chuẩn.

3.1.2. Ảnh hưởng của loại mô lúa và cách chuẩn bị mẫu đến phản ứng PTA-ELISA

Để xác định loại mô lúa và phương pháp xử lý mẫu phù hợp, 4 loại mô (lá, bẹ lá, thân rễ) của cây lúa nhiễm bệnh vàng lụi đã được kiểm tra dùng 2 phương pháp xử lý mẫu là nghiền mẫu và cắt mẫu. Đối với đánh giá phương pháp xử lý mẫu, cùng một mảnh mô được chia đôi, một nửa được nghiền trong đệm carbonate trước khi cố định

vào giếng như mô tả trong phương pháp chuẩn, nửa còn lại được cắt thành các mảnh nhỏ theo chiều ngang của mô với độ dày ~ 0,5 mm và cho vào giếng trước khi cho đệm. Kết quả kiểm tra ELISA được trình bày ở Bảng 2.

Về loại mô: Dựa trên giá trị OD của các mẫu được xử lý theo phương pháp nghiền mẫu trong đệm, hàm lượng virus trong mô thân là cao nhất (OD = 1,081), tiếp theo là mô lá (OD = 0,606), thấp hơn nhiều ở mô bẹ (OD = 0,360) và thấp nhất ở mô rễ (OD = 0,137). Xử lý các mẫu mô theo phương pháp cắt cũng cho kết quả tương tự với giá trị OD lần lượt là 0,745, 0,425, 0,276 và 0,164. Tuy nhiên, kết quả của cả 2 phương pháp xử lý cũng cho thấy mô lá có giá trị OD ổn định hơn so với mô thân. Hệ số biến động của giá trị OD của mô lá là 20,3% (xử lý bằng nghiền) và 44,4% (xử lý bằng cắt), trong khi giá trị tương ứng của mô thân là 44,5% và 77,1%.

Về phương pháp xử lý mẫu: Kết quả so sánh giá trị OD cho thấy tất cả các loại mô được xử lý theo phương pháp nghiền trong đệm đều cho giá trị OD trung bình cao hơn so với phương pháp cắt. Phân tích thống kê t-test cho thấy giá trị OD trung bình của mô thân không khác nhau có ý nghĩa giữa 2 phương pháp (P = 0,109). Mặc dù giá trị OD trung bình của mô lá bệnh khác nhau có ý nghĩa giữa 2 phương pháp (P = 0,00198) nhưng ở phương pháp xử lý mẫu bằng cắt mô, giá trị OD của cây bệnh vẫn lớn hơn nhiều so với giá trị OD trung bình của mô lá cây khỏe; và giá trị OD thấp nhất của mẫu cây bệnh (= 0,214) vẫn lớn hơn giá trị ngưỡng (= OD trung bình + 2 độ lệch chuẩn của mẫu cây khỏe = 0,172).

Bảng 2. PTA-ELISA phát hiện RYSV trong các loại mô lúa được chuẩn bị bằng hai phương pháp

Loại mô	Số mẫu	Giá trị OD (405 nm) sau 1 giờ							
		Cắt mô				Nghiền mô			
		Trung bình	SD	Max	Min	Trung bình	SD	Max	Min
Lá cây bệnh	18	0,425	0,189	0,975	0,214	0,606	0,123	0,757	0,401
Bẹ lá cây bệnh	18	0,276	0,344	1,230	0,120	0,360	0,374	1,185	0,157
Thân cây bệnh	9	0,745	0,575	1,465	0,228	1,081	0,481	1,546	0,453
Rễ cây bệnh	9	0,164	0,079	0,361	0,123	0,137	0,006	0,147	0,13
Lá cây khỏe (Đ/C)	3	0,148	0,024	0,176	0,131	0,123	0,004	0,128	0,120

Kiểm định t-test:

Giá trị OD của mô lá giữa 2 phương pháp: P = 0,00198

Giá trị OD của mô thân giữa 2 phương pháp: P = 0,109

Ghi chú: Độ hòa loãng dịch cây: 1/10 (khối lượng/thể tích). Độ hòa loãng kháng huyết thanh: 1/1000.

3.1.3. Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản mẫu đến phản ứng PTA-ELISA

Trong thí nghiệm này, các mẫu lúa bị bệnh được bảo quản ở 7 điều kiện khác nhau đã được sử dụng để kiểm tra PTA-ELISA (Bảng 3). Dựa trên phân tích thống kê giá trị OD, các mẫu có thể được chia là 3 nhóm. Nhóm 1 cho giá trị OD cao nhất (> 1,2) gồm các mẫu bệnh tươi được phân tích ngay sau khi thu thập và các mẫu khô bảo quản ở -20^{o}C từ 1 đến 2 năm. Nhóm 2 có giá trị OD trung bình ~ 1 gồm các mẫu khô bảo quản 1 năm ở nhiệt độ phòng và các mẫu tươi bảo quản mát trong tủ lạnh 3 và 7 ngày trước khi thử. Nhóm mẫu cuối cùng là mẫu khô bảo quản 2 năm ở nhiệt độ phòng với giá trị OD trung bình vẫn khá cao (0,908).

Bảng 3. PTA-ELISA phát hiện RYSV trong mô lá bệnh được bảo quản ở các điều kiện khác nhau

Công thức	Điều kiện bảo quản	Giá trị OD (405 nm) sau 1 giờ			
		Trung bình	SD	Max	Min
CT1	Lá bệnh khô (2 năm, -20^{o}C)	1,239^{abc}	0,093	1,378	1,076
CT2	Lá bệnh khô (2 năm, nhiệt độ phòng)	0,908^{e}	0,110	1,100	0,801
CT3	Lá bệnh khô (1 năm, -20^{o}C)	1,289^{ab}	0,106	1,466	1,175
CT4	Lá bệnh khô (1 năm, nhiệt độ phòng)	1,080^{cde}	0,087	1,194	0,938
CT5	Lá bệnh tươi (3 ngày 10^{o}C)	1,117^{bcd}	0,149	1,334	0,900
CT6	Lá bệnh tươi (7 ngày, 10^{o}C, 7 ngày)	0,969^{de}	0,114	1,119	0,765
CT7	Lá bệnh tươi, thử ngay sau khi thu	1,412^{a}	0,193	1,655	1,113
CT8	Lá khỏe tươi, thử ngay sau khi thu (đ/c)	0,167	0,024	0,198	0,132

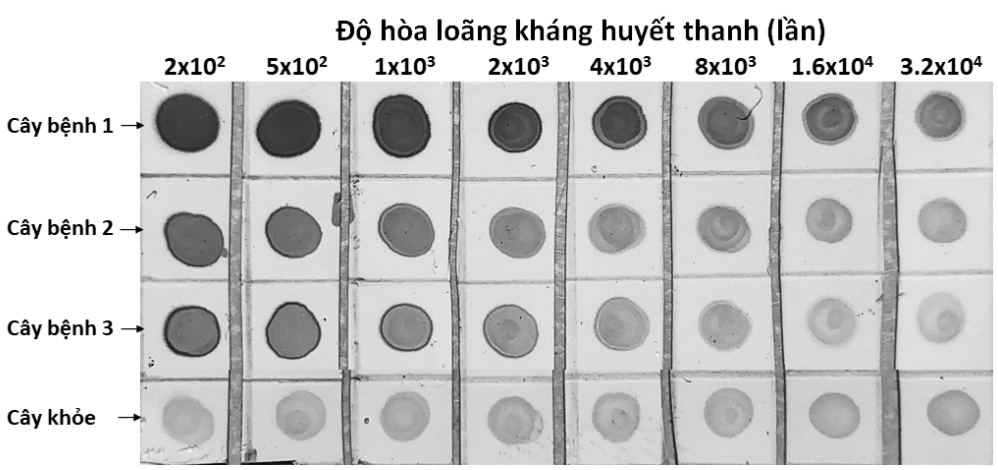
Thống kê ANOVA (phần mềm SPSS) cho 7 công thức (trừ công thức đ/c) để đảm bảo điều kiện đồng nhất phương sai. Kiểm tra phân bố chuẩn của số liệu trong mỗi công thức (Shapiro-Wilk test): P từ 0.148 đến 0.807). Kiểm tra mức đồng nhất phương sai của 7 công thức (Levene test): P = 0,281. Các giá trị OD trong cột trung bình có cùng ký tự thì không khác nhau ở mức ý nghĩa α = 0,05 (Turkey's HSD test). Số mẫu mỗi công thức kể cả đối chứng = 9.

Ghi chú: Độ hòa loãng dịch cây: 1/10 (khối lượng/thể tích). Độ hòa loãng kháng huyết thanh: 1/500.

3.2. Thử nghiệm DIBA và TPIA

3.2.1. Ảnh hưởng của độ hòa loãng kháng huyết thanh đến phản ứng DIBA

Kết quả kiểm tra DIBA với 8 độ hòa loãng KHT 1/200, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000 và 1/32000 cho thấy độ đậm của các ô mẫu bệnh giảm dần theo độ hòa loãng KHT. Mặc dù màu xanh của diệp lục trên các chấm mẫu có ảnh hưởng đến nhận biết phản ứng nhưng KHT ở độ hòa loãng 32,000 lần vẫn tạo phản ứng dương tính phân biệt được bằng mắt thường (Hình 1).

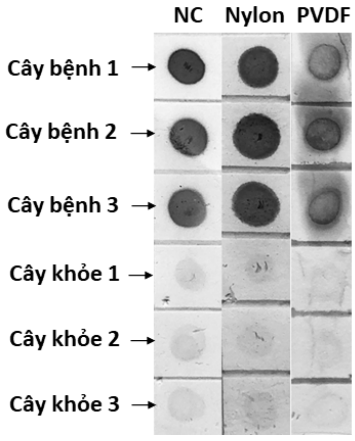


Ghi chú: Cây bệnh 1, 2, 3 là các mẫu lá lúa bị bệnh tươi, thu thập năm 2020. Độ hòa loãng dịch cây 1/10 (khối lượng/thể tích).

Hình 1. Phản ứng DIBA đánh giá độ hòa loãng kháng huyết thanh

3.2.2. Ảnh hưởng của loại màng đến phản ứng DIBA

Kết quả kiểm tra DIBA với 3 loại màng NC, Nylon và PVDF (Hình 2) cho thấy màng NC và nylon có độ đậm của mẫu bệnh, mẫu đối chứng cây khỏe cũng như độ sáng nền (màu trên màng) tương đương nhau. Đối với cả 2 loại màng NC và nylon, vết chấm mẫu đều gọn, màu các mẫu bệnh tương phản rõ rệt với màu đối chứng cây khỏe và có thể phân biệt dễ dàng bằng mắt thường. Các thí nghiệm lặp lại cho thấy việc cố định mẫu lên màng PVDF khó hơn so với màng NC và nylon. Vết chấm mẫu trên màng PVDF thường loang, không gọn và thời gian để virus và protein N trong dịch cây liên kết hết vào màng lâu hơn.

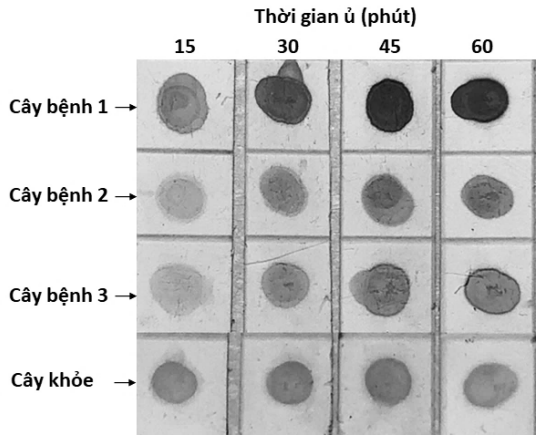


Ghi chú: Cây bệnh 1, 2, 3 là các mẫu lá lúa bị bệnh tươi, thu thập năm 2020. Độ hòa loãng kháng huyết thanh 1/1000. Độ hòa loãng dịch cây 1/10 (khối lượng/thể tích).

Hình 2. Phản ứng DIBA so sánh 3 loại màng

3.2.3. Ảnh hưởng của thời gian ủ màng đến phản ứng DIBA

Kết quả kiểm tra DIBA (Hình 3) với thời gian ủ màng khác nhau ở 3 bước khóa màng, ủ màng với KHT và ủ màng với kháng thể thứ cấp cho thấy độ đậm phản ứng của các mẫu bệnh tăng dần theo thời gian ủ màng. Ủ màng trong 45 phút cho độ đậm phản ứng các mẫu bệnh tương đương với ủ màng trong điều kiện chuẩn 60 phút. Khóa màng trong vòng 15 phút tạo nền phản ứng tương đương khóa màng trong điều kiện chuẩn 60 phút.

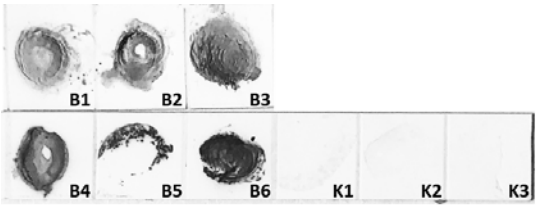


Ghi chú: Cây bệnh 1, 2, 3 là các mẫu lá lúa bị bệnh tươi, thu thập năm 2020. Độ hòa loãng kháng huyết thanh 1/1000. Độ hòa loãng dịch cây 1/10 (khối lượng / thể tích).

Hình 3. Phản ứng DIBA đánh giá ảnh hưởng của thời gian các bước ủ màng (khóa màng, ủ màng với kháng huyết thanh và ủ màng với kháng thể thứ cấp)

3.2.4. Đánh giá khả năng phát hiện virus bằng thử nghiệm TPIA

Chấm trực tiếp mẫu bệnh lên màng còn được gọi là thử nghiệm TPIA. Kết quả kiểm tra TPIA (Hình 4) cho thấy tất cả các mẫu bệnh đều tạo phản ứng đặc hiệu và rõ ràng.



Ghi chú: Từ B1 đến B6 các mẫu thân cây lúa bệnh tươi, thu thập năm 2020. Độ hòa loãng kháng huyết thanh 1/1000.

Hình 4. Phản ứng TPIA phát hiện RYSV trong thân cây lúa

IV. THẢO LUẬN

4.1. Loại mô phù hợp để chẩn đoán RYSV trong cây

Giống như các virus thực vật khác, RYSV nhiễm hệ thống trong cây (Jackson *et al.*, 2005; Hipper *et al.*, 2013). Tuy nhiên, không phải tất cả các bộ phận đều có hàm lượng virus là giống nhau. Mặc dù phân bố của RYSV trong cây chưa được nghiên cứu trên thế giới nhưng đặc điểm lan truyền qua rầy theo kiểu bền vững tái sinh và thuộc nhóm giới hạn mạch phloem cho thấy RYSV tái sinh tốt nhất trong tế bào mạch dẫn (Harper *et al.*, 2014). Các thí nghiệm PTA-ELISA trên 4 bộ phận gồm lá, bẹ lá, thân và rễ của cây lúa nhiễm RYSV cho thấy giá trị OD của mô thân lúa cao nhất, tiếp theo là mô lá lúa và cao hơn đáng kể so với mô rễ. Kết quả này gợi ý hàm lượng RYSV trong mô thân lúa là cao nhất và phù hợp với vị trí tái sinh của virus trong cây. Phát hiện này là quan trọng vì giúp lựa chọn loại mô phù hợp để chuẩn bị mẫu thử. Mô vỏ hoặc gân lá là loại mô thường được lựa chọn để phát hiện các tác nhân gây bệnh giới hạn mạch dẫn (Roistacher, 1991). Sử dụng mô thân để phát hiện RYSV cũng

có ưu điểm là giảm thiểu ảnh hưởng của chlorophyll đến nhận biết kết quả phản ứng DIBA.

4.2. Kháng huyết thanh protein N phát hiện đặc hiệu RYSV trong điều kiện đơn giản hóa phản ứng ELISA và DIBA

KHT protein N của RYSV có hiệu giá rất cao. Độ hòa loãng KHT phát hiện RYSV trong cây ít nhất 32000 lần trong phản ứng DIBA và 10000 lần trong phản ứng PTA-ELISA, phù hợp với các kết luận chung về độ nhạy của 2 kỹ thuật (Abd El-Aziz, 2019). Dựa trên kết quả này, một loạt các thí nghiệm đã được thí nghiệm nhằm tối ưu hóa và đơn giản hóa phản ứng.

Trong chẩn đoán miễn dịch virus thực vật, xử lý mẫu là công đoạn tốn thời gian và công sức, đặc biệt đối với các mẫu khó như lúa và khi phải kiểm tra số lượng mẫu lớn. Trong các thí nghiệm PTA-ELISA, các mảnh mô được cắt nhỏ và ủ trong giếng với đệm carbonate cũng đã chứng tỏ giải phóng phân tử virus và protein N đủ để phản ứng xảy ra và do đó phù hợp khi kiểm tra định tính với số lượng mẫu thử lớn. Phương pháp đặt trực tiếp mảnh mô trong giếng ELISA cũng đã được áp dụng trong chẩn đoán virus thực vật (Roistacher, 1991).

Tương tự, kỹ thuật TPIA, một biến thể của DIBA, trong đó đoạn thân mẫu lúa được chấm trực tiếp lên màng nitrocellulose đã chứng tỏ nhạy tương đương DIBA nhằm phát hiện RYSV trong cây lúa. TPIA là kỹ thuật cũng được sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán virus thực vật vì có nhiều ưu điểm như không cần nghiền mẫu, giảm ảnh hưởng của chlorophyll và mẫu có thể được chấm trên màng ngay trên đồng ruộng (Roistacher, 1991; Lima *et al.*, 2012; Abd El-Aziz, 2019).

Phản ứng DIBA/TIBA có 3 bước quan trọng là khóa màng, ủ màng với kháng huyết thanh và kháng thể thứ cấp. Thí nghiệm về ảnh hưởng của thời gian mỗi bước đến phản ứng DIBA cho thấy màng được khóa hoàn toàn trong vòng 15 phút, ủ màng với KHT và kháng thể thứ cấp trong vòng 45 phút cho mức độ phản ứng tương đương với ủ màng ở điều kiện chuẩn 60 phút. Kết quả này cho phép phản ứng DIBA phát hiện RYSV có thể được thực hiện trong vòng khoảng 3 giờ.

Trong nghiên cứu này, 3 loại màng NC, Nylon và PVDF cho phản ứng DIBA đã được so sánh. Mặc dù màng PVDF là loại màng được sử dụng phổ biến nhất trong phản ứng DIBA vì bền nhưng màng cần phải được hoạt hóa bằng methanol hoặc ethanol trước khi cố định dịch cây. Trong các thí nghiệm lặp lại của chúng tôi, màng PVDF luôn cho kết quả kém nhất vì vết chấm dịch cây không gọn, cần thời gian để khô trước khi khóa màng và nền phản ứng cao hơn so với 2 loại màng còn lại. Trái lại, màng NC và nylon cho kết quả tương đương khi xét về độ nhạy, đặc hiệu và các bước thao tác.

Một trong các nhược điểm chính của kỹ thuật DIBA khi phát hiện virus từ dịch cây là ảnh hưởng của chlorophyll đến nhận biết màu phản ứng. Chen *et al.* (2012) khi nghiên cứu loại bỏ chlorophyll trong phản ứng DIBA phát hiện virus lúa lùn sọc đen phương Nam (Southern rice black-streaked dwarf virus, SRBSDV) kết luận rằng nghiền lá lúa trong đệm chứa

than hoạt tính và xử lý màng PVDF bằng ethanol sau khi cố định dịch cây có hiệu quả cao nhằm giảm thiểu ảnh hưởng của chlorophyll trong phản ứng DIBA. Tuy nhiên, thí nghiệm xử lý dịch nghiền lá lúa bằng than hoạt tính (100 mg/mL) của chúng tôi (không trình bày trong kết quả) cho thấy mặc dù than hoạt tính không hấp thụ RYSV hoặc protein N nhưng không làm giảm đáng kể chlorophyll trong dịch nghiền. Dựa trên kết quả các thí nghiệm, cách tốt nhất để làm giảm ảnh hưởng của chlorophyll trong thử nghiệm DIBA phát hiện RYSV là sử dụng mô thân cây lúa.

Trong nhiều trường hợp, mẫu bệnh thu thập không được kiểm tra ngay và cần phải được bảo quản. Thí nghiệm PTA-ELISA trên các mẫu lúa bị bệnh vàng lụi bảo quản ở các điều kiện khác nhau đã cho thấy phân tử virus RYSV và protein N của virus khá bền vững trong mô lúa và duy trì được hoạt tính kháng nguyên lâu dài. Trong trường hợp không kiểm tra ngay lập tức thì mẫu cây có thể được bảo quản trong ngăn mát tủ lạnh ít nhất 1 tuần mà không ảnh hưởng nhiều tới kết quả phản ứng. Tốt nhất, mẫu nên được làm khô và bảo quản trong tủ lạnh sâu -20^{o}C.

V. KẾT LUẬN

Kháng huyết thanh thỏ được gây miễn dịch với protein N của RYSV có thể được áp dụng để chẩn đoán virus trong cây bằng ít nhất 3 thử nghiệm miễn dịch là PTA-ELISA, DIBA và TPIA. Loại mô phù hợp nhất để chẩn đoán RYSV là thân cây lúa, tiếp theo là lá. Loại màng phù hợp cho thử nghiệm DIBA và TPIA là Nitrocellulose và nylon tích điện dương. Trong trường hợp phát hiện định tính và số mẫu thử lớn, thử nghiệm PTA-ELISA có thể được thực hiện với mẫu lúa được cắt nhỏ ủ trực tiếp trong đệm carbonate.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được hỗ trợ từ các đề tài cấp Bộ (mã số B2013-11-27 và NN-NDT2014/01).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abd El-Aziz M. H. (2019). Three modern serological methods to detect plant viruses. Journal of Plant Science and Phytopathology. 3: 101-106.
2. Chen Z., Liu J., Zeng M., Wang Z., Yu D., Yin C., Jin L., Yang S. & Song B. (2012). Dot immunobinding assay method with chlorophyll removal for the detection of southern rice black-streaked dwarf virus. Molecules. 17(6): 6886-6900.
3. Clark M. F. & Adams A. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology. 34(3): 475-483.
4. Ha V. C., Tran N. H., Do T. D., Nguyen D. H., Wei S. F., Qin W. & Lyu R. H. (2019). Production of polyclonal antisera for diagnosis of rice yellow stunt virus (RYSV) in Vietnam. Journal of Southern Agriculture. 50(7).
5. Hà Viết Cường, Lê Văn Hải, Nguyễn Viết Hải & Vũ Triệu Mân (2010). Xác định nguyên nhân gây bệnh vàng lá lúa tại tỉnh Bắc Giang vụ mùa năm 2010. Tạp chí Bảo vệ thực vật. 228(6): 24 - 31.
6. Harper S., Cowell S., Robertson C. & Dawson W. (2014). Differential tropism in roots and shoots infected by Citrus tristeza virus. Virology. 460: 91 - 99.
7. Hibi T. & Saito Y. (1985). A dot immunobinding assay for the detection of tobacco mosaic virus in infected tissues. Journal of General Virology. 66(5): 1191 - 1194.

8. Hibino H. (1996). Biology and epidemiology of rice viruses. Annual Review of Phytopathology. 34: 249 - 274.
9. Hipper C., Brault V., Ziegler-Graff V. & Revers F. (2013). Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. Frontiers in plant science. 4: 154.
10. Inoue H. (1978). Transmission efficiency of rice transitory yellowing virus by the green plant hoppers, Nephotettix spp. (Hemiptera: Cicadellidae). Applied Entomology and Zoology. 14: 123 - 126.
11. Jackson A. O., Dietzgen R. G., Goodin M. M., Bragg J. N. & Deng M. (2005). Biology of plant rhabdoviruses. Annu. Rev. Phytopathol. 43: 623 - 660.
12. Lima J. A. A., Nascimento A. K. Q., Radaelli P. & Purcifull D. E. (2012). Serology applied to plant virology. Serological diagnosis of certain human, animal and plant diseases. Rijeka, Croatia: InTech. 1: 71 - 94.
13. Ou S. H. (1985). Rice yellow stunt virus. Rice Diseases. Second Edition, Commonwealth Mycological Institute Publication. Kew, Surrey, UK.: 23 - 25 & 48 - 49.
14. Roistacher C. N. (1991). Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis. Food & Agriculture Org. pages pages.
15. Ta H. A., Nguyen D. P., Nguyen V. C., Tran T. T. H., Pham T. L., Hébrard E. & Ngo V. V. (2012). New yellowing syndrome caused by rice transitory yellowing virus on rice in some areas of Mekong Delta. Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology. 1(1): 12 - 18.
16. Walker P. J., Blasdell K. R., Calisher C. H., Dietzgen R. G., Kondo H., Kurath G., Longdon B., Stone D. M., Tesh R. B. & Tordo N. (2018). ICTV virus taxonomy profile: Rhabdoviridae. Journal of General Virology. 99(4): 447 - 448.

TẠO KHÁNG HUYẾT THANH ĐA DÒNG BẰNG PROTEIN VỎ TÁI TỔ HỢP CỦA Passiflora mottle virus, MỘT POTYVIRUS NHIỄM TRÊN CÂY CHANH LEO TẠI VIỆT NAM

Hà Viết Cường, Lê Thị Tuyết, Trần Nguyễn Hà, Nguyễn Đức Huy, Đỗ Tấn Dũng

Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
Tác giả liên hệ: hvcuongnh@vnua.edu.vn; 0978056254

ABSTRACT

Production of polyclonal antiserum using recombinant coat protein of Passiflora mottle virus, a potyvirus infecting passion fruit in Vietnam

The major aim of this work is to produce polyclonal antibodies for diagnosis of Passiflora mottle virus (PaMoV), a putative novel potyvirus (the genus Potyvirus, the family Potyviridae), which was first discovered from passion fruit (Passiflora edulis) and named in Vietnam. The entire gene encoding coat protein (CP) of PaMoV was cloned on pET28a vector and the expression of this protein was evaluated in the Escherichia coli (E. coli) strain Rosetta (DE3). The denatured recombinant PaMoV CP protein was used as antigen for rabbit injection. The titer and specificity of the rabbit antiserum were evaluated by Dot-Immunobinding Assay (DIBA) and Plate Trapped Antigen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (PTA-ELISA). The experiment results showed: (i) Rosetta (DE3) was a suitable host strain for expression of the PaMoV CP protein, (ii) the PaMoV CP antiserum did not react with healthy passion fruit sap and detected easily cognate in passion fruit leaves, and (iii) the antiserum also reacted with two potyviruses, Telosma mosaic virus (TelMV) and East Asian passiflora virus strain IB (EAPV-IB), both are infecting passion fruit in Vietnam.

Keywords: *Passiflora mottle virus, potyvirus, DIBA, ELISA, passion fruit, Vietnam*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây chanh leo (*Passiflora edulis*) hiện là cây ăn quả quan trọng tại Việt Nam. Tuy nhiên, cây chanh leo đang bị nhiễm một số bệnh nguy hiểm, trong đó có bệnh do virus. Các nghiên cứu gần đây tại Bộ môn Bệnh cây và Trung tâm Nghiên cứu Bệnh cây Nhiệt đới (Học viện Nông nghiệp Việt Nam), dựa trên giải trình tự gen các mẫu virus chanh leo thu thập tại Nghệ An, Lâm Đồng, Ninh Bình đã xác định được một potyvirus hoàn toàn mới và virus được đặt tên là Passiflora mottle virus (PaMoV). Tên virus do nhóm nghiên cứu của Học viện đặt và trình tự gen của 4 mẫu virus thu thập tại Nghệ An và Lâm Đồng đã được gửi tại Ngân hàng Gen (GenBank) với mã truy cập

Người phản biện: GS.TS. Vũ Triệu Mân.

MG087833, MG087834, MG087835 và MG087836 (ngày 13/8/2018).

PaMoV gây triệu chứng khảm lá, đốm biến vàng lá, cây còi cọc và đặc biệt làm quả biến dạng và hóa gỗ dẫn tới năng suất và chất lượng quả bị suy giảm nghiêm trọng. PaMoV thuộc chi Potyvirus, họ Potyviridae. Các potyvirus là các virus có bộ gen RNA sợi đơn, cực dương, lan truyền ngoài tự nhiên qua vector rệp muội (họ Aphydidae) theo kiểu không bền vững và qua nhân giống vô tính (Wylie *và cs.*, 2017). Đối với các bệnh virus, một trong các chiến lược phòng trừ quan trọng là phòng chống vector. Tuy nhiên chiến lược này không hiệu quả đối với các virus truyền theo kiểu không bền vững như potyvirus (Gadhave *và cs.*, 2020). Chính vì vậy, sử dụng giống sạch bệnh và loại bỏ cây bệnh có thể xem là biện pháp quan trọng nhất hiện nay nhằm quản lý bệnh do potyvirus trên chanh leo tại Việt Nam. Để đáp ứng được yêu cầu này, hiển nhiên, chẩn đoán nhanh và chính xác virus là cần thiết.

Đối với virus thực vật, các kỹ thuật chẩn đoán dựa trên kháng thể như ELISA, DIBA và que thử nhanh hiện vẫn được sử dụng phổ biến do có nhiều ưu điểm như thao tác đơn giản, không đòi hỏi trang thiết bị và có thể được thực hiện với số lượng mẫu thử lớn (Sastry, 2013; Abd El-Aziz, 2019). Hiện nay, các kỹ thuật chẩn đoán PaMoV dựa trên kháng thể chưa được nghiên cứu và kháng thể đặc hiệu virus này không sẵn có trên thị trường. Chính vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là tạo ra được được kháng thể có thể chẩn đoán được PaMoV trên cây chanh leo.

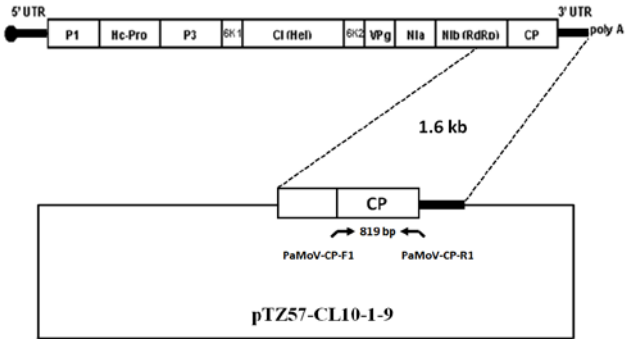
II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu chính

Mẫu chanh leo nhiễm virus và khỏe được bảo quản khô trong silicagel tự chỉ thị hoặc được trồng trong nhà lưới Trung tâm Nghiên cứu Bệnh cây nhiệt đới (VNUA).

Môi trường nuôi cấy: LB (tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L), TB (tryptone 12 g/L, yeast extract 24 g/L, glycerol 4 mL/L, KH_2PO_4 17 mM, K_2HPO_4 72 mM), 2 × TY (tryptone 16 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L).

Plasmid pTZ57-CL10-1-9 mang 1 đoạn ~ 1,6kb đầu 3’ của bộ gen PaMoV được xây dựng từ trước. Đoạn này chứa toàn bộ gen mã hóa protein vỏ của PaMoV (819bp) (Hình 1).



Hình 1. Cấu trúc plasmid pTZ57-CL10-1-9 mang toàn bộ gen mã hóa protein CP của PaMoV và vị trí cặp mồi để nhân toàn bộ gen này

2.2. Xây dựng cấu trúc biểu hiện gen CP của PaMV trên vector pET28a

Toàn bộ gen mã hóa protein CP của PaMoV được nhân bằng PCR với kit 2X PCR Master mix Solution (i-pfu) (iNtRON Biotechnology) dùng cặp mồi PaMoV-CP-F1/PaMoV-CP-R1 (Bảng 1) và khuôn DNA là dòng plasmid pTZ57-CL10-1-9 (Hình 1). Sản phẩm PCR được ghép nối với vector pET28a (Novagen) tại vị trí BamHI/EcoRI và được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng Rosetta (DE3) (Novagen) bằng phương pháp sốc nhiệt. Các dòng vi khuẩn tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường LB agar chứa kháng sinh chloramphenicol (34 µg/ml) và kanamycin (50 µg/ml) và được kiểm tra bằng bằng PCR khuẩn lạc dùng mồi T7-pro/T7-ter (đặc hiệu vector) và PaMV-CP-F1/PaMV-CP-R1 (đặc hiệu gen CP) (Bảng 1). Phản ứng PCR được thực hiện với 2X PCR Master mix Solution (i-Taq) (iNtRON Biotechnology).

Bảng 1. Mồi sử dụng trong nghiên cứu

Mồi	Trình tự (5' - 3')	Mục đích
PaMoV-CP-F1	AGAGGATCCATGTCAGGCAAAGTCGAAAAG	Nhân toàn bộ gen CP, kích thước: 819bp
PaMoV-CP-R1	TCTGAATTC TTACTGCACGGGGCCAA	
T7-Pro	TAATACGACTCACTATAGGG	Kiểm tra sản phẩm nối trên vector pET28a
T7-Ter	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	

2.3. Biểu hiện gen CP của PaMoV trong vi khuẩn E. coli chủng Rosetta (DE3)

Các thí nghiệm biểu hiện gen CP của PaMoV được thực hiện trong ống nghiệm thủy tinh (20 × 2 cm) chứa 5mL môi trường LB bổ sung chloramphenicol (34 µg/ml) và kanamycin (50 µg/ml) ở điều kiện lắc 250 vòng/phút. Cảm ứng biểu hiện bằng bổ sung Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) được bắt đầu khi OD_{600} của dịch vi khuẩn đạt 0,6. Nhiệt độ nuôi cấy và cảm ứng, thời gian nuôi cấy và cảm ứng, nồng độ IPTG được thay đổi theo thí nghiệm. Khả năng biểu hiện protein của vi khuẩn được phân tích bằng điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide 13%. Để đảm bảo đánh giá chính xác, trước khi phân tích SDS-PAGE, lượng tế bào vi khuẩn ở các công thức thí nghiệm được điều chỉnh về cùng mức tương đương nhau bằng đo OD_{600}.

2.4. Tinh chiết protein CP tái tổ hợp

Dòng vi khuẩn mang cấu trúc biểu hiện CP của PaMoV được nuôi trong 50 ml môi trường LB chứa chloramphenicol (34 µg/ml) và kanamycin (50 µg/ml) ở 37^{o}C, lắc 250 vòng/phút tới OD_{600} ~ 0,6. Tiếp theo, dịch vi khuẩn được bổ sung IPTG tới 1 mM và nuôi cảm ứng biểu hiện ở 250 vòng/phút, 30^{o}C qua đêm. Qui trình xử lý tế bào vi khuẩn, tinh chiết protein bằng sắc kí ái lực Ni-NTA-Agarose ở

điều kiện biến tính bằng 8M urea được thực hiện theo QIAgenes *E. coli* Handbook (2009). Protein tinh chiết được phân tích bằng điện di SDS-PAGE và định lượng theo phương pháp được mô tả bởi Grintzalis *và cs.* (2015).

2.5. Gây miễn dịch trên thỏ

Protein CP tái tổ hợp được kết tủa bằng ethanol (Zellner *và cs.*, 2005) và được hòa trong NaCl 0.9% chứa 2M urea ở nồng độ 1 mg/mL. Thỏ trắng New Zealand (3 tháng tuổi) được gây miễn dịch bằng cách tiêm hỗn hợp 0,25 mL dịch protein + 0,25 mL tá chất hỗ trợ miễn dịch (Freund's complete adjuvant) vào bắp đùi sau của thỏ. Quá trình tiêm được thực hiện liên tục 5 lần, mỗi lần trên 1 đùi và cách nhau 1 tuần. Ở 4 lần tiêm sau, tá chất hỗ trợ miễn dịch được thay bằng Freund's incomplete adjuvant. Ở 1 tuần sau lần tiêm thứ 4 và thứ 5, khoảng 0,5 ml máu thỏ được lấy từ ven tai và ly tâm để lấy KHT nhằm kiểm tra sự có mặt của kháng thể virus PaMoV bằng ELISA và DIBA.

2.6. DIBA

Mô lá được nghiền với đệm Carbonate (Na_2CO_3 15 mM, $NaHCO_3$ 35 mM, pH 9,6) theo tỉ lệ 1:10 (khối lượng/thể tích). Dịch cây được nhỏ lên màng nitrocellulose (lỗ màng 0,45 µm, Sigma) với lượng 1 µl/dot. Màng được khóa với skim milk 5% được chuẩn bị trong đệm TBS (Tris 150 mM, NaC l50 mM, pH 7,5) trong một 1 giờ ở 37^{o}C. Màng được rửa 3 lần với đệm TBS-T (TBS chứa Tween20 0,05%). Màng được ủ 1 giờ ở 37^{o}C với KHT (được hòa trong đệm kháng thể (TBS-T chứa Polyvinylpyrrolidone 2% và skim milk 3%)) và được rửa 3 lần với đệm TBS-T. Màng được ủ 1 giờ ở 37^{o}C với kháng thể đơn dòng chuột liên kết Alkaline Phosphatase (AP) đặc hiệu kháng thể thỏ (A2556, Sigma) (được hòa trong đệm kháng thể theo tỉ lệ 1/35000). Màng được rửa 3 lần với đệm TBS-T. Phản ứng được phát hiện bằng cơ chất 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)/nitro blue tetrazolium (NBT) (S3841, Promega).

2.7. PTA-ELISA

Mô lá được nghiền với đệm Carbonate theo tỉ lệ 1:10 (khối lượng/thể tích). Dịch cây được nhỏ vào giếng với lượng 100 µl/giếng. Bản ELISA được ủ qua đêm ở 4^{o}C và được rửa 3 lần với đệm PBS-T (Na_2HPO_4 8 mM, NaCl 150 mM, KH_2PO_4 2 mM, KCl 3 mM, Tween 20 0,05%, pH 7,4). KHT được hòa trong đệm kháng thể (đệm PBS-T chứa PVP 2%, ovalbumin 0,2%) và được nhỏ vào giếng với lượng 100 µl/giếng. Bản ELISA được ủ 4 giờ ở 37^{o}C và được rửa 3 lần với đệm PBS-T. Kháng thể đơn dòng chuột liên kết AP đặc hiệu kháng thể thỏ (A2556, Sigma) được hòa trong đệm kháng thể theo tỉ lệ 1/5000 và được cho vào giếng với lượng 100 µl/giếng. Bản ELISA được ủ 4 giờ ở 37^{o}C và được rửa 5 lần với đệm PBS-T. Dịch cơ chất p-nitrophenyl phosphate (SIGMAFAST, Sigma) được cố định vào giếng với lượng 100 µl/giếng. Bản ELISA được ủ

1 giờ ở 25^{o}C trong tối. Phản ứng được đo bằng máy đọc ELISA ở bước sóng 405 nm.

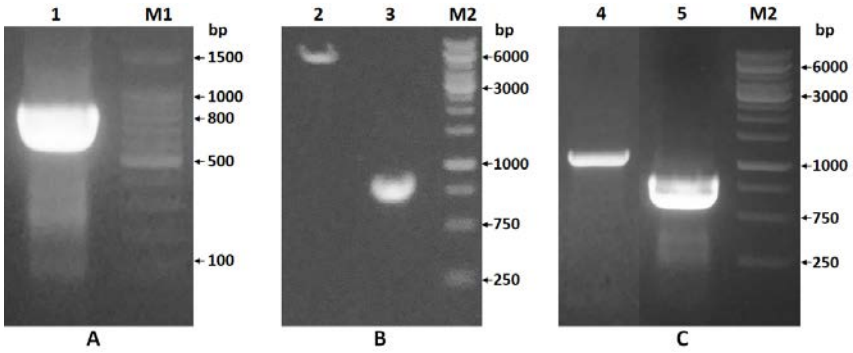
III. KẾT QUẢ

3.1. Tạo kháng nguyên tái tổ hợp dựa trên gen mã hóa CP của PaMoV

3.1.1. Xây dựng cấu trúc biểu hiện gen CP của PaMV trên vector pET28a

Để phân lập gen mã hóa CP, phản ứng PCR được thực hiện với khuôn là plasmid pTZ-CL10-1-9 chứa toàn bộ gen CP của PaMV tạo ra từ trước và cặp mồi PaMoV-CP-F1/PaMoV-CP-R1 (Hình 1, Mục 3). Để đảm bảo chống lỗi do PCR, *Pfu* DNA polymerase đã được sử dụng thay vì Taq DNA polymerase. Phản ứng PCR đã tạo ra sản phẩm có kích thước mong muốn ~ 0,8 kb khi điện di trên gel agarose (Hình 2A).

Sản phẩm PCR được nối với vector pET28a (Hình 2B) và được biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* Rosetta (DE3). Kiểm tra PCR các khuẩn lạc với 2 cặp mồi là PaMoV-CP-F1/R1 (đặc hiệu gen CP) và mồi vector T7-pro/T7-ter (đặc hiệu vector) đã xác định 1 dòng vi khuẩn Rosetta (DE3), ký hiệu là pET-PaMoV-CP-1, tạo sản phẩm có kích thước mong muốn với cả 2 cặp mồi (Hình 2C).



Ghi chú: **A)** PCR nhân toàn bộ gen mã hóa CP của PaMoV (giếng 1). **B)** Điện di kiểm tra hàm lượng pET28a (giếng 2) và gen CP của PaMoV (giếng 3) sau khi được cắt kép bằng BamHI/EcoRI và tinh sạch. **C)** PCR khuẩn lạc kiểm tra dòng vi khuẩn Rosetta (DE3) pET-PaMoV-CP-1 bằng 2 cặp mồi đặc hiệu vector (T7-pro/T7-ter, giếng 4) và đặc hiệu đoạn chèn (PaMoV-CP-F1/PaMoV-CP-R1, giếng 5). M1 là thang DNA 100bp (Promega), M2 là thang DNA 1kb (GeneRuler 1kb DNA ladder, Thermo Scientific) với các băng tham khảo được chỉ bằng mũi tên.

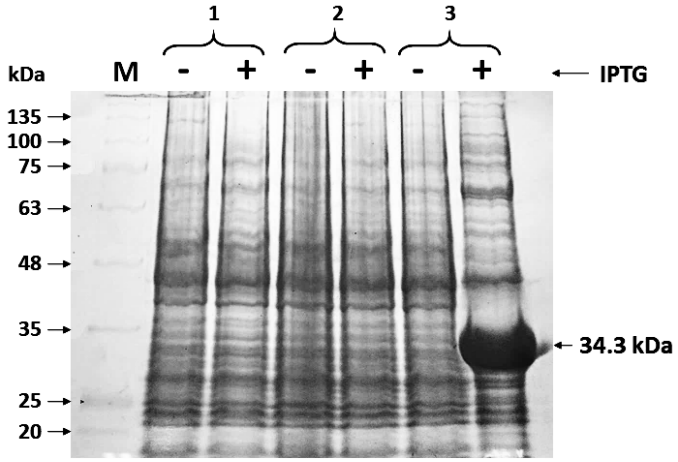
Hình 2. PCR và điện di agarose các sản phẩm trong quá trình xây dựng cấu trúc biểu hiện gen CP của PaMoV

3.1.2. Đánh giá biểu hiện gen CP của cấu trúc pET-PaMoV-CP-1 trong chủng Rosetta (DE3)

Ba dòng vi khuẩn Rosetta (DE3) mang cấu trúc pET-PaMoV-CP-1, pET28a, và không mang cấu trúc đã được thí nghiệm biểu hiện trong điều kiện được và không được cảm ứng với IPTG.

Kết quả kiểm tra SDS-PAGE (Hình 3) cho thấy chỉ dòng vi khuẩn Rosetta (DE3) mang cấu trúc pET-PaMoV-CP-1 được cảm ứng với IPTG mới tạo 1 băng

protein rõ rệt với kích thước mong muốn = 34,3kDa gồm 3.6kDa của protein dung hợp đầu N sẵn trên vector và 30.7kDa của CP. Trái lại 5 đối chứng còn lại gồm Rosetta (DE3) mang cấu trúc pET-PaMoV-CP-1 (không bổ sung IPTG), Rosetta (DE3) mang vector pET28a (có và không bổ sung IPTG) và Rosetta (DE3) (có và không bổ sung IPTG) đều không tạo sản phẩm protein có kích thước tương tự.



Ghi chú: M là thang protein (GangNam-STAIN™ Prestained Protein Ladder, iNtRON BIO). Dấu (+) và (-) là có và không bổ sung IPTG. Các cặp giếng: 1) Rosetta (DE3), 2) Rosetta (DE3) mang vector pET28a, 3) Rosetta (DE3) mang cấu trúc pET-PaMoV-CP-1. Băng sản phẩm protein tái tổ hợp mong muốn 34,3kDa được chỉ bằng mũi tên.

Hình 3. SDS-PAGE kiểm tra biểu hiện protein CP (PaMoV) của cấu trúc pET-PaMoV-CP-1 trong chủng vi khuẩn Rosetta (DE3) ở điều kiện chuẩn

3.1.3. Đánh giá ảnh hưởng của IPTG, nhiệt độ cảm ứng và môi trường tới mức độ biểu hiện protein CP của cấu trúc pET-PaMoV-CP-1 trong chủng Rosetta (DE3)

Ba yếu tố chủ chốt ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện protein CP của PaMoV trong chủng vi khuẩn Rosetta (DE3) gồm nồng độ IPTG, nhiệt độ cảm ứng và môi trường nuôi cấy đã được đánh giá.

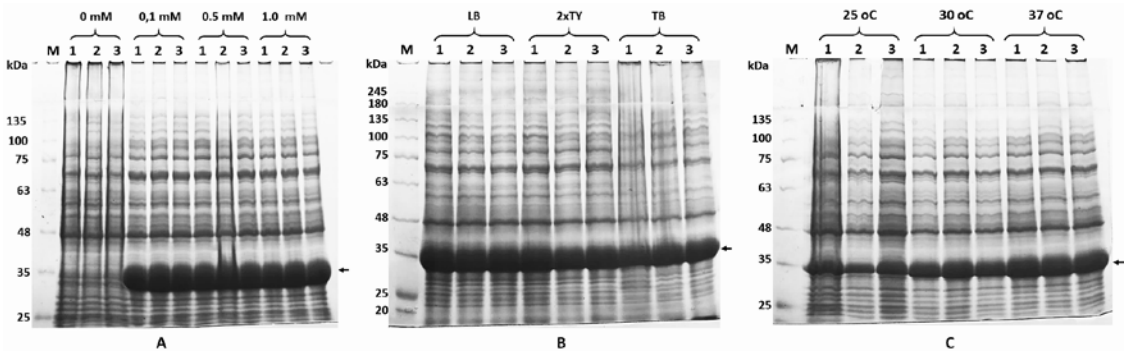
Phân tích SDS-PAGE (Bảng 2, Hình 4A, 4B) cho thấy khả năng biểu hiện protein CP của PaMoV tương tự nhau trong chủng vi khuẩn Rosetta (DE3) ở cả 3 nồng độ IPTG và 3 loại môi trường khi tất cả các băng protein đều có độ đậm tương đương ở mức cao nhất +++.

Phân tích SDS-PAGE cho thấy rõ ảnh hưởng của nhiệt độ đến mức độ biểu hiện protein CP của PaMoV trong chủng vi khuẩn Rosetta (DE3). Mức biểu hiện protein CP cao nhất (+++) là ở 37 ^{o}C, thấp hơn (++) ở 30^{o}C và thấp nhất (+) ở 25^{o}C (Hình 4C).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ IPTG, nhiệt độ cảm ứng và môi trường tới mức độ biểu hiện protein CP của PaMoV trong chủng Rosetta (DE3)

Yếu tố ảnh hưởng	Công thức	Nồng độ IPTG (mM)	Môi trường	Nhiệt độ cảm ứng (^oC)	Mức độ biểu hiện protein
Nồng độ IPTG	CT1 (đối chứng)	0	LB	37	-
	CT2	0,1	LB	37	+++
	CT3	0,5	LB	37	+++
	CT4	1,0	LB	37	+++
Nhiệt độ cảm ứng	CT5	1,0	LB	37	+++
	CT6	1,0	LB	30	++
	CT7	1,0	LB	25	+
Môi trường nuôi cấy	CT8	1,0	LB	37	+++
	CT9	1,0	2TY	37	+++
	CT10	1,0	TB	37	+++

Ghi chú: * Dựa trên độ đậm của băng protein biểu hiện trong phân tích SDS-PAGE (Hình 6); mỗi công thức lặp lại 3 lần.



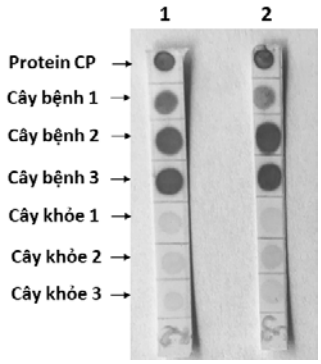
Ghi chú: Điều kiện thí nghiệm được trình bày ở Bảng 2. M là thang protein (GangNam-STAIN™ Prestained Protein Ladder, iNtRON BIO). Băng sản phẩm protein tái tổ hợp mong muốn 34,3kDa được chỉ bằng mũi tên. Các số 1, 2, 3 trên các giếng là lần lặp.

Hình 4. SDS-PAGE đánh giá ảnh hưởng của nồng độ IPTG (A), môi trường (B) và nhiệt độ cảm ứng (C) tới mức độ biểu hiện protein CP của PaMoV trong chủng Rosetta (DE3)

3.2. Tạo kháng huyết thanh thể đa dòng thỏ

3.2.1. Đánh giá sự hình thành kháng thể đặc hiệu PaMoV trong máu thỏ sau khi gây miễn dịch bằng DIBA

Kết quả kiểm tra DIBA (Hình 5 cho thấy cả 2 mẫu KHT thu sau tiêm lần 4 và sau tiêm lần 5 đều chứa kháng thể đặc hiệu PaMoV. Đáng chú ý, KHT không chứa kháng thể phản ứng không đặc hiệu với protein cây khỏe. Do KHT sau tiêm lần 5 chứa nhiều kháng thể đặc hiệu PaMoV nên toàn bộ máu thỏ được thu thập cho các nghiên cứu tiếp theo.

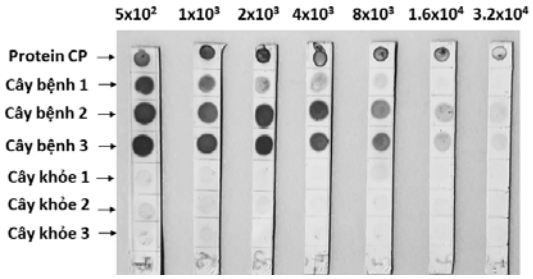


Ghi chú: Cây bệnh 1, 2, 3 là các mẫu lá chanh leo khô, thu thập 2016, bảo quản ở nhiệt độ phòng, chỉ nhiễm PaMoV được xác định bằng giải trình tự. Cây khỏe 1, 2, 3 là các cây chanh leo trồng từ hạt. Prtein CP được hòa trong đệm carbonate tới lượng ~ 20 µg/ ml. Độ hòa loãng kháng huyết thanh: 1/200. Số trên các băng DIBA: 1 và 2 lần lượt là kháng huyết thanh thu sau lần tiêm thứ 4 và 5.

Hình 5. Đánh giá sự hình thành kháng thể đặc hiệu PaMoV trong kháng huyết thanh thỏ được gây miễn dịch với protein CP tái tổ hợp bằng DIBA

3.2.3. Đánh giá độ hòa loãng của kháng huyết thanh bằng DIBA

Kết quả kiểm tra DIBA với 7 độ hòa loãng KHT 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000 và 1/32000 cho thấy độ đậm của các ô mẫu bệnh giảm dần theo độ hòa loãng KHT (Hình 6). KHT ở độ hòa loãng 32,000 lần vẫn có phản ứng rõ với protein kháng nguyên và bằng mắt thường phản ứng dương tính vẫn có thể được phát hiện ở 2/3 mẫu cây bệnh.



Ghi chú: Cây bệnh 1, 2, 3 là các mẫu lá chanh leo khô, thu thập 2016, bảo quản ở nhiệt độ phòng, được xác định chỉ nhiễm PaMoV bằng giải trình tự. Cây khỏe 1, 2, 3 là các cây chanh leo trồng từ hạt. Prtein CP được hòa trong đệm carbonate tới ~20 µg/ml. Số trên các băng DIBA là độ hòa loãng kháng huyết thanh.

Hình 6. Phản ứng DIBA đánh giá độ hòa loãng kháng huyết thanh thỏ đặc hiệu PaMoV

3.2.3. Đánh giá độ nhạy và tính đặc hiệu của kháng huyết thanh bằng PTA-ELISA

Kiểm tra PTA-ELISA (Bảng 3) cho thấy KHT phát hiện PaMoV trong cây rất tốt. Ở độ hòa loãng KHT từ 1/200 đến 1/1000, giá trị OD trung bình của các mẫu cây bệnh không khác nhau nhiều và rất cao, từ 1,729 đến 2,056. Thậm chí ở độ hòa loãng 1/5000, giá trị OD của các mẫu cây bệnh OD cũng vẫn > 1.

Quan trọng nhất, KHT không phản ứng với protein của cây khỏe. Giá trị OD trung bình của các mẫu cây khỏe ở độ hòa loãng từ 1/500 đến 1/1000 rất thấp, từ 0,173 đến 0,234, tương đương với giá trị

của các giếng nền chỉ cho dịch cơ chất (OD trung bình 0,193). Một cách phát hiện kháng thể không đặc hiệu phản ứng với protein cây khỏe là so sánh giá trị OD của KHT được hòa trực tiếp trong đệm (không hấp thụ chéo) với KHT được ủ trước với dịch cây khỏe (có hấp thụ chéo). Phân tích t-test giá trị OD của tất cả các cặp KHT (có và không hấp thụ chéo) ở tất cả các độ hòa loãng và trên 2 nhóm cây bệnh và cây khỏe đều cho thấy không có khác biệt có ý nghĩa thống kê (các giá trị *P* đều > mức ý nghĩa α = 0,05, Bảng 3).

Bảng 3. Đánh giá độ nhạy và tính đặc hiệu của kháng huyết thanh thỏ đặc hiệu PaMoV bằng PTA-ELISA

Loại mẫu	Độ hòa loãng kháng huyết thanh	Hấp thụ chéo[2]	Giá trị OD (405 nm) sau ủ 60 phút		*P* (t-test, two-tailed, α = 0,05)
			Trung bình	Độ lệch chuẩn	
Cây khỏe (n = 3)	1/200	Có	0,273	0,009	0,88
		Không	0,274	0,014	
	1/500	Có	0,231	0,012	0,09
		Không	0,208	0,013	
	1/1000	Có	0,203	0,005	0,12
		Không	0,191	0,010	
	1/5000	Có	0,173	0,009	0,93
		Không	0,173	0,008	
Cây nhiễm PaMoV[1] (n = 3)	1/200	Có	2,065	0,022	0,56
		Không	2,055	0,014	
	1/500	Có	1,929	0,043	0,40
		Không	1,892	0,053	
	1/1000	Có	1,909	0,032	0,05
		Không	1,729	0,106	
	1/5000	Có	1,157	0,127	0,64
		Không	1,096	0,164	
Nền (chỉ dịch cơ chất), n = 8			0,193	0,008	

Ghi chú: [1] Cây bệnh 1, 2, 3 là các mẫu lá chanh leo khô, thu thập 2016, bảo quản ở nhiệt độ phòng, chỉ nhiễm PaMoV được xác định bằng giải trình tự. Cây khỏe là các cây chanh leo trồng từ hạt. [2] Hấp thụ chéo: Kháng huyết thanh được hòa trong dịch cây khỏe nghiền trong đệm kháng thể và ủ ở 37^{o}C 45 phút trước khi cho vào giếng ELISA.

Ngoài ra, KHT cũng được kiểm tra liệu có phản ứng chéo với 2 potyvirus khác nhiễm trên chanh leo tại Việt Nam là EAPV-IB và TelMo và 2 protein

thường được sử dụng làm tác nhân khóa (blocker) là BSA và skim milk.

Kết quả kiểm tra PTA-ELISA (Bảng 4) cho thấy KHT không phản ứng với BSA và Skim milk. Giá trị OD của chúng rất thấp (< 0,2) và tương đương với OD của các giếng nền. Đáng chú ý, KHT phản ứng khá mạnh với EAPV-IB và đặc biệt với TelMV (giá trị OD lần lượt 0,366 và 1,861 ở độ hòa loãng 1/5000).

Bảng 4. Phản ứng của kháng huyết thanh với 2 potyvirus chanh leo (EAPV-IB và TelMV) và 2 protein (BSA và Skim milk)

Độ hòa loãng kháng huyết thanh (không hấp thụ chéo)	Giá trị OD (405 nm) sau ủ 60 phút			
	EAPV-IB	TelMV	BSA	Skim milk
1/200	1,810	2,175	0,196	0,194
1/500	1,325	2,039	0,179	0,177
1/1000	0,925	1,993	0,165	0,176
1/5000	0,366	1,861	0,167	0,169

Ghi chú: Đối chứng giếng nền: xem bảng 3; Hai mẫu virus EAPV-IB và TelMV là mẫu chanh leo tươi, được xác định bằng giải trình tự. BSA và skim milk: 3% trong đệm carbonate.

IV. THẢO LUẬN

4.1. Gen mã hóa protein CP của PaMoV được biểu hiện tốt trong vi khuẩn *E. coli* chủng Rosetta (DE3)

Hiện nay, loại kháng nguyên phổ biến nhất được sử dụng để tạo kháng thể chẩn đoán virus thực vật là protein CP tái tổ hợp được biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli* (Lima *và cs.*, 2012; Souiri *và cs.*, 2014). Vì bộ gen của PaMoV, cũng như của các virus RNA thực vật khác, đã thích ứng để được dịch mã trong tế bào sinh vật nhân chuẩn nên chúng có thể khó đươc dịch mã trong tế bào vi sinh vật tiền nhân như *E. coli* do khác biệt lớn về hiệu suất sử dụng mã bộ ba (Rosano & Ceccarelli, 2014). Các kết quả thí nghiệm biểu hiện trong nghiên cứu này đã chứng tỏ trình tự gen mã hóa protein CP của PaMV hoàn toàn thích ứng với bộ máy dịch mã của chủng Rosetta (DE3) và do đó không cần phải tối ưu trình tự dịch mã. Kết quả này có thể do chủng Rosetta (DE3) là chủng *E. coli* cải biến, cho phép tăng cường biểu hiện các protein có nguồn gốc từ sinh vật nhân chuẩn và chứa 6 mã hiếm được sử dụng trong vi khuẩn *E. coli* như AUA, AGG, AGA, CUA, CCC và GGA.

Quá trình biểu hiện protein tái tổ hợp trong *E. coli* bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố (Costa *và cs.*, 2014). Các thí nghiệm đánh giá các yếu tố chủ chốt ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện gen như nồng độ IPTG, môi trường nuôi cấy, nhiệt độ cảm ứng cũng cho thấy protein CP của PaMoV không gây độc tế bào Rosetta (DE3) và có thể được biểu hiện dễ dàng trong chủng vi khuẩn này ở các điều kiện cảm ứng thay đổi.

4.2. Kháng huyết thanh đa dòng PaMoV nhận biết các epitope liên tục của protein CP

Các epitope (điểm quyết định kháng nguyên) của một protein được chia làm 2 nhóm là liên tục gồm các amino acid liền kề trên chuỗi bâc 1 và không liên tục gồm các amino acid không liền nhau trên chuỗi bậc 1 nhưng xắp xếp gần nhau do sự gấp xoắn của protein (Van Regenmortel, 2014). Đối với potyvirus, các phân tích cấu trúc và huyết thanh học cho thấy: (i) đầu N và đầu C của protein CP được hiển thị trên bề mặt của phân tử virus, (ii) phần đầu N là vùng biến động nhất và chứa các epitope đặc hiệu loài, (iii) vùng trung tâm và vùng đầu C khá bảo thủ và chứa các epitope đặc hiệu cho chi, và (iv) các epitope đặc hiêu loài ở vùng đầu là phần lớn là các epitope liên tục (Shukla *và cs.*, 1989; Peng *và cs.*, 2018). Trong nghiên cứu này, protein CP gây miễn dịch ở dạng cấu trúc bậc 1 do được chuẩn bị trong điều kiện biến tính nên các epitope của protein thuộc nhóm liên tục. Đặc điểm này cho phép kháng thể đa dòng thu được sẽ chứa các dòng kháng thể chỉ phản ứng với các epitope liên tục nằm trên toàn bộ protein CP của PaMoV. Trên phân tử virus nguyên vẹn, protein CP ở dạng cấu trúc thứ cấp và do đó các epitope liên tục ở phần trung tâm phần lớn không được hiển thị trên bề mặt (Shukla *và cs.*, 1988; Van Regenmortel, 1992). Đặc điểm này dẫn tới kháng thể đa dòng thu được chỉ phản ứng với các epitope liên tục có mặt trên đầu N và đầu C của protein CP trên bề mặt phân tử virus và do đó làm tăng tính đặc hiệu. Một ưu điểm nữa khi gây miễn dịch bằng protein CP ở cấu trúc bậc 1 là ở trạng thái này, các epitope liên tục không bị mất do quá trình gấp xoắn hậu dịch mã của protein trong tế bào E. coli không giống trong tế bào thực vật, đặc biệt khi phần protein dung hợp ở đầu N của protein CP có thể ảnh hưởng tới quá trình gấp xoắn.

Sử dụng protein kháng nguyên dưới dạng cấu trúc bậc 1 như protein trong gel polyacrylamide được cắt ra từ điện di SDS-PAGE đã được sử dụng trong sản xuất kháng thể chẩn đoán virus thực vật (Abdel-Salam *và cs.*, 2013, Ha *và cs.*, 2019). Trong nghiên này, tất cả các công đoạn trong quá trình tinh chiết protein CP tái tổ hợp của PaMoV đều sử dụng đệm chứa urea 8M. Qui trình có nhiều ưu điểm vì đơn giản và đặc biệt urea gây biến tính các protease nên protein CP không bị phân hủy trong quá trình tinh chiết.

4.3. Kháng huyết thanh đa dòng PaMoV có giá trị chẩn đoán cao

Một kháng thể đa dòng có giá trị chẩn đoán virus thực vật phải không phản ứng với protein của cây ký chủ nhằm tránh phản ứng dương tính giả. Kháng thể đa dòng thường chứa các dòng kháng thể không đặc hiệu phản ứng với protein của cây do quá trình đáp ứng miễn dịch của động vật phụ nhiều yếu tố, chủ yếu do đặc điểm miễn dịch của động vật và bản chất của nguồn kháng nguyên (Lima *và cs.*, 2012; Van Regenmortel, 2014). KHT đa dòng tạo được trong nghiên cứu này đã chứng tỏ mức độ đặc hiệu và độ nhạy cao. KHT không phản ứng với protein của cây chanh leo khỏe, không phản ứng với BSA và skim milk, hai loại protein thường sử dụng làm tác nhân khóa trong

các thử nghiệm miễn dịch. KHT có thể phát hiện PaMoV trong mẫu lá chanh leo khô (bảo quản 4 năm ở nhiệt độ phòng) ở độ hòa loãng ít nhất 5000 lần trong phản ứng PTA-ELISA với giá trị OD cao (~2). Đáng chú ý, KHT phát hiện PaMoV trong phản ứng DIBA có độ nhạy cao hơn nhiều so với ELISA, phù hợp với các kết luận chung về độ nhạy của 2 kỹ thuật (Abd El-Aziz, 2019). Kết quả này là quan trọng vì kỹ thuật DIBA đơn giản hơn nhiều so với ELISA và có thể áp dụng dễ dàng tại cơ sở sản xuất.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng nhận thấy KHT PaMoV phản ứng chéo với 2 potyvirus đang gây hại chanh leo tại Việt Nam là EAPV-IB và đặc biệt TelMV. Shukla *và cs.*. (1992) đã kết luận phần lớn các kháng thể đa dòng potyvirus có phản ứng chéo ở các mức độ khác nhau với các potyvirus khác, chủ yếu lá do chúng có nhiều epitope chung ở phần trung tâm của protein CP. Trong dịch cây, ngoài phân tử virus nguyên vẹn, các phân tử protein CP chưa lắp ráp cũng tồn tại nhiều và do đó các eptope chung ở phần trung tâm có thể được hiển thị và được nhận biết bởi các kháng thể tương ứng có trong kháng thể đa dòng. Cũng cần chỉ ra ở đây TelMV là virus gần gũi nhất với PaMoV và protein CP của 2 virus có mức đồng nhất trình tự amino acid tới 80% (Xie *và cs.*, 2019).

Như vậy, ngoài áp dụng trong các nghiên cứu cơ bản về PaMoV như phát hiện virus trong cây lây nhiễm khi nghiên cứu về tính gây bệnh và phổ ký chủ của virus này, KHT PaMoV có thể được áp dụng để chọn tạo giống chanh leo sạch potyvirus tại Việt Nam.

V. KẾT LUẬN

Gen mã hóa protein CP của PaMoV đã được xây dựng thành công trên vector pET28a và Rosseta (DE3) là chủng *E. coli* phù hợp để biểu hiện gen này.

KHT đa dòng thỏ được gây miễn dịch với protein CP của PaMoV không phản ứng với protein của cây chanh leo và có thể phát hiện dễ dàng PaMoV trong mẫu lá chanh leo bệnh bằng 2 kỹ thuật PTA-ELISA và DIBA.

KHT PaMoV cũng phản ứng với hai potyvirus đang gây hại chanh leo tại Việt Nam là TelMV và EAPV-IB và do đó có thể được ứng dụng để chọn tạo giống chanh leo sạch potyvirus.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được hỗ trợ từ đề tài cấp Bộ (mã số WB.05/20). Các tác giả chân thành cảm ơn Trung tâm Kiểm dịch Thực vật nhập khẩu I đã cung cấp các mẫu chanh leo nhiễm bệnh virus.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abd El-Aziz M.H. (2019). Three modern serological methods to detect plant viruses. Journal of Plant Science and Phytopathology. 3:101 - 106.
2. Abdel-Salam A.M., El-Attar A.K. & Soliman A.M. (2013). The use of native and denatured recombinant coat protein forms for induction of good quality antisera for Potato virus X and Potato leaf roll virus. American Journal of Research Communication. 1(17):70 - 86.
3. Costa S., Almeida A., Castro A. & Domingues L. (2014). Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in Escherichia coli: the novel Fh8 system. Frontiers in microbiology. 5:63.

4. Gadhave K.R., Gautam S., Rasmussen D. A. & Srinivasan R. (2020). Aphid Transmission of Potyvirus: The Largest Plant-Infecting RNA Virus Genus. Viruses. 12(7):773.
5. Grintzalis K., Georgiou C.D. & Schneider Y.-J. (2015). An accurate and sensitive Coomassie Brilliant Blue G-250-based assay for protein determination. Analytical biochemistry. 480:28 - 30.
6. Ha V.C., Tran N.H., Do T.D., Nguyen D.H., Wei S.F., Qin W. & Lyu R.H. (2019). Production of polyclonal antisera for diagnosis of rice yellow stunt virus (RYSV) in Vietnam. Journal of Southern Agriculture. 50(7):1472:1482.
7. Lima J. A. A., Nascimento A.K.Q., Radaelli P. & Purcifull D.E. (2012). Serology applied to plant virology. Serological diagnosis of certain human, animal and plant diseases. Rijeka, Croatia: InTech. 1:71 - 94.
8. Peng D., Zheng G., Zheng Z., Tong Q. & Ming Y. (2018). High variability in the N terminus of coat protein among potyviruses and its advantage in producing a specific antibody. European Journal of Plant Pathology. 152(2):385 - 393.
9. QIAgenes E. coli Handbook (2009). QIAgenes expression kit E. coli for high-Level expression of His-tagged proteins in E. coli systems.
10. Rosano G. L. & Ceccarelli E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. Frontiers in microbiology. 5:172.
11. Sastry K.S. (2013). Diagnosis and Detection of Plant Virus and Viroid Diseases. In: Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics. Springer: 233 - 353.
12. Shukla D.D., Lauricella R. & Ward C. W. (1992). Serology of potyviruses: current problems and some solutions. In: Potyvirus Taxonomy. 57 - 69.
13. Shukla D.D., Tribbick G., Mason T., Hewish D.R., Geysen H. & Ward C.W. (1989). Localization of virus-specific and group-specific epitopes of plant potyviruses by systematic immunochemical analysis of overlapping peptide fragments. Proceedings of the National Academy of Sciences. 86(21):8192 - 8196.
14. Souiri A., Zemzami M., Amzazi S. & Ennaji M.M. (2014). Polyclonal and monoclonal antibody-based methods for detection of plant viruses. European Journal of Scientific Research. 123(3):281 - 295.
15. Van Regenmortel M.H. (1992). The conformational specificity of viral epitopes. FEMS microbiology letters. 100(1-3): 483 - 487.
16. Van Regenmortel M. H. (2014). Specificity, polyspecificity and heterospecificity of antibody-antigen recognition. Journal of Molecular Recognition. 27(11):627 - 639.
17. Wylie S.J., Adams M., Chalam C., Kreuze J., López-Moya J.J., Ohshima K., Praveen S., Rabenstein F., Stenger D. & Wang A. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Potyviridae. The Journal of general virology. 98(3):352.
18. Xie L., Gao F., Zheng S., Zhang X., Zhang L. & Li T. (2019). Molecular characterization of a new potyvirus infecting passion fruit. Archives of virology. 164(7):1903 - 1906.
19. Zellner M., Winkler W., Hayden H., Diestinger M., Eliasen M., Gesslbauer B., Miller I., Chang M., Kungl A. & Roth E. (2005). Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets. Electrophoresis. 26(12):2481 - 2489.

XÁC ĐỊNH MỨC ĐỘ VÀ THỜI ĐIỂM XUẤT HIỆN TRIỆU CHỨNG ĐẶC TRƯNG LÙN XOẮN LÁ LÚA Ở ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI

Nguyễn Phú Dũng[1] và Trần Văn Thơ[2]

[1] Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh
[2] Công ty PPC

ABSTRACT

The study's objectives were to compare and evaluate the level, the infected stage of the symptom of twisted leaf, twisted leaf tip and serrated leaf tissue on OM 6976 rice plant in the nethouse condition. Indicators such as the incidence, the incubation period and the percent of infected Rice Ragged Stunt Virus (RRSV) in rice plant. Results showed that the incidence in the third inoculation was higher than the first and the second in the individual method. The incubation period in rice plants were 18.2 - 24.2 days and did not depend on the number of times inoculation by viruliferous Brown Plant Hopper. The symptom of twisted leaf tip showed the highest incidence of disease and the incubation period of twisted leaf, twisted leaf tip and serrated leaf tissue symptoms were 19.4 - 25.2 days.

Keywords: *Rice Ragged Stunt Virus, twisted leaf, twisted leaf tip and serrated leaf tissue symptoms.*

I. GIỚI THIỆU

Nghề trồng lúa đang luôn gặp phải những trở ngại và khó khăn, do điều kiện thâm canh và khí hậu gió mùa nóng ẩm quanh năm đã tạo điều kiện thuận lợi cho nhiều loại sâu bệnh hại phát triển. Trong đó, rầy nâu (*Nilaparvatar lugens*) là côn trùng gây hại lớn nhất đối với cây lúa ở Việt Nam cũng như các nước trồng lúa. Khi dịch bùng phát có thể làm năng suất lúa giảm nghiêm trọng, có khi thiệt hại lên đến 70% hoặc mất trắng (Lương Minh Châu *và cs.*, 2006).

Ở Việt Nam, vào năm 2006 ở nước ta đã xuất hiện đại dịch bệnh virus vàng lùn và lùn xoắn lá (VL - LXL) trên lúa đầu tiên ở đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Theo Nguyễn Thơ, 2007 lập luận rằng bệnh sau đó lan ra nhiều tỉnh khác ở Đông Nam Bộ và miền Trung gây ra thiệt hại hàng nghìn héc-ta lúa Hè Thu trên nhiều tỉnh (Nguyễn Phú Dũng, 2011). Bệnh lùn xoắn lá do virus Rice Ragged Stunt Virus (RRSV) và bệnh lùn lúa cỏ (vàng lùn) do virus Rice Grassy

Người phản biện: PGS.TS. Phạm Văn Dư.

Stunt Virus (RGSV) là hai bệnh nghiêm trọng trên cây lúa, rất khó phòng trị và là nỗi lo lắng của người nông dân. Hai bệnh trên không lây truyền qua hạt giống, nước, không khí, đất và các tác nhân giới mà chủ yếu là qua môi giới truyền bệnh là rầy nâu (Phạm Văn Kim, 2016). Hiện nay chưa có giống kháng tuyệt đối và biện pháp phòng trừ cũng chưa áp dụng một cách đúng đắn nên bệnh vẫn còn xuất hiện một số nơi trên đồng ruộng. Bệnh gây hại nghiêm trọng sẽ ảnh hưởng rất lớn đến năng suất lúa và thiệt hại về đời sống kinh tế cho bà con.

Theo Cục Bảo vệ thực vật (2014) tại các tỉnh phía Nam, sâu bệnh phát sinh chủ yếu trên lúa Hè Thu giai đoạn đẻ nhánh, làm đòng và trỗ bông. Đáng chú ý, diện tích nhiễm rầy nâu và đạo ôn lá giảm nhiều so với năm 2013, trong khi bệnh VL - LXL đang có chiều hướng tăng. Tổng diện tích lúa bị nhiễm bệnh VL - LXL là 3.040 ha, tăng 3.000 ha so với năm 2013. Bệnh xuất hiện chủ yếu ở các tỉnh Đồng Tháp, Vĩnh Long, Cần Thơ, Bến Tre, Vũng Tàu và Long An. Vì vậy để góp phần hạn chế sự lây lan và phát tán của bệnh VL - LXL thì việc biết được biểu hiện của cây nhiễm bệnh, để nhanh chóng xác định cây bị nhiễm để có biện pháp đối phó là rất quan trọng. Mục tiêu nhằm so sánh và đánh giá mức độ, thời điểm xuất hiện triệu chứng xoắn lá, xoắn chóp, rách lá lúa trên giống OM 6976 ở hình thức chủng bệnh cá thể trong điều kiện nhà lưới nên đề tài cần được thực hiện, góp phần xác định xu hướng thể hiện chủ đạo trên cây bị nhiễm bệnh VL - LXL để xác định ngay cây bệnh từ giai đoạn đầu nhằm hạn chế lây lan và phát tán của bệnh, đảm bảo sự sinh trưởng và phát triển của cây lúa.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Chuẩn bị nguồn vật liệu truyền bệnh

Thực hiện theo qui trình nghiên cứu của Nguyễn Phú Dũng *và cs.* (2016).

2.1.1. Chuẩn bị nguồn rầy sạch bệnh

Tiến hành thu thập mẫu rầy từ đồng ruộng (Hình 1), mẫu rầy sau khi thu thập cho đẻ trứng (trên nhóm cây không thuộc phổ ký chủ như cây rau mác), sau khi đẻ rầy mẹ chết, trứng rầy nở ra sau 6 - 9 ngày, đây là nguồn rầy không mang virus, được sử dụng cho các nghiên cứu về truyền bệnh (Ling, 1977).

2.1.2. Chuẩn bị cây lúa khỏe

Hạt giống lúa OM 6976 được ngâm trong nước 48 giờ, sau đó ủ thêm 24 giờ, hạt giống nẩy mầm được gieo trong các chậu đất, đặt trong các lồng lưới, nhằm cách ly cây lúa khỏi bị chích hút bởi nguồn rầy bên ngoài. Đây là nguồn vật liệu sử dụng cho công tác nghiên cứu cũng như sử dụng làm nguồn thức ăn cho rầy (Hình 2).

2.1.3. Chuẩn bị cây lúa bệnh

Thu thập cây lúa bệnh (Hình 3) từ các vùng đang có dịch bệnh, nhận dạng cây bệnh bằng triệu chứng bên ngoài và qua phương pháp ELISA để xác định chính xác triệu chứng bệnh, cây bệnh được tiếp tục trồng trong điều kiện nhà lưới để làm nguồn vật liệu truyền bệnh.

2.1.4. Tạo nguồn rầy mang virus

Cho rầy khoẻ chích hút trên cây lúa bệnh mang triệu chứng bệnh lùn xoắn lá để tạo nguồn rầy mang virus. Đây là nguồn rầy bệnh mang virus sẽ được sử dụng để truyền bệnh cho cây lúa khoẻ (Hình 4).

Hình 1. Thu mẫu rầy từ đồng ruộng

Hình 2. Nguồn thức ăn nuôi rầy

Hình 3. Thu mẫu cây bệnh LXL ở đồng ruộng

Hình 4. Tạo nguồn rầy mang virus

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. So sánh và đánh giá xu hướng thể hiện triệu chứng xoắn lá, xoắn chóp, rách lá trên giống lúa OM 6976 ở hình thức chủng cá thể

* **Bố trí:** Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên trong ống nghiệm gồm có 3 nghiệm thức (lần chủng 1, 2 và 3) với lặp lại 3 lần ở điều kiện nhà lưới.

* **Cách thực hiện chủng bệnh cá thể (Nguyễn Phú Dũng *và cs.*, 2016):**

- Sử dụng phương pháp chủng bệnh trong ống nghiệm với cây lúa 9 - 10 ngày tuổi của giống OM 6976 ở điều kiện nhà lưới.

- Cho rầy nâu tuổi 1 - 2 lấy virus trên cây bệnh trong 4 ngày và ủ bệnh/lúa sạch 6 ngày (để đảm bảo rầy nhiễm/mang virus).

- Cho 01 rầy nhiễm virus vào mỗi ống nghiệm với cây mạ 9 - 10 ngày tuổi bằng cách sử dụng ống hút rầy và đậy ống nghiệm lại bằng nắp nhựa.

- Cho rầy chích hút trên cây mạ trong ống nghiệm trong 24 giờ (lần chủng 1).

- Sử dụng 3 giá (racks) đựng ống nghiệm (40 ống/rack = 120 ống nghiệm 16x160 mm) cho thí nghiệm này.

- Ngày tiếp theo (sau khi đã chủng 24 giờ), lấy cây mạ ra khỏi ống nghiệm và thay cây mạ mới. Cứ tiếp tục như thế

trong 2 ngày tiếp theo (lần chủng 2 và 3). Cây mạ đã chủng được cấy bể chứa đất 20 cây/hàng và được giữ trong nhà kính (lưới) cho đến khi triệu chứng bệnh xuất hiện.

*** Chỉ tiêu theo dõi:**

- Tỷ lệ bệnh (%) = (Tổng số cây nhiễm bệnh/Tổng số cây quan sát) × 100

- Tính trung bình thời gian ủ bệnh RRSV trong cây lúa: Quan sát, theo dõi từng ngày và ghi nhận thời điểm (ngày) cây lúa/nghiệm thức (lần chủng bệnh 1, 2 và 3) bắt đầu biểu hiện triệu chứng bệnh sau khi chủng bệnh. Sau đó tính trung bình thời gian ủ bệnh/nghiệm thức.

- Tính trung bình tỷ lệ (%) số cây lúa thể hiện ở từng triệu chứng = (Tổng số cây nhiễm bệnh riêng từng triệu chứng/Tổng số cây nhiễm bệnh quan sát) × 100: Được ghi nhận ở mỗi nghiệm thức (lần chủng 1, 2 và 3) đối với từng triệu chứng bệnh điển hình như xoắn lá, xoắn chóp, rách mép lá theo mô tả triệu chứng của Hibino (1979) và Pepito Q. *et al.* (2009).

- Tính trung bình thời gian ủ bệnh ở từng triệu chứng RRSV trong cây lúa: Quan sát, theo dõi từng ngày và ghi nhận thời điểm (ngày) cây lúa bắt đầu biểu hiện riêng cho từng triệu chứng bệnh sau mỗi lần chủng bệnh.

2.2.2. Phân tích dữ liệu

Số liệu được thu thập, xử lý và phân tích phương sai ANOVA, DUNCAN ở các chỉ tiêu theo dõi trong toàn thí nghiệm bằng phần mềm Excel và SAS.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tỷ lệ bệnh

Từ kết quả Bảng 1 cho thấy tỷ lệ cây lúa bị nhiễm bệnh LXL ở các nghiệm thức có sự gia tăng và khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% và 1% qua các lần chủng, cụ thể như sau:

Bảng 1. Tỷ lệ (%) cây lúa bị nhiễm bệnh sau khi chủng

Nghiệm thức	Tỷ lệ (%) nhiễm bệnh của cây lúa sau khi chủng bệnh (NSC)			
	15 ngày	20 ngày	25 ngày	30 ngày
T1 (chủng lần 1)	8,2^{b}	24,6^{b}	32,9^{b}	42,5^{b}
T2 (chủng lần 2)	12,9^{ab}	31,3^{ab}	41,8^{a}	46,6^{b}
T3 (chủng lần 3)	18,4^{a}	37,5^{a}	45,8^{a}	58,8^{a}
Ý nghĩa	*	*	**	*
CV (%)	*18,5*	*12,17*	*13,7*	*10,4*

Ghi chú: Các số có cùng chữ số theo sau trong cùng một cột của bảng đều không khác biệt có ý nghĩa ở mức 5% (*) và (**): 1%.

- Ở thời điểm 15 - 20 NSC: Có sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% giữa các nghiệm thức. Tỷ lệ bệnh cao nhất ở nghiệm thức chủng lần 3 (18,4 - 37,5%). Kết quả ghi nhận triệu chứng bệnh xuất hiện kể từ sau 15 ngày chủng bệnh thấp hơn so đồng với ghi nhận của Hồ Văn Chiến *và cs.* (2012) cho rằng rầy nâu lấy nguồn siêu vi khuẩn với thời gian ủ bệnh 15 ngày và lây nhiễm bằng quần thể rầy nâu lên cây lúa cho tỷ lệ nhiễm bệnh lùn xoắn lên đến 90%. Đối với cây

mạ sau khi lây nhiễm 15 ngày thì tỷ lệ xuất hiện bệnh lùn xoắn lá trung bình là 2,32%. Theo Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2006) cho rằng rầy nâu chích hút cây lúa bệnh sau 5 đến 19 phút là mang mầm bệnh trong cơ thể và khoảng 10 ngày sau là có thể lan truyền virus gây bệnh sang cây lúa khỏe khác.

- Ở thời điểm 25 NSC: Có sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1% giữa các nghiệm thức. Tỷ lệ cao nhất ở nghiệm thức chủng lần 3 (45,8%) và thấp nhất ở nghiệm thức chủng lần 1 (32,9%).

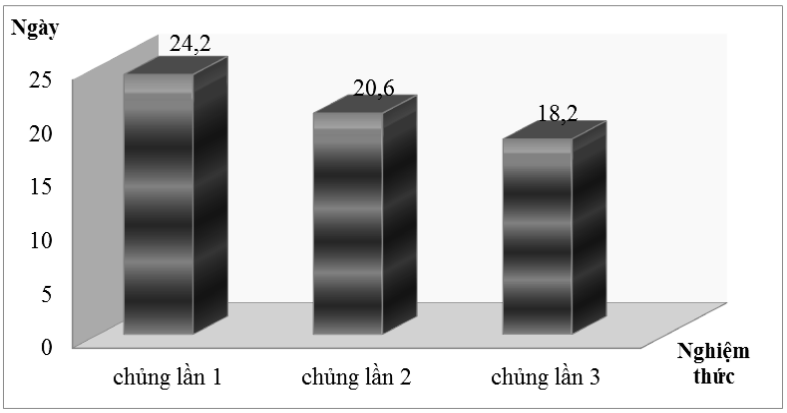
- Ở thời điểm 30 NSC: Tiếp tục có sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% giữa các nghiệm thức. Tỷ lệ cao nhất ở nghiệm thức chủng lần 3 (58,8%) và thấp nhất ở lần chủng 1 (42,5%).

Như vậy, tại những thời điểm ghi nhận điều cho kết quả lần chủng thứ 3 có tỷ lệ bệnh cao nhất (18,4 - 58,8%).

3.2. Thời gian ủ bệnh

Dựa trên Hình 5 cho thấy không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức về thời gian ủ bệnh. Thời gian ủ bệnh trong cây lúa dao động từ 15 - 30 ngày. Kết quả này cũng được ghi nhận ở nghiên cứu của Cao Thị Xuân Thẩm (2012) khi cho rằng thời gian ủ bệnh trong cây lúa đối với bệnh LXL từ 14 - 30 ngày. Trung bình thời gian ủ bệnh ở phương pháp chủng cá thể cao nhất là chủng lần 1 (24,2 ngày) và thấp nhất là lần chủng thứ 3 (18,2 ngày).

Kết quả cho thấy thời gian ủ bệnh trong cây lúa không phụ thuộc vào số lần rầy mang bệnh chích hút vào cây và thời gian ủ bệnh trong khoảng 18,2 - 24,2 ngày ở phương pháp chủng cá thể. Kết quả cũng được ghi nhận bởi Hồ Văn Chiến *và cs.* (2012) thì thời gian ủ bệnh lùn xoắn lá trong cây lúa là 23,08 ngày. Nguyễn Phú Dũng *và cs.* (2016) chứng minh rằng thời gian (ngày) thể hiện triệu chứng ở các thời gian rầy nâu được cho chích hút cây lúa bệnh biến động với từ 15 - 30 ngày và trung bình từ 18 - 25,9 ngày. Kết quả này tương tự như ghi nhận ở nghiên cứu của Phạm Văn Dư *và cs.* (2010) cho rằng, triệu chứng bệnh xuất hiện sau khi bị rầy nâu bay đến và chích hút là 15 - 20 ngày. Kết quả khá tương đồng với ghi nhận ở nghiên cứu của Vương Thị Thắm (2010) với trung bình biến động từ 17,5 - 18,9 ngày và Cabunagan *et al.* (2010) cho rằng, trung bình thời gian ủ RGSV ở giống lúa TN1 là 18,7 ngày.



Hình 5. Trung bình thời gian ủ bệnh trong cây lúa

3.3. Triệu chứng biểu hiện bệnh

Từ kết quả Bảng 2 cho thấy có sự chênh lệch về trung bình tỷ lệ (%) về thể hiện triệu chứng bệnh với những dạng đặc trưng như xoắn lá (XL), rách lá (RL), xoắn chóp (XC) ở cả ba lần chủng bệnh. Qua 3 lần chủng bệnh thì triệu chứng xoắn chóp với tỷ lệ (%) thể hiện triệu chứng cao nhất (45,5 - 48,3%) so với rách lá (29,9 - 35%) và thấp nhất ở triệu chứng xoắn lá (19,5 - 21,7%) ở biện pháp chủng bệnh cá thể. Kết quả có ý nghĩa thực tiễn khi điều tra, chẩn đoán và phát hiện triệu chứng điển hình sớm của bệnh lùn xoắn lá, góp phần cơ sở cho nhận diện và quản lý dịch hại được nhanh trong nghiên cứu và trên đồng ruộng.

Bảng 2. Trung bình tỷ lệ (%) số cây lúa thể hiện ở từng triệu chứng

Triệu chứng	Chủng lần 1	Chủng lần 2	Chủng lần 3
Xoắn chóp	45,5	48,4	48,3
Rách lá	35,0	29,9	31,1
Xoắn lá	19,5	21,7	20,6

3.4. Thời gian ủ bệnh ở từng triệu chứng

Kết quả cho thấy thời gian ủ bệnh của từng triệu chứng xoắn lá (XL), rách lá (RL), xoắn chóp (XC) ở cả ba lần chủng bệnh dù có sự chênh lệch thời gian ủ bệnh, thì vẫn không phụ thuộc vào số lần rầy mang bệnh chích hút vào cây, nhưng tập trung biến động từ 19,4 - 25,2 ngày (Bảng 3). Theo ghi nhận bởi Hồ Văn Chiến *và cs.* (2012) thì thời gian ủ bệnh lùn xoắn lá trong cây lúa là 23,08 ngày. Như vậy, đối với thời gian ủ bệnh của từng triệu chứng điển hình của bệnh RRSV thì không có biến động lớn so với thời gian ủ bệnh lùn xoắn lá trong cây lúa.

Bảng 3. Trung bình thời gian (ngày) ủ bệnh ở từng triệu chứng sau khi chủng

Triệu chứng	Chủng lần 1	Chủng lần 2	Chủng lần 3
Xoắn chóp	22,3	22,7	19,4
Rách lá	23,2	23,5	22,6
Xoắn lá	25,2	22,0	23,1

IV. KẾT LUẬN VÀ KHUYẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Tỷ lệ (%) bệnh lùn xoắn lá khi chủng lần 3 luôn cao hơn so với chủng bệnh lần 1 và chủng bệnh lần 2.

Thời gian ủ bệnh trong cây lúa từ 18,2 - 24,2 ngày và không phụ thuộc vào số lần rầy mang virus chích hút truyền bệnh.

Tỷ lệ (%) triệu chứng thể hiện xoắn chóp cao hơn so với rách lá và xoắn lá ở cả 3 lần chủng bệnh, nhưng thời gian ủ bệnh của từng triệu chứng điển hình của bệnh tập trung biến động từ 19,4 - 25,2 ngày.

4.2. Khuyến nghị

Tiếp tục khảo sát xu hướng phối hợp thể hiện các dạng triệu chứng khác đối với bệnh lùn xoắn lá.

Tìm hướng nghiên cứu mới để biết được khả năng truyền bệnh của rầy nâu qua bao nhiêu cây lúa trong một ngày?

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trung tâm Khuyến nông Quốc gia (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn) (2006). Sổ tay hướng dẫn phòng trừ rầy nâu truyền bệnh vàng lùn, lùn xoắn lá hại lúa. Hà Nội.

2. Cabunagan R.C., Cabauatan P.Q., Cuong L.C., Chien H.V., & Choi I.R. (2010). On-Site Research and Hands-On Training on Brown Planthopper-Transmitted Viruses. Truy cập từ http://ricehoppers.net/wpcontent/uploads/2009/10/report-of-on-siteresearch-and-hands-on-training-on-brownplanthopper-transmitted-viruses.pdf. 22/11/2015.
3. Cao Thị Xuân Thẩm (2012). So sánh thời gian ủ virus vàng lùn và lùn xoắn lá trên lúa ở điều kiện nhà lưới khu B Đại học An Giang. Đề tài nghiên cứu khoa học cấp khoa. Khoa Nông nghiệp và Tài nguyên thiên nhiên, Đại học An Giang.
4. Cục Bảo vệ thực vật (2014). Ngăn chặn kịp thời rầy nâu, bệnh vàng lùn, lùn xoắn lá hại lúa. Truy cập từ http://phanbonvinaphap.com/index.php/tin-nha-nong/shop/81-ngan-ch-n-k-p-th-i-r-y-nau-b-nh-vang-lun-lun-xo-n-la-h-i-lua.
5. Hibino. H. (1979). Rice ragged stunt, a new virus disease occurring in tropical Asia. Rev. Plant Prot. Res. 12:98.
6. Hồ Văn Chiến., L.Q. Cường., L. T. Dung., R.Cabunagan, K. L. Heong., M.Matsumura., N.H. Huân., & I.R.Choi (2012). Nhìn lại nguyên nhân bộc phát rầy nâu, bệnh vàng lùn, lùn xoắn lá hại lúa ở vùng đồng bằng sông Cửu Long và định hướng quản lí rầy nâu, bệnh vàng lùn - lùn xoắn lá bền vững. Kỷ yếu Hội nghị Quốc gia Phòng chống rầy nâu, bệnh vàng lùn, lùn xoắn lá hại lúa. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
7. Ling, K.C., 1977. Transmission of rice grassy stunt by the planthopper. In: The rice brown planthopper. Taipei (Taiwan): Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region:73 - 83.
8. Lương Minh Châu., Lương Thị Phương và Bùi Chí Bửu (2006). Đánh giá tính kháng của các tổ hợp lúa năng suất cao, phẩm chất tốt đối với quần thể rầy nâu tại đồng bằng sông Cửu Long 2003 - 2005. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2, 16 - 20.
9. Nguyễn Phú Dũng, 2011. Hiện trạng quản lý bệnh lùn lúa cỏ (Rice Grassy Stunt Virus, RGSV) và tương quan sinh học giữa virus và vector truyền bệnh ở An Giang. Đề tài nghiên cứu khoa học cấp trường. Khoa Nông nghiệp và Tài nguyên thiên nhiên, Đại học An Giang.
10. Nguyễn Phú Dũng, Phạm Văn Dư & Nguyễn Văn Huỳnh (2016). Nghiên cứu đặc tính truyền virus lùn lúa cỏ (Rice Grassy Stunt Virus, RGSV) của rầy nâu (*Nilaparvata lugens* Stal). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (2016) (3),136 - 144.
11. Pepito Q. Cabauatan, Rogelio C. Cabunagan, and Il-Ryong Choi (2009). New threats to the sustainability of intensive rice production systems in Asia. Los Baños (Philippines): International Rice Research Institute. In Heong KL, Hardy B, editors. 2009. Planthoppers: 357 - 368.
12. Phạm Văn Kim (2016). Các bệnh hại lúa quan trọng ở đồng bằng sông Cửu Long. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
13. Phạm Văn Dư, Phạm Văn Quỳnh, Lê Hữu Hải, Nguyễn Văn Phương, Nguyễn Văn Dương, Trần Quang Củi, Nguyễn Văn Khang, Hồ Văn Chiến, & Nguyễn Hữu Huân (2010). Hiệu quả giải pháp "Gieo sạ đồng loạt và né rầy trên diện rộng" để phòng trừ bệnh lùn lúa cỏ và lùn xoắn lá ở ĐBSCL. Hội thảo Quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam lần 9. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
14. Vương Thị Thắm (2010). Tương quan sinh học giữa virus lùn lúa cỏ (Rice Grassy Stunt Virus, RGSV) và rầy nâu trên cây lúa ở điều kiện nhà lưới. Truy cập từ cơ sở dữ liệu Trường Đại học An Giang, An Giang, Việt Nam.

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG TẠO CHẤT KÍCH THÍCH TĂNG TRƯỞNG INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA) CỦA VI KHUẨN *Serratia nematodiphila* CT-78

Nguyễn Vân Anh[1], Nguyễn Quang Tiến[2], Nguyễn Đắc Khoa[2]*

[1]Trung tâm Dịch vụ Nông nghiệp tỉnh Long An
[2] Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ
**Tác giả liên hệ: ndkhoa@ctu.edu.vn*

ABSTRACT

Indole-3-acetic acid (IAA) production ability of *Serratia nematodiphila* CT-78

Serratia nematodiphila CT-78 was shown to be antagonistic against Xanthomonas oryzae pv. oryzae thus capable of reducing rice bacterial leaf blight under field conditions. The aim of this study is to investigate the indole-3-acetic acid (IAA) production ability of this bacterium which might contribute to its growth promotion effects in addition to the observed effects against the disease. The IAA production was detected at 2, 4, 6 and 8 days after bacterial inoculation (DAI) in the Nutrient Broth (NB) medium suplemented with 0.1 g/L tryptophan. Three bacterial suspensions were tested, i.e., 10^5, 10^6 and 10^7 CFU/mL, where the highest IAA amount (16,17 µg/mL) was detected in the 10^5 CFU/mL suspension at 8 DAI.

Keywords: *IAA, indole-3-acetic acid, plant growth promotion, Serratia nematodiphila, tryptophan.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78, được phân lập từ đất trồng lúa tại thành phố Cần Thơ, đã được chứng minh có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) gây bệnh bạc lá lúa (cháy bìa lá lúa). Khi xử lý vi khuẩn *S. nematodiphila* CT-78 để phòng trị bệnh ngoài đồng, kết quả cho thấy tỷ lệ lúa bệnh giảm đến 83%, tỷ lệ lá bị bệnh giảm đến 88%, năng suất và chất lượng hạt tăng so với đối chứng (Nguyễn Đặng Ngọc Giàu, 2014; Phạm Trút My, 2015; Khoa *et al.*, 2016).

Các loài vi khuẩn thuộc chi *Serratia* là những vi sinh vật vùng rễ có thể tạo ra những tác động có lợi đối với sự phát triển của cây trồng (Tilak *et al.*, 2005). Vi khuẩn *S. nematodiphila* có khả năng kích

Người phản biện: TS. Nguyễn Đức Độ.

thích sự phát triển của cây trồng thông qua một số chất điều hòa sinh trưởng thực vật như indole-3-acetic acid (IAA), gibberellin (Basharat *et al.*, 2018; Kang *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2011). Trong đó, IAA, sản phẩm của quá trình chuyển hóa L-tryptophan, là một trong những chất điều hòa sinh trưởng thực vật quan trọng nhất của cây trồng (Yu *et al.*, 2017). IAA được hầu hết vi sinh vật vùng rễ sinh ra một cách tự nhiên nhờ vào dinh dưỡng được cung cấp từ rễ cây (Myresiotis *et al.*, 2015).

Nghiên cứu khảo sát khả năng tạo IAA của vi khuẩn *S. nematodiphila* CT-78 được thực hiện tiếp nối nghiên cứu của Khoa *et al.* (2016) nhằm xác định khả năng tạo IAA để kích thích sinh trưởng cây trồng bên cạnh khả năng phòng trị bệnh bạc lá lúa.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78 được Nhóm Nghiên cứu Bệnh cây, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ phân lập từ vùng đất trồng lúa tại thành phố Cần Thơ.

2.2. Khảo sát khả năng tổng hợp IAA của vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của (Glickmann and Dessaux, 1995) gồm 3 nghiệm thức là vi khuẩn *S. nematodiphila* CT-78 ở các mật số 10^5, 10^6 và 10^7 CFU/mL, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường NB có bổ sung 0,1 g/L tryptophan. Tại các thời điểm 2, 4, 6 và 8 ngày sau khi chủng, huyền phù vi khuẩn được ly tâm, thu dịch nổi trước khi trộn với thuốc thử Salkowski R2 (4,5 g $FeCl_3$ trong 1 lít acid H_2SO_4 10,8 M). Sau đó, hàm lượng IAA được xác định bằng cách đo độ hấp thụ quang của dung dịch ở bước sóng 530 nm. Đường chuẩn được xây dựng bằng cách pha loãng IAA tinh khiết trong đệm phosphate pH 7 (38,5 mL dung dịch KH_2PO_4 1M và 61,5 mL dung dịch K_2HPO_4 1 M), thêm nước cất vừa đủ 200 mL) để đạt dãy nồng độ là 2,5; 5; 10; 15; 20; 30 và 40 µg/mL. Sau đó, thuốc thử Salkowski R2 được cho vào các ống dung dịch IAA với tỷ lệ 1:1, để yên trong điều kiện tối 25 phút và đo quang phổ ở bước sóng 530 nm.

2.3. Xử lý số liệu

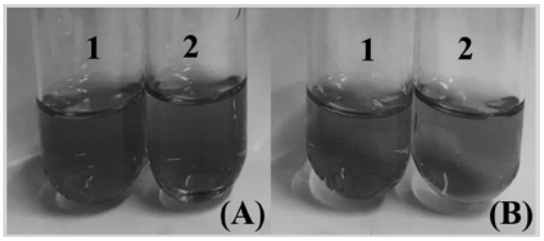
Số liệu được xử lý sơ bộ bằng chương trình Microsoft Excel 2013, sau đó được phân tích phương sai một chiều (One-way ANOVA) bằng phần mềm R 3.5.3, kiểm định Ducan với mức ý nghĩa 5%.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định tỷ lệ thuốc thử Salkowski R2 và dịch nuôi cấy vi khuẩn trong thí nghiệm khảo sát khả năng tạo IAA

IAA do vi khuẩn tạo ra trong dịch nuôi cấy khi kết hợp với thuốc thử tạo ra hợp chất có màu hồng hoặc đỏ ($Fe[(C_8H_6N)CH_2COO]_3$) và hàm lượng IAA được ghi nhận bằng cách đo độ hấp thu quang phổ của hợp chất này ở bước sóng 530 nm (Tang and Bonner, 1947; Kamnev *et al.*, 2001). Theo Trần Văn

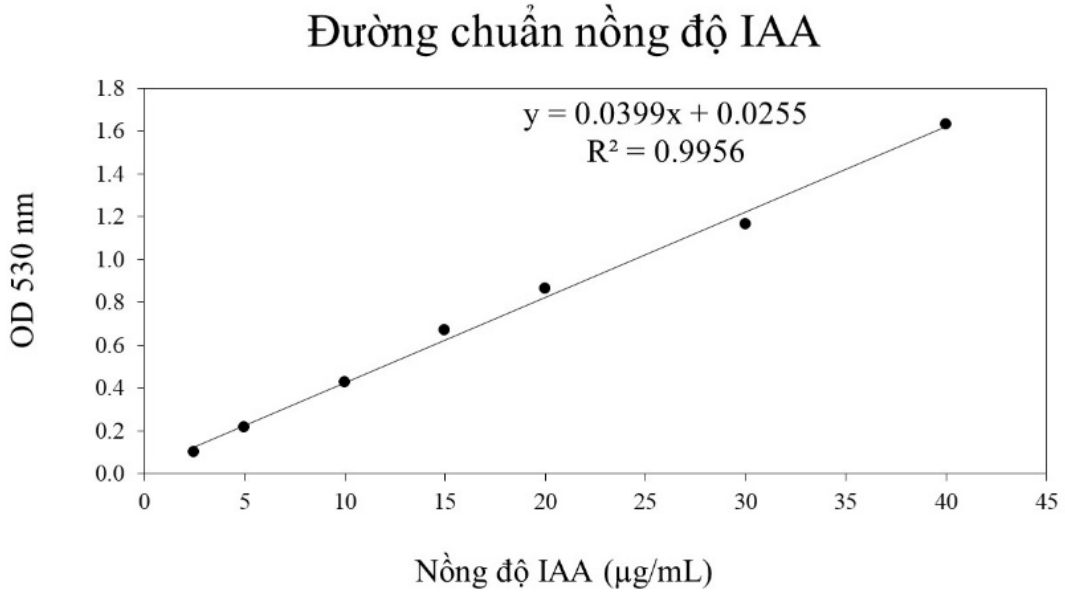
Chiêu và Nguyễn Hữu Hiệp (2010), hàm lượng IAA trong mẫu được ghi nhận khi phối trộn dịch nuôi cấy và thuốc thử với tỷ lệ 1:2; tuy nhiên, theo Glickmann and Dessaux (1995), với tỷ lệ này chỉ có thể phát hiện IAA ở nồng độ cao hơn từ 5 - 200 µg/mL. Đối với các mẫu có hàm lượng IAA thấp (0,5 - 20 µg/mL), phản ứng tạo hợp chất màu không thể hiện rõ (Hình 1A) do sự hiện diện của tryptophan trong môi trường làm giảm độ nhạy của thử nghiệm. Trong trường hợp này, tỷ lệ phối trộn của dịch nuôi cấy và thuốc thử được điều chỉnh thành 1:1 để sự thay đổi màu được thể hiện rõ hơn (Hình 1B). Như vậy, thí nghiệm khảo sát khả năng tạo IAA của vi khuẩn *S. nematodiphila* CT-78 đã được thực hiện với tỷ lệ của dịch vi khuẩn thuốc thử Salkowski R2 và là 1:1.



Hình 1. Sự thay đổi màu của dung dịch khi bổ sung thuốc thử Salkowski R2 vào môi trường NB có bổ sung 0,1 g/L tryptophan (1) và dịch nuôi cấy vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78 có bổ sung 0,1 g/L tryptophan (2) (A): Tỷ lệ thuốc thử R2 và dịch nuôi cấy là 2:1 (B): Tỷ lệ thuốc thử R2 và dịch nuôi cấy là 1:1

3.2. Kết quả xây dựng đường chuẩn IAA

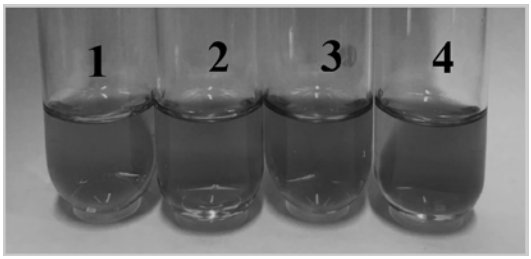
Đồ thị đường chuẩn nồng độ IAA với tỷ lệ thuốc thử Salkowki R2 và dịch IAA tinh khiết là 1:1 được thể hiện ở Hình 2. Phương trình đường chuẩn có hệ số R^2 là 0,9956 nên được sử dụng để xác định hàm lượng IAA do vi khuẩn *S. nematodiphila* CT-78 tạo ra.



Hình 2. Đường chuẩn nồng độ IAA

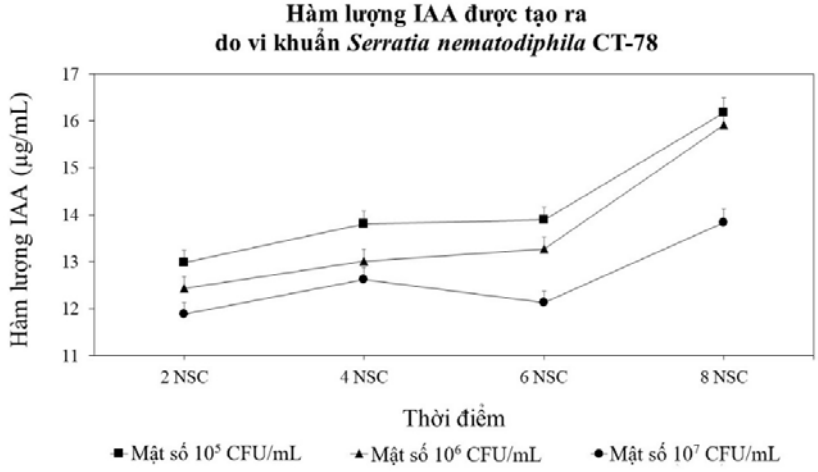
3.3. Kết quả khảo sát khả năng tạo IAA của vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78

Vi khuẩn *S. nematodiphila* CT-78 được xác định có khả năng tạo IAA ở các mật số khác nhau là 10^5, 10^6 và 10^7 CFU/mL đến 8 ngày sau chủng thông qua việc tạo phức màu hồng khi cho thuốc thử Salkowski R2 vào dịch nuôi cấy (Hình 3).



Hình 3. Sự thay đổi màu khi bổ sung thuốc thử Salkowski R2 vào môi trường NB có bổ sung 0,1 g/L tryptophan (1) và dịch nuôi cấy vi khuẩn Serratia nematodiphila CT-78 mật số 10^5 CFU/mL (2), 10^6 CFU/mL (3) và 10^7 CFU/mL (4)

Các nghiệm thức cho kết quả phản ứng tạo màu trong thí nghiệm trên được tiến hành đo quang phổ ở bước sóng 530 nm tại các thời điểm 2, 4, 6, 8 ngày sau khi chủng vi khuẩn vào môi trường NB có bổ sung 0,1 g/L tryptophan. Hàm lượng IAA do vi khuẩn ở các mật số 10^5, 10^6 và 10^7 CFU/mL tạo ra khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên hàm lượng IAA tạo ra ở các thời điểm khác nhau có sự biến đổi được thể hiện qua Hình 4. Hàm lượng IAA do vi khuẩn ở các mật số 10^5, 10^6 CFU/mL tạo ra tăng dần theo thời gian, thấp nhất vào ngày thứ 2 và cao nhất vào ngày thứ 8 sau khi chủng khuẩn. Đối với mật số 10^7 CFU/, hàm lượng IAA giảm nhẹ ở ngày thứ 6 sau chủng nhẹ sau đó tăng lên ở ngày thứ 8.



Hình 4. Hàm lượng IAA do vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78 ở các mật số 10^5, 10^6 và 10^7 CFU/mL tạo ra ở các thời điểm 2, 4, 6 và 8 ngày sau chủng (NSC)
NSC: Ngày sau chủng

Ở ngày thứ 8 sau khi chủng khuẩn hàm lượng IAA do vi khuẩn *S. nematodiphila* CT-78 với các mật số 10^5, 10^6 và 10^7 CFU/mL tạo ra đạt mức cao

nhất với giá trị 13,84 - 16,17 µg/mL. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của (Lwin *et al.*, 2012), tất cả 5 chủng *Serratia* spp. phân lập được sản xuất IAA tăng dần qua các ngày 2, 4, 6, 8 và đạt mức cao nhất ở ngày thứ 8 sau khi chủng khuẩn trên môi trường NB có bổ sung 0,5 g/L tryptophan với hàm lượng 9,71 - 20,05 µg/mL, đến ngày thứ 10 sau khi chủng khuẩn thì hàm lượng IAA giảm xuống do sự tạo thành các dẫn xuất khác của IAA.

Kết quả khảo sát khả năng tạo IAA của *S. nematodiphila* CT-78 cao hơn nghiên cứu của Basharat *et al.* (2018) trên chủng *S. nematodiphila* MB307 có khả năng sản xuất IAA với hàm lượng 8,089 µg/mL trong môi trường có bổ sung 0,5 g/L tryptophan. Tuy nhiên, một kết quả nghiên cứu khác của Dastager *et al.* (2011) trên *S. nematodiphila* NII-0928 có khả năng sản xuất IAA với hàm lượng 20,2 - 58,9 µg/mL trong môi trường nuôi cấy có bổ sung 1 g/L tryptophan. Theo nghiên cứu của (Karnwal and Dohroo, 2018), nồng độ tryptophan bổ sung vào môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng sản xuất IAA. Với nồng độ tryptophan từ 0,2 - 0,5 g/L thì vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* RE17 sản xuất được IAA với hàm lượng 1,2 - 10,2 µg/mL. Do đó khả năng sản xuất IAA của vi khuẩn *S. nematodiphila* CT-78 có thể thay đổi và có thể tăng lên nếu môi trường có bổ sung tryptophan với hàm lượng cao hơn.

IV. KẾT LUẬN

Vi khuẩn *S. nematodiphila* CT-78 có khả năng tạo IAA trong môi trường có bổ sung 0,1 g/L tryptophan. Vi khuẩn *S. nematodiphila* CT-78 ở mật số 10^5 CFU/mL được chọn sử dụng để thu nhận IAA cho các thí nghiệm tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Basharat, Z., Tanveer, F., Yasmin, A., Shinwari, Z.K., He, T. and Tong, Y. (2018). Genome of *Serratia nematodiphila* MB307 offers unique insights into its diverse traits. Genome. 61(7): 469 - 476.
2. Dastager, S.G., Deepa, C.K. and Pandey, A. (2011). Potential plant growth-promoting activity of *Serratia nematodiphila* NII-0928 on black pepper (Piper nigrum L.). World Journal of Microbiology and Biotechnology. 27(2): 259 - 265.
3. Glickmann, E. and Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 61(2): 793 - 796.
4. Kamnev, A. A., Shchelochkov, A.G., Perfiliev, Y.D., Tarantilis, P. A. and Polissiou, M.G. (2001). Spectroscopic investigation of indole-3-acetic acid interaction with iron (III). Journal of Molecular Structure. 563 - 564: 565 - 572.
5. Kang, S.M., Khan, A. L., Waqas, M., You, Y.H., Hamayun, M., Joo, G.J., Shahzad, R., Choi, K.S. and Lee, I.J. (2015). Gibberellin-producing *Serratia nematodiphila* PEJ1011 ameliorates low temperature stress in *Capsicum annuum* L. European Journal of Soil Biology. 68: 85 - 93.
6. Karnwal, A. and Dohroo, A. (2018). Effect of maize root exudates on indole-3-acetic acid production by rice endophytic bacteria under influence of L-tryptophan. F1000Research. 7:112.
7. Khoa, N.Đ., Giàu, N.Đ. N. and Tuấn, T.Q. (2016). Effects of *Serratia nematodiphila* CT-78 on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Biological Control. 103: 1 - 10.

8. Luo, S., Wan, Y., Xiao, X., Guo, H., Chen, L., Xi, Q., Zeng, G., Liu, C. and chen, J. (2011). Isolation and characterization of endophytic bacterium LRE07 from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and its potential for remediation. Applied Microbiology and Biotechnology. 89(5): 1637 - 1644.

9. Lwin, K.M., Myint, M.M., Tar, T. and Aung, W.Z.M. (2012). Isolation of plant hormone (Indole-3-acetic acid-IAA) producing rhizobacteria and study on their effects on maize seedling. Engineering Journal. 16(5): 137 - 144.

10. Myresiotis, C.K., Vryzas, Z. and Papadopoulou-Mourkidou, E. (2015). Effect of specific plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on growth and uptake of neonicotinoid insecticide thiamethoxam in corn (*Zea mays* L.) seedlings. Pest Management Science. 71(9): 1258 - 1266.

11. Nguyễn Đặng Ngọc Giàu (2014). Phân lập, định danh và khảo sát khả năng phòng trừ bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn trong đất thành phố Cần Thơ và tỉnh Hậu Giang. Luận văn tốt nghiệp Cao học ngành Công nghệ sinh học. Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

12. Phạm Trút My (2015). Khảo sát hiệu quả phòng trừ bệnh cháy bìa lá của vi khuẩn *Serratia nematodiphila* trên ruộng lúa. Luận văn tốt nghiệp Cao học ngành Công nghệ sinh học. Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

13. Tang, Y. W. and Bonner, J. (1947). The enzymatic inactivation of indoleacetic acid. I. Some charasteristics of the enzyme contained in pea seedlings. Arch Biochem. 13:11 - 25.

14. Tilak, K.V.B.R., Ranganayaki, N., Pal, K.K., De, R., Saxena, A.K., Nautiyal, C.S., Mittal, S., Tripathi, A.K. and Johri, B. N. (2005). Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. Current Science. 89(1): 136 - 150.

15. Trần Văn Chiêu và Nguyễn Hữu Hiệp (2010). Ảnh hưởng của Indole acetid acid (IAA) do vi khuẩn *Azospirillum* tổng hợp lên sự phát triển của rễ lúa trồng ở điều kiện nhà lưới. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số 15b: 132 - 140.

16. Yu, X., Li, Y., Cui, Y., Liu, R., Li, Y., Chen, Q., Gu, Y., Zhao, K., Xiang, Xu, K. and Zhang, X. (2017). An indoleacetic acid-producing *Ochrobactrum* sp. MGJ11 counteracts cadmium effect on soybean by promoting plant growth. Journal of Applied Microbiology. 122(4): 987 - 996.

XÁC ĐỊNH HIỆU QUẢ QUẢN LÝ BỆNH CHÁY LÁ KHOAI MÔN CỦA CHẾ PHẨM XẠ KHUẨN ĐỐI KHÁNG TRIỂN VỌNG Ở ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM VÀ NHÀ LƯỚI

Nguyễn Phú Dũng[1], Nguyễn Tấn Thạnh[2] và Phạm Văn Dư[3]

[1] Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh
[2] Công ty Việt Á
[3] Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam

ABSTRACT

The objectives of study were to determine the cultural factors effect on the Actinimycetes isolates therefore establish a procedure to create biological product for management of leaf blight disease on taro caused by Phytophthora sp. *fungus. In laboratory conditions, the results indicated that Streptomyces* sp. *(CMAG11) were againsted the best to Phytophthora* sp. *after 7 days of storage in MS 4% medium, it had a antagonistic bacteria density of 1.104 × 10^6cfu/ml, inhibition zone of 15.25mm and an antagonistic efficacy of 50.83% at 6 days after inoculation (dai). In the greenhouse conditions, the results showed that the ability to control leaf blight on taro disease of M8-Plus 72WP pesticide was the best and higher than that of MS 4% and Bran 4% formulation, but the lowest efficiency in Corn 4% medium during 4-13 dai through disease incidence, disease index, disease reduction effectiveness and area under disease progress curve.*

Keywords: *Leaf blight disease on taro, Streptomyces* sp. *(CMAG11), MS 4% medium, Bran 4% medium and Corn 4% medium.*

I. GIỚI THIỆU

Ở nước ta, khoai môn (*Colocasia esculenta*), thuộc họ Ráy (Araceae) là cây lấy củ quan trọng thứ tư sau khoai tây, khoai lang và khoai mì, đóng vai trò quan trọng đối với an ninh lương thực của hộ nông dân sản xuất nhỏ, diện tích trồng khoai môn hàng năm khoảng 15,000 ha (Nguyễn Thị Ngọc Huệ *và ctv.*, 2010). Tuy nhiên, bệnh cháy lá khoai môn do nấm *Phytophthora* sp. gây ra thiệt hại đáng kể, nếu bị bệnh cháy lá nặng có thể giảm đến 50% năng suất. Để đối phó với bệnh, người nông dân thường sử dụng các biện pháp phòng trị là thuốc hóa học nhưng không có hiệu quả cao mà còn ảnh

Người phản biện: PGS.TS. Lê Minh Tường.

hưởng đến môi trường và sức khỏe con người (Tuzun and Kloepper, 1995). Nhằm phát triển nền nông nghiệp theo hướng bền vững và khắc phục những nhược điểm của thuốc hóa học, nhiều biện pháp quản lý dịch hại bằng những biện pháp sinh học được sử dụng như: dịch trích thực vật để kích thích tính kháng bệnh, giống kháng, vi sinh vật đối kháng. Trong nhóm vi sinh vật có lợi thì xạ khuẩn là một nhóm có triển vọng với những đặc điểm nổi bật như có khả năng tiết ra nhiều chất kháng sinh (streptomycin, validamycin, kasugamycin, gentamycin...) và các enzyme ngoại bào (chitinase, glucanase, protease, lipase...) để chống lại các tác nhân gây hại cây trồng (Doumbou *et al.*, 2001). Hiện nay, 80% chất kháng sinh hiện có đều được sản xuất từ *Streptomyces*, một chi quan trọng của xạ khuẩn (Watve *et al.*, 2001). Gần đây có thể kể đến các kết quả nghiên cứu về sử dụng xạ khuẩn để kiểm soát bệnh hại cây trồng do nấm gây ra như bệnh thối thân trên mè do nấm *Phytophthora nicotianae* gây ra (Phạm Công Hưởng, 2013), bệnh cháy lá thối thân trên sen do nấm *Phytophthora* sp. gây ra (Lê Văn Tiến, 2015). Điều này chứng tỏ xạ khuẩn có tiềm năng rất lớn và cần có những nghiên cứu sâu hơn về nhóm vi sinh vật này để phòng trừ bệnh cháy lá trên khoai môn do nấm *Phytophthora* sp. gây ra. Trên cơ sở đó, đề tài "*Xác định hiệu quả quản lý bệnh cháy lá khoai môn của chế phẩm xạ khuẩn đối kháng triển vọng ở điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới*" cần được thực hiện.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chuẩn bị nguồn vật liệu

Nguồn nấm *Phytopthora* sp. được phân lập từ các mẫu bệnh tại huyện Chợ Mới (An Giang) và định danh dựa trên đặc điểm hình thái theo miêu tả của Nguyễn Phi Hùng (2010).

Nguồn xạ khuẩn *Streptomyces* sp. *(CMAG11)* đã được phân lập theo phương pháp Hsu and Lockwood (1975) từ các mẫu đất ở huyện Chợ Mới (An Giang), định danh đặc điểm hình thái theo phương pháp của Shirling and Gottlie (1966) và đánh giá tính đối kháng với nấm *Phytopthora* sp. (Nguyễn Phú Dũng, 2019).

Các môi trường trong nuôi cấy và phân lập: môi trường ISP - 4 (Kuster, 1959), PDA (Shurfleff and Averre, 1997) và môi trường thạch agar.

Các loại chất mang (chế phẩm) nhân nuôi được tuyển chọn gồm Cám mịn 4%; Cùi Bắp 4% và MS (Manitol Soya Flour medium) - Đậu nành 4%. Quy trình tạo chất mang nhân nuôi được thực hiện dựa theo Vidhyasekaran and Muthamilan (1995).

2.2. Thí nghiệm 1: Khảo sát mật số và khả năng đối kháng trên đĩa thạch của xạ khuẩn *Streptomyces* sp. *(CMAG11)* trong môi trường nuôi cấy (chế phẩm) sau thời gian tồn trữ 1 tuần

❖ Mục tiêu nghiên cứu: Xác định mật số và khả năng đối kháng trên đĩa thạch của xạ khuẩn *Streptomyces* sp. sau thời gian tồn trữ ở điều kiện phòng thí nghiệm.

❖ Bố trí: Chế phẩm ở từng loại chất mang được tồn trữ 1 tuần, sau đó tiến hành bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên và 4 lần lặp lại ở điều kiện phòng thí nghiệm, gồm các bước sau:

➢ Bước 1: Khảo sát mật số xạ khuẩn/chế phẩm

- Pha loãng chế phẩm: Cân 1 g mẫu cho vào ống nghiệm chứa 9 ml nước cất đã khử trùng và vortex để đồng nhất mẫu (mẫu ở độ pha loãng 10^{-1}). Mẫu được tiếp tục pha loãng thành các độ pha loãng 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}.

- Trải đĩa: Hút 50 µl huyền phù xạ khuẩn đã được pha loãng về nồng độ thích hợp vào đĩa môi trường nutrient agar (WA) và trải đều lên bề mặt môi trường bằng que tam giác, sau đó ủ đĩa ở 30^oC; sau 48 giờ, đếm số khuẩn lạc được hình thành.

➢ Bước 2: Chuẩn bị nấm *Phytophthora* sp.

- Cấy nấm từ nguồn lên môi trường PDA.

- Sau 3 ngày cấy chuyền nấm sang môi trường PCA.

- Khi nấm được cấy ra môi trường PCA sau 7 ngày tiến hành cắt rãnh cho 2 ml nước cất thanh trùng vào mỗi rãnh.

- Để đĩa nấm vào tủ với hệ thống chiếu đèn 12 giờ tối - 12 giờ sáng với nhiệt độ khoảng 25^oC (nhiệt độ trong phòng cấy).

- Sau 7 ngày, quan sát trên kính hiển vi đến khi thấy xuất hiện động bào tử.

➢ Bước 3: Chuẩn bị huyền phù xạ khuẩn *Streptomyces* sp. *(CMAG11)*

- Chủng xạ khuẩn được nuôi nhân mật số trong đĩa petri chứa môi trường MS trong 5 - **7** ngày, tiến hành bơm 3 ml nước cất đã được thanh trùng vào đĩa, dùng lam vô trùng để cạo và thu huyền phù, lược huyền phù thu được bằng vải lược thanh trùng, thu được dung dịch gốc.

- Pha loãng và chà dung dịch gốc vào đĩa petri chứa 10 ml môi trường MS. Dựa vào số khuẩn lạc hình thành trên đĩa ở mỗi nồng độ pha loãng sau 48 giờ, suy ra mật số bào tử sống ở huyền phù ban đầu. Thực hiện phương pháp pha loãng để thu huyền phù xạ khuẩn ở mật số 10^8 cfu/ml.

➢ Bước 4: Khảo sát khả năng đối kháng

- Dùng dụng cụ đục lỗ đường kính 5 mm đục lấy khoanh nấm từ đĩa nguồn chuyển vào đĩa petri chứa 10 ml môi trường PDA.

- Đặt khoanh giấy thấm (ø = 5 mm) vào huyền phù xạ khuẩn đã chuẩn bị và dùng nhíp kẹp khoanh giấy thấm đưa lên thành để ráo. Đặt khoanh giấy thấm đối chứng (nước cất) đối diện với khoanh nấm *Phytophthora* sp. và cách thành đĩa 1 cm.

- Đĩa petri được đặt trong điều kiện nhiệt độ phòng.

- Theo dõi và đánh giá khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm bằng cách đo bán kính vòng vô khuẩn trong thời gian 2, 4 và 6 ngày sau thí nghiệm.

❖ Ghi nhận chỉ tiêu:

- Mật số của xạ khuẩn *Streptomyce*s sp./chất mang nhân nuôi (chế phẩm): Mỗi loại chế phẩm khác nhau ở mỗi đĩa được lặp lại 4 lần. Số liệu mật số xạ khuẩn là giá trị trung bình của 4 lần lặp lại.

- Đánh giá khả năng đối kháng của chủng xạ khuẩn với nấm bệnh: Bằng cách đo bán kính vòng vô khuẩn (BKVVK) trong thời gian 2, 4 và 6 ngày sau bố trí. Bán kính vòng vô khuẩn được đo ở mặt sau đĩa petri từ điểm ngoài cùng của bìa khuẩn lạc đến điểm lan cuối cùng của vòng vô khuẩn. Số liệu BKVVK là giá trị

trung bình của 4 lần lặp lại. Tính hiệu suất đối kháng (HSĐK) theo Moayedi and Mostowfizadeh-ghalamfarsa (2009):

$$\text{HSĐK } \% = \frac{\text{BKKLđc} - \text{BKKLxk}}{\text{BKKLđc}} \times 100\%$$

Trong đó:

+ $BKKL_{đc}$: Bán kính tản nấm phát triển về phía đối chứng.

+ $BKKL_{xk}$: Bán kính tản nấm phát triển về phía xạ khuẩn.

2.3. Thí nghiệm 2: Khảo sát khả năng phòng trị bệnh cháy lá thối củ khoai môn của xạ khuẩn *Streptomyces* sp. (CMAG11) trong môi trường nuôi cấy (chế phẩm) sau thời gian tồn trữ 1 tuần ở điều kiện nhà lưới

❖ *Mục tiêu nghiên cứu:*

Xác định khả năng làm giảm bệnh cháy lá thối củ khoai môn trong điều kiện nhà lưới của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. trong môi trường nhân nuôi (chế phẩm).

❖ *Phương pháp tiến hành:*

➢ Bước 1: Chuẩn bị cây khoai môn

Giống khoai môn là giống khoai lùn, sạch bệnh, củ giống đường kính 3 - 4 cm có khối lượng 20 - 30 g không thối hoặc khô, lớp vỏ ngoài có nhiều lông. Ngâm củ giống trong thau nước ngập xâm xấp, có xử lý thuốc trừ nấm trong vòng 12 giờ, sau đó rữa cho sạch, trải bao bố nơi mát tránh bị mưa rồi trùm bao lên củ giống thời gian 1 - 3 ngày. Chuẩn bị liếp ươm, rải tro trấu, rải củ đều lên mặt liếp sau đó phủ lớp tro trấu trên mặt (tro trấu và đất đã được thanh trùng từ trước). Sau 10 - 12 ngày lấy ra trồng vào chậu. Mỗi chậu trồng 2 cây.

➢ Bước 2: Chuẩn bị nguồn nấm bệnh (thí nghiệm 1)

➢ Bước 3: Chuẩn bị huyền phù xạ khuẩn (thí nghiệm 1): Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. (CMAG11) sau khi được tồn trữ 1 tuần trong các túi chế phẩm sẽ được đem ra pha loãng với tỉ lệ 100 ml nước cất/1 g môi trường nhân nuôi (chế phẩm) chứa xạ khuẩn.

➢ Bước 4: Chủng bệnh nhân tạo: Cây khoai môn trồng được 1 tháng thì tiến hành chủng bệnh nhân tạo. Đầu tiên, di chuyển tất cả các chậu cây vào phòng ủ bệnh. Tiến hành phun 10 ml huyền phù chứa bọc bào tử nấm *Phytophthora* sp. (5×10^4 cfu/ml) đã chuẩn bị lên lá khoai môn của mỗi chậu. Các chậu được che tối hoàn toàn bằng tấm nylon đen, ở nhiệt độ 25^{o}C. Sau đó, 24 giờ đem các chậu cây ra ngoài điều kiện bình thường, thực hiện tưới phun sương, tiến hành quan sát và ghi nhận triệu chứng.

➢ Bước 5: Tiến hành thí nghiệm 2

◦ Tiến hành phun lên tán lá của các cây khoai môn ở mỗi chậu 10 ml huyền phù xạ khuẩn *Streptomyces* sp. (CMAG11) 10^8 cfu/ml và 10 ml dung dịch thuốc hóa học đặc trị gốc Mancozeb được chọn áp dụng phòng trừ nấm *Phytophthora* sp., trong đó thời điểm phun xịt giai đoạn 1 ngày trước và sau khi chủng bệnh.

◦ Thí nghiệm 2 được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 6 nghiệm thức(Bảng 1) và 4 lần lặp lại ở nhà lưới Đại học An Giang. Mỗi chậu khoai được xử lý với mỗi loại chế phẩm chứa chất mang khác nhau được tính là một nghiệm thức.

Bảng 1. Các nghiệm thức xử lý ở điều kiện nhà lưới

TT	Nghiệm thức	Nồng độ	Thời điểm phun xịt (ngày)
1	MS 4%	10 ml dd (mật số 10^8 fu/ml)/cây	Phun giai đoạn trước và sau khi chủng bệnh 1 ngày
2	CÁM 4%		
3	BẮP 4%		
4	Thuốc M8-Plus 72WP	50 g/25 l	
5	ĐC (+) - chủng bệnh	10 ml/cây	Chủng nấm *Phytophthora* sp., phun nước cất
6	ĐC (-) - không chủng bệnh	---	Không chủng nấm *Phytophthora* sp., phun nước cất

❖ Chỉ tiêu theo dõi: Trên mỗi chậu (mỗi lần lặp lại) ghi nhận tổng số chồi và số lá bệnh (cháy lá).

- Ghi nhận mức độ gây hại của nấm *Phytophthora* sp.: Trên cây khoai ở các thời điểm 4, 7, 10 và 13 ngày sau thí nghiệm theo qui chuẩn ghi nhận bệnh của Little and Hills (1978).

- Tỷ lệ bệnh (TLB)(%) = (Số mẫu bệnh/tổng số mẫu quan sát) × 100

- Chỉ số bệnh (CSB): $\text{CSB (\%)} = \frac{\sum \text{Số cây bệnh ở mỗi cấp} \times \text{cấp bệnh tương ứng}}{\sum \text{Tổng số cây đánh giá} \times \text{cấp bệnh cao nhất}} \times 100$

- Hiệu quả giảm bệnh (HQGB): $\text{HQGB (\%)} = \frac{TLB \text{ đối } chứng - TLB \text{ } xử \text{ } lý}{TLB \text{ đối } chứng} \times 100$

- Diện tích dưới đường cong tiến triển bệnh (AUDPC - Area Under Disease Progress Curve): Thể hiện diễn biến bệnh theo thời gian trên mỗi nghiệm thức được tính theo công thức Jeger and Viljanen-Rollinson (2001):

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{R_{i+1} + R_i}{2}\right)(t_{i+1} - t_i)$$

Trong đó:

+ R_i, R_{i+1} là tỉ lệ trái bệnh trên cây vào thời điểm ghi nhận i và i + 1.

+ t_i, t_{i+1} là thời điểm ghi nhận i và thời điểm kế tiếp i + 1 (ngày).

+ n là tổng số lần theo dõi bệnh.

2.4. Xử lí số liệu

Số liệu khảo sát được phân tích thống kê bằng phần mềm SAS, sử dụng phân tích phương sai một chiều (One-way ANOVA), kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 5% để so sánh trung bình các nghiệm thức.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đối với chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. *(CMAG11)* sau thời gian tồn trữ 1 tuần ở điều kiện phòng thí nghiệm

3.1.1. Mật số của xạ khuẩn trong mỗi môi trường nuôi cấy

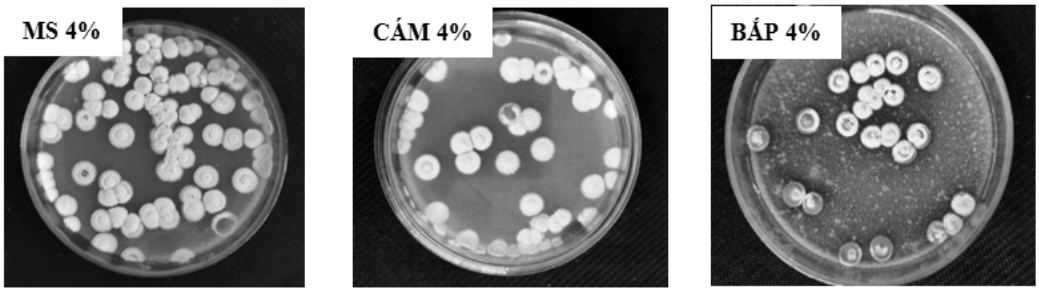
Kết quả từ Bảng 2 và Hình 1 cho thấy mật số của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. (CMAG11) diễn biến ở các môi trường tồn trữ sau 7 ngày (1 tuần) như

sau: Mật số xạ khuẩn ở nghiệm thức MS 4% đạt 1,104 × 10^6 cfu/ml, có khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức CÁM 4% và BẮP 4%. Trong đó ở nghiệm thức BẮP 4% có mật số xạ khuẩn là 0,036 × 10^6 cfu/ml, ở mức thấp hơn so với các nghiệm thức còn lại, kết quả này có thể BẮP 4% với thành phần kém tương thích hơn cho xạ khuẩn phát triển.

Bảng 2. Mật số của xạ khuẩn Streptomyces* sp. *(CMAG11) ở các chế phẩm khác nhau

Nghiệm thức	Mật số xạ khuẩn *Streptomyces* sp. (CMAG11)
MS 4%	1,104 × $10^{6\ a}$
CÁM 4%	0,903 × $10^{6\ b}$
BẮP 4%	0,036 × $10^{6\ c}$
Mức ý nghĩa	***
CV (%)	*4,0*

Ghi chú: Các số trong cùng một cột được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% qua phép kiểm định Duncan. ***: khác biệt ở mức ý nghĩa 1‰.



Hình 1. Mật số xạ khuẩn *Streptomyces* sp. CMAG11 trong các môi trường nuôi cấy ở thời điểm 5 ngày sau bố trí

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Phạm Tuấn Vũ (2015), trong các môi trường chất mang khảo sát mật số xạ khuẩn *Streptomyces helvaticus* AG10 sau 1 tuần tồn trữ thì xạ khuẩn trên môi trường MS cho khả năng sinh bào tử tốt nhất, tiếp theo là đến môi trường CÁM. Hơn nữa, môi trường chất mang bột đậu nành (MS) cũng là nguồn dinh dưỡng rất tốt cho sự phát triển của vi khuẩn (Nguyễn Thị Thu Nga, 2003; Dương Thị Nguyễn Quyên, 2007).

3.1.2. Khả năng đối kháng của xạ khuẩn Streptomyces sp. *(CMAG11) trong môi trường nuôi cấy trên đĩa thạch*

3.1.2.1. Bán kính vô khuẩn

Kết quả được thể hiện cụ thể ở Bảng 3 cho thấy xạ khuẩn trong cả 3 chế phẩm sau 1 tuần tồn trữ đều có khả năng tạo ra bán kính vòng vô khuẩn (BKVVK) với nấm *Phytophthora* sp. nhưng có sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1‰ so với nghiệm thức đối chứng (ĐC) trong suốt 2 - 6 NSKC:

Bảng 3 & 4. Bán kính vòng vô khuẩn (BKVVK) và Hiệu suất đối kháng (%) của chủng xạ khuẩn Streptomyces* sp. *(CMAG11)

Nghiệm thức	Bán kính vòng vô khuẩn (mm)			Nghiệm thức	Hiệu suất đối kháng (%)		
	2 NSKC	4 NSKC	6 NSKC		2 NSKC	4 NSKC	6 NSKC
MS 4%	22,58 [a]	17,67 [a]	15,25 [a]	MS 4%	46,67 [a]	58,89 [a]	50,83 [a]
CÁM 4%	19,42 [b]	14,08 [b]	7,92 [b]	CÁM 4%	23,78 [b]	46,94 [b]	26,39 [b]
BẮP 4%	19,67 [b]	11,50 [c]	1,17 [c]	BẮP 4%	25,63 [b]	38,33 [c]	4,72 [c]
ĐC	16,08 [c]	0,00 [d]	0,00 [d]	ĐC	0,00 [c]	0,00 [d]	0,00 [d]
Mức ý nghĩa	***	***	***	*Mức ý nghĩa*	***	***	***
CV (%)	*2,6*	*4,7*	*11*	*CV (%)*	*14,1*	*4,7*	*9,8*

Ghi chú: Các số trong cùng một cột được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% qua phép kiểm định Duncan. ***: khác biệt ở mức ý nghĩa 1‰; NSKC: ngày sau khi cấy; ĐC: đối chứng.

- Ở thời điểm 2 NSKC: Xạ khuẩn *Streptomyces* sp. (CMAG11) ở các nghiệm thức MS 4%, CÁM 4% và BẮP 4% đều có đối kháng với nấm, có BKVVK lần lượt là 22,58 mm, 19,42 mm và 19,67 mm so với nghiệm thức đối chứng là 16,08 mm. Trong đó nghiệm thức MS 4% thể hiện khả năng đối kháng cao và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại.

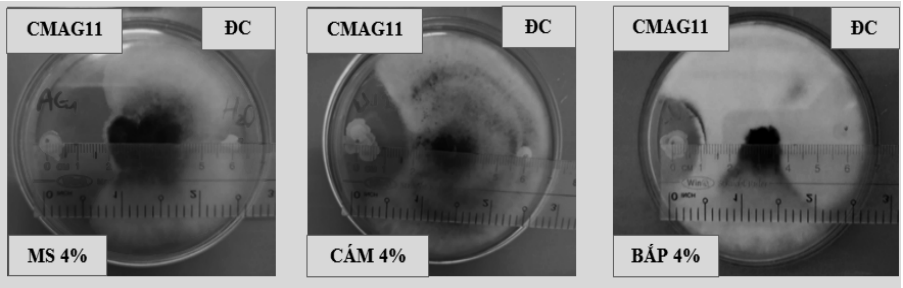
- Ở thời điểm 4 NSKC: BKVVK ở các nghiệm thức hầu hết đều giảm. Nghiệm thức MS 4% có khả năng đối kháng cao nhất với BKVVK là 17,67 mm khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 1‰ so với các nghiệm thức còn lại. Tiếp theo đó, hai nghiệm thức CÁM 4% và BẮP 4% đều có khả năng đối kháng cao, BKVVK lần lượt là 14,08 mm và 11,50 mm so với nghiệm thức đối chứng là 0,00 mm.

- Ở thời điểm 6 NSKC: BKVVK ở các nghiệm thức tiếp tục giảm. Tuy nhiên, nghiệm thức MS 4% vẫn thể hiện khả năng đối kháng cao với BKVVK là 15,25 mm. Hai nghiệm thức CÁM 4% và BẮP 4% vẫn có khả năng đối kháng với BKVVK lần lượt là 7,92 mm và 1,17 mm và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 1‰ so với nghiệm thức đối chứng.

Nhìn chung, khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn có khuynh hướng giảm dần theo thời gian. Trong đó, ở nghiệm thức MS 4% thể hiện khả năng đối kháng cao và ổn định so với các nghiệm thức còn lại đến thời điểm 6 ngày sau thí nghiệm. Kết quả cũng phù hợp với nghiên cứu của Shimizu *et al.* (2001) đã lựa chọn môi trường MS nuôi cấy để tạo bào tử cho xạ khuẩn *Streptomyces* sp. đối kháng với nấm *Colletotrichum orbiculera.*

3.1.2.2. Hiệu suất đối kháng

Dẫn liệu từ Hình 2 và Bảng 4 cho thấy trong suốt giai đoạn 2 - 6 NSKC thì có sự khác biệt về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 1‰ giữa các nghiệm thức so với nghiệm thức ĐC về HSĐK (%):



Hình 2. Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. CMAG11 trong các chất mang nhân nuôi với nấm bệnh *Phytophthora* sp. ở thời điểm 6 NSKC

- Ở thời điểm 2 NSKC: Nghiệm thức MS 4% có HSĐK với nấm cao nhất là 46,67%. Trong khi đó, do nấm phát triển nhanh về phía không có đặt xạ khuẩn đối kháng *Streptomyces* sp. (CMAG11) nên HSĐK ở nghiệm thức đối chứng là 0,00%. Hai nghiệm thức CÁM 4% và BẮP 4% có HSĐK tương đương nhau lần lượt là 23,78% và 25,63%.

- Ở thời điểm 4 NSKC: Tất cả các nghiệm thức đều có HSĐK với nấm ở các mức độ khác nhau. Nghiệm thức MS 4% có HSĐK cao nhất là 58,89% cao hơn so với các nghiệm thức còn lại, khác biệt ý nghĩa ở mức 1‰.

- Ở thời điểm 6 NSKC: HSĐK của các nghiệm thức bắt đầu giảm. Tuy nhiên, nghiệm thức MS 4% vẫn có HSĐK cao nhất là 50,83% có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 1‰ với các nghiệm thức còn lại. Nghiệm thức BẮP 4% có HSĐK giảm nhiều nhất so với nghiệm thức MS 4% và CÁM 4% từ 38,83% ở thời điểm 4 NSKC còn 4,72% ở thời điểm 6 NSKC.

Như vậy, từ kết quả ở Bảng 3 và Bảng 4 cho thấy xạ khuẩn *Streptomyces* sp. (CMAG11) được nuôi trong môi trường MS 4% luôn thể hiện sự đối kháng cao với nấm *Phytophthora* sp. qua các thời điểm khảo sát và duy trì đến 6 NSKC với BKVVK và HSĐK cao. Kết quả cũng đã xác định xạ khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Phytophthora nicotianae* gây bệnh trên mè (Phạm Công Hưởng, 2013). Theo Lê Văn Tiến (2015), xạ khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Phytophthora* sp. gây hại trên sen.

3.2. Khả năng phòng trị bệnh cháy lá thối củ khoai môn của xạ khuẩn *Streptomyces* sp. *(CMAG11)* trong chất mang nhân nuôi sau thời gian tồn trữ một tuần ở điều kiện nhà lưới

3.2.1. Tỷ lệ bệnh

Kết quả được trình bày ở Bảng 5 cho thấy qua 13 NSCB tất cả các nghiệm thức đều khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1‰ so với nghiệm thức ĐC về tỉ lệ bệnh (TLB):

- Thời điểm 4 - 7 NSCB: TLB của các nghiệm thức có sự khác biệt ý nghĩa so với ĐC (+) ở mức ý nghĩa 1‰. Tuy nhiên, cả 3 nghiệm thức MS 4%, CÁM 4%, BẮP 4% đều không khác biệt nhau ở 4 - 7 NSCB nhưng có TLB cao hơn nghiệm thức M8-Plus 72WP và ĐC (-). Kết quả chứng tỏ cả 3 nghiệm thức MS 4%, CÁM 4%, BẮP 4% cho hiệu quả quản lý bệnh kém hơn nghiệm thức M8-Plus 72WP và ĐC (-). Đặc biệt nghiệm thức MS 4% có xu hướng thể hiện TLB thấp hơn ở CÁM 4% và BẮP 4% đến thời điểm này.

- Thời điểm 10 - 13 NSCB: TLB ở nghiệm thức M8-Plus 72WP và ĐC (-) có TLB thấp nhất lần lượt là 31,84% và 27,69 - 28,88% khác biệt ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại. Riêng ở nghiệm thức MS 4% (58,78 - 63,79%) khác biệt và thấp hơn so với CÁM 4% và BẮP 4% với TLB dao động 68,88 - 77,19% (2 nghiệm thức này không khác biệt nhau). Kết quả vẫn chứng tỏ nghiệm thức M8-Plus 72WP có hiệu quả quản lý bệnh tốt và cao hơn các nghiệm thức còn lại; kế đến MS 4%, và thấp nhất ở CÁM 4% và BẮP 4% đến thời điểm 13 NSCB. Kết quả trong suốt 4 - 13 NSCB cũng cho thấy, do nghiệm thức ĐC (-) không được chủng bệnh nên có TLB tương đương với nghiệm thức với M8-Plus 72WP với TLB thấp nhất. Nghiệm thức MS 4% bắt đầu có sự khác biệt ý nghĩa với nghiệm thức CÁM 4%, BẮP 4% ở thời điểm 10 NSCB trở đi với TLB thấp hơn, điều này chứng minh xạ khuẩn *Streptomyces* sp. (CMAG11) trong chất mang MS 4% giúp cây có TLB thấp hơn so với trong chất mang CÁM 4% và BẮP 4%. Theo Nguyễn Xuân Thành *và ctv.* (2005) cho rằng xạ khuẩn có khả năng sinh tiết chất kháng sinh enzym ngoại bào trong quá trình phát triển có thể vì chính sản phẩm này của xạ khuẩn đã làm ức chế sự phát triển của nấm *Phytophthora* sp.

Bảng 5. Tỉ lệ bệnh của các nghiệm thức

Nghiệm thức	Tỷ lệ bệnh (%) ở các NSCB			
	4 NSCB	7 NSCB	10 NSCB	13 NSCB
MS 4%	18,72^{bc}	39,02^{bc}	58,78^{c}	63,79^{c}
CÁM 4%	14,93^{bc}	44,38^{b}	68,88^{b}	71,45^{b}
BẮP 4%	22,69^{b}	47,31^{b}	75,87^{b}	77,19^{b}
M8-Plus 72WP	10,85^{c}	26,49^{c}	31,84^{d}	31,84^{d}
ĐC (-)	12,62^{c}	24,13^{c}	27,69^{d}	28,88^{d}
ĐC (+)	60,13^{a}	85,90^{a}	85,36^{a}	88,14^{a}
Mức ý nghĩa	***	***	***	***
CV (%)	*23*	*22,2*	*9,6*	*8,2*

Bảng 6. Chỉ số bệnh của các nghiệm thức

Nghiệm thức	Chỉ số bệnh (%) ở các NSCB			
	4 NSCB	7 NSCB	10 NSCB	13 NSCB
MS4%	3,70^{bc}	10,52^{cd}	25,49^{c}	30,69^{c}
CÁM4%	2,49^{bc}	13,05^{c}	32,30^{bc}	37,91^{c}
BẮP4%	7,59^{b}	18,95^{b}	36,80^{b}	47,57^{b}
M8-Plus72WP	1,81^{c}	7,55^{cd}	15,39^{d}	17,79^{d}
ĐC(-)	3,18^{bc}	6,24^{d}	12,16^{d}	15,89^{d}
ĐC(+)	14,64^{a}	34,12^{a}	48,90^{a}	59,77^{a}
Mức ý nghĩa	***	***	***	***
CV (%)	*57,9*	*24*	*17,2*	*15,9*

Ghi chú: Các số trong cùng một cột được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% qua phép kiểm định Duncan. ***: khác biệt ở mức ý nghĩa 1‰ ; NSCB: ngày sau chủng bệnh.

3.2.2. Chỉ số bệnh

Chỉ số bệnh (CSB) cũng thể hiện rõ sự chênh lệch và khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1‰ của các nghiệm thức trong suốt 4 - 13 NSCB (Bảng 6):

- Thời điểm 4 NSCB: Chỉ số bệnh dao động trong khoảng từ 1,81 - 14,64% và khác biệt có ý nghĩa thống kê của ở các nghiệm thức xử lý so với ĐC (+). Tuy nhiên, ở M8-Plus 72WP có CSB thấp nhất 1,81% so với các nghiệm thức xử lý còn lại (2,49 - 3,7%) dù không khác biệt lẫn nhau.

- Thời điểm 7 NSCB: CSB đều tăng lên ở tất cả các nghiệm thức. Ở 3 nghiệm thức ĐC (-), M8-Plus 72WP, MS 4% và CÁM 4% có CSB thấp nhất là 6,24 -

13,05% và khác biệt ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại. Riêng ở nghiệm thức BẮP 4% có CSB 18,95% cao và có sự khác biệt ý nghĩa với các nghiệm thức khác ngoại trừ so với nghiệm thức ĐC (+). Như vậy, đến thời điểm 7 NSCB thì M8-Plus 72WP, MS 4% và CÁM 4% cho hiệu quả quản lý bệnh tốt hơn BẮP 4%.

- Thời điểm 10 - 13 NSCB: CSB của hai nghiệm thức M8-Plus 72WP và ĐC (-) vẫn duy trì ở mức 12,16 - 17,79% là cao và khác biệt ý nghĩa với các nghiệm thức khác. Ở 2 Các nghiệm thức MS 4% và CÁM 4% có CSB 25,49 - 37,91% không khác biệt ý nghĩa với nhau hơn cao và khác biệt với nghiệm thức BẮP 4% (36,8 - 45,57% và ĐC (+) với 48,9 - 59,77%. Kết qủa này chứng tỏ M8-Plus 72WP cho hiệu quả quản lý bệnh tốt nhất và cao hơn các nghiệm thức còn lại trong suốt 13 NSCB; kế đến ở nghiệm thức MS 4% và CÁM 4% và thấp nhất ở nghiệm thức BẮP 4%. Theo Trần Phương Dinh (2019) cho thấy ngoài nghiệm thức xử lý thuốc hóa học thì nghiệm thức xử lý xạ khuẩn luôn có chỉ số bệnh thấp và duy trì đến 6 NSCB.

3.2.3. Hiệu quả giảm bệnh

Theo kết quả thể hiện ở Bảng 7 và Hình 3 cho thấy không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức về hiệu quả giảm bệnh (HQGB) tại thời điểm 4 - 7 NSCB với HQGB dao động từ 45,38 - 81,34%. Kết qủa chứng tỏ đến thời điểm này các nghiệm thức đều cho hiệu quả quản lý bệnh như nhau.

Đến thời điểm 10 - 13 NSCB thì HQGB của nghiệm thức M8-Plus 72WP 62,75 - 63,72% vẫn được duy trì cao nhất và có khác biệt thống kê với 3 nghiệm thức còn lại; kế đến nghiệm thức MS 4% (27,42 - 31,05%) và thấp nhất ở CÁM 4% và BẮP 4% với HQGB 11,1 - 19,29%. Kết qủa chứng tỏ đến thời điểm này nghiệm thức M8-Plus 72WP và MS 4% đều cho hiệu quả quản lý bệnh cao nhất và tốt hơn CÁM 4% và BẮP 4%. Theo Nguyễn Phú Dũng *và ctv.* (2019) cũng ghi nhận CM. AG11 có khả năng quản lý bệnh tốt tương đương thuốc Mancozeb chỉ ở giai đoạn 6 ngày sau chủng bệnh. Nhưng kể từ 8 - 12 NSCB thì chủng xạ khuẩn CM. AG11 cho hiệu quả quản lý bệnh thấp hơn Mancozeb.

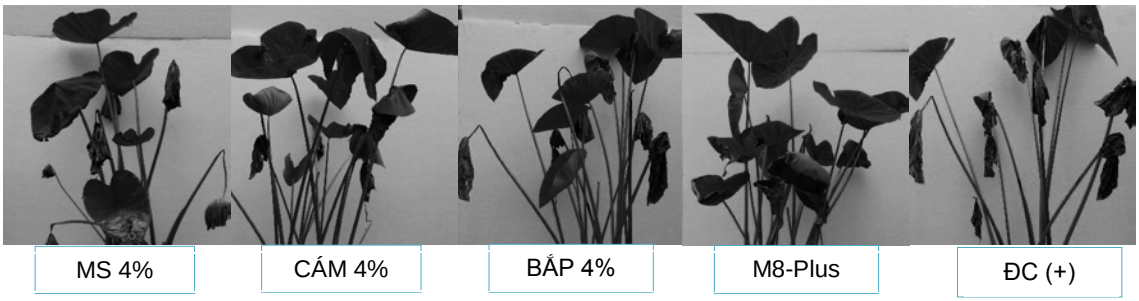
Bảng 7. Hiệu quả giảm bệnh (%) của các nghiệm thức

Nghiệm thức	Hiệu quả giảm bệnh (%) ở các NSCB			
	4 NSCB	7 NSCB	10 NSCB	13 NSCB
MS 4%	68,79	54,43	31,05^{b}	27,42^{b}
CÁM 4%	75,16	47,80	19,29^{c}	18,78^{c}
BẮP 4%	62,90	45,38	11,10^{c}	12,49^{c}
M8-Plus 72WP	81,34	68,85	62,75 ^{a}	63,72 ^{a}
Mức ý nghĩa	*ns*	*ns*	***	***
CV (%)	*11,8*	*23,8*	*21,4*	*16,6*

Bảng 8. Giá trị AUDPC của các nghiệm thức

Nghiệm thức	AUDPC
MS 4%	417,17^{c}
CÁM 4%	469,33^{bc}
BẮP 4%	519,35^{b}
M8-Plus 72WP	239,00^{d}
ĐC (-)	217,73 ^{d}
ĐC (+)	736,16 ^{a}
Mức ý nghĩa	***
CV (%)	*10,1*

Ghi chú: Các số trong cùng một cột được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% qua phép kiểm định Duncan. ***: khác biệt ở mức ý nghĩa 1‰; ns: không có sự khác biệt; NSCB: ngày sau chủng bệnh.



Hình 3. Hiệu quả giảm bệnh cháy lá khoai môn của các nghiệm thức được phun thuốc và các chất mang nhân nuôi so với ĐC (+) ở 13 NSCB trong điều kiện nhà lưới

3.2.4. Diện tích dưới đường cong tiến triển bệnh (AUDPC - Area Under Disease Progress Curve)

Theo Bảng 8 thì chỉ số AUDPC dao động từ 217,73 - 736,16. Chỉ số AUDPC của hai nghiệm thức M8-Plus 72WP và ĐC(-) là thấp nhất lần lượt là 239,00 và 217,73 khác biệt với các nghiệm thức còn lại ở mức ý nghĩa 1‰. Ba nghiệm thức MS 4%, CÁM 4%, BẮP 4% đều có khác biệt với nghiệm thức ĐC (+), trong đó nghiệm thức MS 4% có AUDPC thấp nhất 417,17 so với hai nghiệm thức CÁM 4% (469,33) và BẮP 4% (519,35).

Tóm lại, kết hợp phân tích dữ liệu về TLB, CSB, HQGB và AUDPC cho thấy nghiệm thức xử lý M8-Plus 72WP vẫn cho hiệu quả quản lý bệnh tốt nhất; kế đến ở 2 nghiệm thức MS 4% và CÁM 4%, nhưng thấp nhất ở nghiệm thức BẮP 4% trong suốt 4 - 13 NSCB so với nghiệm thức ĐC (+). Kết quả ghi nhận tương tự nghiên cứu trước đây của Nguyễn Thành Thủ (2017) là nấm *P. colocasiae* tương đối mẫn cảm với hoạt chất Mancozed cũng cho hiệu quả ức chế với nấm *Phytophthora nicotianae* gây thối gốc mè. Ngoài ra các hoạt chất Metalaxyl, Dimethomorph, Mancozeb cũng có khả năng ức chế cao đối với nấm *P. infestans* trên khoai tây (Emil Rekanovic, 2012).

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Ở điều kiện phòng thí nghiệm chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. (CMAG 11) trong chế phẩm MS 4% sau 7 ngày tồn trữ có mật số $1,104 \times 10^6$ cfu/ml, bán kính vòng vô khuẩn 15,25 mm và hiệu suất đối kháng 50,83% sau 6 ngày sau chủng bệnh cao nhất so với chế phẩm CÁM 4% và BẮP 4%.

Ở điều kiện nhà lưới xử lý M8-Plus 72WP cho hiệu quả quản lý bệnh tốt nhất; kế đến ở 2 chế phẩm MS 4% và CÁM 4%, nhưng thấp nhất ở chế phẩm BẮP 4% trong suốt 4 - 13 ngày sau chủng bệnh thể hiện qua các chỉ tiêu về tỉ lệ bệnh, chỉ số bệnh, hiệu quả giảm bệnh và diện tích dưới đường cong tiến triển bệnh sau thời gian một tuần tồn trữ.

4.2. Đề nghị

Tiếp tục nghiên cứu và đánh giá khả năng đối kháng của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. (CMAG 11) trên các loại chế phẩm nhân nuôi khác nhau ở điều kiện nhà lưới và ngoài đồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Doumbou, C. L., M.H. Salove, D. L. Crawford and C. Beaulieu (2001). Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. Phytoprotection, 82(3): 85 - 102.
2. Dương Thị Nguyễn Quyên, 2008. Tìm môi trường nhân nuôi và tồn trữ vi khuẩn *Burkholderia cepacia* TG17. Trường Đại học Cần Thơ.
3. Emil Rekanovic (2012). Toxicity of metalaxyl, azoxystrobin, dimethomorph, cymoxanil, zoxamide and mancozeb to *Phytophthora infestans* isolates from erbia. Journal of Environmental Science and Health, Part B(2012),47:403 - 409.
4. Hsu and Lockwood (1975). Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enmeration of Actinomycetes in Water and Soil. Appl Microbiology, 422 - 426.
5. Jeger, M. J., and Viljanen-Rollinson, S. L.H. (2001). The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theoritical and Applied Gennetic*. 102 (1):32 - 40.
6. Kuster, E. (1959). Outline of a comparative study of criteria used in characterization of the actinomycetes. International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy, 9(2): 97 - 104.
7. Lê Văn Tiến (2015). Khảo sát khả năng phòng trị bệnh thối thân trên sen do nấm *Phytophthora* sp. bằng biện pháp sinh học và hóa học trong điều kiện phòng thí nghiệm. Luận văn tốt nghiệp kỹ sư ngành Bảo vệ thực vật. Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng. Trường Đại học Cần Thơ.
8. Little, T.M and F.J. Hills. (1978). Agricutural experimentation: Design and analysis. Jonhn and Sons, New York, pp. 234.
9. Moayedi G. and Mostowfizadeh-ghalamfarsa R. (2009). Antagonistic Activities of *Trichoderma* spp. on Phytophthora Root Rot of Sugar Beet. Iran Agricultural Research 28(2) 21 - 38.
10. Nguyễn Phi Hùng (2010). Nghiên cứu nấm *Phytophthora colocasiae* gây bệnh cháy lá trên một số giống khoai môn *(Colocasiae esculenta* L.). Luận văn Thạc sĩ Khoa học Nông nghiệp. Đại học Nông Lâm TP. HCM.
11. Nguyễn Phú Dũng (2019). Phân lập, tuyển chọn và thời điểm phun chủng xạ khuẩn đối kháng bệnh cháy lá khoai môn ở điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới Đại học An Giang 2018 - 2019. Chuyên đề nông nghiệp đồng bằng sông Cửu Long: Ứng dụng công nghệ cao hướng đến phát triển bền vững 11/2019. Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển nông thôn. Trang 17 - 27.
12. Nguyễn Phú Dũng, Lê Minh Tường và Trần Phương Dinh (2019). Tuyển chọn và hiệu quả phòng trị của xạ khuẩn đối với bệnh cháy lá khoai môn do nấm *Phytophthrora* sp. gây ra ở An Giang. Đề tài cấp cơ sở tỉnh An Giang 2019. Khoa Nông nghiệp. Trường Đại học An Giang.
13. Nguyễn Thành Thủ (2017). Đánh giá hiệu quả phòng trị của xạ khuẩn đối với bệnh cháy lá khoai môn do nấm *Phytophthora* sp. gây ra. Luận văn tốt nghiệp kỹ sư ngành Bảo vệ thực vật. Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng. Trường Đại học Cần Thơ.
14. Nguyễn Thị Ngọc Huệ và Nguyễn Văn Viết (2004). Tài nguyên di truyền khoai môn - sọ ở Việt Nam. NXB. Nông nghiệp.
15. Nguyễn Thị Thu Nga (2003). Khảo sát đặc tính sinh học, khả năng đối kháng của vi khuẩn *Burkholderia cepacia* TG17 đối với nấm *Rhizoctonia solani* Kunh và tìm môi trường nhân nuôi vi khuẩn này. Luận văn cao học Ngành Nông học, Trường Đại học Cần Thơ.
16. Nguyễn Xuân Thành, Nguyễn Bá Hiên, Hoàng Hải và Vũ Thị Hoan (2005). Giáo trình vi sinh vật công nghiệp. Nhà xuất bản Giáo dục.
17. Phạm Công Hưởng (2013). Đánh giá hiệu quả của xạ khuẩn và thuốc hóa học trong phòng trị bệnh thối thân *(Phytophthora nicotianae)* trên mè trong điều kiện nhà lưới. Luận văn tốt nghiệp kỹ sư Ngành Bảo vệ thực vật. Khoa

Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng. Trường Đại học Cần Thơ.

18. Phạm Tuấn Vủ (2015). Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện nhân nuôi đối với một số chủng xạ khuẩn có triển vọng. Luận văn tốt nghiệp kỹ sư Ngành Bảo vệ thực vật. Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng. Trường Đại học Cần Thơ.
19. Shimizu M, N. Fujita, Y. Nakagawa, T. Nishimura, T. Furumai, Y. Igarashi, H Onaka, R. Yoshida and H. Kunoh (2001). Disease resistance of tissue-cultured seedlings of rhododendron after treatment with *Streptomyces* sp. R-5. J *Gen Plant Pathol* 67, pp. 325 - 332.
20. Tuzun, S. and J. Kloepper (1995). Practical application and implementation of induced resistance. In Induced Resistance to Disease in Plants: 152 - 168. Springer Netherlands.
21. Shirling, E. B. and Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of streptomyces species. International journal of systematic bacteriology 16 (3):313 - 340.
22. Shurtleff, M. C. and Averre III, C. W. (1997). The plant disease clinic and field diagnosis of abiotic diseases. APS press. The American Phytopathological Soceity. St. Paul, Minnesata. pp 245.
23. Trần Phương Dinh (2019). Đánh giá khả năng phòng trị của xạ khuẩn đối với bệnh cháy lá khoai môn do nấm *Phytophthora* sp. gây ra. Luận văn Thạc sĩ Nông nghiệp. Đại học An Giang.
24. Vidhyasekaran, P. and Muthamilan M. (1995). Development of Formulation of Pseudomonas fluorescens for Control of Chickpea wilt. Plant disease. 79(8): 782 - 786.
25. Watve, M.G., R. Tickoo, M.M. Jog and B.D. Bhole (2001). How many antibiotics are produced by the genus Streptomyces?. Archives of microbiology, 176(5): 386 - 390.

XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN VI KHUẨN GÂY BỆNH LOÉT THÂN XÌ MỦ TRÊN CÂY MÍT (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

Hứa Thanh Hải[1], Nguyễn Huỳnh Cao Quí[1], Đoàn Thị Kiều Tiên[1], Lê Thanh Toàn[1], Mai Văn Trị[2], Nguyễn Thị Thu Nga[1]

[1] Bộ môn Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp, Đại học Cần Thơ

[2] Trung tâm Nghiên cứu Cây ăn quả miền Đông Nam Bộ, Viện Cây ăn quả miền Nam

ABSTRACT

Identification of bacterial agent causing gummosis stem canker on jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

Gummosis stem canker is a new emerging disease on jackfruit cv. Sieu Som in Vietnam causing stem canker, gummosis, and vascular brownish discoloration. The disease may quickly kills the above parts of infected branches or trunks. This study was conducted to determine the causal agent of the disease through the Koch postulates combined with molecular and biochemical methods. The isolated bacterium from infected jackfruit is able to cause hypersensitive reaction on chili leaf by leaf infiltration. When the bacterial solution was injected into jackfruit stems, the bacteria were seen flowing to the upper xylem and turning the infected xylem to brown (stem canker) three weeks after the injection. Bacterial reisolation from the stem canker obtained bacterial strain similar to the initial artificial inoculation. Based on testing bacterial characteristics including solubilization on 3% KOH, using Glucose in both aerobic and anaerobic conditions, and white colony on YDC medium, the bacterial isolate was classified belong to Pectobacterium genus. By sequencing the 16S rRNA gene of the bacterial isolate after PCR amplification with 27F/1492R primers and then comparing with the published sequences on NCBI by BLAST, the bacterial isolate showed high similarity with two species P. carotovorum and P. aroidearum. Based on its characteristic without growth in Tween 80, the bacterial isolate was clarified as P. carotovorum. Therefore, the causal agent of gummosis stem canker and die-back on jackfruit cv. Sieu Som was proved as P. carotovorum.

Keywords: *Gummosis stem canker, causal agent, jackfruit cv. Sieu Som.*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Đắc Khoa.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây mít là cây ăn trái quan trọng có giá trị kinh tế cao ở Việt Nam. Hiện nay, giống mít Siêu Sớm đang được nông dân chú trọng phát triển do cho trái sớm, dễ trồng, phẩm chất và năng suất cao cũng như có lợi nhuận cao. Tỉnh Tiền Giang là một trong những tỉnh có diện tích trồng mít lớn nhất khu vực đồng bằng sông Cửu Long với tổng diện tích hơn 6.000 ha. Tuy nhiên, do quy mô diện tích và mức độ trồng tập trung thâm canh cao cùng một số yếu tố khác đã dẫn đến dịch bệnh gây hại ngày càng tăng. Từ năm 2017, bệnh loét thân xì mủ (gọi theo triệu chứng bệnh) được ghi nhận ở huyện Cái Bè (Tiền Giang), ngày càng nghiêm trọng và trở thành yếu tố giới hạn sản xuất mít. Bệnh thường tấn công trên những cây từ 2 năm tuổi (Báo điện tử Tiền Giang, 2018). Triệu chứng được thấy khi những giọt nhựa cây (mủ) màu trắng tiết ra từ vết loét trên vỏ thân, khi lớp vỏ được cạo đi có thể thấy những vệt hóa nâu chạy dọc theo mạch dẫn, mở rộng dần. Có thể có vết nứt dọc thân và có mùi thối. Lá phần phía trên vết bệnh vàng và rụng sớm; lá mới mọc thay thế thường nhỏ và phát triển kém; phần ngọn trụi lá khô dần và có thể chết. Ở Thái Lan, một bệnh trên mít có triệu chứng tương tự được gọi là loét (canker) hay chết ngược/ngọn (die-back) gây ra bởi vi khuẩn *Erwinia nigrifluens* (Chuenchitt và Wismitanant, 1996). Sau đó, bệnh chết ngược trên mít được ghi nhận và được báo cáo có liên quan đến hai loài vi khuẩn là *E. carotovora* và *E. nigrifluens* (Vareket *et al.*, 2005). Gần đây Lê Thanh Toàn *và ctv.* (2019) dùng phương pháp giải trình tự và phương pháp phân tích đặc điểm sinh hóa đã xác định bệnh loét thân xì mủ trên mít ở Hậu Giang là do vi khuẩn *E. carotovora* gây ra. Nghiên cứu này nhằm xác định tác nhân gây bệnh loét thân xì mủ trên mít Siêu Sớm tại tỉnh Tiền Giang bằng phương pháp lây bệnh nhân tạo theo quy trình Koch, phân tích đặc điểm sinh hóa kết hợp với giải trình tự gen nhằm cung cấp cơ sở cho các nghiên cứu phòng trừ bệnh trong tương lai.

II. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Phương tiện và vật liệu nghiên cứu

Mẫu bệnh loét thân xì mủ trên mít Siêu Sớm được thu thập tại các vườn mít thuộc huyện Cái Bè, tỉnh Tiền Giang.

Môi trường phân lập và nuôi cấy King's B (peptone 20 gr, glycerol 15 ml, K_2HPO_4 1,5 gr, $MgSO_4.7H_2O$ 1,5 gr, agar 20 gr, nước cất vừa đủ 1000 ml, pH 7,2) (Shurtleff và Averre, 1997).

Môi trường kiểm tra sự tăng trưởng trong điều kiện yếm khí (Anaerobic growth, Peptone 2 gr, NaCl 5gr, KH_2PO_4 0,3 gr, agar 3 gr, Bromthymol blue (1%) 3 ml, glucose 10 gr) (Janse, 2009; Schaad *et al.* 2001).

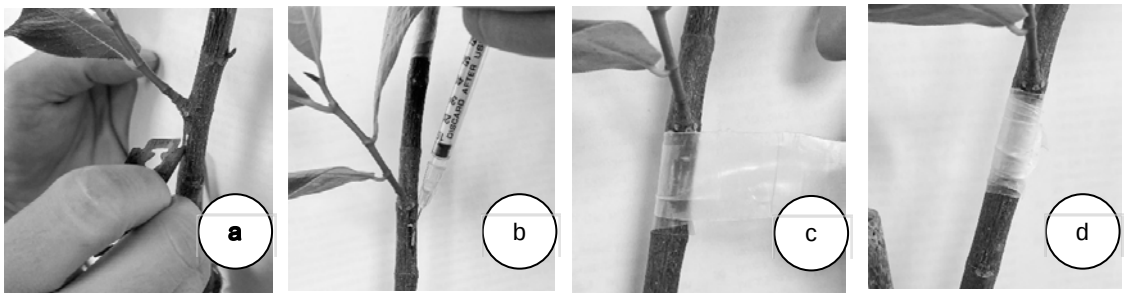
Môi trường YDC (Yeast extract - dextrose - $CaCO_3$, yeast extract 10 gr, dextrose 20 gr, $CaCO_3$ 20 gr, agar 20 gr, nước cất vừa đủ 1000 ml, pH 7).

Hóa chất ly trích DNA, PCR, điện di: TE buffer, TAE buffer 1X, agarose 1%, loading dye blue, ethidium bromide, Phusa master mix 2X, cặp mồi phổ thông 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') và 1492R (5'- TACGGTTACCTTGTTACGACT-3'). Cặp mồi 27F/1492R sẽ khếch đại vùng gen 16S rRNA với sản phẩm gen khuếch đại 1500 bp (Zhang *et al.*, 2020).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập mẫu bệnh và kiểm chứng khả năng gây bệnh theo quy trình Koch

Áp dụng 4 bước của quy trình Koch (Agrios 2005; Burgess *et al.*, 2009) gồm: (i) Mô tả triệu chứng bệnh, quan sát sự hiện diện của vi sinh vật; (ii) phân lập mẫu bệnh và làm thuần; (iii) Lây bệnh nhân tạo ở điều kiện nhà lưới: Đầu tiên khử trùng bề mặt vị trí thân mít cần lây bệnh bằng cồn 70%, dùng dao mổ thanh trùng tách phần vỏ thân một đoạn dài 1 - 2 cm ngang 3 - 5 mm ở vị trí phía trên mắt ghép, dùng kim tiêm đã thanh trùng với 1 ml huyền phù vi khuẩn tiêm vào phần cắt cho huyền phù đi vào mạch dẫn (huyền phù vi khuẩn ở OD_{600nm} = 0,3), sau đó lấp phần vỏ thân lại và cố định vị trí vết thương bằng parafilm (Hình 1) (Janse 2009). (iv). Quan sát triệu chứng xuất hiện, kiểm tra sự phát triển của vi khuẩn trong bó mạch dẫn sau thời gian lây bệnh và tái phân lập mầm bệnh và so sánh với mầm bệnh ban đầu.



Hình 1. Thực hiện lây bệnh nhân tạo lên cây mít Siêu Sớm

(a) Tạo vết thương, (b) Tiêm huyền phù vi khuẩn,
(c) Cố định vết thương bằng parafilm, (d) Sau khi đã cố định

2.2.2. Định danh bằng phương pháp sinh hóa

- Kiểm tra Gram vi khuẩn với dung dịch KOH 3% (Shurtleff và Averre, 1997):

Dùng đũa cấy vòng lúp vít ít khuẩn lạc vi khuẩn hòa đều trên phiến lam có nhỏ 1 giọt KOH 3%. Vi khuẩn gram âm (-) sau khi cho tiếp xúc với dung dịch KOH 3% sẽ thấy hiện tượng vi khuẩn tạo keo nhầy và kéo sợi. Vi khuẩn gram dương (+) sau khi cho vi khuẩn tiếp xúc dung dịch KOH 3% sẽ thấy hiện tượng vi khuẩn không tạo keo nhầy.

- Kiểm tra sử dụng carbonhydrate trong điều kiện yếm khí (Janse, 2009):

Mục đích nhằm xác định vi khuẩn gây bệnh thuộc nhóm vi khuẩn hiếu khí hay kị khí. Chuẩn bị ống nghiệm chứa 5 ml môi trường Hugh và Leifson đã thanh trùng (pH 7,1) để ấm 50 - 55^{o}C, sau đó cho 0,5 ml dung dịch glucose 10% vô trùng (bằng phương pháp qua màng lọc vi khuẩn) vào ống nghiệm. Thực hiện cấy vi khuẩn vào 2 ống nghiệm, sau đó phủ lên bề mặt môi trường một lớp sáp parafin tan chảy (vô trùng), sâu khoảng 5 mm vào 1 trong 2 ống nghiệm để tạo điều kiện yếm khí. Đặt các ống nghiệm

ở điều kiện nhiệt độ phòng và quan sát kết quả thông qua sự đổi màu của chất chỉ thị màu bromthylmol blue trong 24 - 48 giờ. Vi khuẩn có khả năng sống yếm khí sẽ sử dụng glucose và sinh ra acid làm giảm pH của môi trường từ đó sẽ làm đổi màu ở ống nghiệm bromthymol blue từ màu xanh nhạt chuyển sang màu vàng.

- Kiểm tra khả năng tạo khuẩn lạc vàng trên môi trường YDC (Schaad *et al.*, 2001):

Việc kiểm tra nhằm xác định vi khuẩn thuộc chi *Pectobacterium* hay chi *Pantoea* dựa vào tạo khuẩn lạc màu vàng hay màu trắng trên môi trường YDC. Thực hiện cấy vạch đơn vi khuẩn trên dĩa Petri môi trường YDC (pH 7), sau đó đĩa được đặt trong điều kiện phòng quan sát và ghi nhận kết quả sau 24 - 48 giờ. Nếu vi khuẩn sinh trưởng được trên môi trường YDC và tạo khuẩn lạc màu trắng là chi *Pectobacterium* hoặc màu vàng là chi *Pantoea.*

2.2.3. Định danh dựa trên kỹ thuật giải trình tự gen của sản phẩm DNA khuyếch đại bằng cặp mồi 27F/1492R (Zhang et al., 2020)

- Ly trích DNA: Vít khuẩn lạc vi khuẩn để vào trong 400 µl TE buffer 1X trong ống eppendorf. Đun sôi ống eppendorf 20 phút, sau đó để mẫu trong nước đá 5 phút. Thực hiện ly tâm 13.200 vòng/phút trong 5 phút. Rút 150 µl phần dịch trong ở trên chứa DNA cho vào ống eppendorf khác và trữ ở -20^{o}C để chạy PCR (Junior *et al.*, 2016).

- Phản ứng PCR: Thể tích phản ứng PCR 50 µl (protocol PHUSA MASTER MIX) gồm Phusa master mix 2X 25 µl, DNA mẫu 2 µl, mồi F (27F) 2µl, mồi R (1492R) 2 µl, 19 µl nước PCR (Phusa PCR buffer 10X). Phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt: khởi đầu biến tính ở 94^{o}C trong 4 phút, tiếp theo là 35 chu trình gồm 3 bước: 94^{o}C trong 45 giây (biến tính), 55^{o}C trong 45 giây (bắt cặp mồi), 72^{o}C trong 90 giây (tổng hợp kéo dài), cuối cùng là 72^{o}C trong 10 phút và giữ ở 4^{o}C. Sản phẩm PCR nhuộm với loading dye blue được điện di trên gel agarose 1% trong TAE buffer 1X chạy trên thiết bị điện di ở hiệu điện thế 50V trong 30 phút.

- Giải trình tự và phân tích trình tự: Sản phẩm PCR được gửi giải trình tự tại Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa**.** Trình tự được so sánh với trình tự trong cơ sở dữ liệu đã được công bố nhờ công cụ tìm kiếm BLAST tại NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), so sánh độ tương đồng của các dòng đã công bố trên cơ sỡ dữ liệu của NCBI để xác định tên vi khuẩn.

2.2.4. Xác định đến mức độ loài bằng kiểm tra đặc tính gây thối mềm trên khoai tây và đặc tính sinh trưởng trên môi trường Tween 80 ở 37^{o}C

Mục đích để phân biệt hai loài vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum* và *Pectobacterium adroidearum* sau kết quả phân tích giải trình tự trên NCBI (Nabhan *et al.*, 2013).

Kiểm tra khả năng gây thối mềm khoai tây: Khoai tây được rửa sạch, sau đó cắt từng lát dày 7 - 8 mm. Trước khi xử lí vi khuẩn, lát khoai tây được khử trùng bằng cách lau qua cồn 70%. Mảnh khoai tây được đặt trong đĩa petri giữ ẩm bằng giấy thấm vô trùng. Một lúp khuẩn lạc vi khuẩn nuôi cấy trên môi trường King's B trong 36 giờ được đặt vào giữa miếng khoai tây. Sau đó, đĩa petri được đặt ở nhiệt độ 20 - 24^{o}C trong 48 giờ. Quan sát và ghi nhận hiện tượng thối mềm xảy ra hay không sau khi gạt bỏ lớp vi khuẩn (Goszczynska *et al.*, 2000).

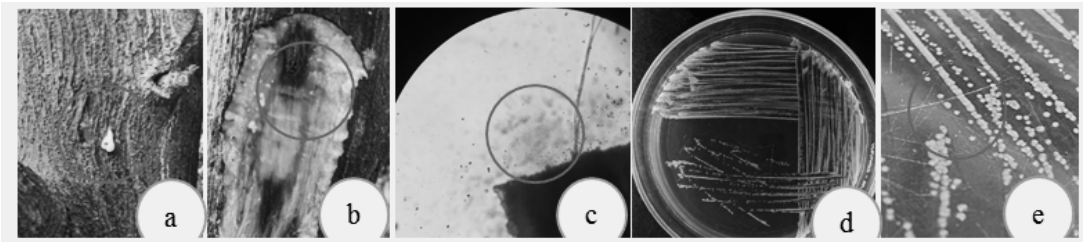
Kiểm tra khả năng vi khuẩn tăng trưởng trong môi trường Tween 80: 4 ml môi trường Tween 80 (2 g KH_2PO_4, 0,1 g $MgSO_4.7H_2O$, 5 g NaCl, 0,5g $(NH_4)_2SO_4$, 10 ml Tween 80, 1000 ml nước cất, pH 6,8) được chuẩn bị cho vào ống nghiệm và thanh trùng ở 121^oC trong 20 phút. Sau đó, cấy nguồn vi khuẩn gây bệnh ở thể tăng trưởng vào ống nghiệm và đặt ở 37^oC trên máy lắc ngang, ghi nhận sự phát triển vi khuẩn sau 24 giờ và 48 giờ. Môi trường trong ống nghiệm chuyển từ không màu sang màu trắng đục sau khi thêm vi khuẩn ở thời điểm 24 giờ và 48 giờ chứng tỏ vi khuẩn có sử dụng Tween 80 làm nguồn carbon duy nhất để phát triển, ngược lại môi trường vẫn như nguyên như ban đầu chứng tỏ vi khuẩn không có khả năng sử dụng Tween 80 làm nguồn carbon để phát triển (Arai *et al.*, 1970 có sửa đổi). Đối chứng dương là ống nghiệm nuôi cấy vi khuẩn *Xanthomonas* phát triển được trên môi trường Tween 80 (Goszczynska *et al.*, 1998).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập mẫu bệnh, kiểm chứng khả năng gây bệnh theo quy trình Koch

Bệnh loét thân xì mủ gây hại chủ yếu ở những cây từ 2 năm tuổi, triệu chứng ngoài vườn chủ yếu là các giọt mủ màu trắng chảy ra từ thân cây (Hình 2a), sau khi cạo lớp vỏ thân ra, ta thấy các mạch dẫn bị hóa nâu (Hình 2b), hiện tượng nứt thân chỉ xuất hiện khi cây đã chết một thời gian.

Mẫu được phân lập và quan sát dưới kính hiện vi để kiểm tra dòng tuôn vi khuẩn trên vật kính 10X (Hình 2c), tiến hành nuôi cấy và tách ròng sau đó quan sát đặc điểm hình thái của khuẩn lạc (Hình 2d, 2e).

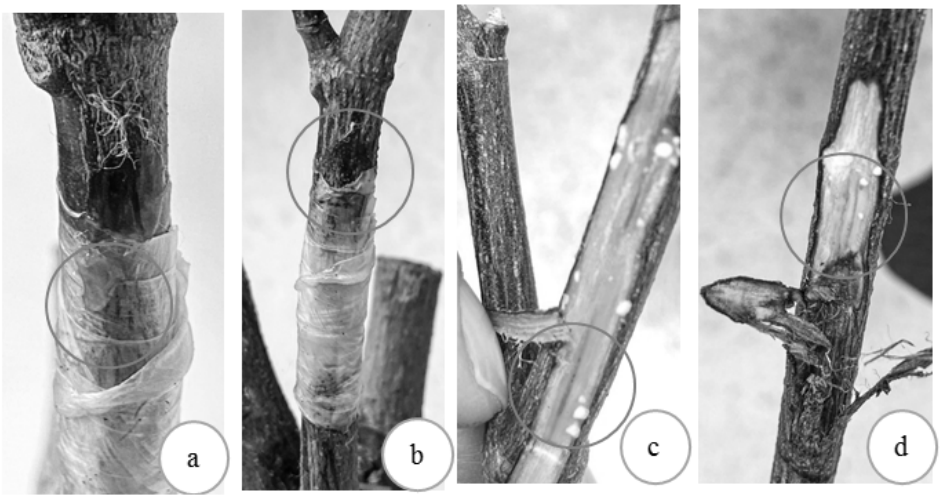


Hình 2. Triệu chứng vết bệnh, dòng tuôn vi khuẩn và khuẩn lạc vi khuẩn đã tách ròng

Kết quả kiểm tra khả năng gây phản ứng siêu nhạy cảm trên cây ớt để loại trừ khả năng là vi khuẩn hoại sinh cho thấy mẫu vi khuẩn phân lập có khả năng gây phản ứng siêu nhạy cảm trên ớt (Hình 3).

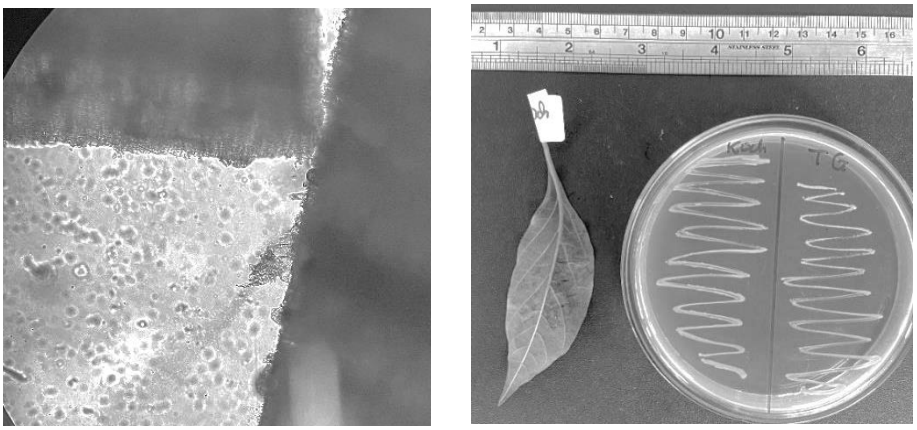
Hình 3. Phản ứng siêu nhạy cảm tạo ra trên lá ớt khi tiêm các dòng vi khuẩn phân lập được sau 24 giờ

Kết quả lây bệnh nhân tạo sau 3 tuần quan sát, có 1 dòng vi khuẩn gây bệnh thể hiện rõ các triệu chứng điển hình của bệnh (Hình 4). Sau đó tiến hành tái phân lập và so sánh với mầm bệnh được phân lập lúc ban đầu (Hình 5).



Hình 4. Triệu chứng vết bệnh quan sát được sau khi lây bệnh
(a) Vết bệnh sau khi lây bệnh 7 ngày, (b) Vết bệnh sau khi lây bệnh 14 ngày,
(c) Mạch dẫn hóa nâu sau 21 ngày lây bệnh (phía dưới vị trí đã lây bệnh),
(d) Mạch dẫn hóa nâu sau 21 ngày lây bệnh (phía trên vị trí đã lây bệnh)

Kết quả kiểm tra dòng tuôn vi khuẩn tại vị trí mạch dẫn hóa nâu dưới kính hiển vi ghi nhận vi khuẩn tuôn dòng với mật số cao (Hình 5a). Mẫu vi khuẩn tái phân lập cho hình thái giống như nguồn vi khuẩn lây bệnh phân lập được lúc ban đầu và cũng gây phản ứng siêu nhạy cảm trên ớt (Hình 5b). Như vậy, dòng vi khuẩn lây bệnh nhân tạo là tác nhân gây loét thân xì mủ trên mít Siêu Sớm.



Hình 5. Kiểm tra sự hiện diện vi khuẩn trong mô thực vật sau lây bệnh và kết quả tái phân lập vi khuẩn từ mô bệnh
a) Dòng tuôn vi khuẩn quan sát trên kính hiển vi ở vật kính 10X,
(b) Kiểm tra phản ứng siêu nhạy cảm và so sánh hình thái khuẩn lạc với mầm bệnh ban đầu

3.2. Kết quả định danh tác nhân bằng phương pháp sinh hóa

- Kiểm tra Gram vi khuẩn với dung dịch KOH 3% (Shurtleff và Averre, 1997):

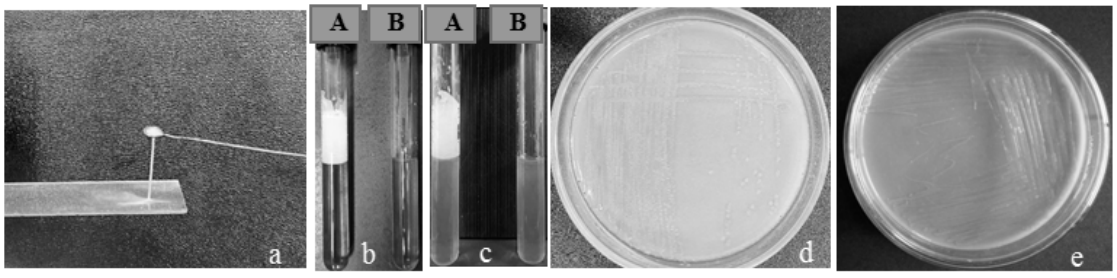
Khuẩn lạc vi khuẩn gây bệnh có hiện tượng tạo keo nhầy và kéo sợi chỉ (Hình 6a), vậy nên có thể kết luận vi khuẩn này thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm gồm một số chi như: *Pectobacterium, Pantoea, Xylophilus, Xanthomonas, Pseudomonas, Acidivoras, Ralstonia* theo Schaad *et al.* (2010).

- Kiểm tra khả năng sử dụng carbonhydrate trong điều kiện hiếu và yếm khí:

Sau 48 giờ nuôi vi khuẩn trong ống nghiệm A ở điều kiện hiếu khí (không phủ lớp parafin) và ống nghiệm B ở điều kiện yếm khí (có phủ parafin), môi trường nuôi cấy đều đổi màu từ xanh sang vàng (Hình 6b và 6c). Sự chuyển màu là do trong quá trình sinh trưởng, vi khuẩn đã sinh ra acid làm cho pH trong môi trường chuyển từ tính kiềm (pH 7,1) sang tính acid. Chứng tỏ mẫu vi khuẩn có khả năng sinh trưởng, phát triển và sử dụng nguồn dinh dưỡng là glucose có trong môi trường. Theo Schaad *et al.*(2001), dựa vào đặc tính có thể sinh trưởng và phát triển trong môi trường yếm khí và hiếu khí nên dòng vi khuẩn này được xác định thuộc một trong hai chi *Pantoea* và *Pectobacterium.*

- Kiểm tra khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn trên môi trường YDC:

Mẫu vi khuẩn gây bệnh loét thân xì mủ trên cây mít được cấy lên môi trường YDC. Sau 48 giờ đặt trong điều kiện phòng, kết quả cho thấy vi khuẩn được phân lập sinh trưởng, phát triển tạo khuẩn lạc màu trắng trơn bóng trên môi trường YDC (Hình 6d). Như vậy, ta có thể kết luận được đũa vi khuẩn gây bệnh thuộc chi *Pectobacterium* (Schaad *et al.*, 2001).

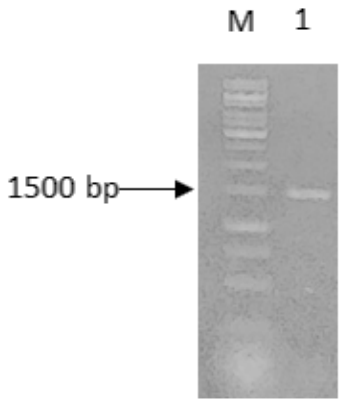


Hình 6. Kết quả định danh tác nhân bằng phương pháp sinh hóa
(a) Kiểm tra Gram vi khuẩn với KOH 3%; (b, c) Kiểm tra khả năng vi khuẩn sống ở điều kiện yếm khí và hiếu khí; (d) Vi khuẩn *Pectobacteriu*m tạo khuẩn lạc màu trắng trên môi trường YDC, (e) Vi khuẩn *Xanthomonas* tạo khuẩn lạc màu vàng trên môi trường YDC (Schaad *et al.*, 2001)

3.3. Định danh tác nhân bằng phương pháp sinh học phân tử

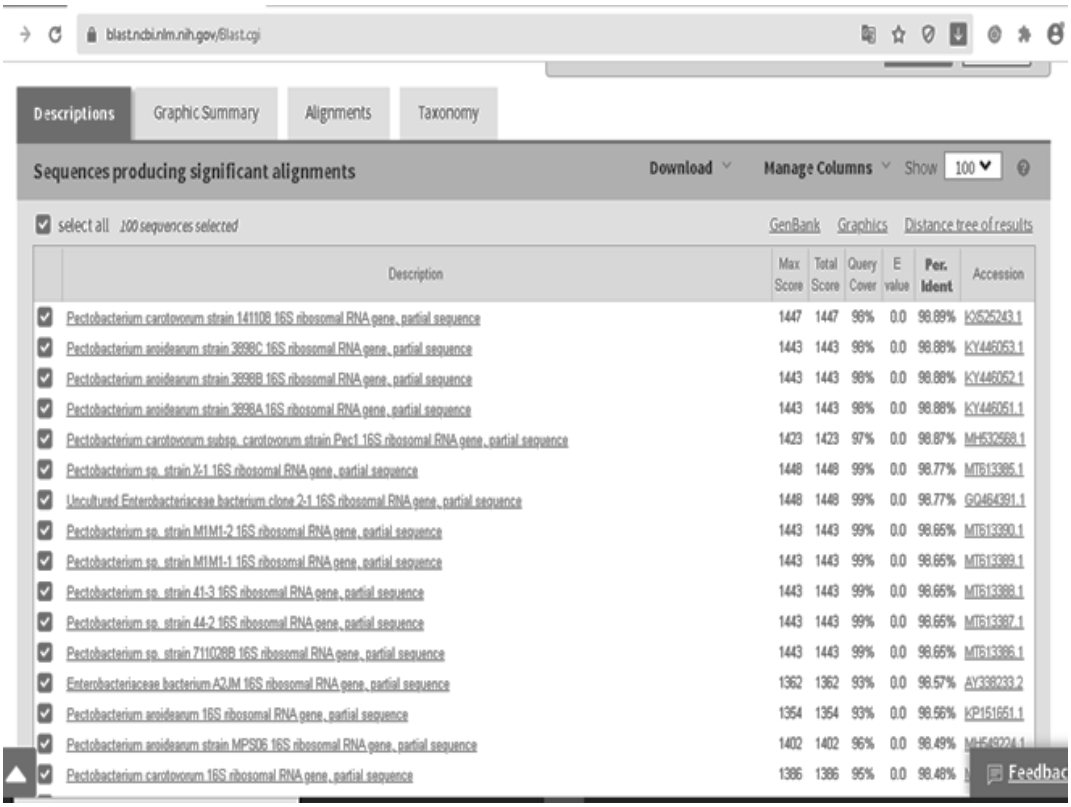
Dựa vào kết quả định danh bằng phương pháp sinh hóa thì bước đầu đã xác định được vi khuẩn phân lập được cây mít bị bệnh loét thân xì mủ là chi *Pectobacterium*.

Qua kết quả chạy PCR, sản phẩm khuyếch đại bởi cặp mồi 27F/1492R thể hiện băng trên gel agarose 1% với trọng lượng phân tử 1500 bp (Hình 7). Sau khi giải trình tự, kết quả so sánh với các trình tự trên NCBI bằng công cụ tìm kiếm BLAST (Hình 8) ghi nhận tương đồng cao trên 98,8% với hai loài *Pectobacterium carotovorum* và *Pectobacterium aroidearum*.



M: Thang chuẩn 1kb,
Giếng 1: dòng VK gây bệnh

Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm PCR dòng vi khuẩn gây loét thân xì mủ sử dụng cặp mồi 27F và 1492R

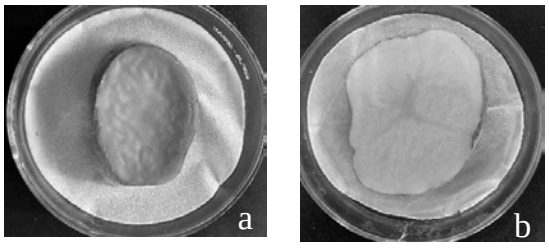


Hình 8. Kết quả so sánh kết quả giải trình tự gen 16S rDNA với ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST

Vì vậy, để xác định chính xác loài gây hại trên mít Siêu Sớm, đặc tính sinh hóa của 2 loài này cần phải được khảo sát.

3.4. Khả năng gây thối mềm khoai tây và khả năng tăng trưởng trên môi trường Tween 80 của dòng vi khuẩn gây bệnh

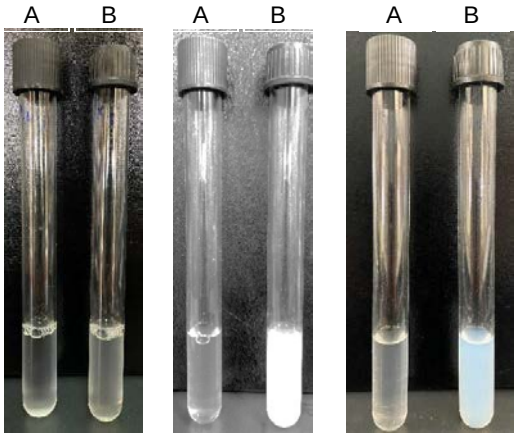
Kết quả kiểm tra khả năng gây thối mềm trên củ khoai tây sau 48 giờ cho thấy củ khoai tây bị thối mềm và có mùi hôi. Kết quả này cũng giống như nghiên cứu của Nabhan *et al.* (2013) đã công bố các hai vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum* và *P. aroidearum* có gây hiện tượng thối mềm trên khoai tây.



Hình 9. Khả năng gây thối mềm trên khoai tây của dòng vi khuẩn gây bệnh

(a) Mảnh khoai tây bị thối nhũn khi có cấy vi khuẩn gây bệnh
(b) Mảnh khoai tây đối chứng không có cấy vi khuẩn

Kết quả kiểm tra trên môi trường Tween 80 sau 24 giờ và 48 giờ (Hình 10) cho thấy vi khuẩn gây bệnh loét thân xì mủ không có khả năng sinh trưởng trong môi trường Tween 80 (ống nghiệm A vẫn giữ nguyên màu môi trường), còn đối với mẫu vi khuẩn *Xanthomonas* sp. (đối chứng) sinh trưởng được nên làm cho môi trường từ màu trắng sang màu trắng đục (ống nghiệm B). Dựa theo kết quả nghiên cứu của Nabhan *et al.* (2013) thì loài *Pectobacterium aroidearum* có khả năng sinh trưởng trên môi trường Tween 80, còn loài *Pectobacterium carotovorum* không có khả năng sinh trưởng trên môi trường Tween 80.



Hình 10. Kết quả kiểm tra khả năng sinh trưởng trên môi trường Tween 80

Ống nghiệm A: Đũa vi khuẩn gây bệnh loét thân xì mủ
Ống nghiệm B: Đũa vi khuẩn *Xanthomonas* sp. (đối chứng)
(a) Thời điểm vừa thêm vi khuẩn
(b) Thời điểm 24 giờ sau khi nuôi lắc vi khuẩn
(c) Thời điểm 48 giờ sau khi nuôi lắc vi khuẩn

Như vậy, mẫu vi khuẩn gây bệnh loét thân xì mủ trên mít là loài *Pectobacterium carotovorum.* Kết quả này tương đồng với ghi nhận của Varrket *et al.* (2015) và Lê Thanh Toàn (2019), chính là *Erwinia carotovora* hiện nay được gọi là *Pectobacterium carotovorum* là tác nhân gây bệnh loét thân xì mủ trên mít. Nghiên cứu này dựa vào phương pháp định danh truyền thống trước để xác định chi vi khuẩn, sau đó mới sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử kết hợp với đặc tính sinh hóa để xác định đến mức độ loài. Kết quả này khẳng định được dòng vi khuẩn gây loét thân xì mủ trên mít tại Tiền Giang là *Pectobacterium carotovorum.*

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Tác nhân gây bệnh loét thân xì mủ trên mít Siêu Sớm ở Tiền Giang được xác định là loài *Pectobacterium carotovorum* sử dụng phương pháp sinh hóa và sinh học phân tử. Việc xác nhận chính xác tác nhân là cơ sở khoa học cần thiết để nghiên cứu phát triển các biện pháp phòng trừ hiệu quả.

Để phát triển bền vững ngành sản xuất mít, việc nghiên cứu biện pháp quản lý bệnh loét thân chảy nhựa là cấp thiết.

Lời cảm ơn

Đề tài được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp Bộ "Nghiên cứu chọn tạo giống và quy trình kỹ thuật thâm canh cây mít cho một số vùng chính ở các tỉnh phía Nam".

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. 5th edition. University of Florida. 992 pages.
2. Arai T, Enomoto S., and Goto S. (1970). Determination of *Pseudomonas aeruginosa* by Biochemical Test Methods. *Japan. J. Microbiol. Vol*. 14 (4), 285 - 290.
3. Burgess, L.W., E.K. Timothy, L. Tesoriero và Phan Thúy Hiền (2009). Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam. ACIAR. 210 pages.
4. Chuenchitt S. and Wismitanant B. (1996). Die-back: A new bacterial disease of champedak jack-fruit (Artocarpus sp. (Merr.) Thumb.). Agris 10(1-2): 19-29. Abstract in English.
5. Goszczynska T and Serfontein J.J (1998). Milk-Tween agar, a semiselective medium for isolation and differentiation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Journal of Microbiological Methods* 32: 65-72
6. Goszczynska T, Serfontein J.J. and Serfontein S. (2000). Introduction to practical phytobacteriology. Bacterial Diseases Unit ARC - Plant Protection Research Institute Pretoria, South Africa.17 pages.
7. Himel R. M., Khan A. A., Akanda A.M, Karim M. (2016). Characterization and identification of soft rot bacterial pathogens of different fruits in Bangladesh. *International Journal of Biosciences* 9(1) 1 - 9.
8. http://txcailay.tiengiang.gov.vn/chi-tiet-tin?/Benh-nut-than-xi-mu-va-so-den-mui-mit-gay-thiet-hai-cho-nha-vuon/7957587
9. Nguyễn Sự, https://baomoi.com/tien-giang-mo-rong-vung-chuyen-canh-cay-an-qua/c/36310016.epi
10. https://vov.vn/kinh-te/gia-mit-tang-cao-nong-dan-tien-giang-trong-o-at-bat-chap-khuyen-cao-967938.vov
11. Janse J.D. (2009). Phytobacteriology principles and practice. CABI.
12. Junior J.C. R., Tamanini R.,; Fritegoto B., de Oliveira A. M.; de Godoi Silva F., Fernandes F.; Augusto N. A., Beloti V. (2016). Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. *Ciências Agrárias, Londrina*, 37(5) 3069-3078.
13. Lê Thanh Toàn, Lê Thị Thu Hà, Nguyễn Văn Chí Hải, Thái Ngọc Oanh, Phan Văn Hướng, Đỗ Văn Bảo. Nguyễn Văn Măng (2019). Xác định tác nhân và hiệu quả phòng trị của một số nông dược đối với bệnh thối thân xì mủ trên cây mít Changrai. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn 2: 17 - 23
14. Nabhan S, De Boer S.H., Maiss E. and Wydra K. (2013). *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 2520 - 2525.
15. Schaad N.W., Jones J.B. and W. Chun (2001). Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria. *Third edition. APS press.*
16. Shurtleff, M. C. and C. W. Averre (1997). The plant disease clinic and field diagnosis of abiotic diseases. St Paul, MN, USA: APS Press.
17. Vareket, R.; Thaveechai, N.; Hongprayoon, C.; Kositcharoenkul, N.; Chuenchitt, S.; W. Kositratana (2005). Identification and serological detection of bacterial organism causing die-back disease of jackfruit and champedak. Proceedings of 43rd Kasetsart University Annual Conference, Subject: Plants: 254 - 261.
18. Zhang, W., Y. Chen, Q. Shi, B. Hou, and Q. Yang (2020) Identification of bacteria associated with periapical abscesses of primary teeth by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. Microb. Pathog. 141:103954.

NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN VI KHUẨN VÙNG RỄ TRONG PHÒNG TRỪ BỆNH THỐI HẠT TRÊN LÚA DO VI KHUẨN *Burkholderia glumae*

Nguyễn Thị Thu Nga, Nguyễn Văn Khởi

Bộ môn Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Cần Thơ
Email: nttnga@ctu.edu.vn

ABSTRACT

Study on screening of rhizobacteria for biological control of grain rot on rice caused by *Burkholderia glumae*

Grain rot or bacterial panicle blight caused by Burkholderia glumae is important disease on rice. In Vietnam, the disease reduce 75% yield loss in severe infested field. Disease control based on chemical method cause negative effect on environment and also promote development of resistant strain. This study focus on biological control of the disease using rhizobacteria with aim to screen promising antagonistic bacteria can inhibit pathogenic bacterium and can control the grain rot disease on rice. In in vitro test, nine from thirty-six tested rhizobacteria showed antagonistic ability to B. glumae with inhibition zone from 0.6 -11.8 mm, two strains Pseudomonas fluorescens 28 and P. fluorescens 44 showed highest inhibition zone. When apply suspension of these strains (10^8cfu/ml) on rice plant at 2 days before flowering and 5 days after flowering can reduced disease very good and increase yield compared nontreated control in greenhouse conditions.

Keywords: *Antagonistic bacteria, Burkholderia glumae, grain rot, rice.*

I. GIỚI THIỆU

Bệnh thối hạt hay còn gọi là bệnh lép vàng do vi khuẩn *Burkholderia glumae* là bệnh gây hại năng suất quan trọng trên lúa ở nhiều quốc gia trên thế giới và cả Việt Nam (Trung *et al.*, 1993; Ham *et al.*, 2011; Riera-Ruiz *et al.*, 2014; Zhou, 2014). Bệnh thường xuyên gây hại trên lúa ở đồng bằng sông Cửu Long, đặc biệt vào vụ Hè Thu và Thu Đông do mưa nhiều (Phạm Văn Kim, 2016). Vi khuẩn tấn công lúa cả giai đoạn cây con, giai đoạn lúa trổ và phát triển hạt (Agarwal *et al.*, 1989), tuy nhiên gây hại năng suất nhiều nhất vào giai đoạn trổ và giai đoạn sau thụ phấn (ngậm sữa và vào bột). Gié

Người phản biện: PGS.TS. Trần Vũ Phến.

lúa bị bệnh giai đoạn trổ làm hạt bị lép nên gọi là bệnh lép vàng hay lép xanh. Vi khuẩn tấn công giai đoạn sau khi phôi đã hình thành thì gây triệu chứng thối phôi nhũ dẫn đến hạt không vào chắc được.Vì vậy bệnh có tên là lép vàng hoặc thối hạt tùy giai đoạn bông lúa nhiễm bệnh. Nếu bệnh nặng có thể làm thất thu năng suất lên tới 75%, làm giảm trọng lượng hạt, hạt không thụ phấn được làm bông bị đứng không cúi được (bạc bông), ngoài ra vi khuẩn còn ức chế sự nảy mầm của hạt khi vi khuẩn lưu tồn trong hạt giống (Agarwal *et al.*, 1989; Trung *et al.*, 1993). Trên thế giới bệnh được ghi nhận là mầm bệnh cần quan tâm trong điều kiện biến đổi khí hậu hiện nay (Ham *et al.*, 2011). Biện pháp phòng trừ bệnh thối hạt do *B. glumae* chủ lực vẫn là biện pháp hóa học. Tuy nhiên biện pháp này thường ô nhiễm môi trường, nông sản nhiễm dư lượng thuốc BVTV và mầm bệnh cũng dễ hình thành nòi kháng (Hikichi *et al.*, 1998). Biện pháp sinh học sử dụng vi khuẩn vùng rễ kích thích cây trồng tăng trưởng (plant growth promoting rhizobacteria) trong phòng trừ bệnh hại trên cây lúa góp phần giảm việc sử dụng thuốc hóa học được ghi nhận (Zhou *et al.*, 2020). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tuyển chọn được các chủng vi khuẩn vùng rễ đối kháng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *B. glumae* trong điều kiện *in vitro* và hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt (lép vàng) cao trong điều kiện nhà lưới là nghiên cứu cơ sở để tiếp tục nghiên cứu ứng dụng trong phòng trị bệnh ngoài đồng.

II. PHƯƠNG TIỆN PHƯƠNG PHÁP

2.1. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn vùng rễ có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Burkholderia glumae* gây bệnh thối hạt trong điều kiện *in vitro*

- Mục đích: Tuyển chọn các chủng vi khuẩn đối kháng tốt với vi khuẩn *B. glumae* để nghiên cứu hiệu quả phòng trừ bệnh thối hạt ở điều kiện nhà lưới.

- Vật liệu: 36 chủng vi khuẩn vùng rễ (VKVR) được cung cấp tại Bộ môn Bảo vệ thực vật được ghi nhận có khả năng đối kháng một trong các vi khuẩn gây bệnh gồm *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* và *Erwinia carotovora*. Nguồn vi khuẩn *B. glumae* chủng TT-ST12 có khả năng gây hại cao nhất đã có thực hiện qua thí nghiệm đánh giá khả năng gây hại trong điều kiện nhà lưới (Bộ môn Bảo vệ thực vật cung cấp).

- Phương pháp: Thực hiện đánh giá khả năng đối kháng nhanh không lặp lại của 36 chủng VKVR đối với vi khuẩn *B. glumae* trên đĩa petri, sau đó các chủng vi khuẩn thể hiện khả năng đối kháng sẽ được chọn để thực hiện thí nghiệm so sánh khả năng đối kháng với vi khuẩn *B. glumae* với 4 lần lặp lại. Các chủng vi khuẩn vùng rễ và vi khuẩn *B. glumae* được nuôi trong môi trường King'B lỏng (50 ml) trên máy lắc ngang HY2 với vận tốc 150 vòng/phút trong 48 giờ. Sau đó rút 25 µl huyền phù vi khuẩn gây bệnh vào ống nghiệm chứa 12 ml môi trường King'B agar đã được nấu tan và giữ ở 50^{o}C, lắc đều bằng vortex sau đó đổ ra đĩa petri đã thanh trùng và để nguội.

Nhúng khoanh giấy thấm (đường kính 5 mm) đã thanh trùng vào ống nghiệm chứa huyền phù vi khuẩn đối kháng và đặt lên đĩa petri có chứa vi khuẩn gây bệnh theo 4 điểm đã được đánh dấu trước, đĩa petri được đặt trong tủ úm 28^{o}C. Ghi nhận bán kính vòng vô khuẩn (mm) vào 1, 2 và 3 ngày sau khi bố trí.

2.2. Khảo sát hiệu quả phòng trừ bệnh thối hạt vi khuẩn *Burkholderia glumae* của các chủng vi khuẩn đối kháng ở điều kiện nhà lưới

- Mục đích: Xác định khả năng phòng trị bệnh thối hạt do *B. glumae* của các chủng vi khuẩn đối kháng tuyển chọn.

- Vật liệu: Chủng vi khuẩn *B. glumae* TT-ST12 và 2 chủng vi khuẩn vùng rễ có khả năng đối kháng cao tuyển chọn được từ thí nghiệm 2.1, thuốc hóa học Starner 20WP (hoạt chất oxolinic acid)

- Phương pháp: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 5 nghiệm thức (1) chủng vi khuẩn đối kháng 1; (2) chủng vi khuẩn đối kháng 2; (3) Thuốc Starner; (4) Đối chứng. Mỗi nghiệm thức gồm 4 lần lặp lại (1 chậu lúa/ mỗi lặp lại).

- Chuẩn bị cây lúa: Đất trồng lúa được trộn đều cho vào chậu nhựa (đường kính 25 cm) chứa 7 kg đất/chậu. Thực hiện ngâm nước, xả phèn cho đất trước khi gieo. Giống lúa OM 4900 trước khi gieo được xử lý trong nước muối 15%, sau đó ngâm trong nước ấm (50^{0}C) và tiếp tục ngâm qua đêm, sau đó và đem ủ ấm ở nhiệt độ 35^{0}C trong 2 ngày. Hạt nảy mầm được gieo vào trong chậu với 5 hạt/ chậu. Lượng phân bón theo công thức phân N-P_2O_5-K_2O là 120-40-50 kg/ha (Nguyễn Ngọc Đệ, 2008) áp dụng dựa trên diện tích chậu cụ thể là 1,3 (g) urea - 0,98 (g) lân supe - 0,41 (g) KCl trên chậu (0,049 m^2), phân được hòa tan vào nước tưới đều cho tất cả các chậu. Vào giai đoạn 5 ngày trước trổ đều, tiến hành lây bệnh nhân tạo với 10 chồi hữu hiệu ở mỗi chậu (tương đương với 10 bông lúa).

- Cách lây bệnh: Lây bệnh nhân tạo trước khi lúa trổ 5 ngày. Phun đều toàn bông lúa với huyền phù vi khuẩn *B. glumae* với mật số 10^8 cfu/ml (tương đương 50 ml/chậu) vào lúc chiều mát.

- Cách xử lý vi khuẩn đối kháng và thuốc hóa học: Vi khuẩn vùng rễ với huyền phù vi khuẩn vùng rễ với mật số 10^8 cfu/ml và thuốc Starner (nồng độ khuyến cáo 1,25 g/lít) được phun lên bông hai lần vào 2 ngày trước khi lây bệnh và 5 ngày sau khi lây bệnh.

- Ghi nhận chỉ tiêu:

(1) Tỷ lệ bệnh (%): Số bông bị nhiễm bệnh/Tổng số bông trên chậu × 100

(2) Cấp bệnh: Phân thành 5 cấp theo thang đánh giá IRRI (2002):

- Cấp 1: < 1% số hạt bị bệnh trên tổng số hạt.

- Cấp 3: > 1 đến 5% số hạt bị bệnh trên tổng số hạt.

- Cấp 5: > 5 đến 25% số hạt bị bệnh trên tổng số hạt.

- Cấp 7: > 25 - 50% số hạt bị bệnh trên tổng số hạt.

- Cấp 9: > 50% số hạt bị bệnh trên tổng số hạt.

(3) Chỉ tiêu năng suất giai đoạn thu hoạch: Ghi nhận tỷ lệ hạt chắc, trọng lượng hạt (g/chậu) ở ẩm độ 14%.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng Excel và phân tích thống kê bằng phần mềm thống kê MSTATC qua phép thử Duncan.

III. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

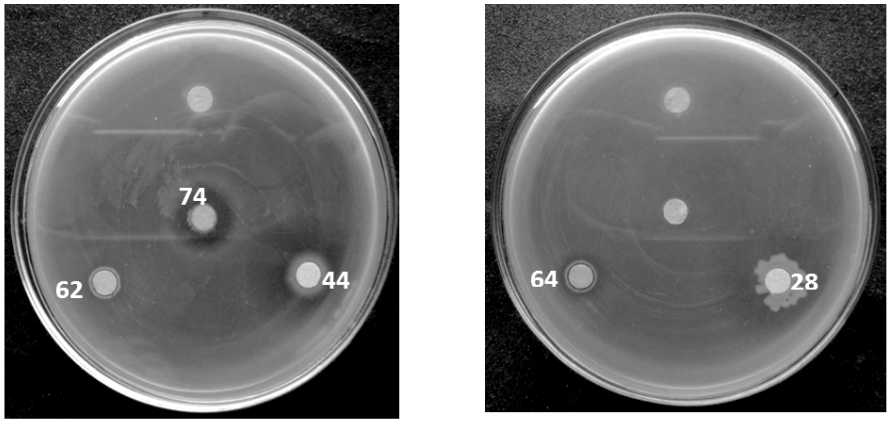
3.1. Kết quả đánh giá khả năng đối kháng của các chủng vi khuẩn vùng rễ đối với vi khuẩn *Burkholderia glumae* chủng TT-ST12 gây bệnh thối hạt (lép vàng) trong điều kiện *in vitro*

Qua kết quả đánh giá nhanh ghi nhận có 9 trong tổng số 36 chủng vi khuẩn thể hiện khả năng đối kháng với *B. glumae*. Kết quả so sánh khả năng đối kháng của 9 chủng vi khuẩn đối với *B. glumae* chủng TT-ST12 được trình bày ở Bảng 1. Ở một ngày sau khi cấy (NSKC), chỉ có 5 chủng thể hiện khả năng đối kháng với vi khuẩn *B. glumae*. Trong đó, chủng vi khuẩn 44 (*P. fluorescens*) thể hiện khả năng đối kháng cao nhất với bán kính vòng vô khuẩn là 9,0 mm, cao hơn và khác biệt ý nghĩa so với các chủng còn lại, kế đến là chủng vi khuẩn 28 (*P. fluorescens*) với bán kính vòng vô khuẩn là 7,0 mm. Ở 3 NSKC, tất cả 9 chủng vi khuẩn vùng rễ thể hiện khả năng đối kháng với vi khuẩn *B. glumae*, chủng vi khuẩn 44 (*P. fluorescens*) thể hiện bán kính vô khuẩn cao nhất đạt 10,9 mm; khác biệt ý nghĩa so với các chủng còn lại, kế đến là chủng vi khuẩn 28 (*P. fluorescens*) và chủng vi khuẩn 74 (chưa xác định tên) với bán kính vòng vô khuẩn lần lượt là 8,1 mm và 5,0 mm.

Bảng 1. Khả năng đối kháng của 9 chủng vi khuẩn vùng rễ đối với vi khuẩn B. glumae chủng TT-ST12 trong điều kiện phòng thí nghiệm

TT	Mã số	Chủng	Bán kính vòng vô khuẩn (mm) qua các thời điểm		
			1NSKC	3NSKC	5NSKC
1	7	Cxđ	0,0 ^{e}	1,0 f	1,0 g
2	28	*P. fluorescens*	7,0 ^{b}	8,1 ^{b}	9,1 ^{b}
3	44	*P. fluorescens*	9,0 ^{a}	10,9 ^{a}	11,8 ^{a}
4	62	*P. fluorescens*	1,0 ^{d}	2,0 ^{e}	2,1 ^{e}
5	64	*P. fluorescens*	1,0 ^{d}	3,1 ^{d}	4,1 ^{d}
6	74	Cxđ	2,9 ^{c}	5,0 ^{c}	5,3 ^{c}
7	83	*Pseudomonas* sp.	0,0 ^{e}	1,0 f	0,6 h
8	113	*Bacillus* sp.	0,0 ^{e}	1,1 f	1,5 f
9	184	*Bacillus* sp.	0,0 ^{e}	0,5 g	1,9 ^{e}
Mức ý nghĩa			*	*	*
CV (%)			*3,59*	*4,58*	*5,56*

Ghi chú: Trong cùng một cột những số theo có cùng chữ cái theo sau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan, * khác biệt ở mức ý nghĩa 5%, NSKC: ngày sau khi cấy; cxđ: chưa xác định tên.



Hình 1. Khả năng đối kháng của các chủng vi khuẩn vùng rễ đối với *Burkholderia glumae* chủng TT-ST12 trong điều kiện *in vitro* ở thời điểm 1 NSKC (*28: P. fluorescens, 44: P. fluorescens, 62: P. fluorescens, 64: P. fluorescens, 74: cxđ*)

Tóm lại qua kết quả tuyển chọn trong phòng thí nghiệm hai chủng vi khuẩn kháng *P. fluorescens* 28 và *P. fluorescens* 44 thể hiện khả năng đối kháng cao nhất đối với vi khuẩn *B. glumae* nên được chọn để khảo sát hiệu quả phòng trị bệnh ở điều kiện nhà lưới

3.2. Hiệu quả phòng trừ bệnh thối hạt của vi khuẩn đối kháng ở điều kiện nhà lưới

Kết quả đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh của hai chủng vi khuẩn đối kháng *P. fluorescens* 28 và *P. fluorescens* 44 khi xử lý 2 lần vào 2 ngày trước trổ và 5 ngày sau khi trổ ghi nhận trên tỉ lệ bông bị bệnh (Bảng 2) và cấp bệnh (Bảng 3) qua các thời điểm sau khi lây bệnh

Về tỉ lệ bông bị bệnh trên chậu ở thời điểm 7 và 15 NSKLB hai nghiệm thức xử lý vi khuẩn và nghiệm thức thuốc Starner đều có tỉ lệ bông bệnh thấp hơn khác biệt so với đối chứng, trong đó nghiệm thức xử lý vi khuẩn *P. fluorescens* 28 có tỉ lệ bông bị bệnh thấp hơn khác biệt với vi khuẩn *P. fluorescens* 44 ở 7 NSKLB. Đến 23 NSKLB, chỉ riêng nghiệm thức xử lý Starner là có tỉ lệ bệnh thấp hơn khác biệt so với đối chứng và các nghiệm thức còn lại.

Bảng 2. Tỷ lệ bệnh (%) của các nghiệm thức ở các thời điểm sau khi lây bệnh

Nghiệm thức	7NSKLB	15NSKLB	23NSKLB
P. fluorescens 28	15,7^{cd}	72,9^{e}f	99,2^{ab}
P. fluorescens 44	35,3^{b}	85,4^{de}	99,2^{ab}
Thuốc Starner	7,7^{de}	60,1fg	67,8^{d}
ĐC có lây bệnh	90,3^{a}	100,0^{a}	100,0^{a}
ĐC không lây bệnh	0,0^{e}	0,0h	0,0^{e}
Mức ý nghĩa	*	*	*
CV (%)	*31,76*	*10,34*	*9,78*

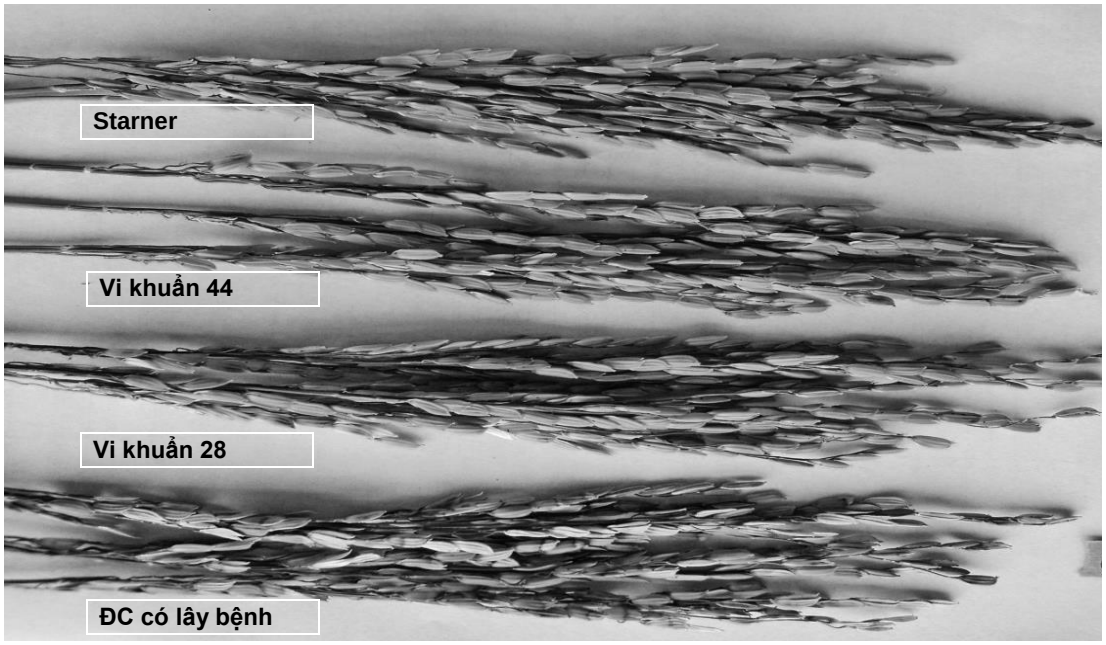
Ghi chú: * khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. Các số trung bình trong cùng một cột có cùng chữ cái theo sau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử Duncan. Số liệu trước khi thống kê được chuyển đổi sang acrsin$\sqrt{x/100}$ với x là tỷ lệ bệnh tính bằng %. NSKLB: ngày sau khi lây bệnh, ĐC: đối chứng.

Kết quả ghi nhận về cấp bệnh (Bảng 3) cho thấy hai nghiệm thức xử lý vi khuẩn *P. fluorescens* 28 và *P. fluorescens* 44 đều thể hiện giảm cấp bệnh trên hạt so với đối chứng không xử lý cả 3 thời điểm khảo sát, trong đó giai đoạn 7 và 15 NSKLB thì nghiệm thức xử lý *P. fluorescens* 28 thể hiện hiệu quả hơn so với nghiệm thức *P. fluorescens* 44. Nghiệm thức Starner thể hiện hiệu quả cao giảm bệnh cao hơn so với hai nghiệm thức xử lý vi khuẩn đối kháng. Hình 2 cho thấy về mức độ nhiễm bệnh của các hạt trên bông giữa các nghiệm thức cho thấy vi khuẩn vùng rễ đã mang lại hiệu quả phòng trị tốt.

Bảng 3. Cấp bệnh thối hạt của các nghiệm thức ở các thời điểm sau khi lây bệnh

Nghiệm thức	7NSKLB	15NSKLB	23NSKLB
P. fluorescens 28	$0,8^{cd}$	$3,3^{cd}$	$4,6^{cd}$
P. fluorescens 44	$1,4^{bc}$	$4,5^{b}$	$4,9^{bc}$
Thuốc Starner	$0,3^{de}$	$2,5^{e}$	$3,2^{f}$
ĐC có lây bệnh	$4,4^{a}$	$6,8^{a}$	$7,1^{a}$
ĐC không lây bệnh	$0,0^{e}$	$0,0^{f}$	$0,0^{g}$
Mức ý nghĩa	*	*	*8,0*
CV (%)	*28,35*	*15,45*	*5,95*

Ghi chú: * khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. Các số trung bình trong cùng một cột có cùng chữ cái theo sau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử Duncan. NSKLB: ngày sau khi lây bệnh.



Hình 2. Mức độ bệnh thối hạt trên bông ở các nghiệm thức ở 15 ngày sau lây bệnh

*** Về chỉ tiêu năng suất**

Về các chỉ tiêu tỉ lệ hạt chắc cho thấy hai nghiệm thức xử lý vi khuẩn và thuốc Starner đều có tỉ lệ hạt chắc cao hơn khác biệt với đối chứng không xử lý có lây bệnh, trong đó tỉ lệ hạt chắc cao nhất là nghiệm thức Starner, kế đế nghiệm thức vi khuẩn *P. fluorescens* 28 và *P. fluorescens* 44. Về trong lượng hạt trên chậu ghi nhận tất cả các nghiệm thức phòng trị đều đạt cao hơn nghiệm thức đối chứng gần gấp đôi, trong đó nghiệm thức xử lý Starner đạt trọng lượng hạt cao nhất (27,00 g/chậu), kế đến là 2 nghiệm thức xử lý với *P. fluorescens* 28 (24,52 g/chậu) và *P. fluorescens* 44 (23,60 g/chậu), trong khi đối chứng không xử lý chỉ đạt 12,30 g/chậu.

Bảng 4. Tỉ lệ hạt chắc và trọng lượng hạt trên chậu của các nghiệm thức

Nghiệm thức	Tỉ lệ hạt chắc	Trọng lượng hạt (g/chậu)
P. fluorescens 28	76,2 c	24,52 cd
P. fluorescens 44	72,4 d	23,60 d
Thuốc Starner	81,7 b	27,00 b
Đc có lây bệnh	41,1 f	12,30 g
Đc không lây bệnh	90,5 a	30,70 a
Mức ý nghĩa	*	*
CV (%)	*1,96*	*5.3*

Ghi chú: * khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. Các số trung bình trong cùng một cột có cùng chữ cái theo sau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử Duncan.

Tóm lại, hai chủng vi khuẩn vùng rễ *P. fluorescens* 28 và 44 thể hiện khả năng đối kháng cao với vi khuẩn *B. glumae* trong điều kiện *in vitro* và thể hiện được hiệu quả phòng trị bệnh thối hạt trên lúa do vi khuẩn *B. glumae* góp phần gia tăng năng suất lúa trong điều kiện nhà lưới. Kết quả này là cơ sở cho nghiên cứu đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh của hai chủng vi khuẩn này ở điều kiện ngoài đồng. Vi khuẩn nhóm *Pseudomonas fluorescens* được ghi nhận nhóm vi khuẩn vùng rễ triển vọng trong phòng trừ sinh học nhiều bệnh hại vi khuẩn trên cây trồng như bệnh héo xanh do *Ralstonia solanacearum* ((Elsayed *et al.*, 2019; Yendyo *et al.*, 2017), thối nhũn trên rau màu (Liao, 2009), bệnh cháy bìa lá lúa (Jambhulkar và Sharma, 2014; Velusamy *et al.*, 2006). Kết quả nghiên cứu này góp phần cung cấp thêm thông tin về hiệu quả của nhóm vi khuẩn này trong phòng trừ bệnh thối hạt trên lúa do *B. glumae*. Việc nghiên cứu đánh giá hiệu quả ở điều kiện ngoài đồng và khảo sát thêm các cơ chế liên quan đến hiệu quả của vi khuẩn cần tiếp tục thực hiện nhằm có thể ứng dụng trong thực tế quản lý bệnh thối hạt trên cây lúa theo hướng sinh học.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu tuyển chọn vi khuẩn vùng rễ đối kháng để phòng trị bệnh thối

hạt hay lép vàng trên lúa do vi khuẩn *B. glumae* được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới đã xác định được 9 dòng vi khuẩn đối kháng trong tổng số 36 chủng vi khuẩn khảo sát có khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh thối hạt *B. glumae*, trong đó hai chủng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* 28 và *Pseudomonas fluorescens* 44 có khả năng đối kháng cao nhất đồng thời thể hiện hiệu quả giảm bệnh thối hạt trong điều kiện nhà lưới góp phần bảo vệ tốt được năng suất lúa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Elsayed, T. R., S. Jacquiod, E. H. Nour, S. J. Sorensen, and K. Smalla (2019). Biocontrol of Bacterial Wilt Disease Through Complex Interaction Between Tomato Plant, Antagonists, the Indigenous Rhizosphere Microbiota, and *Ralstonia solanacearum*. *Front Microbiol*. 10:2835.
2. Ham, J. H., R. A. Melanson, and M. C. Rush (2011). *Burkholderia glumae:* next major pathogen of rice? *Mol. Plant Pathol.* 12(4):329 - 339.
3. Jambhulkar, P. P., and P. Sharma (2014). Development of bioformulation and delivery system of *Pseudomonas fluorescens* against bacterial leaf blight of rice (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). *J. Environ. Biol.* 35(5):843 - 849.
4. Liao, C. H. (2009). Control of foodborne pathogens and soft-rot bacteria on bell pepper by three strains of bacterial antagonists. *J. Food Prot.* 72(1):85 - 92.
5. Phạm Văn Kim (2016). Các bệnh hại lúa quan trọng ở đồng bằng sông Cửu Long. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
6. Riera-Ruiz, C., J. Vargas, C. Cedeno, P. Quirola, M. Escobar, J. M. Cevallos-Cevallos, M. Ratti, and E. L. Peralta (2014). First Report of *Burkholderia glumae* Causing Bacterial Panicle Blight on Rice in Ecuador. *Plant Dis.* 98(7):988.
7. Trung, H.M., Van, N.V., Vien, N.V., Lam, D. T. and Lien, M. (1993). Occurrence of rice grain rot disease in Vietnam. *Int. Rice Res. Note*. 18, 30.
8. Velusamy, P., J. E. Immanuel, S. S. Gnanamanickam, and L. Thomashow (2006). Biological control of rice bacterial blight by plant-associated bacteria producing 2,4-diacetylphloroglucinol.*Can.J. Microbiol.* 52(1):56 - 65.
9. Yendyo, S., G C R, and B. R. Pandey (2017). Evaluation of *Trichoderma* spp., *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* for biological control of *Ralstonia* wilt of tomato. F1000 Res. 6:2028.
10. Zhou, X. G. (2014). First Report of Bacterial Panicle Blight of Rice Caused by *Burkholderia glumae* in South Africa. *Plant Dis*. 98(4):566.
11. Zhou, X. S., K. V. K. Kumar, L. W. Zhou, M. S. Reddy, and J. W. Kloepper (2020). Combined Use of PGPR and Reduced Rates of Azoxystrobin to Improve Management of Sheath Blight of Rice. *Plant Dis.* doi: 10.1094/PDIS-07-20-1596-RE.

TUYỂN CHỌN VI KHUẨN *Bacillus* sp. ĐỐI KHÁNG VỚI VI KHUẨN *Burkholderia glumae* VÀ CÓ HIỆU QUẢ PHÒNG TRỊ BỆNH LÉP VÀNG TRÊN LÚA TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI

Trần Vũ Phến và Phạm Hoàng Nhân

Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

ABSTRACT

Screening of *Bacillus* sp. antagonistic to *Burkholderia glumae* and effective in preventing bacterial panicle blight disease of rice in net-house conditions

The study was conducted in the laboratory and greenhouse to select Bacillus strtains effective in preventing the bacterial panicle blight disease caused by Burkholderia glumae. From the preliminary assessment results in in vitro conditions, 19 strains of Bacillus spp.*, were further assessed for their antagonism against B. glumae-Bg-AG9, compared with 3 chemical drugs. From the results, Bacillus strains B-THDT3, B-PTAG1, B-PTAG12, with the best antagonistic ability, i.e. owned high antagonistic radius (mm) of 16.2; 15.8 and 14.4 respectively, higher than that of Starner 20WP (13.0) at 7 days after testing, were selected for evaluating their effectiveness in the control of bacterial panicle blight disease. The pot experiment in net house conditions on OM4900 rice variety included factor (A) 5 treatment agents (3 strains of Bacillus, Starner 20WP and control and (B) 3 ways of handling), was arranged randomly, with 4 replications, each is a rice pot. The results showed that all 3 Bacillus strains (i.e. B-THDT3, B-PTAG1, B-PTAG12) showed high prevention of bacterial panicle blight disease, no difference between 3 ways of handling (1 day before, 1 day after infection or combination) and equivalent to that of Starner 20WP (1,26 ‰) treatment.*

Keywords: *Bacillus, Burkholderia glumae, biocontrol, Starner.*

I. MỞ ĐẦU

Bệnh lép vàng do vi khuẩn *Burkholderia glumae* gây ra có thể làm giảm năng suất đến 75%, đã trở thành mối đe dọa đối với nền sản xuất lúa gạo (Zhou, 2019). Ở nước ta, bệnh lép vàng được ghi nhận từ năm 1991 trên lúa Hè Thu ở miền Trung và lúa Mùa ở các tỉnh

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Nga.

thuộc đồng bằng sông Hồng, bệnh tiếp tục phát triển trong năm 1992, ruộng nhiễm bệnh nặng thiệt hại có thể lên đến 75% (Trung *et al.*, 1993). Gần đây, bệnh càng được chú ý nhiều hơn, không chỉ ở Việt Nam mà ở các vùng trồng lúa trên thế giới, được xem như một điển hình của sự chuyển đổi một bệnh thứ yếu thành chủ yếu do ảnh hưởng của biến đổi khí hậu (Ham *et al.,* 2011), do *B. glumae* thích nhiệt độ cao hơn cho sự tăng trưởng (Cui *et al.,* 2016). Đến nay, biện pháp hóa học vẫn tiếp tục được lựa chọn, trong đó hoạt chất oxolinic acid được đánh giá là có hiệu quả cao trong việc phòng trị bệnh lép vàng do vi khuẩn *B. glumae,* tuy nhiên, những nghiên cứu gần đây đã ghi nhận tính kháng với oxolinic acid của nhiều chủng *B. glumae* (Ham *et al.,* 2011; Cui *et al.,* 2016). Từ đó, nhiều nghiên cứu nhằm tìm giải pháp thay thế hiệu quả, trong đó biện pháp sinh học tỏ ra rất triển vọng, với nhiều tác nhân phòng trị được cho là có hiệu quả đối với vi khuẩn *B. glumae* như *Bacillus* spp., *Pseudomonas fluorescens*,... (Zhu *et al.*, 2011; Ham *et al.*, 2011; Shrestha *et al.*, 2016; Zhou, 2019). Ở Việt Nam, các nghiên cứu về tác nhân sinh học có khả năng phòng trị bệnh lép vàng chưa nhiều, tập trung vào khai thác vai trò của thực khuẩn thể (Nguyễn Thị Thu Nga *và ctv.*, 2017). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tuyển chọn chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. có đối kháng cao và có khả năng kiểm soát hiệu quả bệnh lép vàng trên lúa do vi khuẩn *B. glumae* gây ra.

II. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thí nghiệm được thực hiện từ tháng 12/2017 đến tháng 4/2019 tại Phòng Thí nghiệm và nhà lưới Bộ môn Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

2.1. Đánh giá khả năng đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* đối với vi khuẩn *B. glumae* trong điều kiện phòng thí nghiệm

Khả năng đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* đối với chủng vi khuẩn *B. glumae Bg*-AG9, có khả năng gây hại cao, được tiến hành trong đĩa petri chứa môi trường King's B agar, theo phương pháp khoanh giấy thấm huyền phù khuếch tán (Monteiro *et al.*, 2005).

Thí nghiệm gồm 22 nghiệm thức (19 chủng *Bacillus* chọn ra từ thí nghiệm sơ khởi) và 3 loại thuốc hóa học (theo nồng độ khuyến cáo): Starner 20WP (1,26 ‰), Xantocin 40WP (0,7‰) và Coc 85WP (3,3‰), được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 lặp lại.

Vi khuẩn *B. glumae* được phân lập từ hạt lúa bị bệnh lép vàng ở An Giang, trữ trên môi trường King's B (Atlas, 2010) ở 4^oC. Nguồn vi khuẩn *Bacillus* được phân lập từ các hạt không bệnh trên mẫu bệnh lép vàng, với tác động xử lý nhiệt ở 90^0C trong 15 phút (Sadfi *et al.*, 2001). Khi xử lý, vi khuẩn Bacillus hoặc *B. glumae* được nuôi trong môi trường King's B lỏng trên máy lắc ngang trong 48 giờ, xác định mật số và chỉnh về 10^8 cfu/ml.

Ghi nhận bán kính vô khuẩn (mm) vào 1, 3, 5, 7 ngày sau khi thử nghiệm. Tuyển chọn chủng *Bacillus* có khả năng đối kháng cao dựa trên so sánh với thang đánh giá mức độ đối kháng giữa vi khuẩn và vi khuẩn (Ahmed and Zaharan, 2006) và với thuốc hóa học.

2.2. Đánh giá hiệu quả của 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. trong phòng trị bệnh lép vàng do vi khuẩn *B. glumae* trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm thực hiện trong chậu nhựa được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, gồm 2 nhân tố (A) 5 tác nhân xử lý (3 chủng *Bacillus* B-THDT3, B-PTAG1, B-PTAG12, thuốc Starner 20WP và đối chứng, (B) 3 thời điểm xử lý), với 4 lần lặp lại, mỗi lặp lại là 1 chậu lúa.

- Lúa giống OM4900 cấp xác nhận được xử lý 3 sôi 2 lạnh trong 1 giờ, ngâm trong 24 giờ và ủ 48 giờ. Hạt lúa nảy mầm được gieo vào chậu nhựa đã chuẩn bị (Φ 25 cm, 7 kg đất ruộng), 10 hạt/chậu. Lượng phân bón cho lúa dựa theo công thức 90N-40P_2O_5-30K_2O (kg/ha), được quy theo trọng lượng đất, giữ 10 chồi hữu hiệu/chậu ở giai đoạn trổ đều.

- Vi khuẩn *B. glumae* được nuôi 2 ngày trên môi trường King's B agar trong đĩa petri, thu huyền phù vi khuẩn với nước cất thanh trùng. Lây nhiễm bệnh tất cả các nghiệm thức bằng cách phun ướt đều bông lúa với huyền phù *B. glumae* (10^8 cfu/ml) (Trung *et al.*, 1993).

- Vi khuẩn *Bacillus* được nhân nuôi trong môi trường King's B lỏng trên máy lắc ngang (150 vòng/phút), trong 48 giờ, xác định mật số và chuyển về 10^8 cfu/ml khi xử lý. Ở biện pháp phun trước (PT), *Bacillus* được xử lý 1 ngày trước khi lây nhiễm bệnh; biện pháp phun sau (PS), *Bacillus* được xử lý vào 1ngày sau khi lây nhiễm bệnh, ở biện phun phun kết hợp trước sau (PTS), *Bacillus* được xử lý 2 lần (1 ngày trước và 1 ngày sau khi lây nhiễm bệnh).

- Thuốc Starner 20WP được xử lý cùng lúc với xử lý vi khuẩn *Bacillus*, ở nồng độ khuyến cáo (1,26‰).

Sau khi xử lý lây nhiễm bệnh, chậu lúa thí nghiệm được trùm kín bằng túi nylon và che tối trong 24 giờ, rồi được chuyển ra nhà lưới và phun sương để giữ ẩm.

Ghi nhận: Tỷ lệ bệnh (%): Đếm số lượng hạt bị nhiễm bệnh trên tổng số hạt trên bông (10 bông/chậu) vào các thời điểm 5, 10, 15 ngày sau khi lây bệnh; tỷ lệ hạt chắc/bông (%), trọng lượng hạt (g/chậu).

*** Xử lý số liệu:** Các số liệu ghi nhận được xử lý và so sánh sự khác biệt giữa các trung bình nghiệm thức bằng phần mềm phân tích thống kê Mstat-C qua phép thử Duncan.

III. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* spp. đối với vi khuẩn *Burkholderia glumae* trong điều kiện phòng thí nghiệm

Kết quả đánh giá khả năng đối kháng của 19 chủng *Bacillus* spp. triển vọng và 3 loại thuốc hóa học đối với vi khuẩn *B. glumae* chủng *Bg*-AG9 được trình bày ở Bảng 1.

Ở thời điểm 1 ngày sau khi trắc nghiệm (NSTN), bán kính vòng vô khuẩn (BKVVK) của các nghiệm thức biến

thiên trong khoảng 1,00 - 15,00 mm, trong đó nghiệm thức Starner 20WP đạt cao nhất (15,00 mm).

Ở thời điểm 3 NSKC, BKVVK của các nghiệm thức *Bacillus* đều tăng, đạt trong khoảng 5,2 - 11,4 mm. Khả năng đối kháng của thuốc Starner 20WP bắt đầu giảm nhưng BKVVK vẫn có giá trị lớn nhất (13,4 mm).

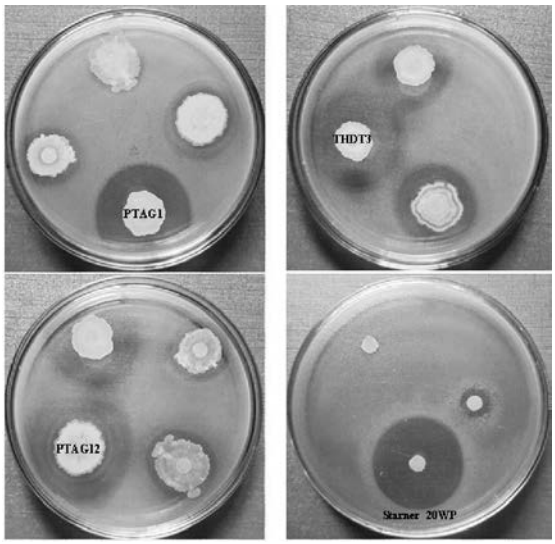
Bảng 1. Bán kính vòng vô khuẩn (mm) của 19 chủng Bacillus và thuốc hóa học

TT	Nghiệm thức	Bán kính vòng vô khuẩn (mm) qua các thời điểm			
		1 NSKC	3 NSKC	5 NSKC	7 NSKC
1	B-CKTV1	3,6^{cd}	11,0^{b}	12,8^{b}	13,6^{bc}
2	B-CKTV11	3,0^{de}	10,6^{bcd}	12,2^{bc}	13,0^{bcd}
3	B-CKTV9	1,0^{g}	5,2^{gh}	6,2^{h}	6,4^{h}
4	B-CLDT9	2,6^{def}	8,6^{def}	9,0^{fg}	9,8^{ef}
5	B-CRCT2	3,6^{cd}	11,0^{b}	13,0^{b}	14,8^{ab}
6	B-PTAG1	3,0^{de}	10,2^{bcd}	12,4^{bc}	15,8^{a}
7	B-PTAG9	3,6^{cd}	8,8^{cdef}	10,2^{ef}	13,4^{bcd}
8	B-PTAG12	3,6^{cd}	10,4^{bcd}	12,2^{bc}	14,4^{ab}
9	B-PTAG14	2,4^{def}	10,0^{bcde}	11,6^{bcde}	12,2^{cd}
10	B-PTAG6	3,2^{cde}	11,2^{b}	11,8^{bcd}	15,0^{ab}
11	B-THDT1	2,8^{de}	10,8^{bc}	12,8^{b}	14,2^{abc}
12	B-THDT2	2,0^{efg}	5,6^{gh}	6,2^{h}	7,4^{gh}
13	B-THDT3	4,4^{c}	11,4^{b}	15,0^{a}	16,2^{a}
14	B-THDT6	2,0^{efg}	6,0^{gh}	7,8^{g}	8,4^{fgh}
15	B-THDT7	1,4^{fg}	5,6^{gh}	6,2^{h}	6,8^{h}
16	B-THDT8	2,0^{efg}	8,0^{ef}	10,4^{def}	11,4^{de}
17	B-TOVL3	2,8^{de}	7,0^{fg}	8,6^{g}	9,2^{fg}
18	B-TOVL4	3,6^{cd}	10,8^{bc}	13,0^{b}	14,8^{ab}
19	B-TOVL5	2,8^{de}	9,6^{bcde}	10,8^{cde}	10,0^{ef}
20	Coc 85WP	1,0^{g}	1,0^{i}	1,0^{j}	0,0^{j}
21	Starner 20WP	15,0^{a}	13,4^{a}	13,2^{b}	13,0^{bcd}
22	Xantocin 40WP	9,0^{b}	4,2^{h}	3,0^{i}	2,0^{i}
	Mức ý nghĩa	*	*	*	*
	CV (%)	*25,38*	*16,76*	*11,43*	*13,56*

Ghi chú: Các trung bình trong cùng một cột được theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, * khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. NSKC: ngày sau khi cấy.

Ở 5 NSKC, BKVVK của các nghiệm thức *Bacillus* đều tăng, trong đó, nghiệm thức *Bacillus* B-THDT3 đạt cao nhất 15,0 mm, trong khi hiệu quả của thuốc hóa học bắt đầu giảm.

Đến thời điểm 7 NSKC, nhìn chung khả năng đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* tiếp tục tăng, BKVVK đạt trong khoảng 6,4 - 16,2 mm, trong đó *Bacillus* B-THDT3 là nghiệm thức có đối kháng cao, với BKVVK đạt 16,2 mm, nhưng không khác biệt ý nghĩa thống kê so với *Bacillus* B-CRCT2, B-PTAG1, B-PTAG12, B-PTAG6, B-THDT1 và B-TOVL4BKVVK. Theo Ahmed and Zahran (2006), các chủng *Bacillus* này có tính đối kháng rất mạnh với *B. glumae* (BKVK > 12 mm), cao hơn thuốc Starner 20WP vào thời điểm 5 và 7 NSKC, đến thời điểm này, hiệu quả của Starner 20WP giảm, chỉ duy trì ở mức 13,0 mm, trong khi Coc 85WP và Xantocin 40WP cho tác động ức chế vi khuẩn gây bệnh rất thấp (Bảng 1).



Hình 1. Bán kính vòng vô khuẩn của các chủng *Bacillus* spp. triển vọng (7 NSKC)

Từ kết quả trên, các chủng vi khuẩn *Bacillus* B-THDT3, B-PTAG1, B-PTAG12 được chọn để đánh giá khả năng phòng trị bệnh lép vàng trong điều kiện nhà lưới, với đối chứng dương là thuốc Starner 20WP ở nồng độ khuyến cáo (1,26‰).

3.2. Hiệu quả của 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. trong phòng trị bệnh lép vàng do vi khuẩn *B. glumae* trong điều kiện nhà lưới

3.2.1. Tỷ lệ bệnh

** Thời điểm 5 ngày (Bảng 2):* Nhìn chung, tỷ lệ bệnh trung bình của các tác nhân phòng trị đều thấp và khác biệt ý nghĩa so với đối chứng lây bệnh. Tỷ lệ bệnh trung bình của thời điểm xử lý không khác biệt ý nghĩa thống kê.

** Thời điểm 10 ngày (Bảng 3):* Ở thời điểm này tỷ lệ bệnh ở các nghiệm thức được xử lý với vi khuẩn *Bacillus* tương đương nhau (6,47 - 8,64%) và đều thấp hơn so với đối chứng (93,50%), cho thấy các chủng vi khuẩn *Bacillus* đều có hiệu quả đối với bệnh lép vàng và hiệu quả tương đương với thuốc hóa học Starner 20WP. Tương tự, tỷ lệ bệnh trung bình của các biện pháp xử lý cũng có cùng ý nghĩa thống kê với nhau, đạt trong khoảng 24,51 - 25,23%.

Bảng 2. Tỷ lệ bệnh (%) của các nghiệm thức ở thời điểm 5 ngày sau khi lây bệnh

Tác nhân xử lý (A)	Tỷ lệ bệnh (%) lép vàng ở 5 NSKLB theo cách xử lý (B)			Trung bình (A)
	Phun trước (PT)	PT-PS	Phun sau (PS)	
B-THDT3	5,48^{cde}	4,46^{de}	7,99^{b}	5,97^{B}
B-PTAG1	7,29^{bc}	3,97^{e}	5,43^{cde}	5,56^{B}
B-PTAG12	4,91^{de}	4,48^{de}	6,75^{bcd}	5,38^{B}
Starner 20WP	3,23^{e}	3,48^{e}	5,01^{de}	3,91^{B}
Đối chứng	82,76^{a}	82,76^{a}	82,76^{a}	82,76^{A}
Trung bình (B)	20,73	19,83	21,59	
Mức ý nghĩa	*F(A)**, F(B)^{ns}, F(AxB)**			
CV (%)	*6,90*			

Ghi chú: Các trung bình trong cùng một cột được theo sau bởi chữ cái giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, *: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%, **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%, ns: không khác biệt ý nghĩa thống kê. Số liệu % được chuyển đổi sang acrsin$\sqrt{x}$ khi phân tích thống kê.

Bảng 3. Tỷ lệ bệnh (%) của các nghiệm thức ở thời điểm 10 ngày sau khi lây bệnh

Tác nhân xử lý (A)	Tỷ lệ bệnh (%) lép vàng ở 10 NSKLB theo cách xử lý (B)			Trung bình (A)
	Phun trước (PT)	PT-PS	Phun sau (PS)	
B-THDT3	8,71	7,46	9,77	8,64 ^{B}
B-PTAG1	8,99	6,62	6,87	7,49 ^{B}
B-PTAG12	6,50	9,55	8,77	8,27 ^{B}
Starner 20WP	6,72	5,44	7,25	6,47 ^{B}
Đối chứng	93,50	93,50	93,50	93,50 ^{A}
Trung bình (B)	24,88	24,51	25,23	
Mức ý nghĩa	*F(A)**, F(B)^{ns}, F(AxB)^{ns}*			
CV (%)	*10,80*			

Ghi chú: Các trung bình trong cùng một cột được theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%, ns: không khác biệt ý nghĩa thống kê. Số liệu tỷ lệ phần trăm bệnh được chuyển đổi sang acrsin$\sqrt{x}$ khi phân tích thống kê.

* *Thời điểm 15 ngày:* Kết quả được trình bày ở Bảng 4 cho thấy tỷ lệ bệnh trung bình của các tác nhân phòng trị tương đương nhau, trong khoảng 12,49 - 15,16% và đều thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

Bảng 4. Tỷ lệ bệnh (%) của các nghiệm thức ở thời điểm 15 ngày sau khi lây bệnh

Tác nhân xử lý (A)	Tỷ lệ bệnh (%) lép vàng ở 15 NSKLB theo cách xử lý (B)			Trung bình (A)
	Phun trước (PT)	PT-PS	Phun sau (PS)	
B-THDT3	11,58	10,88	15,02	12,49 ^{B}
B-PTAG1	13,79	10,00	14,08	12,62 ^{B}
B-PTAG12	10,70	11,89	15,81	12,80 ^{B}
Starner 20WP	14,36	11,33	19,77	15,16 ^{B}
Đối chứng	96,69	96,69	96,69	96,69 ^{A}
Trung bình (B)	29,42	28,16	32,27	
Mức ý nghĩa	*F(A)**, F(B)^{ns}, F(AxB)^{ns}*			
CV (%)	*11,56*			

Ghi chú: Các trung bình trong cùng một cột được theo sau bởi chữ cái giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%, ns: không khác biệt ý nghĩa thống kê. Số liệu tỷ lệ phần trăm bệnh được chuyển đổi sang acrsin$\sqrt{x}$ khi phân tích thống kê.

Trung bình tỷ lệ bệnh của các thời điểm xử lý dao động trong khoảng 28,16 - 32,27% và không khác biệt ý nhĩa thống kê với nhau.

Nhìn chung, qua chỉ tiêu tỷ lệ bệnh ghi nhận được ở 3 thời điểm có thể thấy các tác nhân phòng trị bệnh cho hiệu quả phòng trị tương đương nhau và thời điểm xử lý tác nhân phòng trị không ảnh hưởng rõ đến tỷ lệ bệnh.

3.2.2. Tỷ lệ hạt chắc

Tỷ lệ hạt chắc trung bình của các tác nhân phòng trị trong khoảng 66,54 - 76,30%, đều cao hơn có ý nghĩa so với đối chứng. Trong đó, nghiệm thức *Bacillus* B-THDT3 có tỷ lệ hạt chắc cao nhất (76,30%). Biện pháp PT-PS có tỷ lệ trung bình hạt chắc cao hơn PT hoặc PS.

Do có sự tương tác giữa các tác nhân phòng trị và thời điểm xử lý nên tỷ lệ hạt chắc có thay đổi tùy vào tác nhân và thời điểm xử lý: Nghiệm thức *Bacillus* B-THDT3 tại thời điểm PT-PS có tỷ lệ hạt chắc cao nhất (86,80%), kế đến là B-PTAG1 (75,45%), Starner 20WP (75,00%), B-PTAG12 (72,28%).

Bảng 5. Tỷ lệ (%) hạt chắc của các nghiệm thức

Tác nhân xử lý (A)	Tỷ lệ (%) hạt chắc theo cách xử lý (B)			Trung bình (A)
	PT	PT-PS	PS	
B-THDT3	69,75 ^{cde}	86,80 ^{a}	72,35 ^{bcd}	76,30 ^{A}
B-PTAG1	64,60 ^{efg}	72,28 ^{bcd}	62,75 ^{fg}	66,54 ^{B}
B-PTAG12	61,08 ^{g}	75,45 ^{b}	67,80 ^{def}	68,11 ^{B}
Starner 20WP	61,25 ^{g}	75,00 ^{bc}	66,25 ^{efg}	67,50 ^{B}
Đối chứng	7,00 ^{h}	7,00 ^{h}	7,00 ^{h}	7,00 ^{C}
Trung bình (B)	52,74 ^{B}	63,31 ^{A}	55,23 ^{B}	
Mức ý nghĩa	*F(A)**, F(B)**, F(AxB)***			
CV (%)	*5,43*			

Ghi chú: Các trung bình trong cùng một cột được theo sau bởi chữ cái giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%. Số liệu % được chuyển đổi sang acrsin$\sqrt{x}$ khi phân tích thống kê.

3.2.3 Trọng lượng hạt/chậu

Thời điểm xử lý PT-PS và PT cho năng suất thực tế cao hơn và khác biệt ý nghĩa so với thời điểm xử lý PS.

Bảng 6. Trọng lượng hạt (g/chậu) của các nghiệm thức

Tác nhân xử lý (A)	Trọng lượng hạt (g/chậu) của các nghiệm thức theo cách xử lý (B)			Trung bình (A)
	PT	PT-PS	PS	
B-THDT3	13,60 ^{ab}	14,45 ^{a}	10,82 ^{def}	12,96 ^{A}
B-PTAG1	11,88 ^{cd}	13,10 ^{abc}	9,525 ^{ef}	11,50 ^{AB}
B-PTAG12	11,10 ^{de}	13,05 ^{abc}	9,372 ^{f}	11,17 ^{B}
Starner 20WP	11,75 ^{cd}	12,05 ^{bcd}	9,575 ^{ef}	11,13 ^{B}
Đối chứng	0,85 ^{g}	0,85 ^{g}	0,85 ^{g}	0,85 ^{C}
Trung bình (B)	9,835 ^{A}	10,70 ^{A}	8,030 ^{B}	
Mức ý nghĩa	*F(A)**, F(B) **, F(AxB) **			
CV (%)	*11,34*			

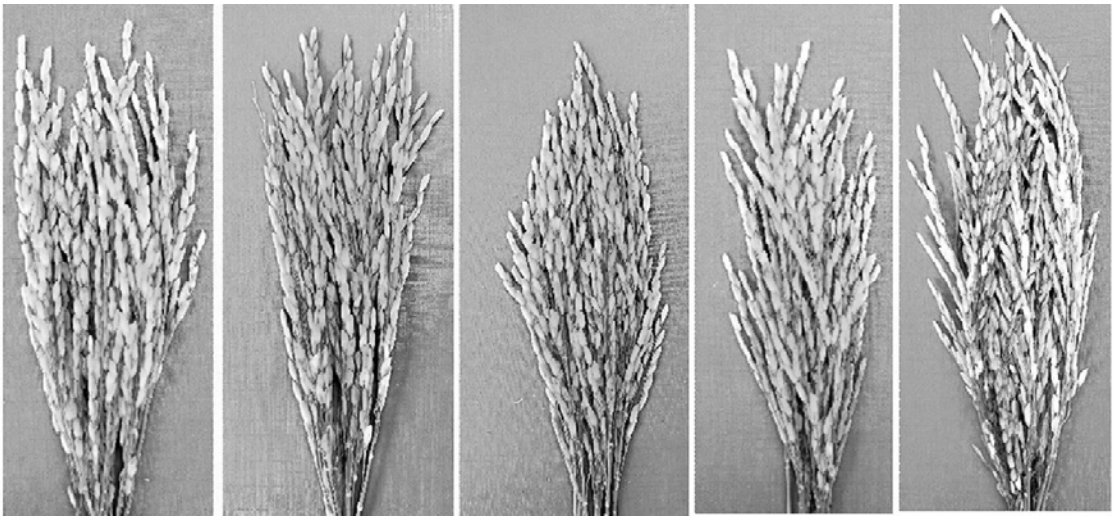
Ghi chú: Các trung bình trong cùng một cột được theo sau bởi ký tự giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%, *: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Giữa các tác nhân phòng trị và thời điểm xử lý có tương tác nên hiệu quả của tác nhân có khác nhau theo thời điểm xử lý: Chủng *Bacillus* B-THDT3 khi xử lý ngừa hoặc kết hợp cho trọng lượng hạt/chậu cao hơn Starner 20WP. Thời điểm xử lý PS cho thấy tất cả các tác nhân có năng suất tương tự nhau nhưng cao hơn và khác biệt ý nghĩa so với đối chứng lây bệnh.

Kết quả trên cho thấy, khi được xử lý vào các thời điểm khác nhau, các tác nhân phòng trị đều giúp tăng tỷ lệ hạt chắc góp phần làm tăng trọng lượng hạt/chậu. Xử lý 1 lần trước khi nhiễm bệnh cho hiện quả tương đương với xử lý 2 lần và đều cao hơn sau khi đã nhiễm bệnh.

Oxolinic acid là hoạt chất có hiệu quả cao đối với bệnh lép vàng (Hikichi, 1995; Ham *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2016; Zhou, 2019), tuy nhiên, hiệu quả thường thấp đối với các bông lúa đã bị nhiễm trước bởi *P. glumae*, do tác động của hoạt chất chủ yếu là ngăn ngừa sự lây nhiễm bệnh thứ cấp (Hikichi, 1995; Hikichi *et al.*, 1998). Trong thí nghiệm này, đối chứng dương, Starner 20WP (oxolinic acid) sử dụng ở nồng độ khuyến cáo (1,26‰), đã kiểm soát tốt bệnh lép vàng, hiệu quả thể hiện cao từ ban đầu nhưng sau đó có khuynh hướng giảm và đều tương đương với hiệu quả khi xử lý với các chủng *Bacillus*. Mặt khác, bên cạnh hiệu quả thông qua giúp giảm tỷ lệ bệnh, làm tăng tỷ lệ hạt chắc, trọng

lượng hạt/chậu được xử lý với chủng B-THDT3 đều cao, cho thấy ngoài tác động ức chế vi khuẩn gây bệnh cao hơn 2 chủng còn lại, còn có thể kích thích sự sinh trưởng của cây lúa. Như vậy, tuy biểu hiện chậm nhưng tác nhân sinh học duy trì hiệu quả bền hơn, cho thấy triển vọng trong phòng trị bệnh lép vàng trên lúa của tác nhân phòng trừ sinh học được tuyển chọn.



Hình 2. Mức độ bệnh ở các nghiệm thức vào thời điểm thu hoạch

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Trong điều kiện nhà lưới, các chủng vi khuẩn *Bacillus*-THDT3, B-PTAG1, B-PTAG12 có khả năng đối kháng mạnh trong điều kiện *in vitro* đều thể hiện khả năng kiểm soát hiệu quả bệnh lép vàng do chủng Bg-AG9, hiệu quả tương đương với thuốc Starner 20WP (1,26 ‰).

Khi được xử lý phun ngừa, các chủng *Bacillus* cho hiệu quả phòng trị bệnh lép vàng cao hơn so với được xử lý sau khi đã nhiễm bệnh.

Định danh các chủng vi khuẩn *Bacillus*-THDT3, B-PTAG1, B-PTAG1, để làm cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp sau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Atlas R.M. (20100. Handbook of Microbiological Media. CRC Press, 2040 trang.
2. Ahmed, N. A. and E.B. Zahran (2006). Inhibition of soil borne *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* in cotton by *Bacillus* spp.. In: Zeller W., Ullrich C. (eds.) Proceedings of the 1st International Symposium on biological control of bacterial plant diseases, Germany 2005. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtsch. 408: 86 - 92.
3. Cui Z-G, Zhu B, Xie G-L, Li B, Huang S-W. (2016). Research status and prospect of *Burkholderia glumae*, the pathogen causing bacterial panicle blight. *Rice Science*. 23:111 - 118.
4. Ham J.H., Melanson R. A., Rush M.C. (2011). *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice?. Mol Plant Pathol 12: 329 - 39.

5. Hikichi Y. (1995). The Spread of Bacterial Grain Rot of Rice and Its Control in the Paddy Fields. J. Pesticide Sci. 20: 329 - 331.

6. Hikichi Y., Egami H., Oguri Y, Okuno T. (1998). Fitness for survival of *Burkholderia glumae* resistant to oxolinic acid in rice plants. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64: 147 - 152.

7. Monteiro L., R. L.R. Mariano and A.M. Souto-Maior (2005). Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Brazilian Archives of Biology and Technology 48 (1): 23 - 29.

8. Nguyễn Thị Thu Nga, Đoàn Thị Kiều Tiên, Trần Ngọc Trân, Nguyễn Thị Trúc Giang, Nguyễn Thúy An, 2017. Liệu pháp thực khuẩn thể trong phòng trị bệnh hại vi khuẩn trên cây trồng. Kỷ yếu Hội thảo Khoa học Quản lý dịch hại tổng hợp cây trồng theo hướng hữu cơ sinh học trong phát triển nông nghiệp xanh. Trường Cán bộ Quản lý nông nghiệp và PTNN 2. Thành phố Hồ Chí Minh, trang: 319 - 331.

9. Monteiro L, Mariano R. L.R. and Souto-Maior M. A. (2002). Antagonism of *Bacillus* spp. Against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Brazilian Archives of Biology and Technology 48 (1): 23 - 29 (DOI: 10.1590/S1516-89132005000100004).

10. Sadfi N., M. Chérif, I. Fliss, A. Boudabbous and H. Antoun (2001). Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of fusarium dry rot of potato tubers, J. of Plant Pathol. 83(2): 101 - 118.

11. Shrestha B.K., Karki H.S., Groth D.E., Jungkhun N., Ham J.H. (2016). Biological Control Activities of Rice-Associated *Bacillus* sp. Strains against Sheath Blight and Bacterial Panicle Blight of Rice. PLoS ONE 11(1): e0146764. doi:10.1371/journal. pone. 0146764.

12. Trung H.M., Van N.V., Vien N.V., Lam, D. T., Lien M. (1993). Occurrence of rice grain rot disease in Vietnam. International Rice Research Notes 18(3): 30.

13. Zhou X-G. (2019). Sustainable Strategies for Managing Bacterial Panicle Blight in Rice [Online First], IntechOpen, DOI: 10.5772/ intechopen.84882.

14. Zhou X.G., Liu G, Kloepper J.W., Reddy M.S., Kumar K.V.K., Zhang S. (2011). Management of bacterial panicle blight of rice with beneficial *Bacillus* strains. *Phytopathology*. 2011;101:S270.

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN VI KHUẨN GÂY BỆNH THỐI HẠT LÚA Ở MỘT SỐ TỈNH ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Đoàn Thị Kiều Tiên, Bùi Thị Thanh Mỹ, Trần Thị Thu Thủy và Nguyễn Thị Thu Nga

Bộ môn Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

ABSTRACT

Isolation and identification of bacterial grain rot on rice from some provinces Mekong Delta

The research will focus on identification the agent causing grain rot disease and investigation of pathogenicity of bacterial pathogens were conducted in laboratory and greenhouse testing. Result from isolation of pathogen from infected rice grain rot from different rice fields in provinces of Mekong delta, there were six strains of bacterial grain rot on rice collected from Dong Thap, Vinh Long and Kien Giang Province. Identification of bacterial grain rot of rice by using PCR technique using specific primers1416S/1414A for identified Burkholderia glumae with amplifiled gene product at 873 bp, the results found that bacterial strainscausing grain rot wereB. glumae. Evaluating pathogenicity of six B. glumae strains i.e. BurVL21, BurDT46, BurDT50, BurDT51, BurKG52 and BurKG57 in greenhouse conditions, the results showed that the B. glumae BurDT46 showed highest percentage of infection, morereduction in grain weight and yield (g/pot) than the other strains. The highest pathogenicity of strain B. glumae BurDT46are relevance with its higher pigment production characteristic on King B 2% medium.

Keywords: *Bacterial grain rot, Burkholderia glumae, rice, specific primer, pathogenicity.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh thối hạt lúa hay còn gọi là bệnh lép vàng là một trong những bệnh hại góp phần gây thiệt hại năng suất lúa đáng kể. Bệnh thối hạt cũng đã ghi nhận tại nhiều nước và vùng lãnh thổ trồng lúa trên thế giới như Hàn Quốc (Jeong *et al.*, 2003), Đài Loan (Chien and Chang, 1987), Mỹ Latin (Zeigler *et al.*, 1987; Zeigler and Alvarez, 1989a; 1989b; 1989c; 1990, Zeigler, 1990), Việt Nam (Trung *et al.*, 1993), Philippines (trích dẫn Zhou-qi *et al.*, 2016). Theo Trung *et al.*, (1993) đã ghi nhận bệnh thối hạt do vi khuẩn

Người phản biện: TS. Lê Thanh Toàn.

Burkholderia glumae gây ảnh hưởng năng suất khoảng 75% sản lượng lúa tại đồng bằng sông Hồng vào năm 1992. Tại đồng bằng sông Cửu Long, bệnh xuất hiện và gây hại trong hàng chục năm qua, làm giảm năng suất lúa 10 - 20% (Phạm Văn Phú, 2015). Tuy nhiên, bệnh này chưa được xác định loài cụ thể bằng kỹ thuật sinh học phân tử ở đồng bằng sông Cửu Long. Trên cơ sở đó, nghiên cứu "*Phân lập và xác định tác nhân gây hại lúa do vi khuẩn Burkholderia glumae ở một số tỉnh đồng bằng sông Cửu Long*" nhằm xác định đúng tác nhân gây bệnh và tìm hiểu mức khả năng gây hại của vi khuẩn trên hạt lúa, từ đó làm cơ sở cho những nghiên cứu kế tiếp là phòng trị một cách có hiệu quả.

II. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nghiên cứu được thực hiện trong phòng thí nghiệm và nhà lưới Bộ môn Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

2.1. Phân lập tác nhân gây bệnh thối hạt trên lúa

Phương pháp phân lập vi khuẩn gây bệnh được thực hiện theo Goszczynska *et al.,* (2000), các mẫu hạt khi thu về phải đặt trong túi nylon riêng biệt và ghi nhãn cụ thể, mẫu thu về cần phân lập trong ngày hoặc một ngày sau đó. Ở phòng thí nghiệm, mẫu bệnh được xem dưới kính hiển vi, quan sát hiện tượng tuôn vi khuẩn nhằm xác định đúng tác nhân gây bệnh trước khi đem phân lập trên đĩa petri. Mẫu hạt lúa được cắt giữa phần mô khỏe và mô bệnh.

2.2. Xác định tác nhân gây bệnh thối hạt lúa bằng phương pháp sinh học phân tử

- Ly trích DNA của vi khuẩn dựa vào phương pháp đun sôi tế bào vi khuẩn (Junior*et al.,* 2016): Vi khuẩn được nuôi trên nuôi trên môi trường King'B 2% agar sau 48 giờ, chuyển vào ống eppendorft đã chứa vi khuẩn trong 400 µl nước cất thanh trùng và đun sôi trong 20 phút, sau đó ủ nước đá trong 5 phút, tiếp tụctrộn đều hỗn hợp và li tâm ở vận tốc 6000 rpm/phút trong 5 phút. Cuối cùng, thu được phần DNA của vi khuẩn ở phía trên của dung dịch đã ly tâm. Sử dụng DNA đã ly trích được khuếch đại bằng cặp mồi chuyên tính:

+ Mồi xuôi:

1416S(5'-GAGAGAATCGACCATGAAC-3');

+ Mồi ngược:

1414A(3'-GAGCGCATCCAGAACGAAGT-5').

Vi khuẩn *B. glumae* sẽ cho sản phẩm khuêch đại sau PCR có trọng lượng phân tử 873 bp (Schaad *et al.,* 2001).

- Chu trình nhiệt:

+ *Làm biến tính DNA:* 95^0C trong 5 phút (1 chu kỳ).

+ *Gắn mồi*: 29 chu kỳ gồm (95^0C trong 30 phút; 63^0C trong 30 phút; 72^0C trong 45 phút).

+ *Sự kéo dài DNA*: 1 chu kỳ (72^0C trong 5 giây).

Xác định sản phẩm PCR bằng kỹ thuật điện di trên gel agrarose 1% trong 45 phút ở 75 voltage, thạch được nhuộm ethidium bromide (1mg/ml), đọc kết quả bằng máy chụp gel UV2000.

2.3. Đánh giá khả năng gây hại trên lúa của các dòng vi khuẩn *Burkholderia glumae* ở điều kiện nhà lưới

2.3.1. Phương pháp thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố, gồm 6 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức tương ứng với một dòng vi khuẩn (BurVL21, BurDT46, BurDT50, BurDT51, BurKG52 và BurKG57) với 5 lần lặp lại, trong đó mỗi lần lặp lại là một chậu lúa với 10 bông lúa ở giai đoạn lúa trổ đều.

2.3.2. Cách tiến hành

Vào thời điểm cây lúa đang trổ bông đồng loạt phun 50 ml huyền phù vi khuẩn *B. glumae*/chậu (OD_{600nm} = 0,3, mật số 9×10^8 cfu/ml) phun ướt đều từng bông trên chậu lúa. Cây lúa sau khi lây bệnh được đặt trong điều kiện nhà lưới có che mưa.

2.3.3. Ghi nhận chỉ tiêu và xử lý số liệu

Tỷ lệ bệnh, AUDPC(Shanner và Finney, 1997), số hạt chắc trên bông, trong lượng hạt (g/chậu) được quy về ở ẩm độ 14%.

Xử lý số liệu bằng Excel và phân tích thống kê bằng phần mềm MSTATC qua phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%.

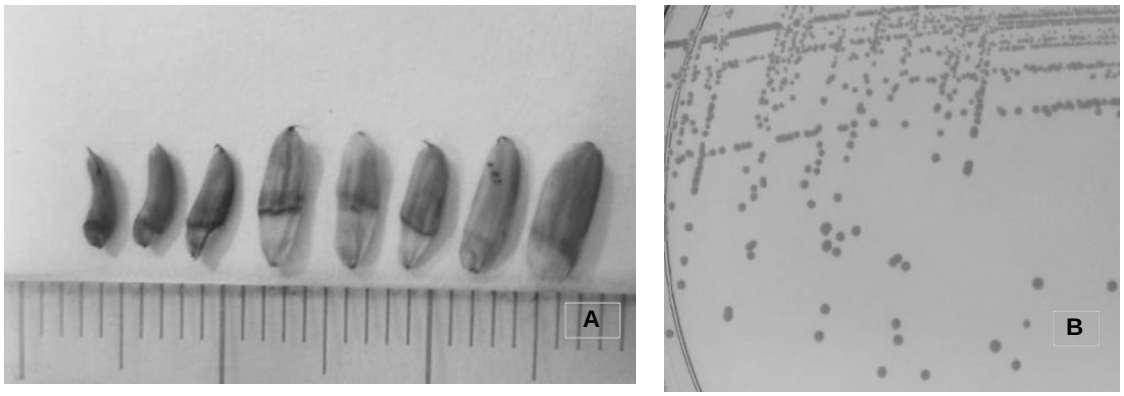
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập tác nhân gây bệnh thối hạt trên lúa tại Đồng Tháp, Vĩnh Long và Kiên Giang

Kết quả phân lập được 6 dòng vi khuẩn tại 3 tỉnh (Vĩnh Long, Đồng Tháp và Kiên Giang) được nhân nuôi trên môi trường King'B 2% agar. Đặc điểm các khuẩn lạc từ các dòng vi khuẩn phân lập có đặc điểm như khuẩn lạc tròn nhẵn lồi, màu trắng đục đến vàng xanh không phát huỳnh quang trên môi trường King's B, một số dòng vi khuẩn có khả năng tiết sắc tố vàng xanh trên môi trường King's B đúng theo miêu tả của Agarwal *et al.*, (1989). Do đó dựa vào triệu chứng ngoài đồng kết hợp kết quả phân lập về hình thái khuẩn lạc đã bước đầu ghi nhận bệnh thối hạt do vi khuẩn *Burkholderia glumae*. Nhưng để xác định đúng tác nhân gây bệnh cần kiểm tra bằng kỹ thuật sinh học phân tử với cặp mồi chuyên cho dòng vi khuẩn *Burkholderia glumae*là 1416S và 1414A (Schaad *et al.*, 2001).

Bảng 1. Sáu dòng vi khuẩn được phân lập tại Vĩnh Long, Đồng Tháp và Kiên Giang

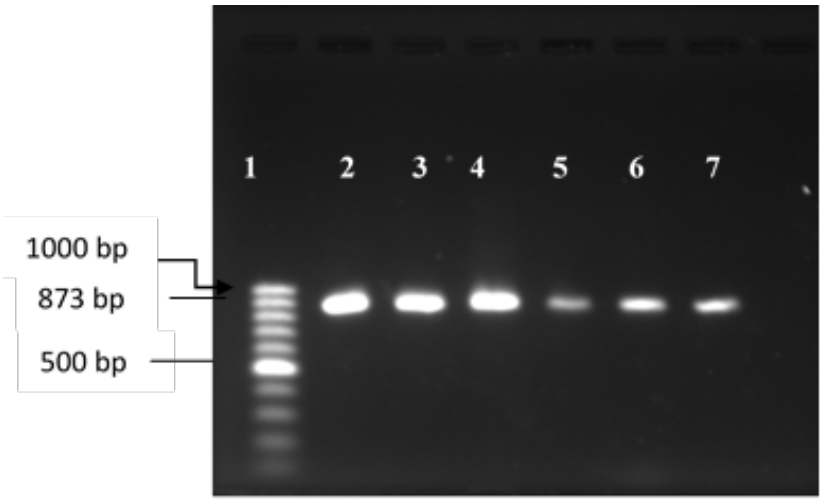
Mã số vi khuẩn	Địa điểm phân lập	Giống lúa
BurVL21	Mang Thít - Vĩnh Long	OM 5451
BurDT46	Phong Hòa - Lai vung - Đồng Tháp	IR50404
BurDT50	Phong Hòa - Lai vung - Đồng Tháp	IR50404
BurDT51	Định Hòa - Lai vung - Đồng Tháp	IR50404
BurKG52	Phước Thạnh - Giồng Riềng - Kiên Giang	không xác định
BurKG57	Thạnh Hưng - Giồng Riềng - Kiên Giang	Không xác định



Hình 1. Triệu chứng bệnh thối hạt (A) và đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên môi trường KB 2% agar

3.2. Xác định tác nhân gây bệnh thối hạt lúa bằng phương pháp sinh học phân tử

Kết quả Hình 2 thấy rằng sản phẩm PCR được khuếch đại bằng hai cặp mồi chuyên tính 1416S và 1414A cho cả 6 dòng vi khuẩn *B. glumae*BurVL21, BurDT46, BurDT50, BurDT51, BurKG52, BurKG57 với sản phẩm PCR đạt trọng lượng phân tử khoảng 873bp. Theo Schaad *et al.*, (2001) đã ghi nhận những dòng vi khuẩn được khuếch đại bằng cặp mồi chuyên tính 1416S và 1414A cho sản phẩm PCR 873 bp khi chạy điện di là dòng vi khuẩn *B. glumae*. Từ đó kết luận rằng, 6 dòng vi khuẩn BurVL21, BurDT46, BurDT50, BurDT51, BurKG52, BurKG57 được phân lập từ những hạt lúa bị bệnh thối hạt do vi khuẩn *B. glumae* gây ra.



Hình 2. Sản phẩm PCR khuếch đại bằng cặp mồi chuyên tính 1414S và 1416A:
Giếng 1: Ladder 100 bp; Giếng 2: BurVL21, Giếng 3: BurDT46, Giếng 4: BurDT50, Giếng 5: BurDT51, Giếng 6: BurKG52, Giếng 7: BurKG57

3.3. Khả năng gây hại của các dòng vi khuẩn *B. glumae* gây bệnh thối hạt trong điều kiện nhà lưới

Khả năng gây hại của 6 dòng vi khuẩn BurVL21, BurDT46, BurDT50, BurDT51, BurKG52 và BurKG57 được thể hiện qua tỷ lệ hạt bệnh, AUDPC và thành phần năng suất (Bảng 2).

3.3.1. Tỷ lệ hạt bệnh và AUDPC

Kết quả Bảng 2 cho thấy qua nhiều điểm khảo sát, đặc biệt vào thời điểm 15 NSKLB cả 6 nghiệm thức khi xử lý các dòng vi khuẩn BurVL21, BurDT46, BurDT50, BurDT51, BurKG52 và BurKG57 có tỷ lệ hạt bệnh khác nhau và khác biệt ý nghĩa giữa các nghiệm thức. Đặc biệt dòng vi khuẩn BurDT46 có tỷ lệ hạt bệnh vượt trội và khác biệt các dòng vi khuẩn còn lại.

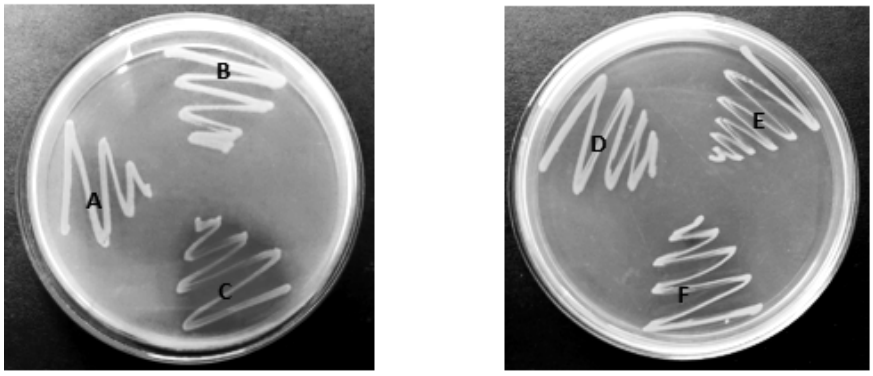
Bên cạnh đó, chỉ số AUDPC ở Bảng 2 cho thấy nghiệm thức BurDT46 có chỉ số AUDPC cao nhất đạt 1308,44 và khác biệt ý nghĩa so với các nghiệm thức BurVL21 (249,63), BurDT51 (590,49), BurKG52 (923,70), BurKG57 (296,50) và BurDT50 có chỉ số AUDPC thấp nhất là 64,89.

Kết quả nghiên cứu này cho thấy các dòng vi khuẩn *B. glumae* có khả năng gây hại khác nhau và dòng *B. glumae* BurDT46 gây hại cao nhất. Khi quan sát sắc tố tạo ra trên môi trường King's B 2% agar thì 6 dòng vi khuẩn *B. glumae* đều tạo sắc tố màu vàng với mức độ khác nhau tương đồng với khả năng gây hại trên hạt lúa. Cụ thể dòng vi khuẩn BurDT46 tạo sắc tố vàng nhiều hơn 5 dòng vi khuẩn còn lại và dòng vi khuẩn này cũng cho tỷ lệ hạt bệnh cao hơn các dòng còn lại, ngược lại dòng vi khuẩn BurDT50 cho sắc tố màu vàng không nhiều cũng đồng thời cho tỷ lệ hạt bệnh ít hơn các dòng vi khuẩn còn lại. Theo Tsushima *et al.* (1996) thì khả năng gây bệnh của vi khuẩn có thể tùy theo khả năng sở hữu các gen qui định một số độc tố như toxoflavin, lipase, khả năng di chuyển của vi khuẩn, hệ thống cảm ứng III, Exopolysaccharide... Ngoài yếu tố gây độc thì tính nhạy cảm của cây ký chủ, nhiệt độ, ẩm độ và mật số của các dòng vi khuẩn *B. glumae* trên bông lúa cũng cần thiết cho quá trình xâm nhiễm. Đặc biệt độc tố thực vật có màu vàng bao gồm toxoflavin và fervenulin do vi khuẩn *B. glumae* tiết ra là yếu tố quan trọng nhất trong quá trình gây hại (Zhou-pi *et al.*, 2016).

Bảng 2. Tỷ lệ hạt bệnh trên bông và ảnh hưởng bệnh thối hạt đến thành phần năng suất lúa được xử lý với sáu dòng vi khuẩn B. glumae

Nghiệm thức	Tỷ lệ hạt bệnh/bông (%), thành phần năng suất			
	15 NSKLB	AUDPC	Tỷ lệ hạt chắc (%)	Trọng lượng hạt (g/chậu)
BurVL21	12,97^{d}	249,63^{d}	75,54^{b}	29,11^{b}
BurDT46	70,07 ^{a}	1308,44^{a}	39,53^{e}	18,47 ^{d}
BurDT50	3,52^{e}	64,89 ^{e}	88,01 ^{a}	34,51 ^{a}
BurDT51	32,55^{c}	590,49 ^{c}	64,22 ^{c}	27,28 ^{bc}
BurKG52	49,83^{b}	923,70 ^{b}	54,64 ^{d}	24,16 ^{c}
BurKG57	15,50^{d}	296,50^{d}	73,45 ^{b}	27,83 ^{bc}
Mức ý nghĩa	*	*	*	*
CV (%)	*12,45*	*19,96*	*3,11*	*12,60*

Ghi chú: Số liệu được chuyển sang $\sqrt{x}$ hoặc arcsin $\sqrt{x \pm \frac{1}{4n}}$ trước khi xử lý thống kê. Trong cùng một cột những số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 5% trong phép thử Duncan, *: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.



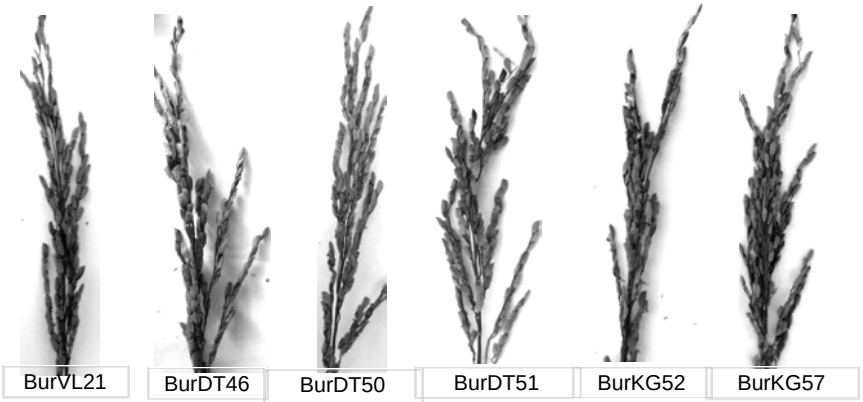
Hình 3. Độc tố do các dòng vi khuẩn *B. glumae* tiết ra trên môi trường King's 2% agar sau 48 giờ: (A) BurKG52, (B) BurDT50, (C) BurDT46, (D) BurVL21, (E) BurDT51 và (F) BurKG57

3.3.2. Ảnh hưởng của sáu dòng vi khuẩn B. glumae đến các thành phần năng suất lúa

Kết quả Bảng 2 cho thấy các thành phần năng suất khác biệt ý nghĩa giữa các nghiệm thức khi xử lý với sáu dòng vi khuẩn khác nhau ở mức ý nghĩa 5%.

- Về chỉ tiêu tỷ lệ hạt chắc (%), các nghiệm thức vẫn có sự khác biệt ý nghĩa với nhau. Nghiệm thức BurDT50 có tỷ lệ hạt chắc cao nhất 88,01% và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại. Kế đến là hai nghiệm thức BurVL21 và BurKG57 có tỷ lệ hạt chắc không khác biệt lần lượt là 75,54% và 73,45%. Cuối cùng nghiệm thức BurDT46 có tỷ lệ hạt chắc thấp nhất 39,53% và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại.

- Về chỉ tiêu trọng lượng hạt (g/chậu), các nghiệm thức có sự khác biệt nhau, dao động từ 18,47 (g/chậu) đến 34,51 (g/chậu). Trong đó, nghiệm thức BurDT46 có trọng lượng thấp nhất (18,47 g/chậu) và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại. Kế đến là nghiệm thức BurKG52 có trọng lượng 24,16 (g/chậu) khác biệt so với BurVL21 và BurDT50 nhưng không khác biệt với hai nghiệm thức BurDT51 và BurK57 có năng suất thực tế lần lượt là 27,28 và 27,83 (g/chậu).



Hình 4. Mức độ nhiễm bệnh thối hạt của sáu dòng vi khuẩn *B. glumae* tại thời điểm 10 NSKLB

IV. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu xác định được bệnh thối hạt trên lúa được phân lập tại Vĩnh Long, Kiên Giang và Đồng Tháp do vi khuẩn *Burkholderia glumae*. Ngoài ra, về khả năng gây hại trong 6 dòng vi khuẩn *B. glumae* phân lập được tại tỉnh Đồng Tháp, Vĩnh Long và Kiên Giang, dòng vi khuẩn *B. glumae* BurDT46 được phân lập từ Đồng Tháp sở hữu độc tính cao nhất với khả năng gây hại trên lúa cao nhất so các dòng vi khuẩn khác và tính gây hại cao của chủng này có liên quan đến khả năng tiết nhiều sắc tố vàng xung quanh khuẩn lạc trên môi trường King B 2%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agarwal, P. C., C. N. Mortensen and S. B. Mathur (1989). Seed-borne Diseases and Seed Health Testing of Rice. *CAB International Mycological Institute*, 104: 73 - 75 pp.
2. Goszczynska T., Serfontein J., Serfontein S. Safrinet (2000). Introduction to practical phytopathology: A manual for phytobacteriology. In.: ISBN 0-620-25487-4. Ultra Litho (Pty) Ltd, Heriotdale. Johannesburg.
3. Junior, J. C. R., Tamanini, R., Soares, B. F., de Oliveira, A. M., de Godoi Silva, F., da Silva, F. F. and Beloti, V. (2016). Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. *Semina: Ciências Agrárias*, *37*(5), 3069 - 3078.
4. Phạm Văn Phú (2015). Phòng trừ một số bệnh vi khuẩn hại lúa. Báo Nông nghiệp Việt Nam ngày 09/4/2015.
5. Tsushima, S. (1996). Epidemiology of bacterial grain rot of rice caused by *Pseudomonas glumae*. *JARQ*, *30*, 85 - 89.
6. Trung, H. M., N. V. Van, N. V. Vien, D. T. Lam and M. Lien (1993). Occurrence of rice grain rot disease in Vietnam. *International Rice Research Notes*, 18: 30.
7. Schaad, N. W., J. B. Jones, and W. Chun (2001). Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. No. Ed. 3. *American Phytopathological Society (*APS Press).
8. Shaner, G. and R. E. Finney (1997). The effect of nitrogen ferilization on the expression of slowmildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67: 1051 - 1056.
9. Zhou-qi, C., Bo, Z., Guan-lin, X., Bin, L., and Shi-wen, H. (2016). Research status and prospect of *Burkholderia glumae*, the pathogen causing bacterial panicle blight. *Rice Science*, *23*(3), 111 - 118.

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG CỦA XẠ KHUẨN ĐỐI VỚI NẤM *Helminthosporium maydis* GÂY BỆNH ĐỐM LÁ NHỎ HẠI BẮP

Lê Minh Tường[1], Lê Thị Ngọc Xuân[1] và Nguyễn Thị Thanh Xuân[2]

[1]Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ
[2]Khoa Nông nghiệp và TNTN, Trường Đại học An Giang
Email liên hệ: lmtuong@ctu.edu.vn; Điện thoại: 0918003719

Antagonistic activity evaluation of actinomycetes isolates against *Helminthosporium maydis* causing southern leaf blight on maize

The objective of this research was to investigate the potential antagonism of actinomycetes isolates against Helminthosporium maydis fungus causing southern leaf blight on maize. The antagonistic activity of 6 actinomycetes isolates toward H. maydis fungus were examined in the Laboratory conditions with 4 replications. The results showed that 3 actinomycetes isolates of TÔ-VL11d, KS-ST6b and BM-VL12 had highest antagonistic effect on H. maydis with radius of inhibition zones reache 11.00 mm, 11.40 mm, 9.60 mm, respectively and antagonistic efficacy of 53.93%, 53.13%, 51.27% at 10 days after testing. On the other hand, the efficiency of 6 actinomycetes isolates in prevention of H. maydis mycelial growth was conducted with 5 replications. The results indicated that BM-VL12 isolate had highest reduction on mycelial growth of H. maydis fungus with the colony diameter reache 45.6 mm at 7 days after inoculation.

Keywords: *Actinomycetes, Helminthosporium turcicum, Maize, prevention of mycelia growth, southern leaf blight.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngô (bắp) (*Zea mays* L.) là cây lương thực quan trọng trong nền kinh tế toàn cầu và ngô được sử dụng với ba mục đích chính như làm lương thực cho người, thức ăn cho gia súc và nguyên liệu cho nhiều sản phẩm công nghiệp (Đinh Thế Lộc *và ctv.*, 1997). Hiện nay, trên đồng ruộng trồng các giống ngô nhập nội và các giống bắp lai bị bệnh đốm lá nhỏ tấn công và gây hại đáng kể về năng suất và chất lượng bắp (Vũ Triệu Mân, 2007). Việc áp dụng biện pháp hóa học trong phòng trị bệnh bên cạnh mang lại hiệu quả nhanh chóng nhưng cũng gây ra nhiều vấn đề liên quan đến ô nhiễm môi trường, dư lượng trong nông phẩm, ảnh hưởng sức khỏe con người và gây ra tính kháng thuốc của mầm bệnh. Hiện nay, việc ứng dụng biện pháp phòng trừ sinh học trong quản lý dịch hại ngày càng được chú ý do chi phí thấp và thân thiện với môi trường (Huang *et al.*, 2010).

Người phản biện: TS. Nguyễn Đức Cương.

Trong số các vi sinh vật có triển vọng trong phòng trừ sinh học bệnh cây thì xạ khuẩn là nhóm được nghiên cứu và ứng dụng phổ biến (Lê Minh Tường *và ctv.*, 2016). Xạ khuẩn có khả năng đối kháng với nhiều mầm bệnh được ghi nhận thông qua các cơ chế tiết kháng sinh, tiết ra các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính kháng nấm, kháng vi khuẩn (Lam, 2006; Palaniyandi *et al.*, 2013); ký sinh trên mầm bệnh (Shimizu *et al.*, 2001), tiết ra enzyme ngoại bào (như cellulases, chitinases, β-glucanase...) (Lam, 2006; Lê Minh Tường *và ctv.*, 2016). Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm ra chủng xạ khuẩn có khả năng phòng trừ bệnh đốm lá nhỏ hại bắp do nấm *Helminthosporium maydis* gây ra, làm tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo về chế phẩm sinh học có nguồn gốc từ xạ khuẩn ứng dụng trong phòng trừ bệnh đốm lá nhỏ hại bắp nói riêng và bệnh hại cây trồng nói chung.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu thí nghiệm

- Nguồn xạ khuẩn: 6 chủng xạ khuẩn (TÔ-VL11d, KS-ST6b, KS-ST8b, BM-VL12, BT-CT7, BT-VL20) được cung cấp từ Phòng Thí nghiệm Bệnh cây, Bộ môn Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Cần Thơ. Các chủng xạ khuẩn trên thuộc chi *Streptomyces* và có khả năng đối kháng cao với nấm *Rhizoctonia solani* gây bệnh gây bệnh đốm vằn trên bắp với hiệu suất đối kháng từ 42,7% đến 60,8% (Lê Minh Tường và Đỗ Thanh Tuyền, 2016) và nấm *Rhizoctonia solani* gây bệnh gây bệnh đốm vằn trên lúa với hiệu suất đối kháng từ 63,50% đến 83,59% (Lê Minh Tường và Ngô Thị Kim Ngân, 2015).

- Nguồn nấm: Dòng nấm *H. maydis* do Phòng Thí nghiệm Bệnh cây, Bộ môn Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Cần Thơ cung cấp. Dòng nấm này đã được ghi nhận có triệu chứng điển hình của bệnh đốm lá nhỏ hại bắp thu thập tại xã Nhơn Nghĩa A, huyện Châu Thành A, tỉnh Hậu Giang và có khả năng xâm nhiễm và gây hại nặng nhất trên bắp trong số 8 dòng nấm thu thập được.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đánh giá khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm Helminthosporium maydis gây bệnh đốm lá nhỏ trên cây bắp trong phòng thí nghiệm

* *Tiến hành thí nghiệm:* Những chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trên môi trường MS trong 7 ngày, xác định mật số và chuyển về huyền phù với mật số xạ khuẩn cần dùng là 10^8 cfu/ml. Chủng nấm *H. maydis* được nuôi cấy trong môi trường PDA trong 5 ngày.

* *Bố trí thí nghiệm:* Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức là một chủng xạ khuẩn thí nghiệm. Khoanh khuẩn ty nấm *H. maydis* có đường kính 5 mm được trong đặt đĩa petri (chứa 10 ml môi trường PDA) và cách thành đĩa 1 cm. Khoanh giấy thấm có đường kính 5 mm được tẩm huyền phù các chủng xạ khuẩn thí nghiệm được đặt đối xứng với khoanh khuẩn ty nấm và cách thành đĩa 1 cm. Ở nghiệm thức đối chứng, các khoanh giấy thấm tẩm xạ khuẩn được thay bằng khoanh giấy thấm tẩm nước cất thanh trùng. Sau đó, các đĩa petri thí nghiệm được đặt ở điều kiện nhiệt độ 28^{o}C.

** Chỉ tiêu ghi nhận:*

- Đo bán kính vòng vô khuẩn ở các thời điểm 6, 7, 8, 9 và 10 ngày sau khi bố trí thí nghiệm.

- Đo bán kính tản nấm ở các thời điểm 6, 7, 8, 9 và 10 ngày sau khi bố trí thí nghiệm và tính hiệu suất đối kháng theo công thức (Palanayandi *et al.*, 2013).

HSĐK (%) = [(BKTNđc - BKTNxk)/BKTNđc] × 100

Trong đó: BKTNđc: Bán kính tản nấm phát triển về phía đối chứng.

BKTNxk: Bán kính tản nấm phát triển về phía xạ khuẩn.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của các chủng xạ khuẩn đối với sự phát triển khuẩn ty nấm Helminthosporium turcicum trên môi trường thạch

** Tiến hành thí nghiệm:* Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trên môi trường MS trong 7 ngày và chuyển về huyền phù với mật số 10^8 cfu/ml. Chủng nấm *H. maydis* được nuôi cấy trong môi trường PDA trong 5 ngày.

** Bố trí thí nghiệm:* Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 nhân tố và 5 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức là một chủng xạ khuẩn thí nghiệm. Cho 1 ml huyền phù xạ khuẩn (mật số 10^8 cfu/ml) vào đĩa petri chứa 9 ml môi trường PDA lỏng ở nhiệt độ 50^0C. Nghiệm thức đối chứng, đĩa petri chứa 9 ml PDA + 1 ml nước cất thanh trùng. Sau đó, đục các khoanh nấm *H. maydis* có đường kính 5mm và cho vào đĩa petri đã chuẩn bị.

** Chỉ tiêu ghi nhận:* Đo bán kính sự phát triển của tản nấm *H. maydis* ở thời điểm 4, 5, 6 và 7 ngày sau khi bố trí thí nghiệm.

2.2.3. Xử lý số liệu

Tất cả số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsofl Office Excel 2010 và phân tích bằng phần mềm thống kê MSTATC qua phép thử Duncan.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Helminthosporium turcicum* gây bệnh đốm lá nhỏ trên bắp trong điều kiện phòng thí nghiệm

Khả năng đối kháng của xạ khuẩn với nấm *H. maydis* gây bệnh đốm lá nhỏ trên bắp trong điều kiện phòng thí nghiệm được đánh giá thông qua bán kính vòng vô khuẩn (Bảng 1) và hiệu suất đối kháng (Bảng 2) ở các thời điểm 6, 7, 8, 9, 10 ngày sau bố trí thí nghiệm.

** Bán kính vòng vô khuẩn (BKVVK):* Ở thời điểm 6 ngày sau khi bố trí thí nghiệm (NSBT), tất cả các chủng xạ khuẩn đều thể hiện khả năng đối kháng với nấm *H. maydis* gây bệnh đốm lá nhỏ trên bắp. Trong đó, 3 chủng TÔ-VL11d, KS-ST8b và BM-VL12 có BKVK lần lượt là 21,40 mm, 21,40 mm và 22,40 mm, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại. Kết quả tương tự ở thời điểm 7 NSBT, 3 chủng TÔ-VL11d, KS-ST8b, BM-VL12 có BKVK cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại. Ở thời điểm 8 NSBT, chủng TÔ-VL11d tiếp tục thể hiện khả năng đối kháng cao với BKVVK tương ứng 15,20 mm, tuy không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chủng KS-ST6b có BKVVK là 14,40 mm nhưng cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại. Ở thời điểm 9 NSBT, chủng TÔ-VL11d tiếp tục thể hiện khả năng đối kháng cao với BKVVK tương

ứng 13,00 mm, tuy không khác biệt ý nghĩa thống kê so với chủng KS-ST6b có BKVVK là 12,60 mm nhưng cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại (Hình 1). Ở thời điểm 10 NSBT, 2 chủng TÔ-VL11d và KS-ST6b vẫn thể hiện khả năng đối kháng cao với BKVVK lần lượt là 11,00 mm và 11,40 mm, cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại.

Bảng 1. Bán kính vòng vô khuẩn của 6 chủng xạ khuẩn với nấm Helminthosporium maydis qua các thời điểm khảo sát

TT	Chủng xạ khuẩn	Bán kính vòng vô khuẩn (mm) qua các thời điểm				
		6 NSBT	7 NSBT	8 NSBT	9 NSBT	10 NSBT
1	TÔ-VL11^{d}	21,40^{a}	19,20^{a}	15,20^{a}	12,60^{ab}	11,00^{a}
2	KS-ST6^{b}	21,40^{a}	18,60^{a}	14,4^{ab}	13,00^{a}	11,40^{a}
3	KS-ST8^{b}	14,20^{c}	12,80^{c}	08,80^{d}	07,20^{d}	05,00^{c}
4	BM-VL12	22,40^{a}	19,00^{a}	13,40^{b}	11,60^{b}	09,60^{b}
5	BT-CT7	14,80^{bc}	12,80^{c}	08,60^{d}	06,80^{d}	04,60^{c}
6	BT-VL20	16,00^{b}	14,40^{b}	11,20^{c}	10,00^{c}	09,00^{b}
Mức ý nghĩa (%)		*	*	*	*	*
CV (%)		*6,21*	*6,04*	*7,65*	*8,95*	*10,72*

Ghi chú: Các số trong cùng một cột được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt qua phép kiểm định Duncan. *: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. NSBT: ngày sau khi bố trí thí nghiệm.

* *Hiệu suất đối kháng (HSĐK):* Ở thời điểm 6 NSBT, các chủng xạ khuẩn có HSĐK với nấm H. maydis ở những mức độ khác nhau, dao động từ 30,42% đến 39,58%. Trong đó chủng TÔ-Vl11d có HSĐK là 39,58%, tuy không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chủng KS-ST6b có HSĐK tương ứng 37,92% nhưng cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn còn lại.

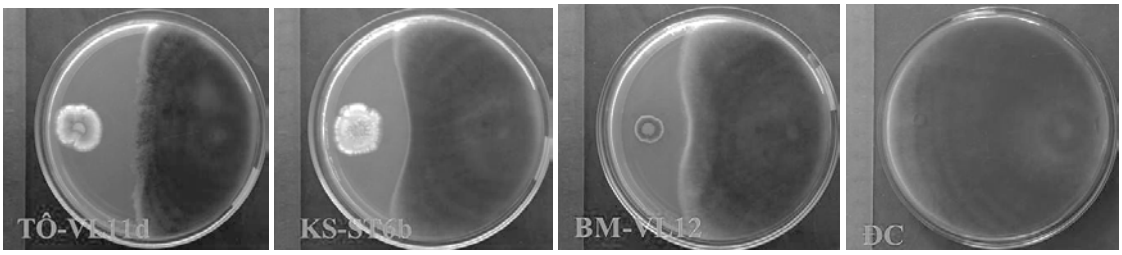
Bảng 2. Hiệu suất đối kháng của 6 chủng xạ khuẩn đối với nấm Helminthosporium maydis qua các thời điểm khảo sát

TT	Chủng xạ khuẩn	Hiệu suất đối kháng (%) qua các thời điểm				
		6 NSBT	7 NSBT	8 NSBT	9 NSBT	10 NSBT
1	TÔ-VL11^{d}	39,58^{a}	43,15^{a}	46,33^{a}	50,29^{a}	53,93^{a}
2	KS-ST6^{b}	37,92^{ab}	42,04^{a}	45,67^{a}	50,00^{a}	53,13^{a}
3	KS-ST8^{b}	31,25^{d}	35,37^{c}	39,67^{c}	43,82^{c}	44,87^{d}
4	BM-VL12	37,08^{b}	41,67^{a}	44,33^{ab}	48,82^{ab}	51,27^{b}
5	BT-CT7	30,42^{d}	34,26^{c}	40,00^{c}	44,12^{c}	44,33^{d}
6	BT-VL20	34,17^{c}	39,07^{b}	43,00^{b}	47,65^{b}	48,33^{c}
Mức ý nghĩa (%)		*	*	*	*	*
CV (%)		*3,68*	*2,79*	*3,42*	*2,40*	*2,07*

Ghi chú: Các số trong cùng một cột được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt qua phép kiểm định Duncan. *: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. Số liệu được biến đổi dưới dạng Arcsin(X) trước khi xử lý thống kê.

Ở thời điểm 7 NSBT, 3 chủng TÔ-VL11d, KS-ST6b và BM-VL12 thể hiện khả năng đối kháng cao với HSĐK lần lượt là 44,58%, 42,92% và 46,67%, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn còn lại. Ở thời điểm 8 NSBT, 2 chủng TÔ-VL11d và KS-ST6b vẫn thể hiện khả năng đối kháng cao với HSĐK tương ứng 46,33% và 45,67%, tuy không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chủng BM-VL12 với HSĐK là 44,33% nhưng cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn còn lại. Ở thời điểm 9 NSBT, 2 chủng TÔ-VL11d và KS-ST6b vẫn duy trì hiệu suất đối kháng cao, tuy không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chủng BM-VL12 nhưng cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn còn lại. Ở điểm 10 NSBT, 2 chủng xạ khuẩn TÔ-Vl11d và KS-ST6b với HSĐK lần lượt là 53,93% và 53,13% cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn còn lại.

Từ kết quả (bảng 1) và (bảng 2) cho thấy, 6 chủng xạ khuẩn thí nghiệm đều có khả năng đối kháng với nấm *H. maydis* gây bệnh đốm lá nhỏ trên bắp trong điều kiện phòng thí nghiệm ở những mức độ khác nhau, trong đó 2 chủng TÔ-Vl11d và KS-ST6b luôn thể hiện khả năng đối kháng cao, liên tục và kéo dài đến thời điểm 10 ngày sau khi bố trí thí nghiệm.



Hình 1. Khả năng đối kháng của xạ khuẩn đối với nấm *Helminthosporium maydis* gây bệnh đốm lá nhỏ hại bắp ở thời điểm 9 ngày sau khi bố trí thí nghiệm

3.2. Ảnh hưởng của các chủng xạ khuẩn đối với sự phát triển khuẩn ty nấm *Helminthosporium turcicum* trên môi trường thạch (agar)

Khả năng ức chế sự phát triển khuẩn ty nấm *H. maydis* của 6 chủng xạ khuẩn thí nghiệm được đánh giá thông qua đường kính tản nấm ở các thời điểm 4, 5, 6 và 7 ngày sau bố trí (NSBT) (Bảng 3). Ở thời điểm 4 NSBT, đường kính tản nấm ở nghiệm thức có xử lý xạ khuẩn dao động trong khoảng 23,80 - 50,60 mm, thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng (56,40 mm), trong số các chủng xạ khuẩn được khảo sát, chủng BM-VL12 có đường kính tản nấm thấp nhất, thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại. Đến thời điểm 5 NSBT, nghiệm thức BM-VL12 tiếp tục có đường kính tản nấm thấp nhất (30,20 mm), thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại.

Bảng 3. Đường kính phát triển của tản nấm Helminthosporium maydis qua các thời điểm khảo sát

TT	Chủng xạ khuẩn	Đường kính tản nấm (mm) qua các thời điểm			
		4 NSBT	5 NSBT	6 NSBT	7 NSBT
1	TÔ-VL11^{d}	50,60^{b}	61,00^{b}	70,60^{bc}	79,80^{b}
2	KS-ST8^{b}	50,20^{b}	61,00^{b}	71,80^{b}	78,60^{b}
3	KS-ST6^{b}	49,60^{bc}	57,80^{c}	72,00^{b}	78,40^{b}
4	BT-CT7	47,80^{c}	58,00^{c}	68,80^{c}	72,40^{c}
5	BM-VL12	23,80^{d}	30,20^{d}	37,80^{d}	45,60^{d}
6	BT-VL20	49,80^{bc}	62,80^{b}	72,80^{b}	82,00^{b}
7	ĐC	56,40^{a}	70,40^{a}	81,80^{a}	90,00^{a}
Mức ý nghĩa (%)		*	*	*	*
CV (%)		*3,49*	*2,55*	*2,41*	*3,46*

Ghi chú: Các số trong cùng một cột được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt qua phép kiểm định Duncan. *: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Đến thời điểm 6 NSBT, chủng BM-VL12 tiếp tục cho hiệu quả ức chế cao nhất với đường kính tản nấm là 37,80 mm, thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa so với tất cả các nghiệm thức còn lại. Ở thời điểm 7 NSBT, nghiệm thức BM-VL12 vẫn thể hiện khả năng ức chế cao nhất với đường kính tản nấm tương ứng 45,60 mm, thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại.

Từ kết quả (Bảng 3) cho thấy, tất cả 6 chủng xạ khuẩn thí nghiệm đều có khả năng ức chế sự phát triển khuẩn ty nấm *H. maydis* gây bệnh đốm lá nhỏ trên bắp, trong đó chủng BM-VL12 thể hiện khả năng ức chế cao nhất và kéo dài đến thời điểm 7 ngày sau khi bố trí thí nghiệm.

Tóm lại, 6 chủng xạ khuẩn thí nghiệm có khả năng đối kháng cao với nấm *H. maydis* đồng thời cũng thể hiện khả năng ức chế tốt sự phát triển khuẩn ty nấm. Điều này có thể giải thích là do các chủng xạ khuẩn có khả năng tiết ra nhiều chất có hoạt tính kháng nấm như chất kháng sinh, các enzyme ngoại bào (chintinase, β-glucanse), chất chuyển hóa thứ cấp,... Theo Zhang *et al.* (2016) một số loại kháng sinh do xạ khuẩn tiết ra như streptomycin, tetracyclin, gentamicin, rifamycin, erythromycin,... vừa có khả năng kháng nấm và vi khuẩn vừa có khả năng diệt côn trùng hay tuyến trùng. Prapagdee *et al.*, (2008) cho rằng chitinase và β-1,3-glucanase được sinh tổng hợp từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces hygroscopicus* có khả năng phá hủy và làm biến dạng vách tế bào của nấm *Colletotrichum gloeosporioides* và *Sclerotium rolfsii*.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

- Trong số 6 chủng xạ khuẩn thí nghiệm đã ghi nhận ba chủng TÔ-VL11d, KS-ST6b và BM-VL12 có khả năng đối

kháng cao nhất với nấm *H. maydis* và kéo dài đến thời điểm 10 ngày sau bố trí.

- Chủng BM-VL12 có khả năng ức chế sự phát triển khuẩn ty nấm *H. maydis* cao nhất và kéo dài đến thời điểm 7 ngày sau bố trí.

- Đề nghị tiếp tục khảo sát khả năng phòng trị bệnh đốm lá nhỏ trên bắp của 3 chủng xạ khuẩn TÔ-VL11d, KS-ST6b và BM-VL12 trong điều kiện nhà lưới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đinh Thế Lộc, Võ Nguyên Quyền, Bùi Thế Hùng và Nguyễn Thế Hùng (1997). Cây bắp. *Trong: Giáo trình Cây lương thực*, tập 2. Đại học Nông nghiệp I, Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.
2. Lam, K.S (2006). Discovery of novel metabolites from marine *Actinomycetes.* Current Opinion in Microbiology, 9: 245 - 251.
3. Lê Minh Tường và Đỗ Thanh Tuyền (2016). Hiệu quả phòng trị xạ khuẩn đối với bệnh đốm vằn trên bắp. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, 3: 62 - 69.
4. Lê Minh Tường và Ngô Thị Kim Ngân (2014). Phân lập và đánh giá khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Rhizoctonia solani* gây bệnh đốm vằn trên lúa. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 4: 113 - 119.
5. Lê Minh Tường, Đinh Hồng Thái, Lý Văn Giang và Phạm Tuấn Vủ (2016). Xạ khuẩn và vai trò của xạ khuẩn trong quản lý bệnh hại cây trồng. Trong: Quản lý dịch hại cây trồng thân thiện môi trường (Chủ biên: Nguyễn Thị Thu Cúc và Lê Văn Vàng). NXB. Đại học Cần Thơ.
6. Palanayandi, S. A., S.H. Yang, L. Zhang and J.W. Suh (2013). Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. Applied Microbiology and Biotechnology, 97: 9621 - 9636.
7. Prapagdee, B., C. Kuekulvong and S. Mongkolsuk (2008). Antifungal Potential of Extracellular Metabolites Produced by *Streptomyces hygroscopicus* against Phytopathogenic Fungi. *International Journal of Biological Sciences*, 4 (5): 330 - 337.
8. Shimizu, M., N. Fujita, Y. Nakagawa, T. Nishimura, T. Furumai, Y. Igarashi, H. Onaka, R. Yoshida and H. Kunoh (2001). Disease resistance of tissuecultured seedlings of rhododendron after treatment with *Streptomyces* sp. R-5. *Journal of General Plant Pathology*, 67: 325 - 332.
9. Vũ Triệu Mân (2007). Giáo trình Bệnh cây chuyên khoa. Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
10. Zhang, J., L.M. Wang, Y.H. Li, S. L. Ding, H.X. Yuan, I. T. Riley and H. L. Li (2016). Biocontrol of cereal cyst nematode by *Streptomyces anulatus* isolate S07. Australasian Plant Pathology, 45 (1): 57 - 64.

KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ NHÂN TẠO KHẢ NĂNG CHỐNG CHỊU BỆNH ĐẠO ÔN LÁ CỦA MỘT SỐ GIỐNG LÚA THUẦN CHỦ LỰC VÙNG ĐỒNG BẰNG SÔNG HỒNG

Nguyễn Huy Chung, Nguyễn Tiến Hưng,
Nguyễn Thị Tho, Lâm Thị Nhung, Lê Thị Phương Lan
Viện Bảo vệ thực vật

ABSTRACT

Evaluation of blast resistance of some inbred rice varieties in Red river delta

Rice blast (Magnaporthe oryzae) is one of the destructive diseases in all rice production areas. In Viet Nam, it is a major disease, occurring and damaging in all regions. In red river delta, north central and north moutainous areas, blast usually causes damage in spring crop season and more serious in sticky rice varieties. In order to provide the information for the resistance of rice varieties cultivated in red river delta region, we evaluated 30 inbred rice varieties by innoculation with 6 Magnaporthe oryzae isolates collected in the region. The result shows that there were 11 varieties that were resistant to blast in which 3 of them were sticky rice varieties. For other varieties that susceptible to blast, it is necessary to manage the blast during cultivation particularly in the favor weather season for blast.

Keywords: *Blast, Magnaporthe oryzae. Rice varieties.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh đạo ôn do nấm (*Magnaporthe oryzae* (Hebert) Barr. [anamorph, *Pyricularia oryzae* (Cooke) Sacc.]) gây ra là một trong những bệnh gây hại nghiêm trọng nhất và phân bố ở hầu hết các vùng trồng lúa trên thế giới (Ou, 1980). Ở Việt Nam, bệnh đạo ôn cũng là bệnh hại chính trên lúa tại hầu hết các vùng trồng lúa. Bệnh thường gây hại nặng hơn ở miền Bắc, ở vùng đồng bằng sông Hồng & đồng bằng ven biển miền Trung, bệnh đạo ôn thường gây hại trong vụ xuân. Gần đây bệnh còn phát sinh và gây hại ở vụ mùa tại một số địa phương. Để có thông tin về khả năng chống chịu bệnh đạo ôn của các giống lúa đang được gieo trồng phổ biến ở vùng đồng bằng sông Hồng, giúp cho việc sử dụng, chọn tạo giống lúa có hiệu quả, bài viết này sẽ đề cập kết quả đánh giá khả năng kháng bệnh đạo ôn của các giống lúa đang được gieo trồng phổ biến tại vùng đồng bằng sông Hồng.

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Viết.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu: Tổng số 21 giống lúa tẻ, 9 giống lúa nếp đang được gieo trồng phổ biến ở vùng đồng bằng sông Hồng, theo kết quả điều tra của Trần Xuân Định *và ctv.* (2017) và một số giống lúa mới được gieo trồng được thu thập và sử dụng trong nghiên cứu. Giống lúa đối chứng kháng: tẻ tép, giống lúa đối chứng nhiễm: CO-39.

Phương pháp lây nhiễm, đánh giá: Các giống lúa được gieo trong khay, mỗi giống 20 hạt, chăm sóc cho cây con phát triển tốt, khi có 3 - 5 lá thật tiến hành lây bệnh với dung dịch vẩn bào tử nồng độ 10^5/ml, bảo đảm điều kiện ẩm độ > 90% và nhiệt độ 25^0C để bệnh đạo ôn phát triển, tiến hành đánh giá sau lây nhiễm 7 ngày, khi giống chuẩn nhiễm đạt cấp bệnh cao nhất. Thí nghiệm được thực hiện tại Viện Bảo vệ thực vật năm 2019.

Thang điểm đánh giá bệnh đạo ôn lá theo phương pháp của IRRI (năm 2014).

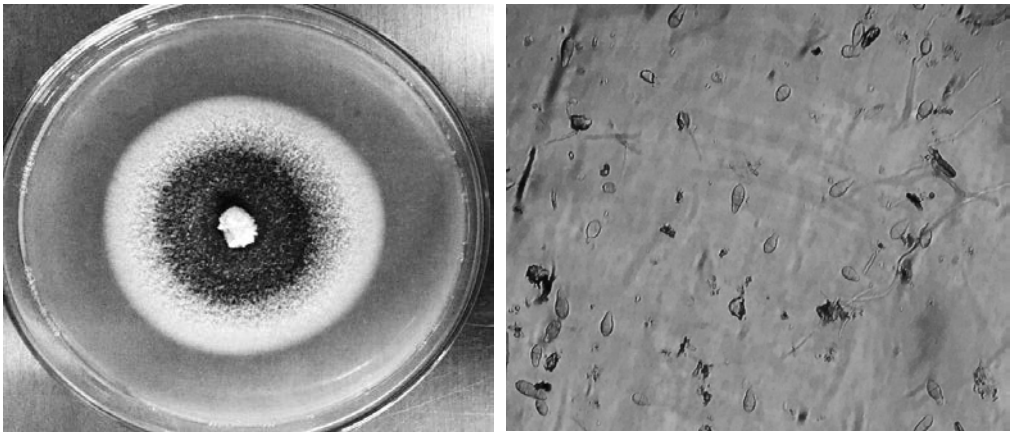
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Thu thập và phân lập nguồn nấm bệnh đạo ôn phục vụ thí nghiệm đánh giá tính chống chịu bệnh

Tổng số 06 isolates nấm bệnh được phân lập và sử dụng, từ các mẫu bệnh thu thập từ các vùng trồng lúa (Bảng 1).

Bảng 1. Các isolate nấm đạo ôn thu thập và sử dụng cho lây bệnh nhân tạo

TT	Isolate	Địa điểm thu thập	Vùng sinh thái
1	2018VNHN76	Liêm Chung - Phủ Lý - Hà Nam	Đồng bằng sông Hồng
2	2018VNNB79	Ninh Giang - Hoa Lư - Ninh Bình	Đồng bằng sông Hồng
3	2018VNHY96	Đặng Lễ - Ân Thi - Hưng Yên	Đồng bằng sông Hồng
4	2018VNHD108	Đoàn Tùng - Thanh Niệm - Hải Dương	Đồng bằng sông Hồng
5	2019VNVP130	Tiền Phong - Nhân Đạo - Sông Lô - Vĩnh Phúc	Đồng bằng sông Hồng
6	2019VNHY146	Ngô Quyền - Tiên Lữ - Hưng Yên	Đồng bằng sông Hồng



Hình 1. Hình ảnh nấm đạo ôn trên môi trường nhân tạo và bào tử nấm đạo ôn dưới kính hiển vi

3.2. Kết quả đánh giá bệnh đạo ôn lá của các giống lúa nếp vùng đồng bằng sông Hồng

Kết quả lây bệnh nhân tạo 9 giống lúa nếp đang được gieo trồng phổ biến ở vùng đồng bằng sông Hồng cho thấy phản ứng của mỗi giống với các isolate nấm bệnh không hoàn toàn giống nhau, có 2 giống kháng và kháng TB với bệnh đạo ôn lần lượt là nếp cô tiên và BM9603, nếp 97 (điểm 3-5). Một số giống nhiễm và nhiễm nặng đạo ôn là nếp bắc, nếp lang liêu, nếp 415, nếp cái hoa vàng (điểm TB > 7).

Bảng 2. Kết quả đánh giá khả năng chống chịu bệnh đạo ôn lá của các giống lúa nếp vùng đồng bằng sông Hồng

TT	Tên giống	Cấp bệnh với từng isolate						Cấp bệnh TB
		2018 VNHN76	2018 VNNB79	2018 VNHY96	2018 VNHD108	2019 VNVP130	2019 VNHY146	
1	Nếp 97	7	5	5	5	5	5	5,33
2	Nếp DN 20	7	5	9	5	5	5	6,00
3	Nếp cô tiên	3	3	3	3	3	5	3,33
4	Nếp lang liêu	7	7	9	7	7	7	7,33
5	Nếp 415	7	5	9	9	7	9	7,67
6	BM 9630	5	5	5	5	5	5	5,00
7	Nếp đài loan	9	5	5	7	7	5	6,33
8	Nếp bắc	9	7	7	9	9	7	8,00
9	Nếp cái hoa vàng	7	9	7	7	5	7	7,00
	Tẻ tép (ĐC kháng)	3	3	3	3	3	1	2,67
	CO39 (ĐC nhiễm)	9	7	7	9	9	7	8,00

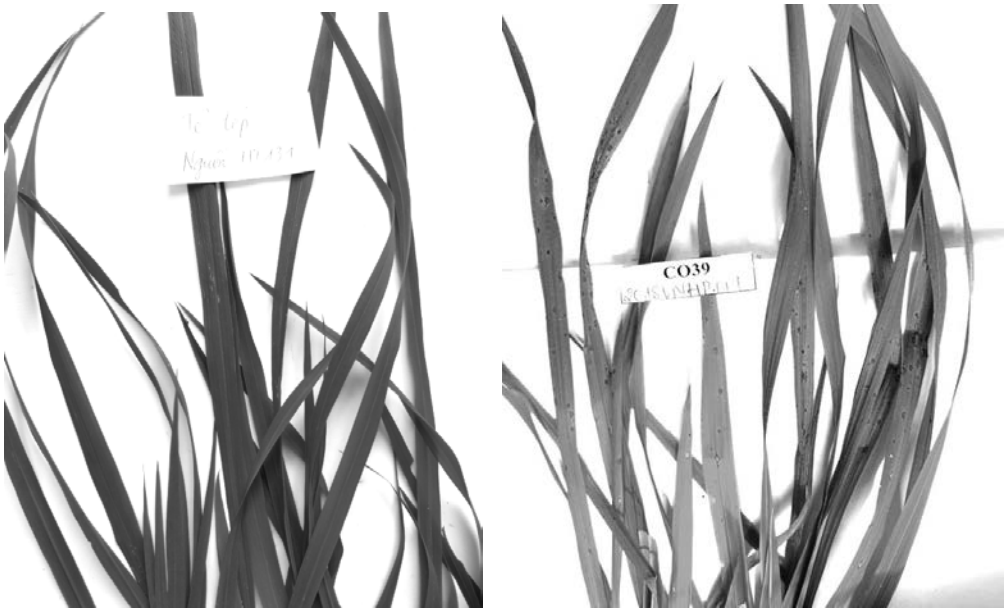
3.3. Kết quả đánh giá bệnh đạo ôn lá của các giống lúa tẻ thuần vùng đồng bằng sông Hồng

Tổng số 21 giống lúa tẻ thuần phổ biến tại vung đồng bằng sông Hồng đã được thu thập và lây nhiễm nhân tạo bệnh đạo ôn với 6 isolate nấm bệnh thu thập trong vùng. Kết quả được trình bày ở Bảng 3. Kết quả đánh giá cho thấy có sự khác biệt về khả năng chống chịu của các giống lúa với các isolate nấm bệnh gây đạo ôn lá. Có 8 giống chống chịu bệnh khá cao (cấp bệnh TB < 4) là các giống ADI 168, TBR 45 (NC 3), thơm RVT, dự hương 8, VNR 20, ADI 28, ADI 30, LP 5. Các giống lúa nhiễm bệnh đạo ôn lá với hầu hết các isolate lây nhiễm và có cấp bệnh TB > 6 là các giống hương thơm 1, BC 15, khang dân 18, đài thơm 8, Q 5, nàng xuân, T 10. Có

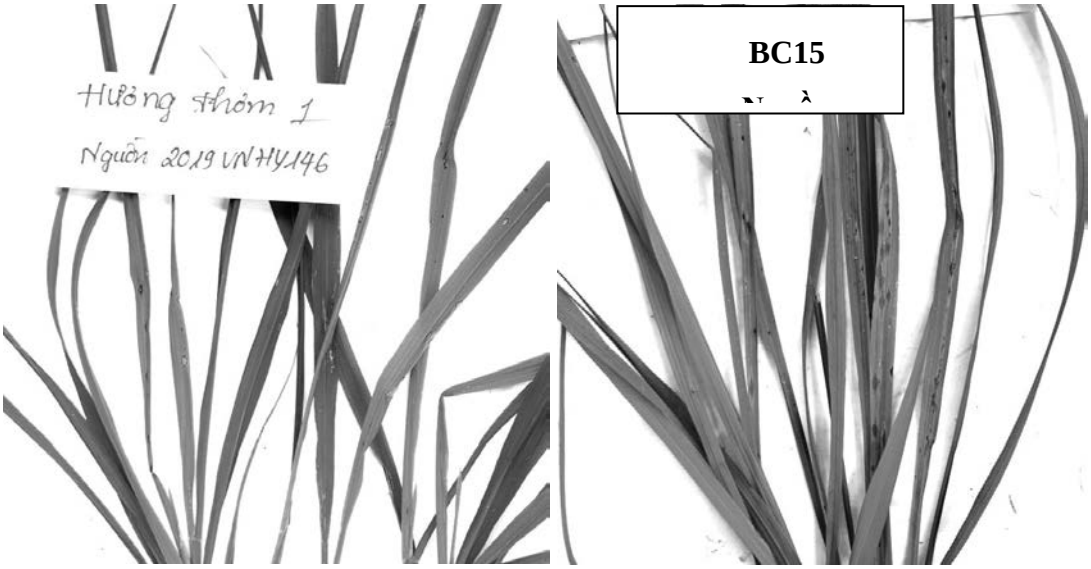
6 giống lúa nhiễm đạo ôn TB (cấp bệnh TB 4 - 6). Kết quả đánh giá nhân tạo cũng phù hợp với thực tế sản xuất ở vùng đồng bằng sông Hồng, các giống thường bị bệnh đạo ôn nặng là BC 15, hương thơm 1, đài thơm 8...

Bảng 3. Kết quả đánh giá khả năng chống chịu bệnh đạo ôn lá của các giống lúa thuần vùng đồng bằng sông Hồng

TT	Tên giống	Cấp bệnh với từng isolate						Cấp bệnh TB
		2018 VNHN76	2018 VNNB79	2018 VNHY96	2018 VNHD108	2019 VNVP130	2019 VNHY146	
1	Hương thơm 1	9	5	5	7	5	7	6,33
2	BC 15	5	7	7	9	7	7	7,00
3	Bắc thơm 7	7	3	5	5	3	7	5,00
4	Thiên ưu 8	3	5	3	7	3	3	4,00
5	Khang dân 18	9	5	7	5	5	5	6,00
6	JO 2	7	5	5	5	5	5	5,33
7	Đài thơm 8	7	5	5	9	9	7	7,00
8	Q5	9	5	5	9	5	5	6,33
9	ADI 168	3	3	3	3	3	3	3,00
10	TBR 45	3	3	3	5	3	3	3,33
11	Thơm RVT	3	3	3	5	3	3	3,33
12	Nàng xuân	9	5	5	5	7	5	6,00
13	Dự hương 8	3	3	3	3	3	3	3,00
14	Sơn lâm 1	7	5	5	5	5	5	5,33
15	HDT 8	7	5	7	5	5	5	5,67
16	Tám xoan đột biến	7	5	3	5	5	5	5,00
17	VNR20	3	3	3	3	3	3	3,00
18	T10	7	7	9	5	5	5	6,33
19	ADI 28	3	3	3	3	3	3	3,00
20	ADI 30	3	3	3	3	3	3	3,00
21	LP5	3	3	3	3	3	3	3,00
	Tẻ tép (ĐC kháng)	3	3	3	3	3	1	2,67
	CO39 (ĐC nhiễm)	9	7	7	9	9	7	8,00



Hình 2. Lây bệnh nhân tạo bệnh đạo ôn trên giống đối chứng



Hình 3. Lây bệnh nhân tạo bệnh đạo ôn trên giống lúa

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết quả đã thu thập, phân lập 6 isolate nấm bệnh đạo ôn và lây nhiễm nhân tạo cho 30 giống lúa trong đó có 9 giống lúa nếp, 21 giống lúa tẻ thuần.

Vùng đồng bằng sông Hồng có 3/8 giống lúa nếp trong thí nghiệm chống chịu đến chống chịu trung bình bệnh đạo ôn bao gồm nếp 97, nếp cô tiên, BM 9603.

Nhóm lúa tẻ thuần có 8 giống chống chịu bệnh tốt (cấp bệnh TB < 4) là các giống ADI 168, TBR 45, thơm RVT, dự hương 8, VNR 20, ADI 28, ADI 30, LP 5.

Các giống lúa nhiễm bệnh đạo ôn lá bao gồm: giống lúa nếp bắc, nếp lang liêu, nếp 415, nếp cái hoa vàng; lúa tẻ thuần: BC 15, hương thơm 1, đài thơm 8, Q5, nàng xuân. Trong quá trình canh tác sử dụng các giống lúa này cần theo dõi và có biện pháp chủ động phòng trừ bệnh đạo ôn.

Kết quả này cho thấy thực trạng hầu hết các giống lúa hiện nay nhiễm bệnh đạo ôn, do đó cần đầu tư chọn tạo, cải tạo khả năng kháng bệnh đạo ôn của các giống lúa hiện có và chủ động phòng trừ bệnh đạo ôn cho các giống lúa nhiễm bệnh đạo ôn khi gieo trồng ở các vùng trồng lúa, đặc biệt là vụ Xuân, khi điều kiện thời tiết rất thuận lợi cho bệnh đạo ôn phát sinh, phát triển.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Don D. L., Kusaba M., Urashima S. A., Tosa Y., Nakayashiki H. & Mayama S. (1999). Population structure of the rice blast fungus in Japan examined by DNA fingerprinting. Japanese Journal of Phytopathology. Vol. 65. No.1.P.15 - 24.
2. International Rice Research Institute (2014). Standard Evaluation System for Rice.
3. Ou S.H. (1980). Pathogen variability and host resistance in rice blast disease. Annual Review of Phytopathology. Vol. 18.P. 167 - 187.
4. Trần Xuân Định, Nguyễn Như Hải, Nguyễn Văn Vương & Phạm Văn Thuyết (2017). Kết quả điều tra, rà soát giống lúa toàn quốc, phục vụ tái cấu trúc ngành hàng lúa gạo. Hội thảo Quốc gia về Khoa học cây trồng lần thứ hai.

MỘT SỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU BỆNH LỞ CỔ RỄ (*Rhizoctonia solani* Kühn) HẠI MỘT SỐ CÂY TRỒNG CẠN NĂM 2019 TẠI GIA LÂM, HÀ NỘI VÀ BIỆN PHÁP PHÒNG TRỪ

Đỗ Tấn Dũng

Học viện Nông nghiệp Việt Nam

ABSTRACT

Studies on the damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* Kühn fungus in the range of different upland crops grown in 2019 in Gia Lam, Ha Noi and control methods

Damping-off disease (Rhizoctonia solani) is well-known to be a serious crop disease in the range of crops, such as tomato, soybean, cucumber, cowpea and peanut. Results of the current status of damping-off disease in 2019 showed that the developmental and harmful diseases on host plants were different and the highest rate of tomato disease was 7.6%, groundnut (4.5%), soybean (6.3%), cucumber (7.2%) and cowpea (6.6%). In addition to this, results from morphological and biological characteristics and pathogenicity of R. solani fungus isolates indicated that R. solani has wide host range. The inhibitory effect of Trichodema viride (T. viride) antagonistic fungus against fungal isolates of R. solani on artificial medium demonstrated that the inhibitory effect with fungal isolate causing damping-off disease reached 79.1% on tomato, and reached 79.8% on cucumber. The effect of T. viride to prevent damping-off disease in pot conditions (on the ground disinfection) showed that the effect of T. viride antagonistic fungus with damping-off disease reached 73.2% on tomato, and 76.2% on cucumber.

Keywords: *Damping-off disease, Rhizoctonia solani fungus, host plant, Trichoderma viride antagonistic fungus.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong số các bệnh nấm hại vùng rễ trên cây trồng có nguồn gốc trong đất thì bệnh lở cổ rễ (LCR) do loài *Rhizoctonia solani* (*R. solani* Kühn) phát sinh gây hại phổ biến trên nhiều chủng loại cây trồng khác nhau thuộc họ Cà, họ Đậu, họ Bầu bí,... Nấm gây bệnh có phạm vi ký chủ

Người phản biện: PGS.TS. Hà Viết Cường.

rộng, nguồn bệnh tồn tại chủ yếu trong đất, trên tàn dư cây bệnh, cây ký chủ, cỏ dại, vật liệu giống nhiễm bệnh,... Ảnh hưởng của các điều kiện thời tiết khí hậu, kỹ thuật chăm sóc, địa thế đất đai, chế độ luân canh cây trồng đến sự phát sinh và gây hại của bệnh cũng rất khác nhau. Vì vậy, việc tiến hành điều tra nghiên cứu mức độ phổ biến, tác hại của bệnh lở cổ rễ và khảo sát biện pháp sinh học phòng trừ bệnh là cần thiết trong sản xuất cây rau màu hiện nay ở vùng Hà Nội và phụ cận.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Điều tra, thu thập mẫu bệnh lở cổ rễ hại một số cây ký chủ như cà chua, lạc, đậu tương, dưa chuột, đậu đũa,... và mẫu hạt giống một số loại cây trồng. Môi trường dùng để phân lập, nuôi cấy nấm *R. solani* như môi trường PDA (khoai tây - gluco - agar), PCA (khoai tây - cà rốt - agar) và môi trường WA (nước cất - agar). Nấm đối kháng *Trichoderrma viride* do Bộ môn Bệnh cây, Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam cung cấp. Đất phù sa được khử trùng và một số hóa chất, vật tư thiết yếu khác phục vụ cho thí nghiệm. Nghiên cứu được thực hiện tại Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam và một số vùng trồng rau màu, huyện Gia Lâm, Hà Nội.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Điều tra bệnh lở cổ rễ hại một số cây trồng theo phương pháp điều tra phát hiện sâu bệnh hại cây trồng của Cục Bảo vệ thực vật (1995), Viện Bảo vệ thực vật (1997). Chọn ruộng, chọn điểm, điều tra theo phương pháp 5 điểm chéo góc, cố định điểm điều tra, mỗi điểm 50 cây, đếm số cây bị bệnh, tính tỷ lệ bệnh (TLB%), điều tra định kỳ 7 ngày một lần.

Phương pháp phân lập mẫu bệnh lở cổ rễ và phân lập nấm gây bệnh, theo phương pháp nghiên cứu bảo vệ thực vật, Viện Bảo vệ thực vật (1997).

Nghiên cứu đặc điểm hình thái, sinh học của các mẫu phân lập (Isolate) nấm *R. solani* trên môi trường PDA: Đặc điểm màu sắc tản nấm, hình thái sợi nấm, khả năng hình thành hạch, ảnh hưởng của nhiệt độ, môi trường nuôi cấy đến sự phát triển của nấm.

Nghiên cứu phạm vi ký chủ của nấm *R. solani*: từ các isolate nấm *R. solani* thuần đã phân ly nuôi cấy được, lây nhiễm nhân tạo trên một số cây ký chủ (cà chua, dưa chuột, đậu tương) trong điều kiện chậu vại. Tiến hành lây nhiễm trên các mẫu hạt giống của một số cây trồng (lây nhiễm trên hạt khỏe); thí nghiệm được nhắc lại 3 lần, mỗi lần 30 hạt, 10 hạt trên mỗi chậu, mỗi chậu dùng 1 đĩa petri (đường kính 90 mm) nuôi cấy nấm *R. solani* thuần. Theo dõi số cây bị bệnh sau lây nhiễm 7 - 14 ngày; tính TLB (%).

Khảo sát hiệu lực ức chế và hiệu lực phòng trừ của nấm đối kháng *Trichoderrma viride* với nấm *R. solani* gây bệnh lở cổ rễ trên cây cà chua, dưa chuột trên môi trường nhân tạo và trong điều kiện chậu vại.

- *Các chỉ tiêu theo dõi và phương pháp xử lý số liệu:*

$$\text{TLB (\%)} = \frac{A}{B} \times 100$$

Trong đó: A là số cây nhiễm bệnh lở cổ rễ; B: tổng số cây điều tra.

Hiệu lực ức chế (HLƯC %):

$$\text{HLƯC \%} = \frac{ĐC - TN}{ĐC} \times 100$$

Trong đó: ĐC: Đường kính tản nấm ở công thức đối chứng; TN: Đường kính tản nấm ở công thức thí nghiệm.

Hiệu lực phòng trừ (HLPT %):

$$\text{HLPT \%)} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

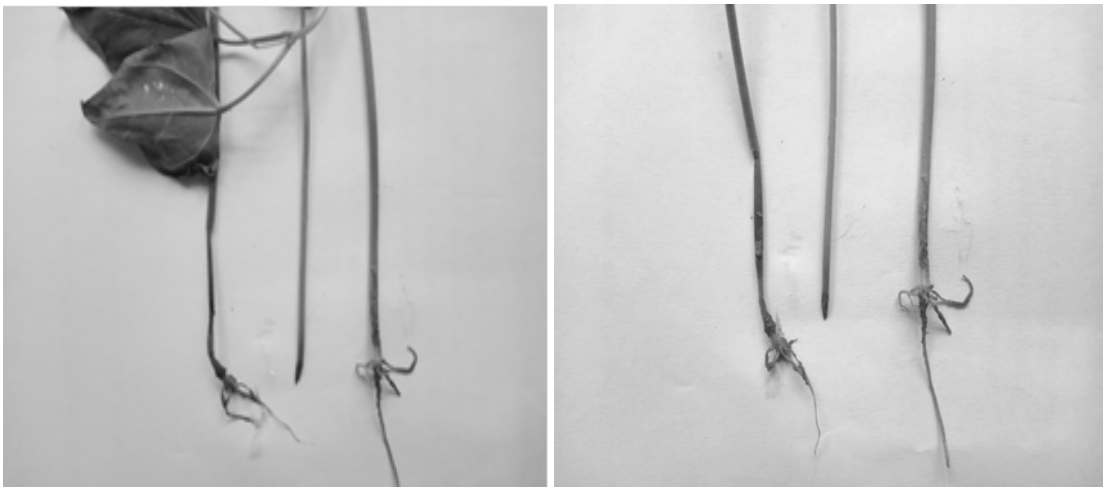
Trong đó: C là số hạt (cây) nhiễm bệnh lở cổ rễ ở công thức đối chứng, T là số hạt (cây) nhiễm bệnh lở cổ rễ ở công thức thí nghiệm (xử lý nấm đối kháng *Trichoderrma viride*).

Các kết quả được tính toán sai số thí nghiệm bằng phương pháp phân tích phương sai với phần mềm IRRISTAT 5.0 (Phạm Tiến Dũng, Nguyễn Đình Hiền, 2010).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Điều tra, thu thập bệnh lở cổ rễ gây hại trên một số cây trồng cạn tại Gia Lâm, Hà Nội năm 2019

Triệu chứng điển hình của bệnh là gây hại ở thời kỳ cây con, vết bệnh ban đầu có màu nâu, nâu nhạt ở phần cổ rễ hay phần thân còn non sát mặt đất, về sau chuyển sang màu nâu - nâu đen, vết bệnh phát triển làm cho bộ phận bị bệnh teo thắt, cây con đổ gục và chết (Hình 1). Bệnh phát triển gây hại làm ảnh hưởng lớn đến số cây trên diện tích gieo trồng, đến sự sinh trưởng và phát triển của cây. Kết quả điều tra, thu thập bệnh lở cổ rễ (LCR) gây hại trên một số cây trồng được thể hiện ở Bảng 1.



Hình 1. Triệu chứng bệnh lở cổ rễ hại cây đậu cô ve tại Phú Thị, Gia Lâm, Hà Nội

Bảng 1. Tình hình bệnh lở cổ rễ trên một số cây trồng cạn tại Gia Lâm, Hà Nội năm 2019

Kỳ điều tra sau gieo, trồng (ngày)	Tỷ lệ bệnh (%) trên các cây ký chủ				
	Cà chua	Lạc	Đậu tương	Dưa chuột	Đậu đũa
7	7.6	0	0	0.8	0.4
14	6.4	4.5	6.3	7.2	6.6
21	3.6	3.2	5.2	5.1	4.7
28	2.8	1.7	2.8	2.2	1.6
35	0.4	0.8	0.5	1.4	1.1

Bệnh lở cổ rễ phát sinh phát triển rất phổ biến trên các loại cây rau màu khác nhau. Bệnh phát sinh gây hại nặng ở thời kỳ cây con và mức độ nhiễm bệnh giảm dần vào giai đoạn cây đã lớn. Mức độ nhiễm bệnh lở cổ rễ đạt cao nhất trên cà chua, lac, đậu tương, dưa chuột, đậu đũa ở thời điểm điều tra sau gieo trồng 7 - 14 ngày, tương ứng là 7,6%; 4,5%; 6,3%; 7,2% và 6,6%. Điều tra bệnh lở cổ rễ trên các loại cây trồng khác nhau như cây cải canh, cải bắp, súp lơ, mồng tơi, xà lách,... cũng cho chúng tôi những nhận xét tương tự về tình hình phát sinh gây hại của bệnh ngoài đồng ruộng.

3.2. Nghiên cứu một số đặc điểm hình thái, sinh học của các mẫu phân lập (isolate) nấm *Rhizoctonia solani* gây bệnh lở cổ rễ trên một số cây trồng cạn

Kết quả nghiên cứu trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Một số đặc điểm hình thái, sinh học các isolate nấm Rhizoctonia solani* Kühn *gây bệnh lở cổ rễ trên một số cây trồng cạn

Chỉ tiêu / Isolate nấm *R. solani*	Vách tế bào sợi nấm	Đặc điểm sợi nấm	Màu sắc sợi nấm	Khả năng hình thành hạch	Đặc điểm tản nấm
R. solani đậu đũa	Dày	Nhiều nhân, nhân to	Vàng nâu	Không	Màu vàng nâu, dẹt, bám chặt mặt môi trường
R. solani cà chua	Mỏng	Ít nhân, nhân nhỏ	Vàng nhạt	Không	Màu vàng nâu, dẹt, bám chặt mặt môi trường
R. solani dưa chuột	Mỏng	Ít nhân, nhân nhỏ	Vàng nhạt	Không	Màu vàng nâu, dẹt, bám chặt mặt môi trường
R. solani lạc	Mỏng	Ít nhân, nhân nhỏ	Vàng nhạt	Không	Màu vàng nâu, dẹt, bám chặt mặt môi trường
R. solani đậu tương	Mỏng	Ít nhân, nhân nhỏ	Vàng nhạt	Không	Màu vàng nhạt, sợi nấm bông, xốp trên mặt môi trường
R. solani xà lách	Dày	Ít nhân, nhân nhỏ	Vàng nâu	Có	Màu vàng nhạt, sợi nấm bông, xốp trên mặt môi trường

Phân li nuôi cấy nấm, nghiên cứu nấm *Rhizoctonia solani* trên môi trường nhân tạo WA, PDA và giám định tác nhân gây bệnh. Kết quả cho thấy các isolate nấm *Rhizoctonia solani* đều có đặc điểm: tản nấm ban đầu có màu vàng nâu, nâu vàng nhạt, về sau chuyển sang màu nâu sẫm. Tản nấm thường phát triển với tốc độ rất nhanh, mịn áp sát bề mặt môi trường hoặc xốp, sợi nấm đa bào, màu nâu hoặc nâu vàng, phân nhánh nhiều, chỗ phân nhánh sợi nấm hơi thắt lại, sát đó có vách ngăn, phân nhánh gần như vuông góc. Hạch nấm khi non có màu trắng, khi hạch già có màu nâu, hơi thô, không định hình (chỉ có isolate nấm *R. solani* trên cây xà lách hình thành hạch trên môi trường). Các isolate nấm *R. solani* làm biến đổi màu môi trường nuôi cấy từ màu trắng đục, sang màu vàng nâu- nâu sẫm. Một số đặc điểm cấu tạo sợi nấm, màu sắc sợi, vách tế bào sợi nấm cũng có sự khác nhau giữa các isolate nấm *R. solani* phân lập từ các cây ký chủ (Hình 2).

- Nghiên cứu phạm vi ký chủ của nấm *R. solani* gây bệnh lở cổ rễ: Lây nhiễm nhân tạo trong điều kiện chậu vại trên các cây ký chủ. Tiến hành sử dụng các isolate nấm *R. solani* thuần phân lập trên 3 cây ký chủ thuộc các họ thực vật khác nhau. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Bảng 3.

Số liệu Bảng 3 cho thấy các isolate nấm *R. solani* phân lập từ cây cà chua, dưa chuột, đậu tương đều có thể lây nhiễm chéo cho nhau. Thời kỳ tiềm dục trên các cây ký chủ ngắn, dao động từ 3 - 4 ngày. Tỷ lệ phát bệnh trên các cây trồng lây nhiễm cũng khác nhau, khi lây nhiễm các isolate nấm *R. solani* trên chính cây ký chủ thường cao hơn so với khi lây nhiễm isolates nấm *R. solani* phân lập từ cây trồng khác họ thực vật. Mặt khác, các isolate nấm *R. solani* phân lập trên các cây ký chủ cùng họ thực vật khi lây nhiễm chéo cho nhau đều cho tỷ lệ phát bệnh cao hơn các cây ký chủ khác họ. Qua đó cho thấy các isolate nấm *R. solani* gây hại trên cây ký chủ khác nhau thể hiện tính gây bệnh và tính độc khác nhau. Kết quả nghiên cứu trên là cơ sở khoa học trong việc ứng dụng biện pháp luân canh trong phòng trừ bệnh lở cổ rễ gây hại các loại cây rau màu khác nhau.

Bảng 3. Kết quả lây nhiễm nhân tạo nấm R. solani gây bệnh lở cổ rễ trên một số cây ký chủ

Isolate nấm *R. solani*	Loại cây ký chủ	Số cây lây bệnh	Số cây nhiễm bệnh	Tỷ lệ phát bệnh (%)	Thời kỳ tiềm dục (ngày)
Cà chua	Cà chua	90	86	95,5a	3 - 4
	Dưa chuột	90	84	93,3a	3 - 4
	Đậu tương	90	80	88,8b	4 - 5
Dưa chuột	Cà chua	90	85	94,4b	3 - 4
	Dưa chuột	90	87	96,6a	3
	Đậu tương	90	82	91,1c	4 - 5
Đậu tương	Cà chua	90	79	87,7b	4 - 5
	Dưa chuột	90	83	92,2a	3 - 4
	Đậu tương	90	85	94,4a	3 - 4

3.3. Khảo sát hiệu lực ức chế của nấm đối kháng *Trichoderrma viride* (*T. viride*) với nấm *Rhizoctonia solani* (*R. solani*) hại cà chua và dưa chuột trên môi trường nhân tạo PDA

Thí nghiệm bố trí gồm 4 công thức, mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần 3 đĩa petri: CT1: Cấy riêng rẽ nấm *T. viride* và nấm *R. solani* riêng rẽ ; CT2: Cấy nấm *T. viride* trước, sau 24 giờ cấy nấm *R. solani*; CT3: Cấy nấm *R. solani* trước, sau 24 giờ cấy nấm *T. viride*; CT4: cấy cùng nấm *R. solani* và nấm *T. viride* trên hộp môi trường. Chỉ tiêu theo dõi: Đo đường kính tản nấm ở mỗi công thức sau thí nghiệm 24, 48, 72 giờ, tính hiệu lực ức chế của nấm *T. viride* với nấm *R. solani* theo công thức Abbott. Kết quả thí nghiệm trình bày ở Bảng 4 và 5.

Số liệu Bảng 4 và 5 đã cho thấy khi nấm đối kháng *T. viride* có mặt trước nấm *R. solani* trên môi trường thì hiệu lực ức chế (HLƯC) cao nhất, tới 79,1% với nấm *R. solani* gây bệnh lở cổ rễ ở cà chua và 79,8% với nấm *R. solani* gây bệnh lở cổ rễ ở dưa chuột. Còn khi nấm đối kháng *T. viride* có mặt cùng hoặc sau nấm gây bệnh *R. solani* thì HLƯC của nó giảm dần. Qua đó chứng tỏ rằng khi nấm đối kháng có mặt trước nấm gây bệnh thì bản thân nó có khả năng sinh trưởng, phát triển nhanh, chiếm chỗ, cạnh tranh, sản sinh enzyme và độc tố có tác dụng ức chế, tiêu diệt nấm gây bệnh.

Bảng 4. Khảo sát hiệu lực ức chế của nấm đối kháng T. viride với nấm R. solani gây bệnh lở cổ rễ cây cà chua trên môi trường PDA

Công thức / Đường kính tản nấm (mm) sau thí nghiệm	Công thức 1		Công thức 2		Công thức 3		Công thức 4	
	T. viride	*R. solani*	*T. viride*	*R. solani*	*T. viride*	*R. solani*	*T. viride*	*R. solani*
24 giờ	24,5	21,6	23,3	-	-	21,5	22,9	20,8
48 giờ	64,1	54,7	53,7	21,1	21,7	45,9	52,1	32,7
72 giờ	90,0	90,0	69,6	18,9	30,2	58,1	54,1	35,0
HLƯC (%)			79,1		35,5		61,1	

Bảng 5. Khảo sát hiệu lực ức chế của nấm đối kháng T. viride với nấm R. solani gây bệnh lở cổ rễ cây dưa chuột trên môi trường PDA

Công thức / Đường kính tản nấm (mm) sau thí nghiệm	Công thức 1		Công thức 2		Công thức 3		Công thức 4	
	T. viride	*R. solani*	*T. viride*	*R. solani*	*T. viride*	*R. solani*	*T. viride*	*R. solani*
24 giờ	23,7	21,7	22,5	-	-	21,5	21,3	20,8
48 giờ	63,6	55,2	62,9	21,1	21,1	45,2	52,1	22,8
72 giờ	90,0	90,0	71,2	18,2	18,2	64,2	54,5	34,3
HLƯC (%)			79,8		28,7		61,9	

3.4. Khảo sát hiệu lực của nấm đối kháng *T. viride* phòng trừ bệnh lở cổ rễ cây cà chua và cây dưa chuột trong điều kiện chậu vại

Từ các kết quả nghiên cứu hiệu lực ức chế của nấm *T. viride* với các isolate nấm *R. solani* trên môi trường nhân tạo, chúng tôi tiến hành nghiên cứu khả năng phòng trừ bệnh lở cổ rễ gây hại ở cà chua và dưa chuột bằng nấm *T. viride* trong điều kiện chậu vại, trên nền đất phân đã khử trùng. Thí nghiệm gồm 4 công thức, mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần một chậu, mỗi chậu 30 hạt (hạt cà chua và dưa chuột khỏe).

Ghi chú: CT1: Ngâm hạt cà chua (hoặc hạt dưa chuột) trong dịch nấm *R. solani* 30 phút, sau đó gieo; CT2: Ngâm hạt cà chua (hoặc hạt dưa chuột) trong dịch nấm *R. solani* 30 phút, sau đó gieo, khi cây có lá mầm thì xử lý bằng dịch nấm *T. viride*; CT3: Ngâm hạt cà chua (hoặc hạt dưa chuột) trong dịch nấm *T. viride* 30 phút, sau đó gieo, khi có lá mầm thì xử lý bằng dịch nấm *R. solani*; CT4: Ngâm hạt cà chua (hoặc hạt dưa chuột) trong hỗn hợp dịch nấm *R. solani* và *T. viride* 30 phút, sau đó gieo.

Kết quả thí nghiệm phòng trừ bệnh lở cổ rễ thể hiện ở Bảng 6 và 7. Kết quả thí nghiệm cho thấy nấm đối kháng *T. viride* có hiệu lực cao trong phòng trừ bệnh lở cổ rễ gây hại ở cà chua và dưa chuột. Khi xử lý hạt cà chua (hoặc hạt dưa chuột) trong dịch nấm đối kháng *T. viride* trước nấm *R. solani* thì hiệu lực phòng trừ bệnh lở cổ rễ trên cà chua đạt cao nhất là 73,2% và bệnh lở cổ rễ hại trên dưa chuột là 76,2%. Còn khi xử lý hạt bằng nấm đối kháng *T. viride* cùng với nấm *R. solani* thì hiệu lực phòng trừ bệnh lở cổ rễ trên cà chua và dưa chuột tương ứng là 52,6% và 50,1%, nhưng khi xử lý hạt bằng nấm đối kháng *T. viride* sau nấm *R. solani* phát sinh gây hại, thì hiệu lực phòng trừ bệnh của nấm đối kháng giảm xuống rõ rệt (HLPT bệnh lở cổ rễ hại cà chua là 31,7% và bệnh lở cổ rễ dưa chuột là 36,9%).

Bảng 6. Hiệu lực phòng trừ của nấm đối kháng Trichoderma viride với bệnh lở cổ rễ cây cà chua trong điều kiện chậu vại

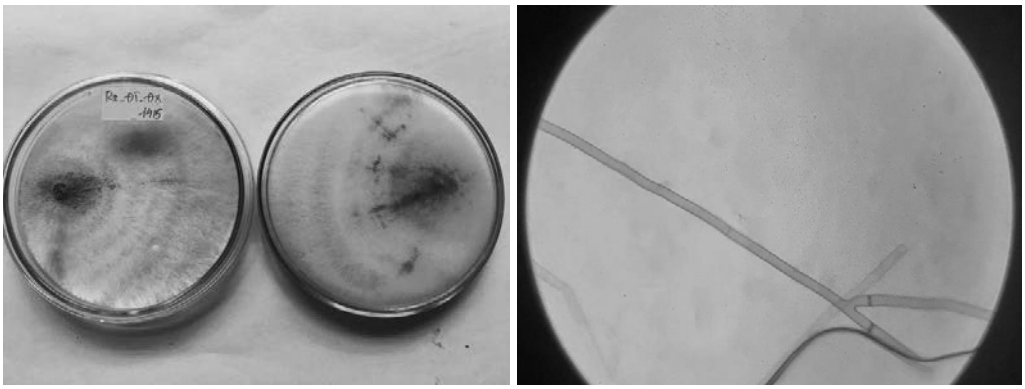
Công thức	Tổng số hạt lây bệnh	Số hạt nhiễm bệnh	TLB (%)	HLPT (%)
CT 1	90	82	91,1 [a]	0
CT 2	90	56	62,2 [b]	31,7
CT 3	90	22	24,4 [d]	73,2
CT 4	90	40	44,4 [c]	52,6

Bảng 7. Hiệu lực phòng trừ của nấm đối kháng Trichoderma viride với bệnh lở cổ rễ cây dưa chuột trong điều kiện chậu vại

Công thức	Tổng số hạt lây bệnh	Số hạt nhiễm bệnh	TLB (%)	HLPT (%)
CT 1	90	84	93,3 [a]	0
CT 2	90	53	58,8 [b]	36,9
CT 3	90	20	22,2 [d]	76,2
CT 4	90	42	46,6 [c]	50,1

IV. KẾT LUẬN

Bệnh lở cổ rễ hại cây trồng do loài nấm *R. solani* Kühn là một trong các loại bệnh phổ biến, phát sinh gây hại trên nhiều loại cây trồng khác nhau, nhất là giai đoạn cây con. Loài *R. solani* Kühn là loài có tính ký sinh đa thực và có phạm vi ký chủ rộng trên nhiều loài cây trồng như họ Cà, họ Đậu, họ Bầu bí,... Nấm đối kháng *Trichoderma viride* có hiệu lực ức chế cao với nấm *R. solani* trên môi trường nhân tạo đạt tới 79,1% với nấm gây bệnh lở cổ rễ cây cà chua và 79,8% với nấm gây bệnh lở cổ rễ cây dưa chuột. Hiệu lực phòng trừ của nấm đối kháng *Trichoderma viride* với bệnh lở cổ rễ cây cà chua đạt tới 73,3% và bệnh lở cổ rễ cây dưa chuột là 76,3% trong điều kiện thí nghiệm trên chậu vại.



Hình 2. Hình thái tản nấm, sợi nấm *Rhizoctonia solani* gây bệnh lở cổ rễ cây đậu tương

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cục Bảo vệ thực vật (1995). Phương pháp điều tra phát hiện sâu, bệnh, cỏ dại hại cây trồng, NXB. Nông nghiệp Hà Nội.
2. Đỗ Tấn Dũng (2001). Bệnh héo rũ hại một số cây trồng cạn và biện pháp phòng chống, NXB. Nông nghiệp Hà Nội, 89 trang.
3. Phạm Tiến Dũng, Nguyễn Đình Hiền (2010). Thiết kế thí nghiệm và xử lý kết quả bằng phân tích thống kê IRRISTAT, NXB. Tài chính, Hà Nội.
4. Lê Lương Tề, 1997. Nghiên cứu hoạt tính đối kháng và khả năng ứng dụng chế phẩm sinh học *Trichoderma viride* phòng trừ bệnh cây, Tạp chí BVTV số 4/1997, tr.8 - 12.
5. Trần Thị Thuần, 1998. Hiệu quả đối kháng của nấm *Trichoderma viride* đối với nấm hại cây trồng, Tạp chí BVTV số 4/1998, tr. 16 - 20.
6. Viện Bảo vệ thực vật (1997). Phương pháp nghiên cứu Bảo vệ thực vật tập I, NXB. Nông nghiệp Hà Nội.
7. Rachid Lahlali *et al.* (2010). Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato. Research letter, University of Montréal, QC, Canada.
8. Radwan M. Barakat *et al.* (2007). Biological control of Rhizoctonia solani by indigenous *Trichoderma* spp isolates from Palestine, Hebron University Research Journal, vol 3, No1, pp.1 - 15.
9. Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A. (1991). Identification of *Rhizoctonia* Species. American Phytopathological Society, APS Press. St. Paul, MN., p. 126 - 135.
10. Vincelli, P.C., Beaupro, C. M.S. (1989). Comparison of media for isolating *Rhizoctonia solani* from soil. Plant Dis, pp. 1014 - 1017., p. 25 - 36.

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG LÂY NHIỄM CỦA MỘT SỐ CHỦNG NẤM PHÂN LẬP TỪ LÁ ĐẬU TƯƠNG BỊ BỆNH PHẤN TRẮNG

Trần Thị Hoa[1], Lý Khánh Linh[1], Tạ Thị Đông[1], Bùi Phương Thảo[1], Trần Thị Trường[3], Chu Hoàng Hà[1,2], Phạm Bích Ngọc[1,2], Đỗ Tiến Phát[1,2]

[1] Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
[2] Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
[3] Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Cây đậu đỗ, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

ABSTRACT

Research of infectious possibility of some strains of fungus isolated from soybean leaves infected powdery mildew

Soybean is one of the most important crops providing major vegetable protein and oil sources for human consumption and animal feed. However, soybean production in Vietnam only meets 8 - 10% of the domestic demand due to certain challenges. The powdery mildew disease has been known as the main cause of reduced soybean yield, especially in Spring soybean production. In this study, 4 strains of the fungus (MĐT2, MĐT4, MĐT5 and MĐT6) were isolated from infected powdery mildew ĐT26 soybean leaves based on morphological characteristics. The toxicity test using in vitro leaves and 14 day-old soybean plants indicated that all 4 isolated fungal strains caused toxicity to soybean. However, the clear infected symptoms were only observed in the leaves of 14-day-old ĐT26 soybean plants. MĐT2 and MĐT6 were highly toxic to soybean indicated by the fastest spreading, causing death of infected soybean plants after one week of infection. The other strains MĐT4 and MĐT5 showed lower toxicity to soybean, the damage causing by MĐT5 on soybean leaves was only observed after 45 days of infection. This primary result is the potential for further researches to protect soybeans from fungal diseases, particularly powdery mildew.

Keywords: *ĐT26, fungal disease, powdery mildew, soybean.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu tương là một trong những cây trồng quan trọng nhất trên thế giới bởi hàm lượng cao của cả dầu và protein trong hạt (Wilson *et al.*, 2008). Ngoài ra, đậu tương được biết đến là cây trồng có giá trị cải tạo đất tốt và thường được dùng trong các công thức luân canh. Hàm

Người phản biện: TS. Phan Thị Hồng Thảo.

lượng protein trong hạt đậu tương chiếm 35 - 50% tổng trọng lượng khô và là nguồn cung cấp protein thực vật chính trong chế độ ăn của con người và nguồn dinh dưỡng cho động vật. Protein đậu tương cũng có thành phần acid amin cân đối và giàu acid amin thiết yếu. Hạt đậu tương được sử dụng rộng rãi trong chế biến các loại thực phẩm hàng ngày như: đậu phụ, sữa đậu, tương đậu, giá đậu,... Ngoài ra, đậu tương còn là nguồn nguyên liệu sơ cấp để tạo ra các sản phẩm thứ cấp có giá trị cao như lecithin, vitamin và chất chống oxy hóa (Liu *et al.*, 2014).

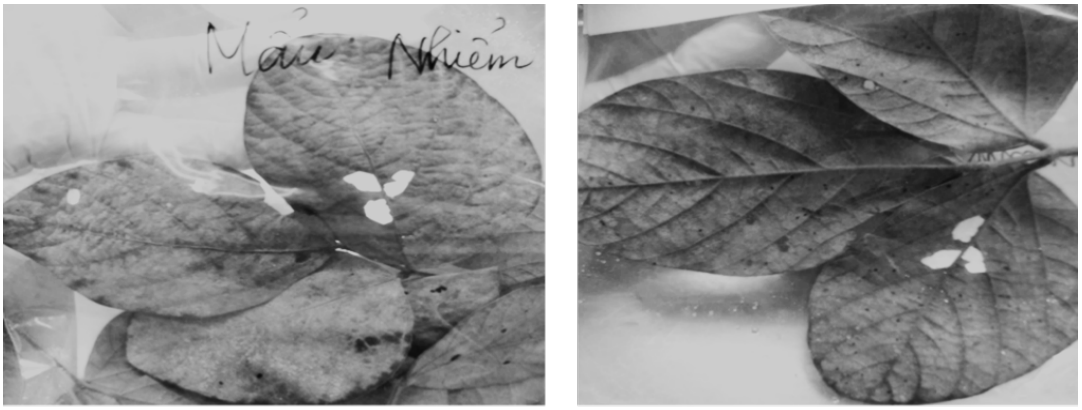
Việt Nam là một trong những nước nhập khẩu đậu tương tăng trưởng nhanh nhất trên thế giới trong thập kỷ qua. Nhìn chung, sản xuất đậu tương trong nước mới chỉ đủ cung cấp cho khoảng 8 - 10% nhu cầu tiêu thụ. Theo số liệu của Tổng cục Hải quan, hơn 1,2 triệu tấn đậu tương được Việt Nam nhập khẩu mỗi năm. Dù vậy, diện tích trồng đậu tương hàng năm ở Việt Nam vẫn chưa cao và không ổn định. Điều này có thể đến từ nhiều nguyên nhân nhưng một trong số những trở ngại lớn nhất vẫn là tác động của sâu bệnh hại. Trong đó, một trong những bệnh hại đậu tương phổ biến và nghiêm trọng ở nước ta là bệnh phấn trắng.

Bệnh phấn trắng là một trong những bệnh hại đậu tương với các sợi nấm bám và bao phủ khắp bề mặt lá, đặc biệt là mặt trên của lá, làm giảm quang hợp và mất dinh dưỡng lá. Bệnh lây lan nhanh bằng bào tử phân sinh và phát triển mạnh trong điều kiện nhiệt độ 18 - 240C. Bệnh phấn trắng gây hại trên rất nhiều loại cây trồng, trong đó có đậu tương, đặc biệt vào vụ Xuân Hè ẩm ướt. Phấn trắng có thể làm giảm năng suất đậu tương lên tới 60% trong điều kiện vụ xuân (Trần Thị Trường *và cộng sự*, 2010). Bệnh xuất hiện và gây hại ngay từ thời kỳ cây con với các triệu chứng có thể nhận biết bằng mắt thường. Thời điểm ban đầu, trên lá xuất hiện những chòm nhỏ mất màu xanh hóa vàng. Sau một thời gian, một lớp nấm trắng dày đặc như bột phấn bao trùm cả phiến lá. Lá bệnh chuyển dần từ màu xanh sang vàng, lá khô cháy và dễ rụng. Lớp phấn trắng có thể lan rộng và bao phủ trên cả thân, cành, hoa khi cây nhiễm bệnh nặng. Cây bị bệnh sinh trưởng yếu, phẩm chất kém, năng suất thấp và thậm chí có thể chết. Mặc dù bệnh phấn trắng đã xuất hiện và gây hại cho đậu tương từ lâu nhưng những nghiên cứu về chúng vẫn còn rất hạn chế (Trần Thị Trường *và cộng sự*, 2015; 2017). Việc xác định rõ thành phần loài nấm xuất hiện trên mẫu bệnh phấn trắng và độc tính, khả năng lây nhiễm của chúng có vai trò quan trọng trong phòng từ tác hại của loại bệnh này trên cây đậu tương.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

- Lá đậu tương ĐT26 bị bệnh phấn trắng 90 ngày tuổi được thu từ nhà lưới của Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Cây đậu đỗ, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. Ở các lá bị nhiễm bệnh, lớp phấn trắng bao phủ gần hết mặt trên của lá đậu tương và có thể lan cả xuống mặt sau của phiến lá (Hình 1).



Hình 1. Mặt trước (A) và mặt sau (B) lá đậu tương nhiễm bệnh phấn trắng

- Hạt giống đậu tương ĐT26 được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Cây đậu đỗ, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam và được lưu giữ tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phân lập nấm bệnh

Lá nhiễm bệnh được thu về, rửa bề mặt bằng nước vô trùng, để ráo tự nhiên và tiến hành phân lập. Sử dụng phương pháp pha loãng của Nguyễn Lân Dũng *và cs.* (2000), môi trường khoai tây PDA có bổ sung chloramphenicol (0,2%) được sử dụng. Quá trình làm thuần được thực hiện bằng cách tiếp tục cấy truyền các tản nấm trên bề mặt môi trường PDA có bổ sung chloramphenicol liên tiếp 2 - 3 lần. Sau khi đã làm thuần, các chủng nấm được cấy trên môi trường giữ giống thạch dinh dưỡng Sabouraud (SNA) theo phương pháp giữ giống trên thạch nghiêng (Nguyễn Lân Dũng, 1983).

Các chủng nấm được nuôi ở 25^0C trong vòng 3 - 5 ngày, sau đó được quan sát bằng mắt thường và dưới kính hiển vi sỏi nổi về bề mặt khuẩn lạc nấm, hình dạng khuẩn ty.

2.2.2. Cách lây nhiễm mốc trên lá cây đậu tương in vitro

Chủng nấm bệnh đã được làm thuần, cấy chấm điểm trên bề mặt lá đậu tương khoẻ mạnh đã được làm ẩm bằng nước vô trùng, thí nghiệm lặp lại 3 lần trên 3 lá hoặc tuỳ số lượng. Mẫu lá sau lây nhiễm được nuôi trong điều kiện vô trùng sử dụng môi trường agar 2% water agar (WA). Mỗi đĩa đặt 3 lá. The dõi sự lây nhiễm mốc sau 4 tuần ở 25^0C.

2.2.3. Cách lây nhiễm mốc trên cây đậu tương trong điều kiện vô trùng

Hạt đậu tương của giống ĐT26 được gieo trong điều kiện *in vitro*. Sau 12 - 14

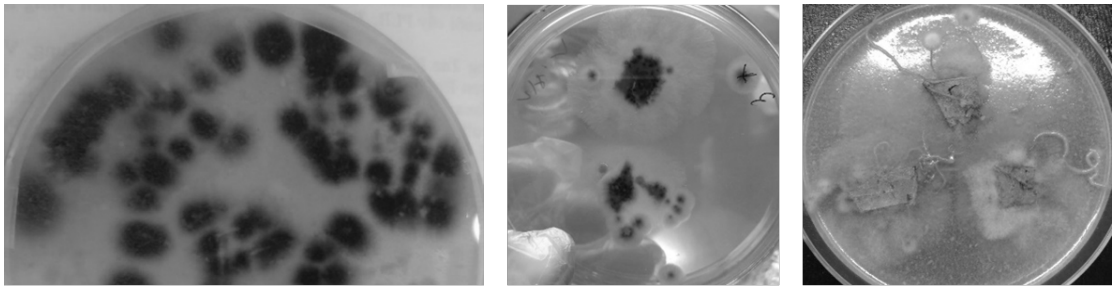
ngày, khi cây vươn cao và ra những cặp lá thật thứ 2 và 3, cây được đưa xuống buồng thích nghi nhiệt độ 24 - 25^{0}C trong điều kiện vô trùng và được sử dụng cho lây nhiễm nấm.

Chủng nấm đã làm thuần, dùng que cấy vô trùng lấy nửa vòng que cấy phết lên mặt lá, thí nghiệm được thực hiện trên 3 điểm khác nhau của 1 cây, lặp lại 2 - 3 cây. Theo dõi sự lây nhiễm của nấm trên cây sau 2 - 3 ngày và kéo dài 6 tuần ở cùng nhiệt độ.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nhận diện sơ bộ các dòng nấm phân lập được thông qua hình thái

Từ mẫu lá đậu tương ĐT26 nhiễm phấn trắng và không nhiễm bệnh, chúng tôi tiến hành phân lập các dòng nấm trên môi trường PDA (Hình 2). Những dòng nấm điển hình có hình dạng khác nhau được lựa chọn và tiếp tục làm thuần. Sau 5 ngày nuôi cấy, đặc điểm của các dòng nấm đã chọn được ghi nhận và tổng hợp trong Bảng 1.

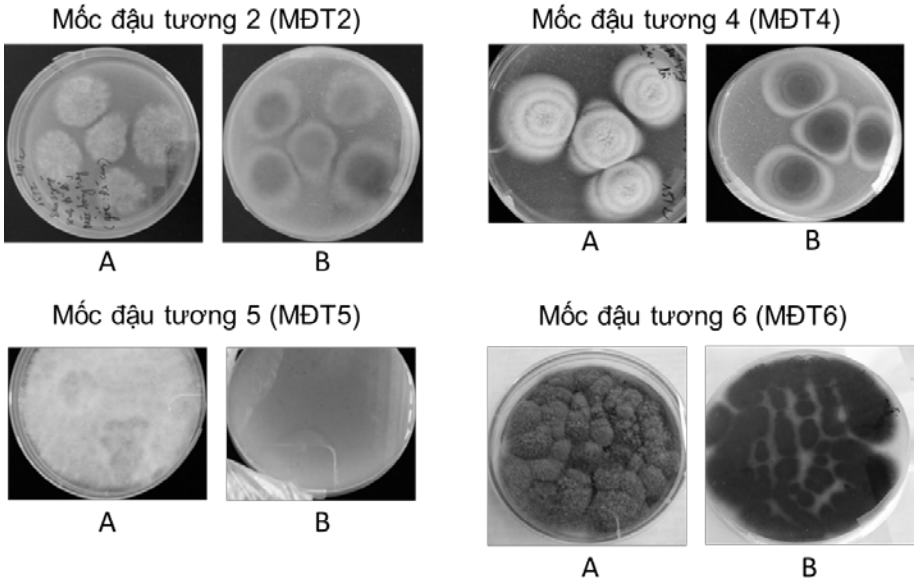


Hình 2. Hình ảnh phân lập nấm từ lá đậu tương nhiễm bệnh phấn trắng
A. Cấy trải dịch lắc dH_2O với lá bị nhiễm phấn trắng; B. Cấy mẫu nấm bám trên bề mặt lá nhiễm phấn trắng; C. Cấy trực tiếp lá nhiễm phấn trắng lên đĩa

Kết quả, chúng tôi phân lập được 4 loại nấm mốc khác nhau và kí hiệu lần lượt MĐT2, MĐT4, MĐT5 và MĐT6 từ các mẫu lá đậu tương nhiễm bệnh phấn trắng (Hình 3). Trong đó, chỉ có MĐT6 xuất hiện cả ở mẫu ĐT26 nhiễm phấn trắng và mẫu ĐT26 không nhiễm bệnh. Dòng MĐT2 có tản nấm màu vàng nâu, cam nhạt lúc ban đầu và chuyển dần sang màu đỏ về sau. Tản nấm MĐT2 không tròn, phát triển với tốc độ vừa phải, có sợi trắng. Bên cạnh đó, tản nấm MĐT4 cũng có tốc độ phát triển vừa phải, có sợi trắng, tản nấm tròn. Tản nấm ban đầu có màu vàng nhạt, về sau chuyển dần sang màu xanh đen. Nấm MĐT5 và MĐT6 có tốc độ phát triển mạnh. Chỉ sau 2 - 3 ngày nuôi cấy ở 25^{0}C, sợi nấm đã bao phủ kín đĩa cấy. Nấm MĐT5 có hệ sợi bông và trắng sau 8 ngày nuôi cấy chuyển sang màu xanh rêu đậm, viền trắng ngà, bề mặt mịn và tạo búi lồi, khuẩn ty cơ chất có màu vàng nhạt. Để xác định độc tính của 4 chủng nấm này với cây đậu tương, tiến hành lây nhiễm các chủng nấm này vào các mẫu đậu tương giống ĐT26.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của các chủng nấm phân lập

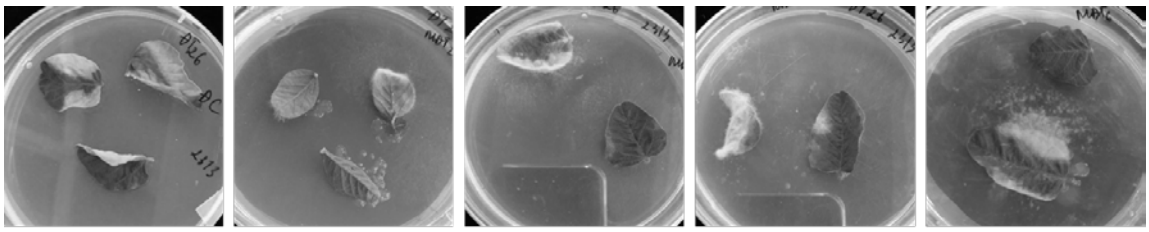
TT	Ký hiệu chủng nấm	Màu sắc, đặc điểm khuẩn lạc
1	MĐT2	Khuẩn ty cơ chất có màu cam sau 3 ngày chuyển đỏ, sợi nấm ở rìa ngoài có viền trắng, khuẩn lạc không tròn đều, sợi nấm có màu trắng và bông
2	MĐT4	Khuẩn lạc tròn, trắng, bề mặt khuẩn lạc có dạng hệ sợi mịn và tạo các vòng phát triển đồng tâm, khuẩn ty cơ chất có màu vàng hơi xanh sau 4 ngày
3	MĐT5	Khuẩn lạc có màu trắng, sợi lan, khuẩn ty cơ chất có màu trắng và bông, sau 8 ngày khuẩn ty cơ chất chuyển hơi vàng
4	MĐT6	Khuẩn lạc có màu xanh rêu đậm, bề mặt bông viền trắng ngà



Hình 3. Mặt trước (A), mặt sau (B) khuẩn lạc của 4 chủng nấm phân lập từ lá đậu tương nhiễm bệnh phấn trắng

3.2. Kết quả lây nhiễm các dòng nấm phân lập vào lá đậu tương ĐT26 trong điều kiện *in vitro*

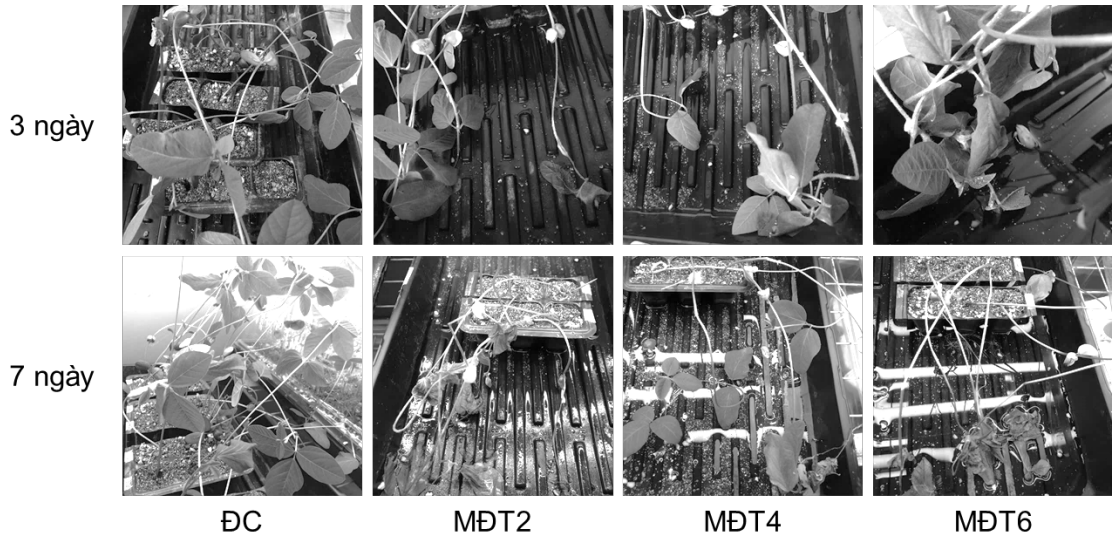
Ở mẫu đối chứng không xâm nhiễm nấm, lá đậu tương *in vitro* khỏe mạnh. Quan sát biểu hiện của lá ta thấy lá đậu tương ĐT26 không lây nhiễm nấm chỉ bị vàng dần từ mép lá vào trong, mẫu sạch, không xuất hiện hiện tượng nhiễm nấm. Trong khi đó, ở tất cả các mẫu lá đậu tương ĐT26 lây nhiễm các chủng nấm đã phân lập được, chúng tôi đều quan sát thấy các sợi nấm hình thành trên bề mặt lá và dần lan ra môi trường xung quanh (Hình 4). Ở điều kiện *in vitro*, các chủng nấm phân lập được đều thể hiện độc tính với lá đậu tương ĐT26 sau 10 ngày lây nhiễm. Các sợi nấm hình thành trên bề mặt lá đều có màu trắng và hình thái khá giống nấm gây bệnh phấn trắng ở đậu tương. Chúng tôi tiếp tục thử độc tính của các chủng nấm phân lập được trên đối tượng cây đậu tương ĐT26 ở giai đoạn 14 ngày tuổi để có đánh giá toàn diện hơn.



Hình 4. Kết quả lây nhiễm ngược các dòng nấm phân lập được vào lá đậu tương ĐT26 ở điều kiện *in vitro* sau 10 ngày

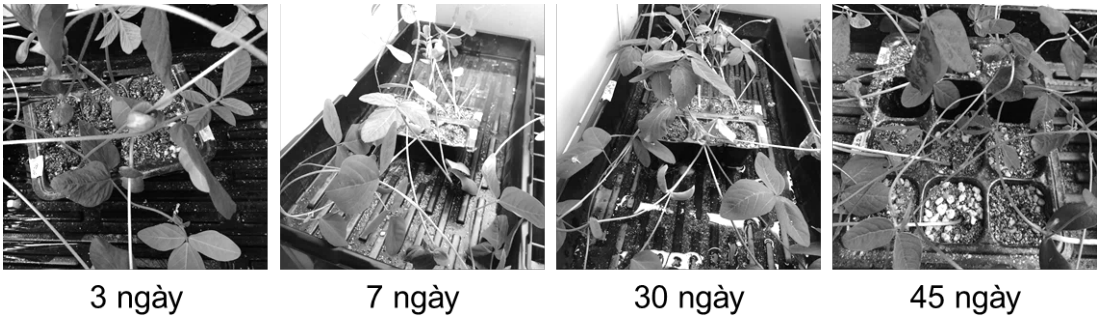
3.3. Kết quả lây nhiễm các chủng nấm phân lập vào cây đậu tương ĐT26 ở giai đoạn 14 ngày tuổi

Kết quả thử khả năng lây nhiễm của các chủng nấm MĐT2, MĐT4, MĐT5 và MĐT6 trên cây đậu tương ĐT26 ở giai đoạn 14 ngày tuổi cho thấy chủng MĐT2, MĐT4 và MĐT6 có độc tính khá mạnh (Hình 5). Chỉ 3 ngày sau khi lây nhiễm ta đã quan sát thấy sự thối nhũn ở lá được lây nhiễm. Trong đó, chủng MĐT2 và MĐT6 có độc tính mạnh hơn. Sau 3 ngày, không chỉ lá bị lây nhiễm bị nhiễm nấm và thối nhũn mà nấm còn lây lan và gây chết ở thân và ngọn liền kề lá lây nhiễm. Các sợi nấm trắng mọc lên thành cụm từ vị trí cây bị thối nhũn và sau một tuần, tất cả các cây đậu tương ĐT26 lây nhiễm hai chủng này đều bị thối và chết. Trong khi đó, một vài cây đậu tương giống ĐT26 lây nhiễm chủng MĐT4 vẫn còn sống và phát triển. Tuy nhiên, tất cả các cây này đều sinh trưởng kém, yếu ớt và và xuất hiện vàng lá.



Hình 5. Kết quả lây nhiễm các dòng nấm MĐT2, MĐT4 và MĐT6 vào cây đậu tương ĐT26 14 ngày tuổi

Điều đáng ngạc nhiên là chủng nấm MĐT6 được phân lập không chỉ ở mẫu lá trên cây đậu tương giống ĐT26 nhiễm phấn trắng mà còn ở mẫu ĐT26 sinh trưởng bình thường lại có độc tính khá mạnh. Kết quả lây nhiễm trên cây đậu tương 14 ngày tuổi cho thấy không phải chủng MĐT6 độc tính yếu không gây hại cho cây đậu tương mà ở điều kiện bình thường, có thể do mật độ của chúng xuất hiện trên bề mặt lá không cao, cây đậu tương vẫn có cơ chế tự bảo vệ để ngăn cản sự tấn công của chủng nấm MĐT6.



Hình 6. Kết quả lây nhiễm các dòng nấm MĐT5 vào cây đậu tương ĐT26 14 ngày tuổi

Kết quả thử độc tính của chủng nấm MĐT5 lại cho kết quả ngoài dự đoán. Kết quả phân lập cho thấy chủng nấm MĐT5 có tốc độ phát triển nhanh, chỉ sau 2 - 3 ngày nuôi cấy sợi nấm đã bao phủ kín đĩa (Hình 3). Kết quả lây nhiễm chủng nấm này vào lá đậu tương ĐT26 ở điều kiện *in vitro* cũng thể hiện đây là chủng có độc tính tương đối cao. Sau 10 ngày lây nhiễm quan sát thấy rất nhiều sợi nấm trắng mọc lan tỏa trên mặt lá bị lây nhiễm (Hình 4). Tuy nhiên, khi lây nhiễm chủng nấm này vào cây đậu tương giống ĐT26 14 ngày tuổi, cả 3 lần lặp lại thí nghiệm đều không quan sát thấy biểu hiện bệnh của cây sau 30 ngày lây nhiễm (Hình 6). Biểu hiện bệnh của cây chỉ bắt đầu xuất hiện sau hơn một tháng từ khi lây nhiễm và quan sát thấy rõ rệt từ ngày thứ 45 sau khi lây nhiễm với biểu hiện là những vòng tròn nhỏ mất màu xanh và hóa nâu trên bề mặt lá (Hình 6). Kết quả trên cho thấy, trong 4 chủng nấm chúng tôi phân lập được, chủng MĐT5 có độc tính yếu nhất.

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Bốn chủng nấm MĐT2, MĐT4, MĐT5 và MĐT6 đã được chúng tôi phân lập từ lá các cây đậu tương ĐT26 nhiễm bệnh phấn trắng. Kết quả lây nhiễm trên lá cây *in vitro* và cây đậu tương ĐT26 ở giai đoạn 14 ngày tuổi cho thấy, hai chủng MĐT2 và MĐT6 có độc tính mạnh và gây chết toàn bộ các cây đậu tương lây nhiễm chỉ sau một tuần; chủng MĐT4 có độc tính trung bình và chủng MĐT5 có độc tính yếu nhất. Đây là kết quả bước đầu về phân lập và đánh giá khả năng lây nhiễm của một số chủng nấm phân lập từ lá đậu tương nhiễm bệnh phấn trắng, chúng tôi sẽ tiếp tục định danh các chủng nấm này và nghiên cứu sâu hơn để cung cấp thêm thông tin cho việc phòng trừ các bệnh gây ra bởi các chủng nấm ở đậu tương.

LỜI CẢM ƠN

Kinh phí nghiên cứu được hỗ trợ bởi đề tài nhà nước NAFOSTED mã số: 106.03-2019.11 và đề tài cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam mã số: VAST02.04/12-20.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Liu P, Zhao M, Cao Y, Lu Y, Liang M, Huang Z, Ren J (2014). Purification and identification of anti-oxidant soybean peptides by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. Rejuvenation research 17: 209 - 211.
2. Nguyễn Lân Dũng (dịch 1983). Thực tập vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại học và Trung học Hà Nôi.
3. Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyến và Phạm Văn Tỵ (2000). Vi sinh vật học. Nhà xuất bản Giáo dục.
4. Trần Thị Trường *và ctv.* (2010). Kết quả điều tra bệnh phấn trắng hại đậu tương. Kết quả nghiên cứu KHCN của Trung tâm NCPT Đậu đỗ 2010.
5. Trần Thị Trường, Trịnh Xuân Hoạt, Nguyễn Đạt Thuần *và ctv.* (2015). Nghiên cứu nấm phấn trắng hại đậu tương (*Microphaera difusa*) ở miền Bắc Việt Nam. Tạp chí KH&CNNN Việt Nam, số 3 (56)/2015.
6. Trần Thị Trường, Nguyễn Đạt Thuần, Nguyễn Thị Tuyết, Hồ Mạnh Tường, ctv (2017). Nghiên cứu chọn giống đậu tương kháng bệnh phấn trắng (*Microphaera diffusa*). Hội thảo Quốc gia về Khoa học Cây trồng lần thứ hai: 517 - 524.
7. Wilson RF (2008). Soybean: market driven research needs. New York: Springer Science Press.

THÀNH PHẦN VÀ ẢNH HƯỞNGCỦA MỘT SỐ YẾU TỐ SINH THÁI ĐẾN MẬT ĐỘ NẤM *Fusarium* spp. TRONG ĐẤT TRỒNG CÂY HỒ TIÊU (*Piper nigrum* L.) TẠI TỈNH ĐẮK LẮK

Trần Thị Huế, Trần Thị Lệ Trà, Ngô Đăng Duyên, Trịnh Thị Huyền Trang, Đỗ Thị Kiều An

Trường Đại học Tây Nguyên
Điện thoại: 0948194165; Email:tranhuetaynguyen@gmail.com

ABSTRACT

Composition and effect of some ecological factors on population dynamic of *Fusarium* spp. in the black pepper-growing soils in Dak Lak province

Fusarium spp. is one of agents causing yellow disease, one of the most serious diseases on black pepper. Isolating Fusarium spp. from various black pepper plant parts and soil, 14 Fusarium spp. isolates were identified, namely: F. solani, F. oxysporum, F. proliferatum and F. equiseti. The effects of black pepper tree ages, pole types (cement pole vs. living pole), cropping system (monocrop vs. interccrop), and fertilizer types (organic vs. chemical fertilizer) were investigated. The results showed that Fusarium spp. population in the farms with young trees, living poles, intercropping and organic fertilizers application were much lesser than those with old trees, cement poles, monocropping and chemical fertilizer application.

Keywords: *Ecological factor, Fusarium spp., Piper nigrum, population dynamic.*

I. MỞ ĐẦU

Hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) là cây gia vị được trồng ở nhiều quốc gia trên thế giới như Ấn Độ, Sri Lanka, Thái Lan, Malaysia, Indonesia, Trung Quốc, Braxin, Madagascar, Việt Nam,... Từ năm 2001 đến nay, Việt Nam đã trở thành nước xuất khẩu hồ tiêu lớn nhất trên thế giới. Đến năm 2016, ngành hồ tiêu Việt Nam đóng góp 41% tổng sản lượng hồ tiêu và 59% tổng sản lượng hồ tiêu xuất khẩu trên toàn thế giới (IPC, 2018). Trong đó, Đắk Lắk là một trong những tỉnh có diện tích trồng tiêu lớn nhất cả nước. Giá cả và lợi nhuận trên đơn vị diện tích đất khi trồng hồ tiêu những năm 2014 - 2016 tăng cao, đã dẫn đến sự phát triển bùng phát về diện tích hồ tiêu cả nước nói chung và Đắk Lắk nói riêng. Theo quy hoạch phát triển ngành hồ tiêu Việt Nam đến năm 2020, tầm nhìn đến 2030 Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn định hướng diện tích hồ tiêu tại Đắk Lắk là 5.000 ha (Bộ NN&PTNT, 2014). Tuy nhiên, đến năm 2018, tổng

Người phản biện: TS. Nguyễn Văn Bốn.

diện tích hồ tiêu tại Đắk Lắk đã vượt gấp hơn 7,5 lần diện tích quy hoạch, với diện tích lên đến 37.601 ha (Cục Thống kê tỉnh Đắk Lắk, 2019).

Sự phát triển quá nhanh về diện tích cùng với đặc điểm cây hồ tiêu rất mẫn cảm với các tác nhân gây bệnh là một trong những thách thức lớn để phát triển bền vững ngành hồ tiêu tại Tây Nguyên. Nấm *Fusarium* spp. được khẳng định là một trong những tác nhân gây bệnh vàng lá chết chậm, một trong những loại bệnh nguy hiểm gây hại cây hồ tiêu (Phạm Ngọc Dung, 2013; Sahar Shahnazi *et al.,* 2012). Tuy nhiên, hiện chưa có công trình nào nghiên cứu về thành phần nấm *Fusarium* spp. trên cây hồ tiêu cũng như các yếu tố sinh thái ảnh hưởng đến sự phát sinh, phát triển của nấm bệnh. Bài viết này sẽ trình bày các kết quả nghiên cứu về thành phần nấm *Fusarium* spp. trên cây hồ tiêu tại Đắk Lắk và ảnh hưởng của một số yếu tố sinh thái đến biến động mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất trồng cây hồ tiêu. Kết quả này sẽ là cơ sở để nghiên cứu và đề xuất các biện pháp nhằm hạn chế sự phát sinh, phát triển và gây hại của nấm bệnh, góp phần phát triển bền vững cây hồ tiêu tại địa phương.

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Xác định thành phần nấm *Fusarium* spp. hại cây hồ tiêu tại Đắk Lắk.

- Điều tra ảnh hưởng của một số yếu tố sinh thái đến mật độ nấm *Fusarium* spp. gây hại trong đất trồng cây hồ tiêu tại Đắk Lắk.

2.2. Địa điểm điều tra nghiên cứu

- Địa điểm thu mẫu: huyện Cư Kuin (gồm các xã: Ea Ning, Drây Bhăng và Ea Bhok) và huyện Krông Năng (gồm: thị trấn Krông Năng, xã Phú Lộc và xã Ea Hồ).

- Địa điểm phân lập và xác định mật độ nấm *Fusarium* spp.: Bộ môn Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Tây Nguyên.

- Các mẫu nấm *Fusarium* spp. được định danh hình thái tại Trường Đại học Tây Nguyên và gửi định danh bằng công nghệ sinh học phân tử tại phòng xét nghiệm NK-BIOTEK, thành phố Hồ Chí Minh.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Xác định thành phần nấm Fusarium spp. *gây hại cây hồ tiêu*

- Thời gian thu thập mẫu: 2 lần giữa mùa mưa và 2 lần giữa mùa khô.

- Phương pháp thu thập mẫu: Tại mỗi xã đã chọn, lấy mẫu tại các vườn tiêu có đặc điểm về loại đất, địa hình, tuổi cây, loại trụ trồng, hình thức trồng, loại phân bón áp dụng và các biện pháp canh tác khác nhau. Mỗi vườn thu thập mẫu tại 10 điểm ngẫu nhiên trên đường chéo góc, mỗi điểm 1 trụ tiêu. Tại mỗi trụ thu mẫu rễ, thân, lá có biểu hiện bệnh và đất ở độ sâu 0 - 20 cm, cách gốc 20 cm ở 4 hướng khác nhau. Mẫu thu được cho vào túi giấy sạch, dán nhãn và mang về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập nấm.

- Chuẩn bị môi trường phân lập nấm gây bệnh: Sử dụng môi trường PPA có bổ sung kháng sinh để phân lập nấm *Fusarium* spp. (Burgess *và ctv.*, 2009). Thành phần 1 lít môi trường PPA bao

gồm: 20 g Agar, 15 g Peptone, 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4.7H_2O$, 1 g Terrachlor (PCNB 75%), 1 g Streptomycin sulfate, 0,12 g Neomycin sulfate. Cân Agar, Peptone, KH_2PO_4, $MgSO_4.7H_2O$ và Terrachlor theo tỷ lệ rồi thêm nước cất thành 1 lít hỗn hợp. Điều chỉnh pH = 6. Khuấy đều, hấp ở 121^0C trong 20 phút, để nguội xuống 55^0C, bổ sung 20 ml nước cất tiệt trùng đã hòa tan 1 g Streptomycin sulfate và 12 ml nước cất tiệt trùng đã hòa tan 0,12 g Neomycin sulfate vào môi trưởng, khuấy đều rồi đổ môi trường ra đĩa petri.

- Phương pháp phân lập nấm *Fusarium* spp. từ mẫu rễ, thân, lá:

Rửa mẫu bệnh dưới vòi nước cho sạch bụi bẩn, để ráo. Cắt mẫu thành từng mẩu 5 × 3 mm ở phần ranh giới giữa mô khỏe và mô bệnh. Nhúng mẫu vào cồn 70% trong 10 giây, sau đó, rửa sạch lại trong nước cất 3 lần và để khô trên giấy thấm đã khử trùng. Sau đó, dùng panh đã khử trùng gắp và ấn nhẹ các miếng mẫu lên mặt môi trường sao cho chúng tiếp xúc tốt với môi trường phân lập. Đặt đĩa cấy trong điều kiện phòng trong 3 - 5 ngày cho đến khi các tản nấm phát triển. Tiếp tục cấy truyền các tản nấm và làm thuần chúng bằng phương pháp cấy đỉnh sinh trưởng lên môi trường PPA. Khi nấm đã phát triển, quan sát và ghi chép các đặc điểm hình thái của nấm như màu sắc khuẩn lạc, cách tạo khuẩn lạc, bào tử, cành sinh bào tử...

- Phương pháp phân lập nấm *Fusarium* spp. từ đất:

Đất mang về phòng thí nghiệm, trải mỏng trên khay sạch để phơi khô tự nhiên ở điều kiện phòng trong 24 - 48 giờ, tùy độ ẩm đất. Mỗi mẫu đất được làm tơi, trộn đều và phơi trên mỗi khay riêng. Sau đó, dùng chày và cối sứ tiệt trùng để nghiền sơ đất, sàng qua rây có đường kính lỗ rây 710 μm. Trộn đều đất, cân 10 g đất mỗi mẫu cho vào mỗi bình tam giác, sau đó cho thêm 90 ml nước cất, buộc chặt miệng bình bằng bông đã qua khử trùng và giấy báo. Đây là dung dịch đất có độ pha loãng 10^{-1}. Dung dịch này được lắc li tâm ở tốc độ 150 vòng/phút trong 15 tiếng ở nhiệt độ phòng. Dùng Pipet hút 1 ml dung dịch đất đã được li tâm bỏ vào ống nghiệm đã có sẵn 9 ml nước cất tiệt trùng, lắc đều được dung dịch đất có độ pha loãng 10^{-2}. Tiếp tục thao tác như trên để lấy được dung dịch đất có độ pha loãng 10^{-3}. Dùng pipet hút 1 ml dung dịch đất có độ pha loãng 10^{-3} bơm vào giữa đĩa petri chứa môi trường PPA, dùng que trang thủy tinh trang đều dung dịch trên bề mặt môi trường trong đĩa petri. Sau khi trang xong bọc kín đĩa petri bằng màng bọc chuyên dụng, để ở điều kiện phòng thí nghiệm. Khi các bào tử nấm vừa hình thành khuẩn lạc, đục một miếng thạch đường kính 0,5 cm chứa 1 khuẩn lạc nấm rồi cấy truyền sang đĩa petri khác. Cứ tiếp tục làm như vậy đến khi nào thu được mẫu nấm thuần trong đĩa. Bước đầu nhận diện mẫu nấm *Fusarium* spp. dựa vào khóa phân loại bằng hình thái của Seifert (1996), Leslie và Summerell (2006) và Tatiana Gagkaeva (2008). Các mẫu nấm có đặc điểm hình thái khuẩn lạc, đặc điểm sợi nấm, cành sinh bào tử, đại bào tử, tiểu bào tử hay bất kỳ một đặc điểm khác biệt nào sẽ được ký hiệu mẫu bắt đầu bằng chữ cái VL, sau đó là số thứ tự bắt đầu từ 1 đến hết.

- Định danh các mẫu nấm *Fusarium* spp. bằng công nghệ sinh học phân tử: Nấm sau khi làm thuần được gởi đi định danh tại phòng xét nghiệm NK-BIOTEK: Sử dụng phương pháp giải trình tự r-DNA bằng sử dụng cặp mồi chung ITS và so sánh giải trình tự trên Ngân hàng Gen để xác định độ tương đồng và tên loài của nấm.

- Kiểm tra lại *Fusarium* spp. gây hại hồ tiêu bằng phương pháp lây bệnh nhân tạo*:* Chuẩn bị cây tiêu con khỏe được trồng trong bịch với đất đã phơi nắng để khử nguồn bệnh trong đất. Tạo vết thương cho tiêu con ở phần thân ngầm dưới bầu đất rồi sử dụng từng dung dịch mỗi dòng nấm đã làm thuần tưới vào đất trong bầu. Quan sát sự nhiễm bệnh vàng lá chết chậm của cây tiêu con.

- Đánh giá mức độ phổ biến mỗi dòng nấm dựa vào tần suất xuất hiện (TSXH%) của mỗi dòng: (+): ít phổ biến (TSXH < 10%); (++): phổ biến trung bình (TSXH: 10 - 20%); (+++): phổ biến (TSXH: > 21 - 50%) và (++++): rất phổ biến (TSXH > 50%).

TSXH (%) = (Số vườn xuất hiện dòng nấm/Tổng số vườn thu thập mẫu) × 100

2.3.2. Điều tra ảnh hưởng của một số yếu tố sinh thái đến biến động mật độ nấm Fusarium spp. *hại cây hồ tiêu*

- Thời gian điều tra: Từ 01/2018 đến 12/2018, định kì điều tra 2 tháng/lần.

- Địa điểm điều tra: Huyện Cư Kuin và huyện Krông Năng.

- Phương pháp điều tra: Tại các xã đã chọn, điều tra các vườn tiêu đại diện cho tuổi cây, loại trụ trồng hồ tiêu, hình thức trồng hồ tiêu và chế độ phân bón. Tại mỗi xã, mỗi đại diện chọn 5 vườn (mỗi vườn điều tra có quy mô ít nhất là 500 trụ hồ tiêu). Tại mỗi vườn điều tra, thu thập đất tại 10 điểm ngẫu nhiên, mỗi điểm 1 trụ. Dùng thuôn hình trụ, đường kính 5 cm để lấy đất trong phạm vi hình chiếu của mép tán lá hồ tiêu, độ sâu lấy mẫu 0 - 20 cm. Mỗi trụ hồ tiêu, lấy 4 mẫu ở 4 hướng khác nhau, mẫu cách gốc 20 cm. Đất ở 10 điểm khác nhau trong vườn được trộn đều và lấy khoảng 1 kg đất mỗi vườn đưa về phòng thí nghiệm để tiến hành các bước tiếp theo.

- Phương pháp xác định mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất:

Các bước chuẩn bị môi trường PPA, xử lý đất, pha loãng dung dịch đất tiến hành tương tự như phương pháp phân lập. Khi đã pha loãng dung dịch đất với độ pha loãng 10^{-3}, trang 1 ml dung dịch mẫu đất vào mỗi đĩa petri. Mỗi mẫu thực hiện lặp lại 3 lần tương ứng với 3 đĩa petri. Sau 3 - 4 ngày đếm số khuẩn lạc nấm *Fusarium* spp. trong mỗi đĩa petri.

Mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất (cfu/1g đất) tính theo công thức:

$$N_f = M.X/V$$

Trong đó:

N_f: Mật độ *Fusarium* spp. trong 1 gam đất

M: Hệ số pha loãng mẫu dùng để cấy

X: Số khuẩn lạc trung bình trong mỗi đĩa petri.

V: Thể tích dung dịch mẫu cấy vào mỗi đĩa petri.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần nấm *Fusarium* spp. hại cây hồ tiêu tại Đắk Lắk

Từ các mẫu đất, rễ, thân và lá hồ tiêu đã phân lập và xác định được 14 dòng nấm *Fusarium* spp. được kí hiệu từ VL1 đến VL14, với tần suất xuất hiện từ ít phổ biến đến rất phổ biến. Trong đó, các dòng nấm kí hiệu VL1, VL3, VL4, VL5 và VL14 có mức độ rất phổ biến; các dòng nấm kí hiệu VL2, VL6, VL7, VL11 và VL12 có mức độ phổ biến trung bình; các dòng nấm còn lại ở mức độ ít phổ biến (Bảng 1).

Giải trình tự gen 28S của 14 dòng nấm *Fusarium* spp. cho kết quả 2 dòng thuộc loài *F. solani,* 4 dòng thuộc loài *F. oxysporum,* 7 dòng thuộc loài *F. proliferatum* và 1 dòng thuộc loài *F. equiseti.* Tất cả các dòng đều đạt độ tương đồng cao (từ 97 - 100%). Kết quả nghiên cứu khẳng định các loài nấm *F. proliferatum* chiếm ưu thế hơn so với các loài nấm *Fusarium* spp. khác. Kết quả này tương đồng với một số nghiên cứu về nấm *Fusarium* spp. gây bệnh vàng lá chết chậm hồ tiêu ở nhiều nơi trên thế giới. Sahar Shahnazi *et al.* (2012) đã phân lập được 2 loài *F. proliferatum* và *F. solani* gây hại hồ tiêu tại Malaysia, Maria *et al.* (2001) đã phân lập được loài *F. oxysporum* tại Braxin, Trinh *et al*. (2013) đã xác định *F. solani* và *Fusarium* spp. gây hại cây hồ tiêu tại Quảng Trị, Việt Nam.

Bảng 1. Kết quả định danh một số dòng nấm Fusarium spp. gây bệnh cây hồ tiêu tại Đắk Lắk bằng phương pháp giải trình tự gen 28S

TT	Kí hiệu dòng	Trình tự tham chiếu	Kết quả định danh	Độ tương đồng	TSXH (%)
1	VL1	KU872821.1	*F. solani*	(775/780) 99%	+++
2	VL2	LT841236.1	*F. oxysporum*	(870/870) 100%	++
3	VL3	LT841264.1	*F. proliferatum*	(881/881) 100%	+++
4	VL4	LT841264.1	*F. proliferatum*	(879/881) 99%	+++
5	VL5	LT841264.1	*F. proliferatum*	(881/883) 99%	+++
6	VL6	LT841264.1	*F. proliferatum*	(874/876) 99%	++
7	VL7	LT841236.1	*F. oxysporum*	(872/873) 99%	++
8	VL8	LT841236.1	*F. oxysporum*	(873/873) 100%	+
9	VL9	LT841264.1	*F. proliferatum*	(873/874) 99%	+
10	VL10	LT841236.1	*F. oxysporum*	(872/873) 99%	+
11	VL11	LT841264.1	*F. proliferatum*	(890/892) 99%	++
12	VL12	KU872821.1	*F. solani*	(850/876) 97%	++
13	VL13	HQ332532.1	*F. equiseti*	(772/772) 100%	+
14	VL14	LT841264.1	*F. proliferatum*	(882/884) 99%	+++

3.2. Ảnh hưởng của một số yếu tố sinh thái đến mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất trồng cây hồ tiêu tại Đắk Lắk

3.2.1. Ảnh hưởng của tuổi cây đến mật số Fusarium spp. *trong đất trồng hồ tiêu*

Kết quả điều tra ảnh hưởng của tuổi cây đến mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất trồng cây hồ tiêu cho thấy: Mật độ nấm *Fusarium* spp. ở vườn tiêu tuổi nhỏ (1 - 3 năm tuổi) luôn luôn thấp hơn và chỉ bằng khoảng 1/3 lần so với ở các vườn tiêu giai đoạn tuổi lớn hơn (4 - 6 tuổi) ở tất cả các thời điểm theo dõi. Ở những vườn tiêu tuổi nhỏ (1 - 3 tuổi) mật độ *Fusarium* spp. cao nhất là 7,17 × 10^3 (cfu/g đất), trong khi đó, ở vườn tiêu tuổi lớn (4 - 6 tuổi), mật độ *Fusarium* spp. thấp nhất đã lên đến 16,59 × 10^3(cfu/g đất). Bảng 2 cũng cho thấy mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất trồng hồ tiêu tăng dần theo các thời điểm theo dõi trong năm. Trinh *et al.* (2013) báo cáo trong rễ cây hồ tiêu 1 - 5 tuổi không xuất hiện nấm *F. solani* trong khi tỷ lệ nhiễm nấm *F. solani* của rễ cây hồ tiêu giai đoạn 6 - 8 tuổi lên đến 41,4%. Kết quả này cho thấy, tuổi cây khác nhau dẫn đến mật số nấm *Fusarium* spp. trong đất trồng hồ tiêu cũng khác nhau.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tuổi cây đến mật số Fusarium spp. trong đất trồng hồ tiêu

Thời điểm điều tra	Mật độ *Fusarium* spp. (10^3cfu/g đất)	
	Tuổi 1 - 3	Tuổi 4 - 6
02/2018	4,59 ± 0,39	16,59 ± 0,71
04/2018	4,96 ± 0,40	18,30 ± 1,00
06/2018	5,59 ± 0,42	18,89 ± 0,69
08/2018	6,09 ± 0,62	20,15 ± 0,98
10/2018	6,31 ± 0,67	22,22 ± 1,11
12/2018	7,17 ± 0,60	22,48 ± 1,19

3.2.2. Ảnh hưởng của loại trụ trồng hồ tiêu đến mật số Fusarium spp. *trong đất*

Theo dõi ảnh hưởng của loại trụ trồng hồ tiêu đến mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất cho thấy: Mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất ở vườn hồ tiêu trồng bằng trụ xi-măng luôn cao hơn khoảng 20 -30% so với ở các vườn hồ tiêu trồng bằng trụ sống. Ở những vườn trồng bằng trụ xi-măng mật độ *Fusarium* spp. trong đất thấp nhất lên đến 20,64 × 10^3 (cfu/g đất), trong khi đó, mật độ *Fusarium* spp. trong đất cao nhất ở vườn tiêu trồng bằng trụ sống là 21,35 × 10^3 (cfu/g đất). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Ade Rosmana *et al.* (2013) về nấm *Fusarium* hại cây ca cao. Các tác giả này đã cho biết tỷ lệ cây ca cao bị bệnh vàng lá do *Fusarium* cao ở những vườn có ít hoặc không có cây che bóng. Trồng hồ tiêu bằng trụ sống đã làm tăng độ che bóng, góp phần làm giảm nhiệt độ trong vườn (Orr & Nelson, 2018). Nhiệt độ trong vườn giảm khiến mật độ *Fusarium* spp.

trong đất cũng giảm bởi nhiệt độ cao làm giảm khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng nấm như capsaicinoids, capsicine và phenolics, tạo điều kiện cho các mầm bệnh sinh sôi và tấn công cây trồng (Estrella *et al.,* 2003).

***Bảng 3. Ảnh hưởng của loại trụ đến mật độ nấm Fusarium* spp. trong đất trồng hồ tiêu**

Thời gian điều tra	Mật độ *Fusarium* spp. (10^3cfu/g đất)	
	Trụ xi-măng	Trụ sống
02/2018	20,64 ± 3,4	16,37 ± 2,22
04/2018	22,22 ± 3,38	17,18 ± 2,27
06/2018	22,31 ± 3,32	18,11 ± 2,30
08/2018	24,13 ± 3,25	18,59 ± 2,31
10/2018	25,31 ± 3,43	20,43 ± 2,61
12/2018	26,51 ± 3,68	21,35 ± 2,74

3.2.3. Ảnh hưởng của hình thức trồng đến mật số Fusarium spp. trong đất trồng hồ tiêu

Theo dõi ảnh hưởng của hình thức trồng thuần và trồng xen đến mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất trồng hồ tiêu cho thấy: vườn hồ tiêu trồng thuần luôn có mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất cao hơn 23 - 35% so với ở vườn hồ tiêu trồng xen với cây cà phê. Ở những vườn hồ tiêu trồng thuần, mật độ *Fusarium* spp. trong đất thấp nhất là 17,79 × 10^3 (cfu/g đất) trong khi mật độ nấm *Fusarium* spp. cao nhất trong đất ở vườn hồ tiêu trồng xen với cà phê chỉ là 17,29 × 10^3 (cfu/g đất). Kết quả nghiên cứu này tương tự với nghiên cứu của Wu Xiong *et al.* (2016) khi khẳng định: Mật số nấm *Fusarium* spp. trong đất trồng xen hồ tiêu với vanilla thấp hơn đất trồng thuần vanilla. Trồng xen cây trồng đã được chứng minh là có khả năng giảm tỷ lệ nhiễm bệnh do nấm *Fusarium* spp. gây ra. Chẳng hạn trồng lúa xen dưa hấu (Ren *et al.,* 2008) và lúa mỳ xen dưa hấu đã làm giảm tỷ lệ dưa hấu nhiễm bệnh héo do nấm Fusarium (Lv *et al.,* 2018).

***Bảng 4. Ảnh hưởng của hình thức trồng đến mật số Fusarium* spp. trong đất trồng hồ tiêu**

Thời gian điều tra	Mật độ *Fusarium* spp. (10^3 cfu/g đất)	
	Thuần	Xen cà phê
02/2018	17,79 ± 2,83	13,29 ± 1,66
04/2018	19,03 ± 2,84	14,11 ± 1,81
06/2018	19,25 ± 2,90	14,55 ± 1,77
08/2018	21,24 ± 2,62	15,70 ± 2,00
10/2018	21,59 ± 2,72	17,51 ± 2,27
12/2018	21,50 ± 2,77	17,29 ± 1,85

Trồng xen được biết đến là một hình thức canh tác nông nghiệp bền vững trên khắp thế giới (Tanveer *et al.*, 2017). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng so với trồng thuần, trồng xen không chỉ có lợi thế về tăng năng suất cây trồng, khai thác hiệu quả nguồn tài nguyên mà còn giúp ngăn chặn các tác nhân gây bệnh có nguồn gốc từ đất (Boudreau, 2013). Kết quả này là do trồng xen có tác động tích cực đến sự đa dạng của cộng đồng vi sinh vật có lợi trong đất, do đó giúp giảm tác hại của các tác nhân gây bệnh có nguồn gốc từ đất (Boudreau, 2013) hoặc tạo ra "bức tường rễ" ngăn không cho tác nhân gây bệnh có thể di chuyển và phát tán hoặc rễ của cây trồng xen có thể sản sinh ra các hợp chất ức chế sự phát triển của nấm gây bệnh (Yang *et al.*, 2014).

3.2.4. Ảnh hưởng của loại phân bón đến mật độ nấm Fusarium spp. trong đất trồng hồ tiêu

Kết quả theo dõi ảnh hưởng của loại phân bón đến mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất trồng hồ tiêu trình bày trong Bảng 5 cho thấy: Mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất ở các vườn tiêu chỉ bón phân hữu cơ thấp hơn nhiều so với ở các vườn hồ tiêu bón phân hóa học. Tùy từng thời điểm điều tra trong năm, mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất ở các vườn bón phân hóa học cao hơn 9 - 14 lần so với ở các vườn chỉ bón phân hữu cơ. Ở những vườn chỉ bón phân hữu cơ mật độ *Fusarium* spp. ở thời điểm cao nhất chỉ là $1,89 \times 10^3$ (cfu/g đất) trong khi ở các vườn hồ tiêu có bón phân hóa học mật độ *Fusarium* spp. ở thời điểm thấp nhất đã lên đến $14,11 \times 10^3$ (cfu/g đất). Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả khác. Ha và Huang (2007) cho biết sử dụng phân hữu cơ cho đất trồng đậu đũa đã giúp giảm tỷ lệ nhiễm nấm *Fusarium* lên đến 50 - 80%. Bón phân hữu cơ làm giảm tỷ lệ bệnh héo do *Fusarium* lên đến 80% (Darby *et al.*, 2006). Trên ớt, hàm lượng hữu cơ càng cao thì tỷ lệ bệnh do *Fusarium oxysporum* gây ra càng giảm (Bashir *et al.*, 2018). Kết quả này là do các chất cải tạo đất có trong phân hữu cơ không chỉ cải thiện các đặc tính vật lý (khả năng giữ nước, độ thoáng khí, khả năng hấp thu dinh dưỡng) và đặc tính hóa học của đất, giúp thúc đẩy tốc độ tăng trưởng cây trồng mà còn ức chế sự phát triển của nấm *Fusarium* (Gotora *et al.*, 2014). Ngoài ra, chất hữu cơ còn làm tăng độ cứng của thành tế bào và sức đề kháng của thực vật chống lại các tác nhân gây bệnh từ đất (Basak *et al.*, 2002).

Bảng 5. Ảnh hưởng của loại phân bón đến mật số Fusarium* spp. *trong đất trồng hồ tiêu

Thời gian điều tra	Mật độ *Fusarium* spp. (10^3 cfu/g đất)	
	Vườn sử dụng phân hữu cơ	Vườn sử dụng phân hóa học
02/2018	1,56 ± 0,75	14,11 ± 3,05
04/2018	1,44 ± 0,51	15,44 ± 3,33
06/2018	1,83 ± 0,48	16,83 ± 2,77
08/2018	1,78 ± 0,77	17,94 ± 2,82
10/2018	1,89 ± 1,01	20,72 ± 3,07
12/2018	1,56 ± 1,24	22,89 ± 3,87

Kết quả trình bày ở các Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4 và Bảng 5 cũng cho thấy: Diễn biến mật độ ở *Fusarium* spp. trong đất ở tất cả các vườn hồ tiêu có độ tuổi khác nhau, trồng bằng trụ xi-măng hay trụ sống, trồng thuần hay trồng xen với cà phê, áp dụng phân bón hữu cơ hay phân bón hóa học đều đạt ngưỡng cao nhất vào các tháng cuối hoặc sau mùa mưa từ tháng 10 - tháng 12. Như vậy, mùa mưa là mùa *Fusarium* spp. phát triển và tích lũy số lượng, do đó cần thực hiện các biện pháp phòng nhằm kiểm soát mật số nấm *Fusarium* spp. không tăng cao vào cuối và sau mùa mưa.

IV. KẾT LUẬN

- Đã phân lập được 14 dòng nấm *Fusarium* thuộc 4 loài nấm *F. solani, F. oxysporum, F. proliferatum* và *F. equiseti* từ các mẫu đất, rễ, thân và lá thu thập trong vườn cây hồ tiêu tại Đắk Lắk.

- Mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất ở vườn hồ tiêu tuổi nhỏ, trồng bằng trụ sống, trồng xen với cà phê và bón phân hữu cơ thường thấp hơn nhiều so với ở các vườn tiêu tuổi lớn, trồng bằng trụ xi-măng, trồng thuần và có sử dụng phân hóa học.

- Mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất thường có xu hướng đạt ngưỡng cao nhất vào các tháng cuối hoặc sau mùa mưa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Nông nghiệp và PTNT (2014). Phê duyệt quy hoạch phát triển ngành hồ tiêu Việt Nam đến năm 2020, tầm nhìn đến 2030. Quyết đinh số 1442/QĐ-BNN-NT. Hà Nội, ngày 27 tháng 06 năm 2014.
2. Cục Thống kê tỉnh Đắk Lắk (2019). *Niên giám thống kê tỉnh Đắk Lắk năm 2018,* Đắk Lắk.
3. Burgess, L.W., Knight, T.E., Tesoriero, Len. và Phan Thúy Hiền (2009). *Cẩm nang chuẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam*. Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia (ACIAR).
4. Phạm Ngọc Dung (2011). *Nghiên cứu ứng dụng các giải pháp khoa học công nghệ trong quản lý tổng hợp bệnh hại chủ yếu trên cây hồ tiêu nhằm nâng cao hiệu quả sản xuất và thu nhập cho người dân nghèo tỉnh Quảng Trị.* Báo cáo tổng kết kết quả thực hiện đề tài thuộc Dự án Khoa học công nghệ nông nghiệp vốn vay ADB.
5. Ade Rosmana, Hikmawati Hikmawati and Asman Asman (2013). "Identification of a disease on cocoa caused by Fusarium in Sulawesi", *Pelita Perkebunan* 29(3): 210 - 219.
6. Boudreau, M. A. (2013). "Disease in intercropping systems", *Annu. Rev. Phytopathol.*, Vol. 51:499-519.
7. Estrella, F.S., M.C. Vargas, M. A. Elorrieta, M.J. Lopez and J. Moreno (2003). "Temperature effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* survival during horticultural waste composting", *J. Appl. Microbiol.*, Vol. 94:475-482.
8. Gotora, T., L. Masaka and M. Sungirai (2014). "Effect of cow urine on the growth characteristics of *Fusarium lateritium*, an important coffee fungus in Zimbabwe", *Int. J. Agron.* 4:231-235.
9. Ha, M. T. and J.W. Huang. (2007). "Control of Fusarium wilt of asparagus bean by organic soil amendment and microorganisms". *Plant Pathol. Bull.*, Vol. 16:169-180.
10. IPC (2018). Country profile: Vietnam, truy cập ngày 20/09/2020, http://www.ipcnet.org/cp/?p=d&id =5&start=5.
11. Orr, Ryan and Nelson, Paul N. (2018). "Impacts of soil abiotic attributes on Fusarium wilt, focusing on bananas", *Applied Soil Ecology*, Vol. 132: 20-33.

11. Seifert, K. (1996). *Fuskey-Fusarium interactive key*. Agriculture and AgriFood, Canada.

12. Leslie J.F. and Summerell B. A. (2006). *The Fusarium* spp. *laboratory manual*. Blackwell Publishing, Victiria, Australia.

12. Lv, H.; Cao, H.; Nawaz, M. A.; Sohail, H.; Huang, Y.; Cheng, F.; Kong, Q.; Bie, Z. (2018). "Wheat intercropping enhances the resistance of watermelon to Fusarium wilt", *Front. Plant Sci.*, Vol. 9: 696

13. Maria de Lourdes Reis Duarte, Fernando Carneiro de Albuquerque and Elizabeth Ying Chu (2001). "New diseases affecting black pepper crop in Brazil". *Internatitonal pepper news bulleitn*.

14. Ramana, K.V. and Eapen, S.J. (1998). "Nematode diseases in plants", *C.B.S. Publishers and Distributors*, New Delhi: 217 - 251.

15. Ren, L.X.; Su, S.M.; Yang, X.M.; Xu, Y.C.; Huang, Q.W.; Shen, Q.R. (2008). "Intercropping with aerobic rice suppressed Fusarium wilt in watermelon", *Soil Biol. Biochem.*, Vol. 40:834 - 844.

16. Rosli. A, Rahim. K. A, Radam. A. and Abdullab. A. M., (2013). "Determinants of cost efficiency of smallholders pepper in Sarawak, Malaysia". *Asian Journal of Social science & Humanities*, Vol. 2(3): 78 - 86.

17. Sahar Shahnazi, Sariah Meon, Ganesan Vadamalai, Khairulmazmi Ahmad and Naghmeh Nejat (2012). "Morphological and molecular characterization of Fusarium spp. associated with yellowing disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia", *Journal of General Plant Pathology, Vol*. 78(3): 160 - 169.

18. Tanveer, M.; Anjum, S. A.; Hussain, S.; Cerdà, A.; Ashraf, U. (2017). "Relay cropping as a sustainable approach: Problems and opportunities for sustainable crop production", *Environ. Sci. Pollut. Res.*, Vol. 24: 6973 - 6988.

19. Tatiana Gagkaeva (2008). Introduction to *Fusarium* spp. taxonomy. file:///C:/Users/ ADMIN/Downloads Introduction to *Fusarium* spp. taxonomy%20(1).pdf

20. Trinh, T. T. T., Chi, N. T. M., Yen, N. T., Anh, L. T. N., Te, L. L. and De Waele, D. (2013). "Fungi associated with black pepper plants in Quang Tri province (Vietnam), and interaction between *Meloidogyne incognita* and *Fusarium solani"*, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, Vol. 46(4): 470 - 482.

21. Wu Xiong, Qingyun Zhao, Chao Xue, Weibing Xun, Qirong Shen, Jun Zhao, Huasong Wu, Rong Li and Qirong Shen (2016). "Comparison of fungal community in black pepper-vanilla and vanilla monoculture systems associated with vanilla fusarium wilt disease", *Frontiers in Microbiology*, Vol. 7:117.

22. Yang, M.; Zhang, Y.; Qi, L.; Mei, X.; Liao, J.; Ding, X.; Deng, W.; Fan, L.; He, X.; Vivanco, J.M.; *et al.* (2014). "Plant-microbe mechanisms involved in soil-borne disease suppression on a maize and pepper intercropping system", *PLoS ONE*, Vol. 9:e115052.

KẾT QUẢ ĐIỀU TRA BỆNH THỐI GỐC MỐC TRẮNG (*Sclerotium rolfsii*) TRÊN CÂY ĐẬU PHỘNG TẠI HUYỆN DƯƠNG MINH CHÂU, TỈNH TÂY NINH

Mai Bá Nghĩa[1], Võ Thị Thu Oanh[2]

[1] Trung tâm Nghiên cứu Chuyển giao TBKT Nông nghiệp, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam

[2] Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

ABSTRACT

Results Survey Of White Mold Stem Rot Disease (*Sclerotium rolfsii*) on peanut in duong minh chau district, tay ninh province

In two surveys (October 2018 - April 2019 and October 2019 - April 2020) conducted in 5 communes with large peanut growing areas of Duong Minh Chau district (Truong Mit, Cau Khoi, Phan, Phuoc Minh and Loc Ninh), with the content of investigating the development of white mold stem rot disease (Sclerotium rolfsii) on peanuts. The results showed that all surveyed fields in Duong Minh Chau district detected harmful white mold stem rot disease on peanut plants. The rate of damaged peanuts is quite high (up to 11.2% in some places). The rate of peanut damage is concentrated in the areas grown in the rice fields with wet rice. White mold stem rot starts to cause harm after 7 DAS (day after sowing) and continues to cause harm until harvest. The time of thriving of pathogenic fungi (Sclerotium rolfsii) in the investigated fields was from 14 DAS to 63 DAS.

Keywords: *peanuts, white mold stem rot, Sclerotium rolfsii.*

II. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây đậu phộng có giá trị kinh tế và giá trị dinh dưỡng cao, hạt đậu phộng chứa khoảng 50% lipid, 25% protein và là nguồn nguyên liệu quan trọng cho công nghiệp chế biến dầu và khô dầu (Allen and Lenné, 1998). Ngoài cho giá trị kinh tế cao, đậu phộng còn có khả năng cố định đạm, cải thiện độ phì của đất (Dương Hồng Dật, 2011).

Tây Ninh có diện tích trồng đậu phộng tập trung khá lớn ở nước ta với diện tích gieo trồng năm 2018 là 5.529 ha (Niên giám thống kê năm 2018, 2019).

Người phản biện: GS. Nguyễn Thơ.

Trong đó, huyện Dương Minh Châu có diện tích trồng lớn nhất toàn tỉnh, với tổng diện tích gieo trồng của huyện năm 2018 là 2.675 ha (Niên giám thống kê tỉnh Tây Ninh năm 2018, 2019). Tuy có diện tích trồng lớn, nhưng người dân trồng đậu phộng tại địa phương đang đối mặt với tình trạng mất năng suất do sâu bệnh hại, trong đó có bệnh thối gốc mốc trắng do nấm *Sclerotium rolfsii* gây ra.

Để có cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo trong việc phòng trừ bệnh thối gốc mốc trắng do nấm (*Sclerotium rolfsii)* thì việc điều tra diễn biến và tình hình bệnh tại vùng sản xuất đậu phộng lớn nhất tỉnh này là cần thiết.

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Giống đậu phộng đang sản xuất đại trà tại địa phương là giống đậu Lỳ.

2.2. Nội dung và phương pháp

2.2.1. Nội dung

Điều tra tình hình và diễn biến bệnh thối gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii)* trên cây đậu phộng canh tác tại huyện Dương Minh Châu, tỉnh Tây Ninh.

2.2.2. Phương pháp

- Điều tra bệnh thối gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii)* trên cây đậu phộng trồng tại xã Truông Mít, huyện Dương Minh Châu, tỉnh Tây Ninh (theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về phương pháp điều tra phát hiện dịch hại trên cây đậu phộng, đậu tương của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2014):

Đợt 1 - Điều tra diễn biến bệnh: Thời gian thực hiện: Từ 10/2018 - 04/2019.

Chọn 5 ruộng trên địa bàn xã Truông Mít - huyện Dương Minh Châu, mỗi ruộng có diện tích tối thiểu 1.000 m^2 nằm trong vùng trồng đậu phộng có diện tích tối thiểu 2 ha. Tiến hành điều tra cố định 10 điểm chéo gốc trên mỗi ruộng, điểm điều tra cách bờ ít nhất 2 m. Mỗi điểm điều tra 55 cây đậu phộng.

Thời gian điều tra: Điều tra định kỳ 7 ngày 1 lần, bắt đầu sau khi gieo hạt.

Đợt 2 - Điều tra tình hình bệnh: Thời gian thực hiện: Từ 10/2019 - 04/2020.

Chọn 5 xã trên địa bàn huyện Dương Minh Châu có diện tích trồng đậu phộng tương đối lớn, số ruộng điều tra tại mỗi xã tùy thuộc vào diện tích gieo trồng của xã: xã Truông Mít (20 ruộng), xã Cầu Khởi (10 ruộng), xã Lộc Ninh (5 ruộng), xã Phước Minh (3 ruộng) và xã Phan (2 ruộng). Ruộng có diện tích tối thiểu 1.000 m^2 nằm trong vùng trồng đậu phộng có diện tích tối thiểu 2 ha. Tiến hành điều tra cố định 10 điểm chéo gốc trên mỗi ruộng, điểm điều tra cách bờ ít nhất 2 m. Mỗi điểm điều tra 55 cây đậu phộng.

Thời gian điều tra: Điều tra vào các thời điểm 30 ngày sau gieo, 60 ngày sau gieo và trước thu hoạch 5 - 7 ngày.

- Phương pháp chẩn đoán bệnh ngoài đồng ruộng: Dựa vào triệu chứng biểu hiện bệnh bên ngoài điển hình: Các sợi nấm trắng phát triển mạnh khi bệnh lan từ cây bệnh sang cây khỏe. Và các hạch nấm

nhỏ màu nâu tròn dạng hạt cải được hình thành trên bề mặt gốc thân bị bệnh.

- Chỉ tiêu theo dõi: Trên mỗi điểm điều tra đã chọn, đếm tất cả số cây bị bệnh trên tổng số cây điều tra và tính tỷ lệ bệnh theo công thức:

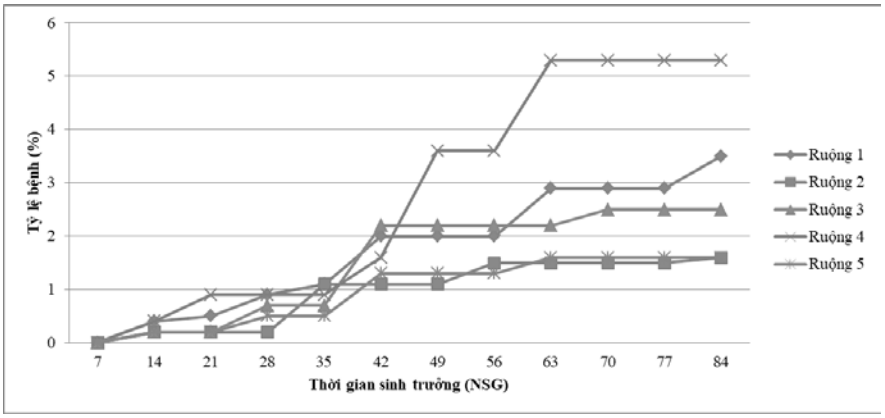
Tỷ lệ bệnh (%) = Số cây bị bệnh/ Tổng số cây điều tra × 100

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả diễn biến bệnh thối gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii)* trên cây đậu phộng trồng tại xã Truông Mít, huyện Dương Minh Châu, tỉnh Tây Ninh

Trong thời gian tiến hành điều tra, toàn vùng điều tra có mưa rải đều suốt vụ. Hệ thống tưới tiêu chủ yếu từ hệ thống kênh mương lấy nước từ lòng hồ Dầu Tiếng. Tất cả các ruộng điều tra trước đây đều đã trồng cây lúa nước.

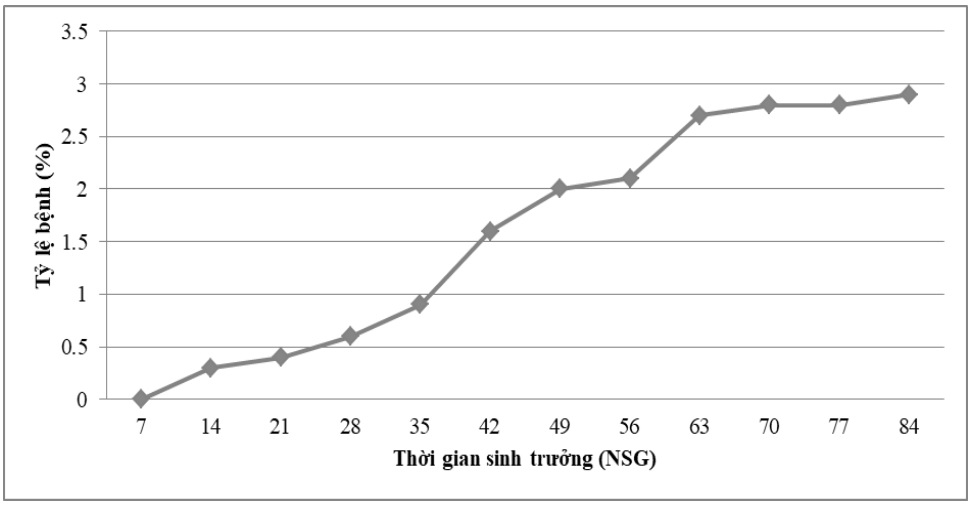
Các ruộng trồng đậu phộng được điều tra tại xã Truông Mít đều có xuất hiện bệnh thối gốc mốc trắng với tỷ lệ bị hại khác nhau (Biểu đồ 1). Đây là vùng chuyên trồng cây đậu phộng hàng năm. Mỗi năm đất trồng cây đậu phộng tại đây được luân canh từ 1 đến 2 vụ lúa nước. Đây là một phương pháp tốt về mặt canh tác nhằm hạn chế sâu bệnh hại đồng thời giúp cải tạo độ phì của đất. Tuy nhiên, theo Abida Akram (2008), nấm *Sclerotium rolfsii* gây bệnh thối gốc mốc trắng trên cây đậu phộng tồn lưu lâu trong đất dưới dạng hạch nấm và được lan truyền thông qua dụng cụ, gió, nước tưới. Vì vậy mầm bệnh vẫn còn và lây truyền cho các vụ sản xuất tiếp theo.



Biểu đồ 1. Diễn biến bệnh thối gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii)* tại các điểm điều tra, tháng 10/2018 - 04/2019

Không những vậy, nước tưới giúp lan truyền hoạch nấm nên các ruộng điều tra gần đường nước tưới tiêu (ruộng 5 và ruộng 1) có tỷ lệ bị hại cao hơn những ruộng khác.

Kết quả điều tra cũng cho thấy, thời điểm trước 14 NSG (ngày sau gieo) hoàn toàn không phát hiện bệnh tại các ruộng được điều tra. Điều này có thể thấy, nấm *Sclerotium rolfsii* có khả năng chỉ gây bệnh ở giai đoạn sau 7 NSG. Đây là giai đoạn cây con. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Trần Văn Chiến (2015).



Biểu đồ 2. Diễn biến bệnh thối gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii)* tại xã Truông Mít, tháng 10/2018 - 04/2019

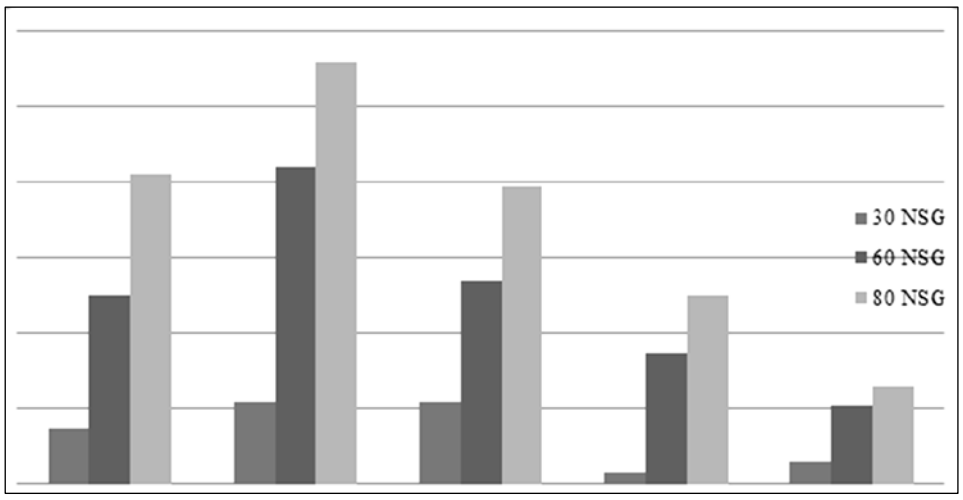
Về diễn biến bệnh thối gốc mốc trắng do nấm *Sclerotium rolfsii* gây ra (Biểu đồ 2). Từ Biểu đồ 2 có thể thấy, bệnh phát triển mạnh trên các ruộng điều tra ở giai đoạn từ sau 14 NSG. Từ thời điểm này, triệu chứng bệnh được ghi nhận tăng mạnh cho đến 63 NSG. Đây là giai đoạn cây đậu phộng phát triển nhánh và đặc biệt là vào thời điểm này cây ra hoa và đâm tia quả xuống đất. Từ 63 NSG trở đi, bệnh vẫn tiếp tục phát triển cho đến thu hoạch. Tuy nhiên tốc độ phát triển của bệnh không mạnh bằng giai đoạn trước đó.

3.2. Tình hình bệnh thối gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii)* trên cây đậu phộng tại huyện Dương Minh Châu, tỉnh Tây Ninh

Qua theo dõi và ghi nhận trong thời gian điều tra, thời tiết tại các vùng điều tra có ít mưa. Người dân trồng đậu phộng chủ yếu sử dụng nước kênh từ hồ Dầu Tiếng để tưới cho cây. Cây trồng vụ trước ở tất cả các hộ điều tra tại Truông Mít và Cầu khởi là cây lúa nước. Tại xã Phan, xã Phước Minh và xã Lộc Ninh gồm cây khoai mì và cây bắp, một số cây rau màu khác và cả cây lúa nước. Vùng đất canh tác tại 3 xa trên tương đối cao hơn tại Truông Mít và Cầu Khởi.

Dựa vào kết quả điều tra diễn biến của bệnh thối gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii*) trên cây đậu phộng tại Truông Mít, việc điều tra tình hình bệnh được tiến hành theo dõi tập trung vào 3 thời kỳ là 30 NSG (ngày sau gieo), 60 NSG và trước khi thu hoạch 5 - 7 ngày (80 NSG).

Theo kết quả điều tra, tại tất cả các địa phương được điều tra đều phát hiện bệnh thối gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii*) gây hại trên cây đậu phộng (Biểu đồ 3).



Biểu đồ 3. Tình hình bệnh thối gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii)* tại huyện Dương Minh Châu, tháng 10/2019 - 04/2020

Bệnh hại nặng nhất tại xã Cầu Khởi, tất cả các ruộng điều tra đều bị bệnh và tỷ lệ bệnh đạt trên 11%. Với tỷ lệ bệnh như trên được đánh giá là nặng (theo Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về phương pháp điều tra phát hiện dịch hại trên cây lạc, đậu tương, 2014). Cầu Khởi cũng là địa phương có diện tích trồng đậu phộng lớn thứ hai sau Truông Mít (Niên giám thống kê tỉnh Tây Ninh năm 2018, 2019).

Mặc dù có diện tích trồng đậu phộng lớn nhất huyện, Truông Mít lại có tỷ lệ bệnh thấp hơn Cầu Khởi (8,2%). Một trong những nguyên nhân là do: Qua theo dõi và ghi nhận trong quá trình điều tra, hầu hết các hộ trồng đậu phộng tại đây đã tốn rất nhiều chi phí cho việc phòng trừ bệnh bằng các loại thuốc hóa học hơn những vùng khác. Vì Truông Mít là vùng trồng đậu phộng lớn nên nhiều đơn vị bán thuốc chuyên phòng trừ bệnh cho cây đậu phộng tập trung nhiều với nhiều chủng loại khác nhau.

Mặt khác, các ruộng điều tra tại xã Truông Mít và Cầu Khởi cây đậu phộng được trồng trên chân đất luân canh với lúa nước. Nhưng tỷ lệ bệnh thối gốc mốc trắng tại hai địa phương này vẫn cao. Điều này cho thấy, việc luân canh với cây lúa nước vẫn chưa phát huy hiệu quả đáng kể. Ngoài biện pháp luân canh hàng năm với lúa nước còn cần áp dụng các biện pháp khác như xử lý đất trước khi trồng, quản lý nước tưới - tiêu, sử dụng các loại thuốc phòng trừ bệnh ít độc cho môi trường và thiên địch nếu cần thiết,...

Ba xã còn lại gồm xã Lộc Ninh, xã Phước Minh và xã Phan tuy có xuất hiện bệnh thối gốc mốc trắng trên cây đậu phộng như tỷ lệ bị hại thấp hơn hai xã còn lại (xã Cầu Khởi và xã Truông Mít) (tỷ lệ bệnh của các xã lần lượt là 7,9%, 5% và 2,6%).

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Trong hai đợt điều tra (tháng 10/2018 - 04/2019 và tháng 10/2019 - 04/2020), tất cả các ruộng điều tra của huyện Dương Minh Châu đều phát hiện bệnh thối gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii*) gây hại trên cây đậu phộng. Tỷ lệ cây đậu phộng bị hại khá cao (có nơi lên đến 11,2%). Tỷ lệ cây đậu phộng bị hại tập trung nhiều ở các vùng trồng trên ruộng luân canh với lúa nước - đất trũng thấp.

Bệnh thối gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii*) bắt đầu gây hại ở giai đoạn từ sau 7NSG (ngày sau gieo) và tiếp tục gây hai cho đến khi thu hoạch. Thời điểm phát triển mạnh của nấm gây bệnh (*Sclerotium rolfsii*) trên các ruộng được điều tra là từ 14 NSG đến 63 NSG.

4.2. Đề nghị

Cần mở rộng điều tra trên các vùng trồng đậu phộng khác của Tây Ninh.

Cần có biện pháp quản lý bệnh thối gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii*) gây hại trên cây đậu phộng tại huyện Dương Minh Châu một cách hiệu quả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abida Akram, Muhammad Iqbal, Rizwana Aleem qureshi and Chaudhary Abdul Rauf (2008). Variability among isolates of sclerotium rolfsii associated with collar rot disease of Chickpea in Pakistan. Pak. J. Bot. 40(1): 453 - 460.
2. Allen D.J. and Lenné J.M. (1998). The pathology of food and pasture legumes. CAB International in association with the International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), pp: 1 - 61.
3. Bộ Nông nghiệp và PTNT (2014). Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về phương pháp điều tra phát hiện dịch hại trên cây lạc, đậu tương. QCVN 01-168: 2014/BNNPTNT.
4. Cục Thống kê Tây Ninh (2019). Niên giám thống kê tỉnh Tây Ninh 2018. NXB. Thống Kê, Hà Nội.
5. Dương Hồng Dật (2011). Cây lạc và biện pháp thâm canh nâng cao hiệu quả sản xuất. NXB. Thanh Hóa, Thanh Hóa.
6. Tổng cục Thống kê (2019). Niên giám thống kê 2018. NXB. Thống kê. Hà Nội.
7. Vũ Trần Chiến (2016). Nghiên cứu bệnh héo rủ gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) gây hại trên một số cây trồng cạn tại Hà Nội và vùng phụ cận năm 2014. Trường Đại học Nông nghiệp I Hà Nội.

XÁC ĐỊNH NẤM *Fusarium solani* GÂY BỆNH HÉO DÂY, THỐI CỦ TRÊN KHOAI LANG

Nguyễn Trường Sơn[1] và Lê Minh Tường[2]

[1] Chi cục Trồng trọt và BVTV tỉnh Kiên Giang
[2] Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ
Liên hệ: Email: lmtuong@ctu.edu.vn; Điện thoại: 0918 003719

SUMMARY

Identification of *Fusarium solani* fungus causing wilt and root rot disease on Sweet potato

Sweet potato (Ipomoea batatas (L.) Lam.) is the third major staple crop and the second largest economic value in Viet Nam. The wilt and root rot disease, caused by Fusarium solani, is one of the most important problems of sweet potato. The objective of this research was to identify the fungal species causing root rot disease on sweet potato. In this study, the samples were determined based on morphological and pathogenicity. The morphology showed that all 9 strains belonged to Fusarium solani and the conidiophores branch into thin, the macroconidia produced by F. solani are slightly curved, hyaline and broad. Microconidia have thickened basal cells and tapered, rounded apical cells. Fusarium solani also forms chlamydospores most commonly under suboptimal growth conditions are also brown and round. Besides, they induced typical symptoms of root rot disease on sweet potato. The results of this study will be the basis for further researches to find the effective methods to control root rot disease on sweet potato.

Keywords: *Fusarium solani, identification, wilt and root rot disease, sweet potato.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Khoai lang (*Ipomoea batatas*) là cây lương thực với các rễ củ lớn, chứa nhiều tinh bột, có vị ngọt và là nguồn cung cấp lương thực quan trọng (Clark *et al.*, 2013). Bệnh héo dây, thối củ trên khoai lang do nấm *Fusarium solani* gây ra, là loại mầm bệnh gây ảnh hưởng vừa ở giai đoạn sinh trưởng ở ngoài đồng và vừa ở giai đoạn tồn trữ. Ở giai đoạn đầu, dây và củ sẽ bị thối và mục, ở giai đoạn sau, củ thu hoạch sẽ bị thối và hoại tử bên trong (Clark *et al.*, 2013). Đặc biệt ở giai đoạn sinh trưởng ngoài đồng, nấm *Fusarium solani* gây triệu chứng dây còi cọc, rễ kém phát triển và đổi màu, từ đó cây không hấp thu chất dinh dưỡng làm lá bị héo và hóa vàng, cuối cùng gây chết. Ngoài ra, nấm bệnh còn gây hại trên củ

Người phản biện: PGS.TS. Trần Thị Thu Thủy.

với vết bệnh hình tròn có vòng đồng tâm màu nâu nhạt và tối, mô bị nhiễm bệnh chuyển sang màu nâu sẫm, bên trong củ bị bệnh cho thấy các tổn thương có thể kéo dài vào trung tâm của củ. Vết bệnh phát triển trở nên khô và lõm xuống, đôi khi có thể nhìn thấy sợi nấm màu trắng ở bên ngoài của vết bệnh (Scruggs and Quesada-Ocampo, 2016). Bệnh xuất hiện khi củ bị tổn thương trong quá trình thu hoạch (thu hoạch khi đất quá khô hoặc quá ẩm), xử lý sau thu hoạch (củ tiếp xúc với nhiệt độ quá lạnh hoặc quá nóng) hoặc trong suốt quá trình tồn trữ (Scruggs and Quesada-Ocampo, 2016). Đồng bằng sông Cửu Long là một trong những vùng có diện tích canh tác và sản lượng khoai lang lớn nhất cả nước. Song song với việc thâm canh tăng vụ nhằm gia tăng sản lượng thì vấn đề dịch hại trên khoai lang ngày càng diễn biến phức tạp, trong đó bệnh thối củ khoai lang do nấm *Fusarium solani* gây ra là một trong những bệnh quan trọng ảnh hưởng đến năng suất của cây khoai lang. Vì vậy, việc xác định chính xác tác nhân gây bệnh để tìm ra phương pháp phòng trừ hiệu quả là một trong những vấn đề quan trọng góp phần giảm thiệt hại, gia tăng năng suất và chất lượng trong sản xuất khoai lang.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thu thập và phân lập tác nhân nấm gây thối củ khoai lang

Các củ khoai lang có biểu hiện triệu chứng bệnh điển hình và có mùi đặc trưng của bệnh thối ở ngoài đồng ruộng được thu thập, phân lập và tách ròng nấm gây bệnh dựa theo phương pháp của Burgess *và ctv.* (2009).

2.2. Khảo sát một số đặc điểm hình thái của nấm gây bệnh

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 1 nhân tố (chủng nấm), với 5 lặp lại: Mỗi chủng nấm phát triển từ đơn bào tử được nuôi trong đĩa petri chứa 10 ml môi trường PDA ở điều kiện nhiệt độ phòng trong 4 ngày. Sau đó, các khoanh khuẩn ty nấm (đường kính 4 mm) ở mép rìa khuẩn lạc được chuyển vào đĩa petri chứa 10 ml môi trường PDA, các dĩa được quấn xung quanh bằng paraffin để tạo ẩm độ và để trong điều kiện chiếu sáng - tối xen kẽ 12 giờ ở nhiệt độ 25^0C.

Chỉ tiêu theo dõi gồm đường kính khuẩn lạc để tính tốc độ nấm phát triển trung bình mỗi ngày được ghi nhận cho đến 5 ngày sau khi nuôi cấy. Các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, đặc điểm của bào tử (30 bào tử/chủng nấm) và đĩa đài (30 đĩa đài/chủng nấm) được ghi nhận vào thời điểm 7 ngày sau khi nuôi cấy.

2.3. Lây bệnh nhân tạo trên củ khoai lang trong điều kiện phòng thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí với 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 1 củ khoai lang. Củ khoai lang có kích thước đều nhau được rửa sạch, khử trùng xung quanh bề mặt bằng bằng cồn 70%. Chủng bệnh bằng cách cho 10 µl huyền phù nấm (mật độ 5×10^6 bào tử/ml) vào vết thương trên bề mặt củ khoai lang (3 vết thương/củ). Củ khoai lang sau khi lây bệnh nhân tạo được đặt trong túi nilong có chứa bông gòn tẩm 3 ml nước cất thanh trùng và đặt trong điều kiện tối ở nhiệt độ 25^0C. Triệu chứng bệnh được ghi nhận ở các thời điểm 10, 20 và 30 ngày sau khi lây bệnh nhân tạo.

2.4. Lây bệnh nhân tạo trên dây khoai lang trong điều kiện nhà lưới

Cây khoai lang khoảng 2 tháng tuổi được sử dụng để chủng bệnh nhân tạo, những cây được chọn để chủng bệnh là những cây phát triển tốt, không có triệu chứng bệnh. Chủng bệnh nhân tạo bằng cách tưới 200 ml huyền phù nấm (mật số 5×10^6 bào tử/ml) vào mỗi chậu khoai lang (5 cây/chậu). Chậu khoai lang sau khi chủng bệnh được đặt trong phòng ủ bệnh có nhiệt độ 25^0C, ẩm độ ≥ 96% trong 24 giờ. Sau đó, cây được chuyển ra nhà lưới điều kiện ánh sáng bình thường, cung cấp nước để tạo ẩm độ thích hợp cho nấm phát triển. Quan sát và ghi nhận triệu chứng bệnh trên cây khoai lang ở thời điểm cây xuất hiện triệu chứng bệnh cho đến khi cây bị chết hoàn toàn.

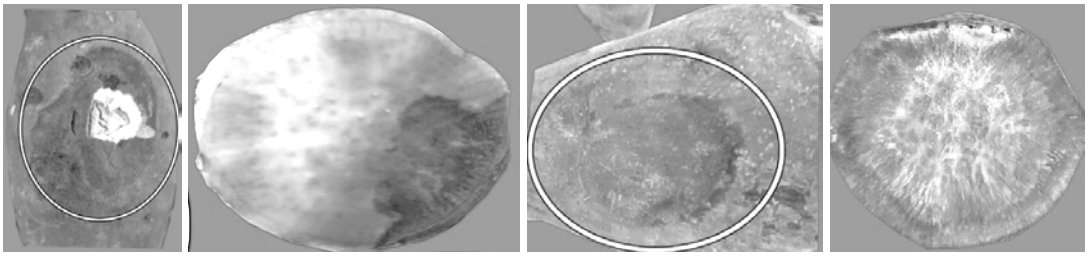
2.5. Phân lập nấm *Fusarium solani* từ các mẫu bệnh sau khi lây bệnh nhân tạo (Tái phân lập)

Khi kết thúc thí nghiệm lây bệnh nhân tạo (trên củ và trên dây khoai lang), tiến hành thu mẫu, phân lập và tách ròng nấm dựa theo phương pháp của Burgess *và ctv*. (2009). Tiến hành quan sát đặc điểm màu sắc khuẩn lạc, hình dạng bào tử nấm của các mẫu tái phân lập để khẳng định nấm gây bệnh thối củ, héo dây khoai lang là nấm *Fusarium solani*.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thu thập và phân lập nấm gây bệnh thối củ khoai lang

Mẫu bệnh được thu thập trên các ruộng trồng khoai lang tại 3 tỉnh gồm Vĩnh Long, Đồng Tháp và Kiên Giang. Kết quả phân lập được 9 dòng nấm *Fusarium solani* gây bệnh thối củ khoai lang gồm 2 dòng Fs-KG1, Fs-KG2 thu thập từ Kiên Giang; 5 dòng Fs-VL1, Fs-VL2, Fs-VL3, Fs-VL4 thu thập từ Vĩnh Long và 2 dòng Fs-ĐT1, Fs-ĐT2 thu thập từ Đồng Tháp.

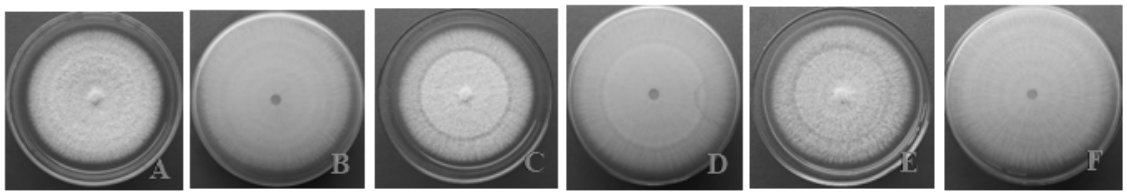


Hình 1. Triệu chứng bệnh thối củ khoai lang do nấm *Fusarium solani* gây ra ở điều kiện ngoài đồng

* *Triệu chứng bệnh*: Vết bệnh ban đầu có hình tròn và lõm xuống và có thể thấy rõ các vòng tròng đồng tâm bên trên bề mặt vết bệnh. Các củ khoai lang khi đưa về ủ bệnh khoảng 24 giờ thì thấy sợi nấm trắng mọc bao phủ bề mặt vết bệnh, cắt củ ra ngây vị trí vết bệnh mô bị hoại tử và có màu nâu xẫm đến thâm đen. Triệu chứng ghi nhận phù hợp với ghi nhận của Wang *et al.*, (2014); Da Silva and Clark (2013) về triệu chứng bệnh thối củ khoai lang do nấm *F. solani* gây ra

3.2. Đặc điểm hình thái của khuẩn lạc

Hình dạng khuẩn ty của các mẫu phân lập khá giống nhau, sợi nấm có màu trắng hoặc không màu, hệ sợi nấm phân nhánh và có vách ngăn. Nấm *F. solani* phát triển nhanh trên môi trường PDA ở nhiệt độ 26^{o}C và hình thành tản nấm có hình thể tơi xốp hoặc bằng phẳng trên môi trường nuôi cấy. Mặt trên tản nấm có màu trắng, mặt dưới có màu kem.

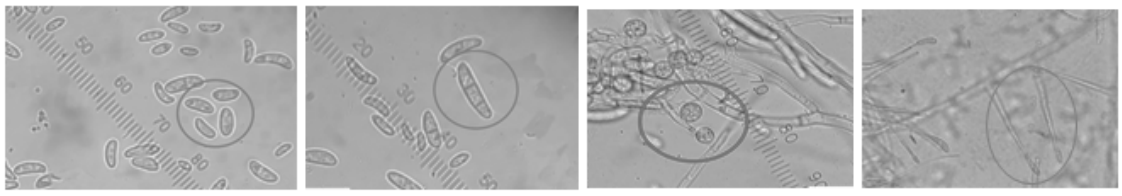


Hình 2. Đặc điểm khuẩn lạc nấm *Fusarium solani* gây hại trên khoai lang ở thời điểm 7 ngày sau khi nuôi cấy trên môi trường PDA

A: Mặt trên và B: Mặt dưới của dòng nấm Fs-KG1; C: Mặt trên và D: Mặt dưới của dòng nấm Fs-VL1; E: Mặt trên và F: Mặt dưới của dòng nấm Fs-ĐT1.

3.3. Đặc điểm bào tử của các chủng nấm

Qua quá trình quan sát theo dõi sự phát triển bào tử của 9 chủng nấm phân lập cho thấy có 3 dạng bào tử xuất hiện là tiểu bào tử, đại bào tử và bào tử áo, ngoài ra còn có cành bào đài mang bào tử đính. Tiểu bào tử được hình thành khoảng 12 giờ sau khi nuôi cấy, tiểu bào tử có dạng hình trụ hoặc hình trứng có thể có 1 vách ngăn hoặc không có vách ngăn (Hình 3A) và có kích thước dao động từ 8,9 - 9,8 × 3,45 - 3,95 µm. Đại bào tử được ghi nhận nhiều ở thời điểm 5 ngày sau khi nuôi cấy, đại bào tử đa số có dạng hình liềm thường có 2 đến 5 vách ngăn (Hình 3B) và có kích thước dao động từ 21,8 - 26,5 × 4,2 - 5,05 µm. Bào tử áo được ghi nhận ở thời điểm 10 ngày sau khi nuôi cấy (đây là lúc sợi nấm phát triển đầy đĩa và môi trường PDA cũng đã hết dinh dưỡng), bào tử áo đa số có dạng hình tròn (Hình 3C) và có đường kính dao động từ 7,85 - 8,95 µm. Cành bào đài có chiều dài dao động từ 85 - 100,4 µm (Hình 3D).



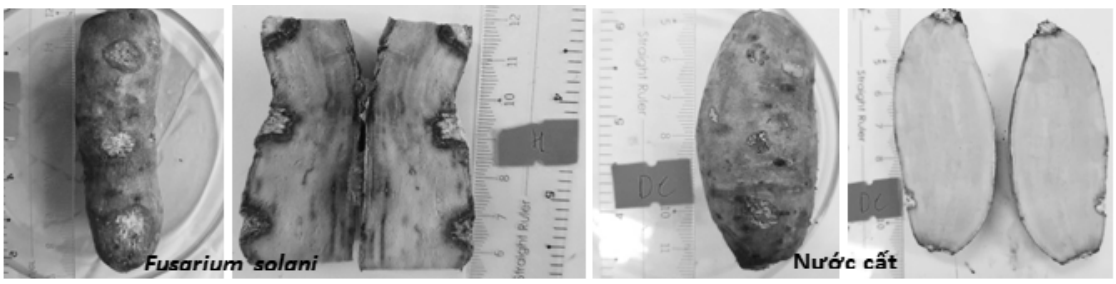
Hình 3. Đặc điểm bào tử của nấm *Fusarium solani* gây hại trên khoai lang

(A): Tiểu bào tử; (B): Đại bào tử; (C): Bào tử áo và (D): Cành bào đài mang bào tử đính

Kết quả về đặc điểm hình thái của khuẩn lạc nấm *Fusarium solani* và đặc điểm bào tử của nấm *F. solani* ghi nhận bên trên phù hợp với ghi nhận của Wang *et al.*, (2014) về đặc điểm của nấm *F. solani* gây bệnh củ khoai lang sau thu hoạch ở Trung Quốc.

3.4. Triệu chứng bệnh thối củ khoai lang do nấm *Fusarium solani* gây ra ở điều kiện phòng thí nghiệm

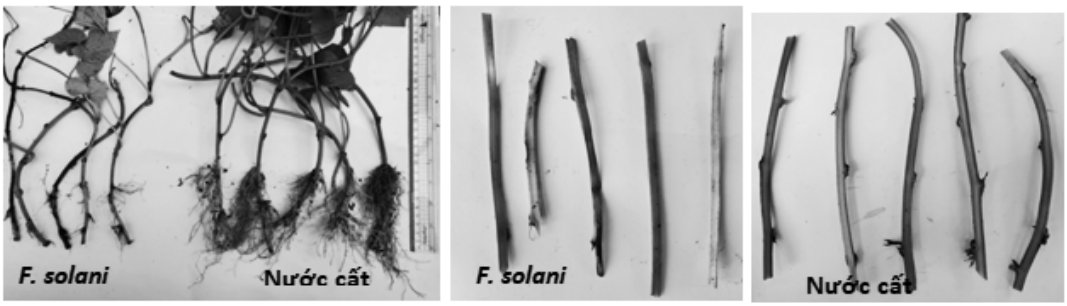
Cả 9 dòng nấm phân lập đều có khả năng gây bệnh trên củ khoai lang, triệu chứng bệnh bắt đầu xuất hiện ở thời điểm 10 ngày sau khi chủng bệnh nhân tạo (NSCB). Ở 10 NSCB, vết bệnh trên bề mặt củ khoai lang có dạng hình tròn và lõm xuống, xung quanh vết bệnh có hiện tượng nhũn nước. Đến 20 NSCB, vết bệnh lớn dần xuất hiện rõ các vòng đồng tâm, có màu nâu nhạt và tối và quan sát thấy sợi nấm trắng phía trên bề mặt vết bệnh. Đến 30 NSCB, các vị trí vết bệnh mô bị hoại tử và có màu đen đến nâu, mô bị nhiễm bệnh chuyển sang màu nâu sẫm, cắt củ bị bệnh cho thấy các tổn thương có thể kéo dài vào trung tâm của củ (Hình 4). Các triệu chứng mô tả trên tương tự với triệu chứng bệnh ngoài đồng quan sát được qua quá trình thu thập mẫu.



Hình 4. Triệu chứng bệnh thối củ khoai lang do nấm *Fusarium solani* gây ra và đối chứng nước cất ở thời điểm 30 ngày sau khi chủng bệnh nhân tạo

3.5. Triệu chứng bệnh do nấm *Fusarium solani* gây ra ở điều kiện nhà lưới

Kết quả ghi nhận trong điều kiện nhà lưới như sau: Bệnh bắt đầu xuất hiện ở thời điểm 7 NSCB với triệu chứng là một số lá khoai lang bị héo, khi nhổ bộ rễ cây lên thì phần chóp của rễ non bị thối hóa và có màu xám đen, khi cắt mạch dẫn ra thì mạch dẫn không bị hóa nâu. Đến 14 NSCB, lá khoai lang bị héo nhiều hơn, rễ bị thối hóa và có màu đen, tuy nhiên mạch dẫn vẫn không bị hóa nâu. Đến 21 NSCB, lá của dây khoai lang bị héo hoàn toàn, rễ cây bị thối đen tuy nhiên mạch dẫn không bị hóa nâu (Hình 5).



Hình 5. Triệu chứng bệnh héo dây khoai lang do nấm *Fusarium solani* gây ra và nghiệm thức đối chứng nước cất ở thời điểm 21 ngày sau khi chủng bệnh nhân tạo

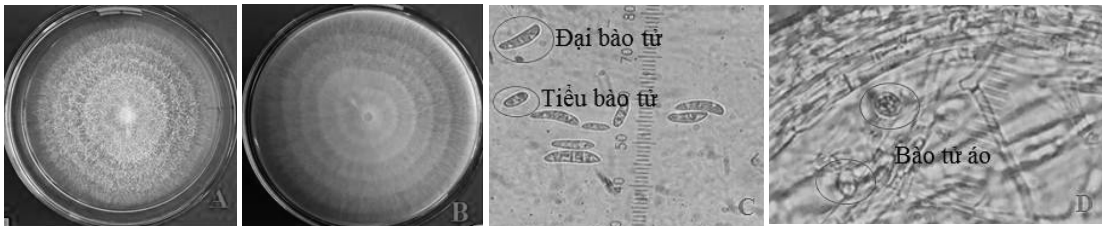
Triệu chứng ghi nhận khi chủng bệnh nhân tạo phù hợp với miêu tả của Yang *et al.*, (2018) về triệu chứng bệnh héo dây, thối củ khoai lang do nấm *Fusarium solani* gây ra ở Hàn Quốc.

3.6. Đặc điểm nấm *Fusarium solani* sau khi tái phân lập

- Màu sắc tản nấm: Nhận thấy khi nấm phát triển trên môi trường PDA, các tản nấm *F. solani* có màu trắng, các sợi nấm bông xốp (Hình 6A và 6B).

- Bào tử nấm: Quan sát nấm *F. solani* trên kính hiển vi cho thấy các mẫu nấm phân lập có 3 dạng bào tử: tiểu bào tử dạng đơn bào, hình bầu dục, đại bào tử có dạng hình liềm và có 3 - 5 vách ngăn, bào tử áo có dạng hình tròn hoặc bầu dục, có vách dầy và có màu nâu sậm (Hình 6 C và 6D).

Như vậy, qua quan sát đặc điểm màu sắc tản nấm, hình dạng bào tử của các mẫu nấm tái phân lập cho thấy các mẫu nấm này phù hợp với miêu tả của Vũ Triệu Mân *và ctv.* (2007); Agrios (2005) về nấm *Fusarium solani* gây bệnh cây trồng.



Hình 6. Đặc điểm khuẩn lạc và bào tử nấm nấm *Fusarium solani* gây hại trên khoai lang ở thời điểm 7 ngày sau khi nuôi cấy trên môi trường PDA

(A) và (B): mặt trên và mặt dưới của khuẩn lạc nấm; (C): Tiêu bào tử và đại bào tử; (D): Bào tử áo của nấm *Fusarium solani* sau khi tái phân lập

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

- Cả 9 dòng nấm gây bệnh héo dây, thối củ trên khoai lang đều thuộc loài *Fusarium solani*.

- Đề nghị định danh đến loài bằng phương pháp sinh học phân tử và nghiên cứu biện pháp phòng trị bệnh trên khoai lang do nấm *Fusarium solani* gây ra bằng biện pháp sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. Deparment of plant pathology, University of Florida, 5th edition. *Elsevier Academic*, 922.
2. Burgess, L.W., T.E. Knight, L. Tesoriero và H. T. Phan (2009). Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam. Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp quốc tế Australia (ACIAR), 212 pages.
3. Clark C. A., D. M. Ferrin, T. P. Smith and G. J. Holmes (2013). *Compendium of Sweet potato Diseases, Pests, and Disorders*, Second Edition. The American Phytopathological Society.
4. Da Silva WL and Clark CA. (2013). Infection of Sweet potato by *Fusarium solani* and *Macrophimina phaseolina* prior to harvest. *Plant Disease*. 97:1636 - 1644.
5. Scruggs, A.C. and Quesada-Ocampo (2016). Etiology and epidemiological conditions promoting root rot in sweet potato. *Phytopathology*, 106 (8): 909 - 919.
6. Vũ Triệu Mân (2007). *Giáo trình bệnh cây chuyên khoa*. Trường Đại học Nông Nghiệp Hà Nội. 252 trang.
7. Yang, J. W., S. S. Nam, H. U. Lee, K. H. Choi, S. G. Hwang and N. C. Paul (2018). Fusarium root rot caused by *Fusarium solani* on sweet potato (*Ipomoea batatas*) in South Korea. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40: 90 - 95.

XÁC ĐỊNH NẤM BỆNH TRÊN HẠT LÚA GIỐNG IR 50404 TẠI AN GIANG

Nguyễn Quang Tiến, Nguyễn Thị Kiều My, Nguyễn Đắc Khoa*

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học,
Trường Đại học Cần Thơ
** Tác giả liên hệ: ndkhoa@ctu.edu.vn*

ABSTRACT

Identification of seed-borne pathogens on rice cv. IR 50404 in An Giang

This study aims at identifying pathogens contaminating seeds of rice cultivar IR 50404 in An Giang province to study disease control methods. A total of 36 seed samples was collected from ten main rice cultivation areas of the province. Eight fungal pathogens were identified based on their morphological characteristics using the blotter method. They include Alternaria padwickii, Aspergillus flavus, Bipolaris oryzae, Fusarium moniliforme, Mucor sp., *Penicilium* sp., *Curvularia* sp. *and Sarocladium oryzae. These results serve as a basis to develop effective control methods for seed transmitted diseases in rice fields.*

Keywords: *blotter method, IR 50404, pathogen identification, rice, seed-borne pathogens*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

An Giang là vựa lúa lớn nhất Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) với IR 50404 là một trong ba giống lúa chủ lực được trồng phổ biến hiện nay (Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn An Giang, 2016). Tuy nhiên, năng suất và sản lượng lúa đang có xu hướng giảm trong những năm gần đây; cụ thể năm 2019, năng suất lúa chỉ đạt 62,71 tạ/ha, giảm 0,31 tạ/ha và sản lượng chỉ gần 4 triệu tấn/ha, giảm 5.000 tấn so với năm 2018 (Cổng thông tin điện tử tỉnh An Giang, 2019). Nguyên nhân chủ yếu do tác động của nhiều yếu tố như sức khỏe hạt giống, thời tiết và dịch bệnh. Trong đó, hạt lúa giống là nơi lưu tồn của nhiều mầm bệnh gây hại trong suốt quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lúa, trở thành nguồn bệnh lây lan trong quần thể lúa trồng (Ora *et al.* 2011). Theo nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước, bệnh hại phát sinh từ hạt lúa giống do các tác nhân nấm mốc và vi khuẩn gây ra. Trong đó, nấm *Fusarium moniliforme* gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến ngành sản xuất lúa gạo giai đoạn 2002 - 2008 tại ĐBSCL (Phạm Văn Kim, 2015). Từ tình hình thực tế nêu trên, đề

Người phản biện: TS. Nguyễn Đức Độ.

tài được thực hiện nhằm xác định được các mầm bệnh nhiễm trên hạt lúa giống IR 50404 tại tỉnh An Giang, làm tiền đề cho các nghiên cứu phòng trị bệnh trên hạt giống trước khi gieo trồng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thu mẫu hạt

Mẫu hạt lúa giống IR 50404 tại các huyện, thành phố thuộc tỉnh An Giang được thu thập và phân tích theo TCVN 8548-2011 (TCVN 8548-2011, 2011).

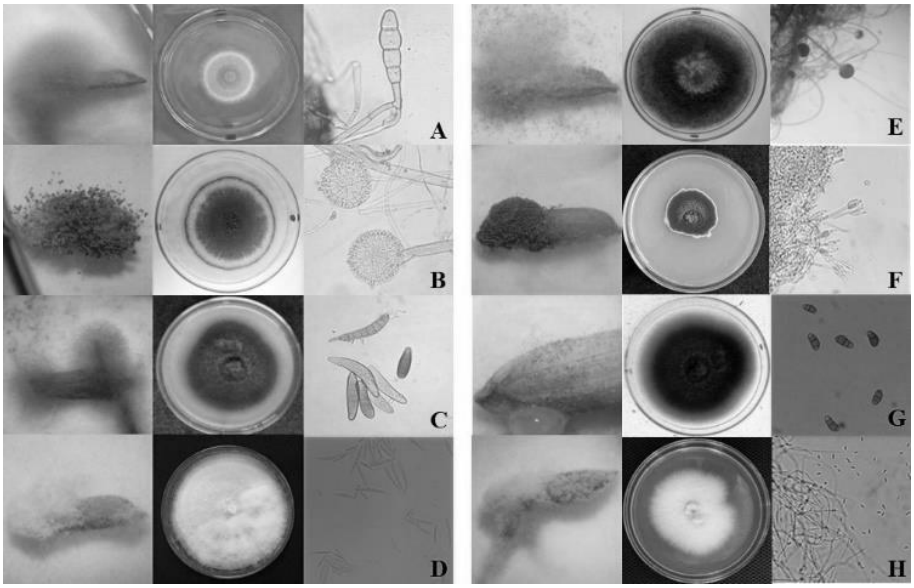
2.2. Xác định mầm bệnh nấm nhiễm trên hạt lúa giống

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp đặt hạt trên giấy thấm (blotter method) của ISTA (International Seed Testing Association, 1993). Sau 6 - 8 ngày, các hạt lúa được quan sát hạt dưới kính hiển vi soi nổi để quan sát những hạt bị nhiễm nấm. Sau đó, nấm bệnh được phân lập và tách ròng trên môi trường Potato dextrose agar-PDA (Burgess *et al.* 2014). Nấm bệnh được xác định dựa vào hình thái sợi nấm trên đĩa thạch và hình thái bào tử dưới kính hiển vi quang học (Mew và Gozales, 2002).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định nấm bệnh nhiễm trên hạt lúa giống

Kết quả phân lập và xác định mầm bệnh cho thấy nấm mốc là mầm bệnh phổ biến nhiễm trên hạt lúa giống. Sau 10 ngày ủ và quan sát dưới kính hiển vi soi nổi, tám loài nấm bệnh được xác định nhiễm trên tổng số 36 mẫu hạt đã thu thập, bao gồm *Alternaria padwickii*, *Aspergillus flavus*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium moniliforme*, *Mucor* sp., *Penicilium* sp., *Curvularia* sp. và *Sarocladium oryzae* (Hình 1).



Hình 1. Sự phát triển của sợi nấm trên hạt, hình thái tản nấm trên môi trường PDA và hình thái bào tử của 8 loài nấm trên hạt giống IR 50404 tại An Giang

Alternaria padwickii (A), *Aspergillus flavus* (B), *Bipolaris oryzae* (C), *Fusarium moniliforme* (D), *Mucor* sp. (E), *Penicilium* sp. (F), *Curvularia* sp. (G) và *Sarocladium oryzae* (H)

Kết quả phân lập thành phần nấm bệnh trên hạt giống lúa tương đồng với các nghiên cứu trên thế giới; trong đó, tần số xuất hiện của nấm *A. padwickii, B. oryzae, F. moniliforme, S. oryzae* ở Đông Nam Á được ghi nhận rất cao; với *A. padwickii* có tần số dao động cao nhất (40 - 100%) trong giai đoạn 1989 - 1997. Ngoài ra, Trong các loài nấm nhiễm trên hạt thì *A. padwickii* và *B. oryzae* phổ biến hơn cả, tiếp theo là các loài *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Aspergilus* sp. và *Penicillium* sp. (Ibiam, 2008; Ora *et al.*, 2011; Zafar *et al.*, 2014).

3.2. Sự phân bố nấm bệnh nhiễm trên hạt lúa giống IR 50404 trên địa bàn tỉnh An Giang

Tám loài nấm bệnh được xác định hiện diện ở nhiều nơi trên địa bàn tỉnh An Giang (Bảng 1); trong đó, *A. padwickii, A. flavus* và *B. oryzae* có mặt ở hầu hết các địa điểm thu mẫu hạt giống. Các địa điểm An Phú, Thoại Sơn và Tân Châu có thành phần nấm bệnh nhiều nhất (6 loài) và Chợ Mới là địa điểm có ít thành phần nấm bệnh nhất (3 loài).

Kết quả này phù hợp với báo cáo tình hình dịch hại của Chi cục Bảo vệ thực vật tỉnh An Giang, các loại bệnh quan trọng xuất hiện trên ruộng lúa tại tỉnh An Giang gồm lem lép hạt do nấm *Fusarium* spp., *Curvularia lunata* và *Alternaria* sp.,... (Trần Thị Thu Thủy, 2011) và bệnh đốm nâu do nấm *Curvularia* sp. (Ou, 1985) và nấm *Bipolaris oryzae* (Kato *et al.*, 1988).

Bảng 1. Sự hiện diện của mầm bệnh trên hạt giống IR 50404 tại An Giang

Địa điểm	Loại nấm bệnh								Tổng loại nấm bệnh
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Tri Tôn	+	+	+	-	-	+	+	-	5
Tịnh Biên	+	+	+	-	-	+	+	-	5
An Phú	+	+	+	-	+	+	+	-	6
Thoại Sơn	+	+	+	+	-	+	+	-	6
Tân Châu	+	+	+	-	+	-	+	+	6
Châu Đốc	+	+	+	+	-	-	+	+	5
Châu Phú	+	+	+	+	-	-	-	+	5
Châu Thành	+	+	+	+	-	+	-	-	5
Long Xuyên	+	+	-	+	-	+	+	-	5
Chợ Mới	+	-	+	-	-	+	+	-	3
Tổng địa điểm	**10**	**9**	**9**	**5**	**2**	**7**	**8**	**3**	

Ghi chú: 1: *Alternaria padwickii*; 2: *Aspergillus flavus*; 3: *Bipolaris oryzae*; 4: *Fusarium moniliforme*; 5: *Mucor* sp.; 6: *Penicilium* sp.; 7: *Curvularia* sp.; 8: *Sarocladium oryzae.*

Nguyên nhân các mầm bệnh này có mặt ở nhiều nơi là do ảnh hưởng của điều kiện môi trường. Trong điều kiện khô ráo, bào tử nấm bệnh trên hạt lúa giống lúa tồn trữ có thể sống sót đến 4 năm (Phạm Văn Kim, 2015). Đặc biệt, bào tử nấm *B. oryzae* trong điều kiện 25 - 35^{0}C có thể lưu tồn đến 2 năm; nấm *F. moniliforme* gây bệnh lúa von là loài gây hại nghiêm trọng do nấm lây qua hạt và có thể lưu tồn trên hạt trong thời gian dài (từ 4 - 10 tháng ở nhiệt độ phòng và hơn 3 năm trong điều kiện bảo quản lạnh) nên nấm bệnh có thể truyền từ vụ này sang vụ khác (Ou, 1985). Nhiệt độ và độ ẩm là các yếu tố môi trường quan trọng ảnh hưởng đến sự phát triển của nấm bệnh. Khoảng nhiệt độ phát triển của *Aspergillus* sp. từ 28 - 37^{o}C và *Penicilium* sp. từ 5 - 32^{o}C phù hợp với điều kiện khí hậu của An Giang là nhiệt đới, mưa nhiều, độ ẩm cao khoảng 80%, nhiệt độ dao động từ 20 - 36^{o}C (Khí hậu An Giang). Bên cạnh đó, nhóm nấm này còn có khả năng phân giải cellulose, protein, lipid và các chất dinh dưỡng trong hạt lúa để cung cấp cho quá trình sinh trưởng và phát triển. Mặt khác, *B. oryzae* gây ra bệnh trên hạt phụ thuộc vào sinh lý của cây lúa (Mew and Gozales, 2002) như gây hại chủ yếu trên các giống lúa dài ngày, thiếu dinh dưỡng vào các giai đoạn sinh trưởng của cây lúa như giai đoạn lúa bị hạn hay thời kì đẻ nhánh (Vũ Triệu Mân, 2007), bệnh cũng thay đổi tùy theo các hệ sinh thái lúa (ở vùng cao, đất thấp, nước mưa, nước tưới, nhiệt đới, cận nhiệt đới) (Mew and Gozales, 2002).

IV. KẾT LUẬN

Đề tài đã xác định được tám loài nấm mốc nhiễm trên hạt lúa giống IR 50404 gồm *Alternaria padwickii*, *Aspergillus flavus*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium moniliforme*, *Mucor* sp., *Penicilium* sp., *Curvularia* sp. và *Sarocladium oryzae*. Trong đó, nấm *A. padwickii*, *A. flavus* và *B. oryzae* có mặt ở hầu hết các địa điểm thu mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Burgess, L. W., Knight, T. E., Tesoriero, L. và Phan Thúy Hiền (2014). Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam. Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia (ACIAR). 210 trang.
2. Cổng thông tin điện tử tỉnh An Giang (2019). Thúc đẩy hợp tác, liên kết trong tiêu thụ lúa gạo.
3. Ibiam, O. F. A., Umechuruba, C. I. and Arnze, A. E. (2008). A surve of seed-born fungi associated with seed of rice in storage and the field in afikapo north local govermment area of lebony state. Scient Africana. Vol. 7 (No.2) December 2008. ISSN 1118-1931.
4. ISTA- International Seed Testing Association (1993). International rules for seed testing. Seed Science and Technology 21 (Suppl.), 288 pages.
5. Kato, H., Ohata, K., Kauraw, L. P. and Lee, Y. H. (1988). Fungal diseases of rice seed. Rice seed health. Proceedings of the International Workshop on Rice Seed Health, 16-20 March 1987, IRRI, Philippines. 151 - 162.
6. Khí hậu An Giang (2018). https://kenhthoitiet.vn /khi-hau-an-giang-101567/.
7. Mew T. W. and Gonzales, P. (2002). Ahandbook of rice seedborne fungi. 83 pages.
8. Ora. N, Faruq, A. N., Islam, M. T., Akhtar, N. and Rahman, M. M. (2011). Detection and Identification of Seed Borne Pathogens from

Some Cultivated Hybrid Rice Varieties in Bangladesh. Middle-East Journal of Scientific Research, 10(4): 482 - 488.

9. Ou, S. H. (1985). Rice diseases. 2nd Edition. Common-wealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 380 pages.
10. Phạm Văn Kim (2015). Các bệnh hại lúa quan trọng ở Đồng bằng sông Cửu Long. Nhà xuất bản Nông nghiệp. 132 trang.
11. Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn An Giang (2006). Cơ cấu giống lúa An Giang.
12. TCVN 8548:2011. 2011. Hạt giống cây trồng - Phương pháp kiểm nghiệm. 110 trang.
13. Trần Thị Thu Thủy (2011). Xác định nấm gây bệnh lem lép hạt lúa tại Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 17a(2011): 155 - 163.
14. Vũ Triệu Mân (2007). Giáo trình bệnh cây chuyên khoa. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội. 233 trang.
15. Zafar, M., Jamal, A., Tahira, R., Zakria, M. and Naeemullah, M. (2014). Incidence of Seed-Borne Mycoflora in Wheat and Rice Germplasm. International Journal of Agriculture Innovations and Research. 2(5): 720 - 722.

PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ENZYME NGOẠI BÀO CÁC CHỦNG NẤM KÝ SINH RỆP SÁP TRÊN DỨA

Nguyễn Thị Ngọc Trúc [1], Nguyễn Duy Khiêm [2], Trần Ngọc Phú Tịnh[1], Phan Thị Mỹ Dung[1], Trương Thanh Xuân Liên [1]

[1] Viện Cây ăn quả miền Nam
[2] Sở Nông Nghiệp và PTNT Tiền Giang

ABSTRACT

There were 8 fungal strains isolated from aphids with parasitic fungi collected from pineapple fields at Tan Phuoc district, Tien Giang province. They were species of Penicillum, Paecilomyces, Aspergillus, symbolized from TG1 to TG8. Extracellular enzymes activity of these fungal strains were tested on 4 different substrates, included: cellulose (enzyme cellulase), Tween 80 (enzyme lipase), glucose (enzyme glucanase) and shrimp shell (enzyme chitinase). Results showed that strains TG3, TG4, TG5, TG6 have the highest hydrolysis activity on all 4 substrates, with hydrolysis diameter from 12 to 24mm. The molecular biology identification for strains TG6, TG3, TG4, TG5 were Paecilomyces parvisporus, Penicillium sp., Penicillium citrinum, Aspergillus ustus respectively.

Từ khóa: *Nấm ký sinh, rệp sáp, enzyme ngoại bào.*

I. GIỚI THIỆU

Cây dứa còn gọi là cây khóm hay cây thơm có tên khoa học *Ananas comosus* (Merr) thuộc họ Bromeliaceae, có tên khoa học là *Ananas comosus* (L) Merr, thuộc phân họ Bromelicideae, chi *Ananas*, loài *comosus*, là một loại quả nhiệt đới. Ở nước ta, dứa là một trong ba loại cây ăn quả hàng đầu gồm: chuối, dứa, cam quýt (Trần Thế Tục và Vũ Mạnh Hải, 2000). Tổng diện tích trồng dứa ở Việt Nam khoảng 36 nghìn ha với tổng sản lượng gần 620 nghìn tấn (FAO, 2017). Các tỉnh có diện tích canh tác dứa lớn đáng kể như Tiền Giang, Kiên Giang, Long An và Hậu Giang chiếm 70 - 80% sản lượng dứa của cả nước. Cây dứa với ưu điểm chịu phèn vì thế là loại cây trồng không thể thiếu trong cơ cấu cây trồng nông hộ ở vùng đất phèn ĐBSCL. Tỉnh Tiền Giang chiếm gần 50% diện tích trồng dứa của toàn vùng với sản lượng hằng năm khoảng 260 nghìn tấn (Viện Qui hoạch và Thiết kế nông nghiệp, 2008). Rệp sáp hại dứa (*Dysmicoccus*

Người phản biện: TS. Trịnh Thị Xuân.

brevipes) là một loại côn trùng gây hại chủ yếu trên cây dứa. *Dysmicoccus brevipes* là một yếu tố ảnh hưởng đáng kể trong trồng dứa vì nó hạn chế việc mở rộng diện tích canh tác và giảm sản lượng cây trồng (Santa - Cecília *và ctv.*, 2004). Rệp sáp hại dứa có rất nhiều thiên địch trong tự nhiên, cả ký sinh trùng và côn trùng. Một số phương pháp phòng trừ sinh học đã được đưa ra tại Hawai để kiểm soát dịch hại trên dứa. Trong đó, một số loài nấm gây bệnh cho rệp sáp (*Dysmicoccus* spp.) gồm nấm *Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae, Paecilomyces, Aschersonia* sp..

II. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đề tài được thực hiện từ tháng 06/2019 đến tháng 12/2019 tại Phòng Thí nghiệm Vi sinh, Bộ môn Nông học, Viện Cây ăn quả miền Nam (SOFRI). Các mẫu rệp sáp bị nấm ký sinh thu thập ở vùng trồng dứa tại tỉnh Tiền Giang. Môi trường dùng trong nghiên cứu: PDA, N1, Citrat photphat (Phạm Văn Nhạ, 2013).

Phương pháp thu mẫu: Xác định các mẫu rệp sáp bị nấm ký sinh từ mẫu ban đầu bằng phương pháp quan sát các mẫu vật theo triệu chứng của nấm ký sinh côn trùng. Mẫu được thu 01 lần, điểm thu mẫu trên mỗi ruộng được lấy tại 05 điểm ngẫu nhiên nằm trên đường chéo của khu vực thu mẫu. Mẫu vật thu thập được bảo quản riêng trong các túi nilong đã được khử trùng sau đó đem về phòng thí nghiệm bảo quản sau đó lựa chọn và phân lập nấm theo phương pháp của Barnett và Hunter (1972).

Đánh giá khả năng tiết các enzyme ngoại bào của các mẫu phân lập: Sau các ngày nuôi cấy N1, tiến hành thu dịch thể nấm chứa enzyme ngoại bào. Sử dụng môi trường đệm Citrat photphat để thử khả năng hình thành một số enzyme ngoại bào của nấm. Bổ sung 0,1% cơ chất (Tween 80, cellulose, vỏ tôm, glucoza) vào môi trường. Khoan thạch môi trường có bổ sung cơ chất và nhỏ dịch nuôi vi nấm (dịch enzym thử) vào các lỗ khoan. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ, sử dụng thuốc thử Lugol để đánh giá vòng phân giải.

Vòng phân giải được tính toán theo công thức: Vòng phân giải = (D - d) mm.

Trong đó: D: Đường kính vòng phân giải. d: Đường kính lỗ khoan.

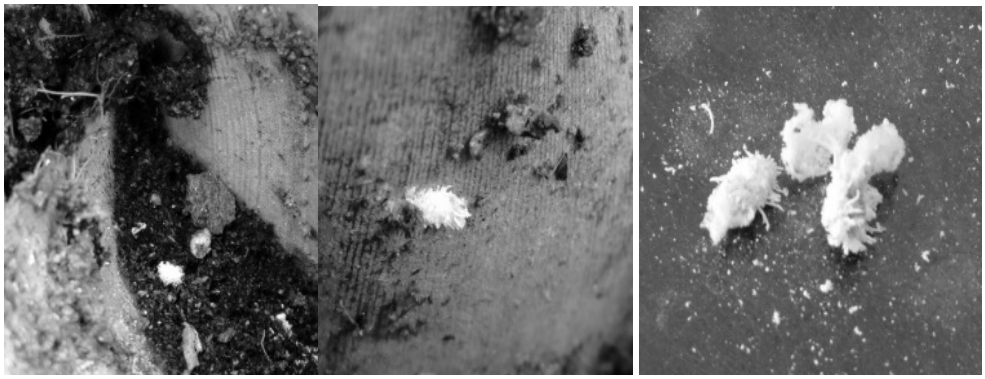
Các chủng nấm sau khi đánh giá khả năng tiết enzyme ngoại bào, chọn ra các chủng có khả năng tiết enzyme ngoại bào cao. Mẫu sau đó được gửi giải trình tự 28S rRNA. Kết quả giải trình tự được Blast trên website NCBI để xác định loài.

Số liệu ở các thí nghiệm được ghi nhận và xử lý thống kê theo phương pháp phân tích phương sai ANOVA và trắc nghiệm phân hạng Ducan bằng phần mềm Statgraphics.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thu thập, phân lập các chủng nấm ký sinh

Điều tra thu thập nguồn rệp sáp bị nấm ký sinh tại 6 xã trồng dứa của tỉnh Tiền Giang bao gồm: Tân Hoà Đông, Tân Lập 2, Thạnh Tân, Thạnh Mỹ, Mỹ Phước, Thạnh Hoà. Sau khi lựa chọn các mẫu điển hình để đem về phòng thí nghiệm tiến hành phân lập và giám định loài bằng phương pháp hình thái học.

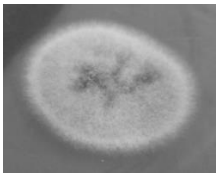
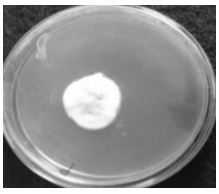
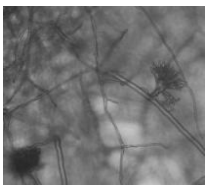
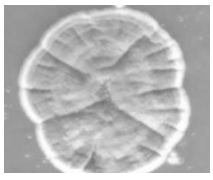
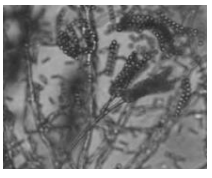


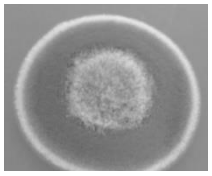
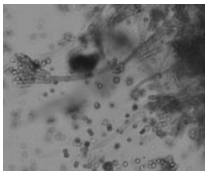
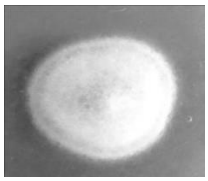
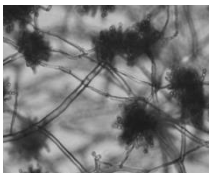
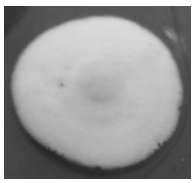
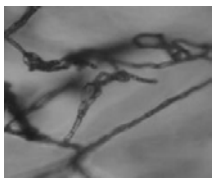
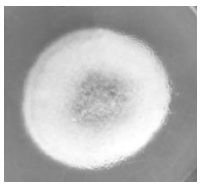
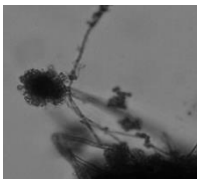
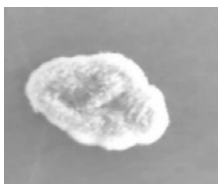
Hình 1. Thu thập mẫu nấm ký sinh rệp sáp

3.2. Định danh nấm theo đặc điểm hình thái

Sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA, quan sát màu sắc, đặc điểm của hệ sợi nấm kết hợp với quan sát hình dạng và kích thước của bào tử dưới kính hiển vi. Kết quả phân lập và giám định như sau:

Bảng 1. Kết quả mô tả hình thái đại thể và vi thể các mẫu nấm phân lập từ rệp sáp trên dứa

TT	Ký hiệu	Mô tả	Hình đại thể	Hình vi thể	Tên nấm
1	TG1	Tản nấm có màu trắng sau chuyển màu nâu. Khối bào tử trần đỉnh bọng hình cầu. Cuống bào tử trần nhẵn không có vách ngăn ngang. Giá bào tử trần không phân nhánh, sợi nấm màu trắng ngà.			*Aspergillus*
2	TG2	Tản nấm phát triển tròn, mặt trên màu trắng, tản nấm có các rãnh. Bào tử đính kết chuỗi dài đính vào đầu sợi nấm bằng đầu bào tử đính phân nhánh.			*Penicillum*
3	TG3	Tản nấm phát triển tròn, mặt trên màu xanh lục rìa màu trắng, tản nấm có các rãnh nhỏ. Bào tử đính kết chuỗi dài đính vào đầu sợi nấm bằng đầu bào tử đính phân nhánh.			*Penicillum*

4	TG4	Tản nấm phát triển tròn, mặt trên xanh lục rìa màu trắng. Bào tử đính kết chuỗi dài đính vào đầu sợi nấm bằng đầu bào tử đính phân nhánh.			*Penicillum*
5	TG5	Tản nấm có màu trắng, chuyển thành vàng nâu, cuối cùng chuyển màu nâu. Khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn. Giá bào tử trần không phân nhánh, có phần đỉnh phình ra thành bọng. Khối bào tử trần dạng hình tia tỏa tròn.			*Aspergillus*
6	TG6	Màu sắc tảng nấm ban đầu có màu trắng sau chuyển sang màu kem. Sợi nấm dạng lông nhung mịn. Cuống bào tử đính dạng đơn, phân nhánh. Bào tử đính có dạng hình thoi.			*Paecilomyces*
7	TG7	Tản nấm có màu trắng, chuyển thành vàng nâu, cuối cùng chuyển màu nâu. Khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn. Giá bào tử trần không phân nhánh. Khối bào tử trần dạng hình tia tỏa tròn.			*Aspergillus*
8	TG8	Tản nấm ban đầu có màu trắng, sau từ từ chuyển thành vàng nâu. Khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn. Giá bào tử trần không phân nhánh. Khối bào tử trần dạng hình tia tỏa tròn.			*Aspergillus*

3.3. Đánh giá khả năng tiết các enzyme ngoại bào của các mẫu phân lập

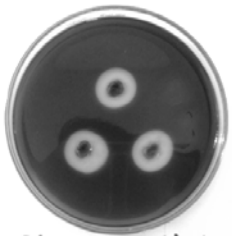
Đánh giá độc lực của các mẫu nấm bằng enzyme ngoại bào. Để tuyển chọn mẫu phân lập có độc lực cao, đề tài đã tiến hành đánh giá khả năng phân giải enzyme ngoại bào của các chủng nấm với các cơ chất khác nhau, kết quả thu được thể hiện trong các bảng sau:

Bảng 2. Khả năng phân giải một số cơ chất của Enzyme ngoại bào 8 mẫu phân lập sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường N1

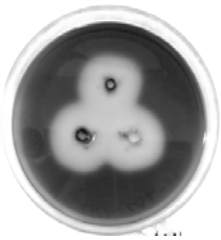
Chủng	Đường kính vòng phân giải trên các cơ chất (mm)			
	Chitin	Glucose	Lipid	Cellulose
TG1	12,54^{e}	6,6^{e}	11,2^{e}	8,58^{e}
TG2	15,68^{d}	6,34^{e}	9,35^{f}	5,01^{f}
TG3	24,35^{a}	17,34^{b}	15,69^{d}	16,35^{b}
TG4	23,35^{b}	21,34^{a}	19,35^{b}	15,35^{c}
TG5	24,35^{a}	12,01^{d}	14,69^{d}	13,35^{d}
TG6	23,68^{ab}	14,68^{c}	20,69^{a}	18,35^{a}
TG7	20,02^{c}	12,34^{d}	17,69^{c}	16,01^{bc}
TG8	15,68^{d}	11,68^{d}	15,69^{d}	14,01^{d}
Mức ý nghĩa	**	**	**	**
CV (%)	*3,9*	*4,9*	*4,2*	*3,9*

Ghi chú: Trong cùng một cột số có ít nhất một chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê qua kiểm định LSD, (**) khác biệt ở mức ý nghĩa 1. Giá trị trong bảng là trung bình của các lần lặp lại.

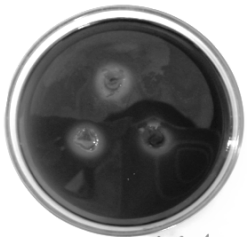
Đối với cơ chất bổ sung Chitin (vỏ tôm) mẫu phân lập TG3, TG5 và TG6 cho kết quả cao nhất lần lượt là 24,35 mm, 24,35 mm và 23,68 mm. Mẫu phân lập TG1 cho kết quả thấp nhất 12,54 mm. Mẫu phân lập TG6 không có sự khác biệt với mẫu phân lập TG4.



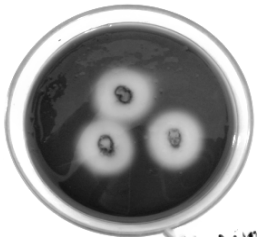
Hình 2. Chủng nấm TG1 trên môi trường bổ sung chitin



Hình 3. Chủng nấm TG5 trên môi trường bổ sung chitin



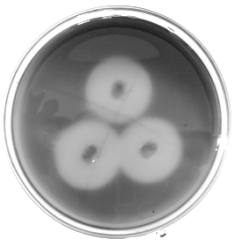
Hình 4. Chủng nấm TG1 trên môi trường bổ sung glucose



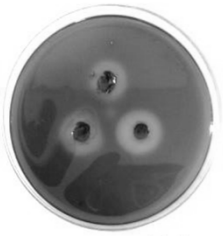
Hình 5. Chủng nấm TG4 trên môi trường bổ sung glucose

Đối với cơ chất bổ sung Glucose mẫu phân lập TG4 cho kết quả cao nhất 21,34 mm kế đến là mẫu phân lập TG3 với kích thước vòng phân giải 17,34 mm. Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy vòng phân giải thấp nhất ở mẫu phân lập TG2, TG1 lần lượt đạt 6,34 mm và 6,6 mm.

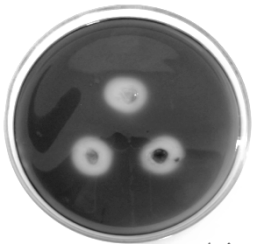
Trên môi trường bổ sung lipid (Tween 80) mẫu phân lập TG6 cho kết quả cao nhất so với các nghiệm thức còn lại đạt vòng phân giải 20,69 mm và mẫu phân lập TG4 cho kết quả vòng phân giải đạt 19,35 mm. Các mẫu phân lập TG1 và TG2 vẫn cho kết quả thấp nhất với đường kính vòng phân giải lần lượt là 11,2 mm và 9,35 mm.



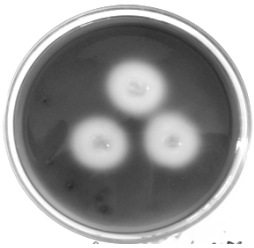
Hình 6. Chủng nấm TG6 trên môi trường bổ sung lipid



Hình 7. Chủng nấm TG1 trên môi trường bổ sung lipid



Hình 8. Chủng nấm TG2 trên môi trường bổ sung cellulose



Hình 9. chủng nấm TG3 trên môi trường bổ sung cellulose

Đối với môi trường bổ sung cellulose vẫn cho kết quả cao ở mẫu phân lập TG6 với đường kính vòng phân giải đạt 18,35 mm tiếp theo là mẫu phân lập TG3 (đạt 16,35 mm). Kết quả thí nghiệm vẫn thấp nhất ở 2 mẫu phân lập TG1, TG2 với đường kính vòng phân giải đạt 8,58 mm và 5,01 mm.

Trêm 4 loại môi trường được bổ sung cơ chất để đánh giá khả năng phân giải cơ chất của một số eyme ngoại bào cho thấy các mẫu phân lập TG3, TG4, TG5, TG6 bước đầu được đánh giá khá tốt.

3.4. Định danh các mẫu phân lập bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Sử dụng chương trình BLAST N và BioEdit để so sánh trình tự các đoạn DNA của 4 mẫu phân lập với trình tự DNA của bộ gen ở các loài nấm có trong Ngân hàng Gen (NCBI).

Bảng 3. So sánh trình tự gene của các mẫu nấm đã phân lập trên NCBI

Mẫu nấm	Loài xác định	Độ tương đồng (%)	Mã Genbank	Tác giả và năm công bố*	Quốc gia
TG3	*Penicillium* sp.	100	MK817609.1	Jiang, 2019	Trung Quốc
TG4	*Penicillium citrinum*	99,81	KJ173539.1	Zhang và Qi, 2014	Trung Quốc
TG5	*Aspergillus ustus*	89,1	KY203997.1	Prameela, Tyagi và Kamil, 2016	Ấn Độ
TG6	*Paecilomyces parvisporus*	99,27	JQ776543.1	Raja, Subhashini và Thangaradjou, 2012	Ấn Độ

Ghi chú: * Nguồn trích dẫn bởi NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast).

IV. KẾT LUẬN

Đề tài đã phân lập được 8 chủng nấm thuộc các loài *Penicillum, Paecilomyces, Aspergillus*. Kết quả thử nghiệm hoạt tính enzyme ngoại bào cho thấy các chủng nấm TG3, TG4, TG5, TG6 có hoạt tính thủy phân cao nhất trên cả 4 loại cơ chất tween, cellulose, glucose và vỏ tôm, với đường kính thủy phân từ 12 - 24 mm. Kết quả định danh sinh học phân tử cho kết quả chủng TG6 - *Paecilomyces parvisporus*, TG3 - *Penicillium* sp., TG4 - *Penicillium citrinum*, TG5 - *Aspergillus ustus, Aspergillus pseudodeflectus.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barnett, H. L. and Hunter, B.B. (1972). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 3rd Edition, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 241 p.
2. FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018). http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC
3. Phạm Văn Nhạ, Hồ Thị Thu Giang, Phạm Thị Vượng, Đồng Thị Thanh, Trần Thị Tuyết, Đặng Thanh Thúy, Phạm Duy Trọng (2011). Giám định một số chủng nấm ký sinh rệp sáp hại cà phê bằng phương pháp DNA. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 9: 713 - 718.
4. Santa - Cecília, L. V. C., Bueno, V. H. P., Prado, E. (2004). *Desenvolvimento de Dysmicoccus brevipes (Cockerell) (Hemiptera: Pseudococcidae) em duas cultivares de abacaxi.* Ciência e Agrotecnologia, v. 28, n. 5, p. 1015 - 1020.
5. Trần Thế Tục và Vũ Mạnh Hải (2000). *Kỹ thuật trồng dứa*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 3 - 47.
6. Viện Quy hoạch và Thiết kế nông nghiệp (2008). Điều tra, khảo sát, nghiên cứu xác định vùng trồng rừng Tân Phước - tỉnh Tiền Giang, Tiền Giang, tháng 8/2008.

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU BỆNH THỐI THÂN, THỐI CỦ SEN Ở THỪA THIÊN HUẾ

Nguyễn Vĩnh Trường[1] và Lê Minh Vương[1]

[1]Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

ABSTRACT

First report of lotus stem and rhizome rot caused by *Fusarium* in Thua Thien Hue

Lotus stem and rhizome rot in Thua Thien Hue has caused serious damage to the crop, however, the cause of this disease has not been determined yet. A survey of lotus diseases in Thua Thien Hue showed that stems, rhizome and leaves rot are the most severe at harvesting stage. This affected plant growth and crop yield and productivity. Fusarium spp. belong to Nectriaceae family were determined the cause of lotus stem and rhizome rot in Thua Thien Hue based on the disease symptoms, morphological characteristics of pathogens and pathogenicity test.

Keywords: *Diagnosis, lotus, stem, rhizome, rot.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam cây sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) có vị trí quan trọng trong đời sống con người, là loại sản phẩm đặc biệt vừa mang giá trị kinh tế, y học lại vừa có giá trị thẩm mỹ và văn hóa, tâm linh (Lê Công Sơn, 2008). Việc nghiên cứu trên cây sen chưa được chú ý nhiều, chủ yếu tập trung vào lĩnh vực thực phẩm và dược liệu dùng làm thuốc, thực phẩm chức năng thông thường, mới chỉ có một số nghiên cứu nhập nội giống và kỹ thuật canh tác trong khi việc nghiên cứu sâu bệnh hại sen ở Việt Nam hầu như chưa được quan tâm.

Ở Thừa Thiên Huế rất thích hợp cho trồng trọt nhiều loài sen như sen hồng, sen trắng và đã tạo thành một sản phẩm mang thương hiệu "sen Huế" (Nguyễn Thị Quỳnh Trang *và cs.*, 2018). Cây sen hồng là cây ưa nắng, chúng phát triển rất nhanh, sau hai đến ba tháng thì tiến hành thu hoạch. Mặc dầu sen hồng là cây dễ trồng và thích hợp với nhiều loại đất. Tuy nhiên, tình hình sâu bệnh có khuynh hướng phát triển mạnh hiện nay như sâu khoang, bọ trĩ, thán thư và đặc biệt là bệnh thối thân. Bệnh nặng có thể làm củ bị thối, cây bị chết rụi hoàn toàn, tuy nhiên nguyên nhân gây bệnh vẫn chưa được xác định (Tường Vi, 2019). Trên cơ sở đó chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu chẩn đoán bệnh thối thân, thối củ hại sen để làm cơ sở phòng trừ bệnh hại hiệu quả.

Người phản biện: TS. Nguyễn Thị Thu Thủy.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Dụng cụ điều tra ngoài đồng gồm: khay, túi nylon, băng dính, dao, kéo, sổ ghi chép, bút viết, máy tính bỏ túi, hộp petri và hóa chất cần thiết. Dụng cụ trong phòng gồm kính lúp 2 mắt soi nổi, kính hiển vi có gắn máy ảnh kỹ thuật số; lam, la men và các hóa chất, kháng sinh cho các môi trường phân lập nuôi cấy.

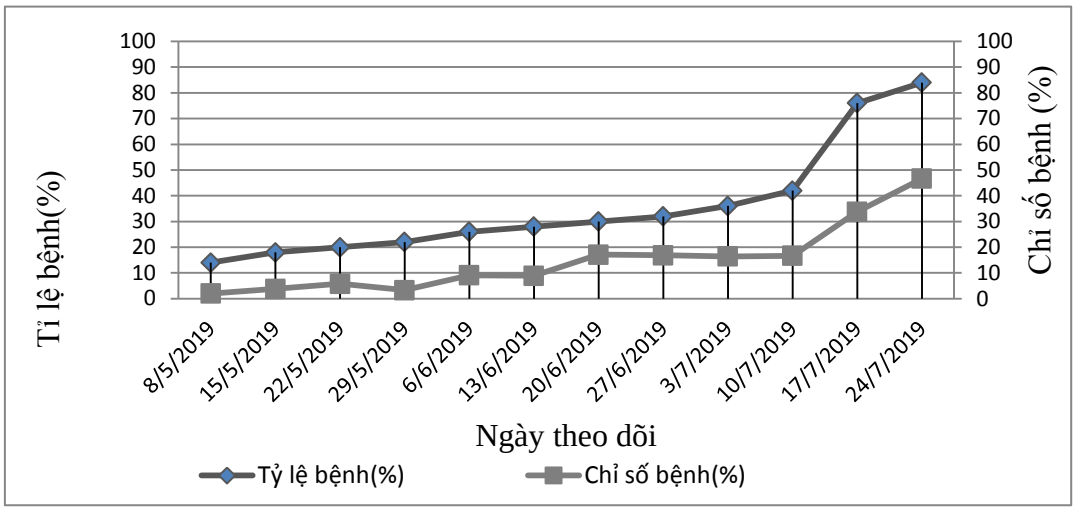
2.2. Phương pháp nghiên cứu

Mẫu bệnh phẩm thu về được rửa sạch bằng nước cất vô trùng và cồn 70%, lau khô mẫu bệnh sau đó cắt một phần mẫu bệnh và phần không bị bệnh. Mẫu bệnh mới cắt sẽ cho vào cồn 70% trong 30 giây sau đó lấy ra cho vào nước cất vô trùng 30 giây, thấm khô mẫu bệnh rồi cấy lên môi trường PSM, PDA, WA. Sau 2 ngày phân lập, cấy truyền lên môi trường PDA, CLA và WA. Việc lây bệnh nhân tạo được tiến hành trên cây sen trồng trong nhà lưới và được theo dõi hằng ngày về kích thước vết bệnh và mức độ nhiễm bệnh.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tình hình bệnh thối thân hại sen ở Thừa Thiên Huế

Kết quả nghiên cứu về bệnh thối thân hại sen tại Phong Điền, Thừa Thiên Huế được trình bày ở Hình 1 cho thấy sự phát triển của bệnh trong giai đoạn đầu ở mức trung bình, đến giai đoạn 90 ngày sau trồng bệnh phát triển nhanh chóng, lan rộng và gây hại nặng. Ở giai đoạn đầu, bệnh khó phát hiện do các triệu chứng chưa rõ ràng, càng về sau thì sự bùng phát gây hại đạt đến đỉnh cao triệu chứng thối xuất hiện trên toàn cây. Mức độ ảnh hưởng của bệnh đến quá trình sinh trưởng của cây sen ở mức trung bình khá từ giai đoạn mới trồng đến giữa thời kỳ thu hoạch (CSB từ 14% tăng lên 32% ở tháng thứ 4 và thứ 5). Giai đoạn thu hoạch bệnh phát sinh mạnh (tỉ lệ bệnh chiếm 84% vào ngày 10 và 24/7/2019) và mức độ bị hại của cây trồng lên đến 46,67% vào ngày 24//7/2019.



Hình 1. Tình hình bệnh thối thân hại sen tại Phong Điền, Thừa Thiên Huế

3.2. Xác định nguyên nhân gây bệnh thối thân, thối củ sen

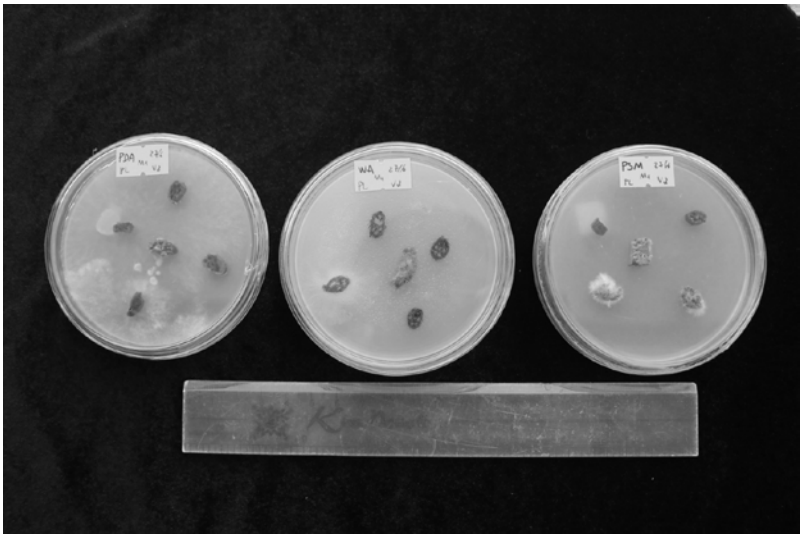
3.2.1. Triệu chứng bệnh hại

Kết quả quan sát triệu chứng bệnh trên đồng ruộng được trình bày ở Hình 2 triệu chứng này giống với mô tả của Zeng *et al.* (2017) về bệnh thối thân, thối củ do *Fusarium* trên cây sen ở Trung Quốc. Mẫu bệnh phẩm được thu và tiến hành phân lập trong phòng thí nghiệm để xác định tác nhân gây bệnh.

Hình 2. Triệu chứng bệnh thối thân và thối củ, rễ cây sen

3.2.2. Kết quả phân lập

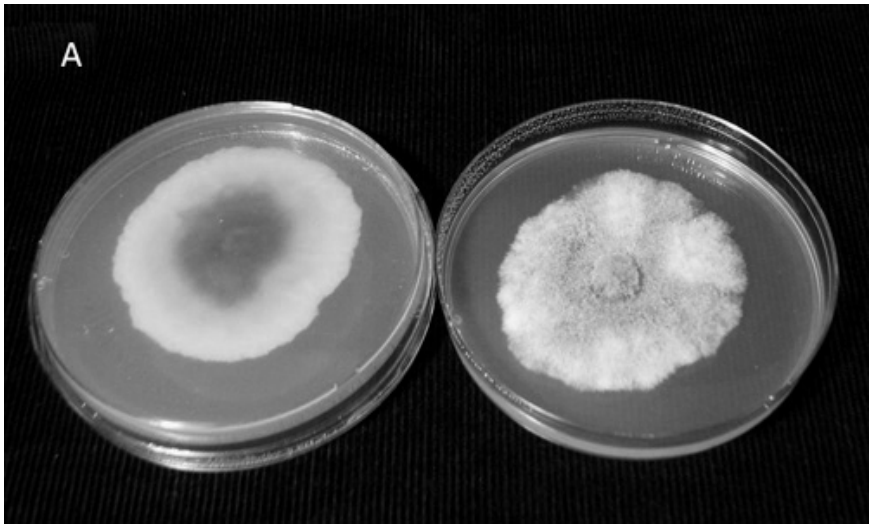
Tiến hành phân lập tổng số 3 mẫu bệnh, ở các bộ phận khác nhau trên cây sen được trồng tại Phong An, Phong Điền, Thừa Thiên Huế, với triệu chứng đặc trưng trên đồng ruộng trên các môi trường PDA, PCA và WA. Sau khi phân lập trên môi trường PSM, chúng tôi cấy truyền sang môi trường PDA, PCA, WA để làm thuần và trên môi trường CA, CLA để quan sát sợi nấm và sự hình thành bào tử.



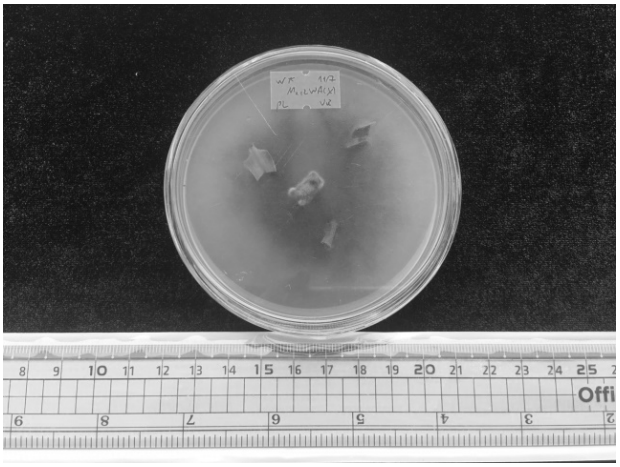
Hình 3. Kết quả phân lập các mẫu bệnh trên môi trường PDA, PSM và WA

3.2.3. Kết quả giám định hình thái tác nhân gây bệnh

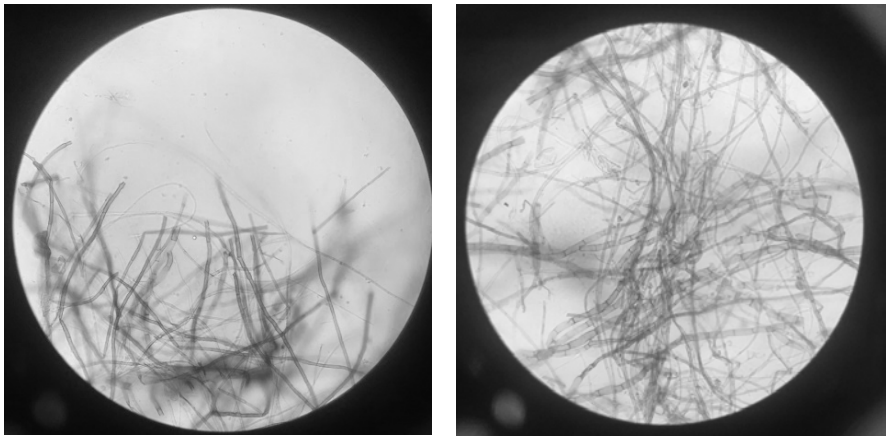
Kết quả cấy truyền qua môi trường PDA cho thấy tản nấm phát triển tốt và có màu hồng kem, phía trong sẫm màu hơn bên ngoài rìa tản nấm (Hình 5). Cấy truyền sang môi trường WA cho thấy tản nấm có màu trắng xám, về sau chuyển sang nâu đen, sợi nấm có vách ngăn, phát triển nhanh trên môi trường. Trên môi trường chọn lọc PSM cho thấy tản nấm có màu trắng đục, sợi nấm có vách ngăn và phát triển nhanh trên môi trường. Sau khi quan sát dưới kính hiển vi, nhìn chung thì nhận thấy kết quả phân lập ở các môi trường thu được là sợi nấm có vạch ngăn và có màu nâu (Hình 6), tuy nhiên, khả năng sinh bào tử chưa được phát hiện. Bước đầu kết luận sợi nấm thuộc nhóm Fusarium theo như mô tả của Zeng *et al.* (2017).



Hình 4. Tản nấm phát triển trên môi trường PDA và CLA



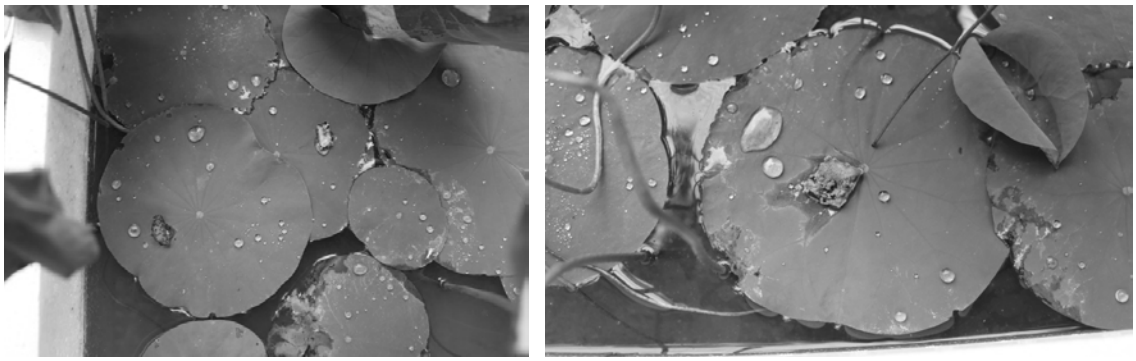
Hình 5. Tản nấm trên môi trường PDA và WA



Hình 6. Sợi nấm quan sát dưới kính hiển vi độ phóng đại 40x

3.2.4. Kết quả lây nhiễm bệnh nhân tạo

Kết quả lây bệnh nhân tạo trên lá cây sen trong điều kiện nhà lưới được trình bày ở Hình 7 cho thấy vết bệnh xuất hiện sau 1 ngày lây nhiễm, triệu chứng vết bệnh gần giống như quan sát trên đồng ruộng. Sau 1 ngày lây nhiễm nhân tạo trên cây sen thì kết quả cho thấy sự xuất hiện vết bệnh màu đen, lan rộng ra xung quanh miếng thạch chứa nấm bệnh. Qua quan sát triệu chứng cho thấy màu sắc của vết bệnh giống với mẫu bệnh thu được ở các ruộng sen tại Phong An, Phong Điền, Thừa Thiên Huế. Tiếp tục theo dõi sự phát triển đường kính của vết bệnh qua 10 ngày thì thu được kết quả như Bảng 1. Kết quả theo dõi chiều dài và chiều rộng vết bệnh lây nhiễm nhân tạo trên cây sen qua 8 ngày cho thấy tốc độ phát triển vết bệnh tương đối nhanh, vết bệnh ở CT3 là lớn nhất và ở CT1 là nhỏ nhất. Tản nấm lây nhiễm được phân lập trên môi trường WA (CT3) mang độc tính mạnh nhất nên đây là nguyên nhân gây bệnh thối thân trên cây sen tại Phong An, Phong Điền, Thừa Thiên Huế.



Hình 7. Kết quả lây nhiễm bệnh nhân tạo với vết thối trên lá sen sau 2 ngày lây nhiễm

Bảng 2. Kết quả theo dõi chiều dài và chiều rộng vết bệnh sau lây nhiễm nhân tạo

NSLN	Công thức	Chiều dài vết bệnh (mm)	Chiều rộng vết bệnh (mm)
1	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
	ĐC	0	0
2	1	$29{,}67^{a} \pm 0{,}74$	$21{,}13^{a} \pm 1{,}49$
	2	$55{,}33^{a} \pm 3{,}81$	$22{,}97^{a} \pm 3{,}11$
	3	$39{,}47^{b} \pm 1{,}37$	$27{,}37^{c} \pm 2{,}60$
	ĐC	0	0
3	1	$36{,}30^{a} \pm 1{,}43$	$24{,}07^{a} \pm 1{,}85$
	2	$60{,}70^{a} \pm 4{,}74$	$25{,}60^{a} \pm 0{,}90$
	3	$43{,}60^{b} \pm 1{,}23$	$30{,}53^{a} \pm 1{,}71$
	ĐC	0	0
4	1	$38{,}20^{a} \pm 0{,}81$	$27{,}43^{a} \pm 0{,}45$
	2	$64{,}07^{b} \pm 2{,}29$	$27{,}73^{a} \pm 0{,}57$
	3	$57{,}77^{b} \pm 4{,}05$	$44{,}77^{b} \pm 3{,}30$
	ĐC	0	0
5	1	$39{,}43^{a} \pm 0{,}67$	$28{,}00^{a} \pm 0{,}70$
	2	$65{,}67^{b} \pm 2{,}26$	$28{,}47^{a} \pm 0{,}41$
	3	$64{,}67^{b} \pm 4{,}20$	$52{,}97^{b} \pm 1{,}10$
	ĐC	0	0
6	1	$42{,}43^{a} \pm 0{,}73$	$29{,}20^{a} \pm 0{,}46$
	2	$69{,}20^{b} \pm 0{,}76$	$29{,}93^{a} \pm 0.32$
	3	$79{,}93^{c} \pm 1{,}10$	$60{,}43^{b} \pm 0{,}64$
	ĐC	0	0
7	1	$44{,}63^{a} \pm 0{,}67$	$30{,}43^{a} \pm 1{,}13$
	2	$71{,}83^{b} \pm 0{,}90$	$31{,}50^{a} \pm 0{,}38$
	3	$82{,}60^{c} \pm 0{,}98$	$62{,}67^{b} \pm 0{,}75$
	ĐC	0	0
8	1	$45{,}60^{a} \pm 0{,}78$	$30{,}97^{a} \pm 1{,}14$
	2	$73{,}70^{b} \pm 0{,}57$	$32{,}47^{a} \pm 0{,}71$
	3	$85{,}87^{c} \pm 1{,}51$	$65{,}03^{b} \pm 1{,}10$
ĐC		0	0

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa ở mức $P \leq 0{,}05$.

CT 1: Lây nhiễm từ tản nấm phân lập trên môi trường PDA; CT 2: Lây nhiễm từ tản nấm phân lập trên môi trường PSM; CT 3: Lây nhiễm từ tản nấm phân lập trên môi trường WA; NSLN: ngày sau lây nhiễm.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Kết quả điều tra tình hình bệnh hại sen ở Thừa Thiên Huế chúng tôi thấy bệnh thối thân gây hại trên thân, củ, lá và gây hại nặng nhất lúc cây thu hoạch, bệnh ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây, do đó đã làm giảm năng suất cây trồng. Nguyên nhân gây bệnh thối thân sen được xác định là do chi *Fusarium* thuộc họ Nectriaceae gây ra trên cơ sở nghiên cứu về triệu chứng bệnh, đặc điểm hình thái tác nhân gây bệnh và kết quả lây nhiễm bệnh nhân tạo.

4.2. Đề nghị

Đề nghị giám định loài nấm bệnh thối thân sen phân lập được ở trên bằng kĩ thuật sinh học phân tử để có những kết luận chính xác hơn về nguyên nhân gây bệnh tại Thừa Thiên Huế phục vụ công tác nghiên cứu các biện pháp phòng trừ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Quỳnh Trang, Hoàng Thị Kim Hồng, Võ Thị Mai Hương, Bùi Ninh, Ngô Quý Ngọc Thảo (2018). Đặc điểm hình thái và khả năng sinh trưởng, phát triển, năng suất của giống sen cao sản trồng tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế - Khoa học Tự nhiên*, 127: 193 - 201.
2. Lê Công Sơn (2008). *Bảo tồn lưu giữ giống sen trắng phục vụ tôn tạo cảnh quản cho hồ Thái Dịch, Khu vực Đại Nội Huế*. Trung tâm Bảo tồn di tích Cố đô Huế.
3. Tường Vi (2019). *Sen bị chết hàng loạt ở Thừa Thiên Huế*. Bnew. https://bnews.vn/sen-bi-chet-hang-loat-o-thua-thien-hue/125556.html
4. Zeng L-s, Zheng Z-b, Shun L, Xia L, Deng Z-p, Hu G-y, Du C-x, Mai J-p, Zhou J-k (2017). Identification of pathogen causing rhizome rot of lotus (Nelumbo nucifera) based on morphology and multi-gene sequence analysis. *Acta Phytopathologica Sinica* 47, 162 - 173.

ĐIỀU TRA THÀNH PHẦN BỆNH HẠI CHÍNH HẠI NGÔ TRÊN ĐỒNG RUỘNG VÀ SAU THU HOẠCH Ở VIỆT NAM

Nguyễn Văn Tuất[1], Nguyễn Văn Liêm[2]

[1]Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam
[2]Viện Bảo vệ thực vật

ABSTRACT

Maize is one of the most food crops in Vietnam and recently this crop has been facing with a number of constraints namely pests and diseases. In order to develop the effective suitable control measures against major diseases the study on the survey of maize diseases has been done as an important part for the corn sustainable production in Vietnam. The research has identified ten major diseases in the field condition and seven ones in the storage that are belonging to fungal, bacterial and viral families. Currently, it has established a primary database of disease characteristics, typical symptoms, time of occurrence, distribution and damage level of major diseases on maize.

Keywords: *Maize, diseases occurrence, field condition, storage.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâu bệnh hại cây trồng nói chung, đặc biệt là sâu bệnh hại trên các cây trồng nông nghiệp có ý nghĩa kinh tế luôn luôn là yếu tố cản trở sự phát triển của sản xuất cây trồng nông nghiệp. Trong những năm gần đây quá trình tổ chức lại sản xuất, đầu tư thâm canh tăng năng suất, chuyển đổi cơ cấu cây trồng, sử dụng nhiều giống cây trồng mới và áp dụng các thành tựu khoa học kỹ thuật đã làm thay đổi rõ rệt thành phần sâu bệnh hại trên nhiều loại cây trồng ở các vùng sinh thái khác nhau ở Việt Nam. Những thay đổi này cùng với những tác động của biến đổi khí hậu đã dẫn đến sự bùng phát thành dịch trên diện rộng của một số sâu bệnh hại như bệnh vi-rút lúa vàng lùn, lùn xoăn lá, bệnh virus lúa lùn sọc đen phương nam, bệnh thối đen quả ca cao, rầy nâu, rầy lưng trắng, nhện gié hại lúa, bệnh chết nhanh và bệnh chết chậm trên hồ tiêu, bệnh đốm trắng thanh long,... đã gây thiệt hại nghiêm trọng cho sản xuất nông nghiệp nước ta. Những hiểu biết cơ bản về thành phần sâu bệnh hại cũng như nguyên nhân gây bệnh, triệu chứng và mức độ gây hại của sâu bệnh là cơ sở khoa học để xây dựng và thực hiện các giải pháp phòng chống sâu bệnh hại cây trồng một cách hiệu quả và an toàn.

Cho đến nay đã có một số lần điều tra cơ bản về côn trùng và bệnh hại cây trồng

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Viết.

được tiến hành trên quy mô rộng tại Việt Nam (1961, 1967 - 1968, 1977 - 1979, 1997 - 1998 và 2006 - 2010). Những kết quả điều tra trong thời gian trước đây đã tiếp tục cập nhật thông tin về sinh vật hại cây trồng nông nghiệp ở nước ta. Bên cạnh đó, nhiều công trình nghiên cứu chuyên biệt về thành phần sâu bệnh, thiên địch và cỏ dại hại cây trồng cũng đã được thực hiện. Các cuộc điều tra cơ bản nêu trên và các nghiên cứu về thành sinh vật hại và thiên địch trên cây trồng đã xây dựng được danh lục thành phần sâu bệnh hại và thiên địch của chúng trên các cây trồng điều tra. Tuy nhiên, việc điều tra cơ bản đồng thời cả thành phần sâu bệnh hại và thiên địch của chúng mới chỉ được tiến hành trên một số loại cây trồng. Một số cây trồng mới được nhập nội/cây trồng mới chưa rõ thành phần sinh vật hại. Có loài sinh vật hại đã xuất hiện như là những dịch hại mới (ốc bươu vàng, bệnh nén hương lúa, tuyến trùng sầu riêng, bệnh chảy gôm sầu riêng, bệnh đốm trắng thanh long, bệnh chổi rồng hại mía, bệnh chổi rồng hại sắn, bệnh chổi rồng hại nhãn, bệnh trắng lá mía, sâu đục thân mía bốn vạch đầu nâu mới,...). Những vấn đề này đang là đòi hỏi bức xúc của sản xuất nông nghiệp cần phải có những nghiên cứu cập nhật để đề xuất các biện pháp quản lý.

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nội dung

Điều tra thu thập giám định thành phần sinh vật hại cây ngô trên đồng ruộng và sau thu hoạch. Xây dựng, bảo quản bộ mẫu vật các bệnh hại trên cây ngô và soan thảo sổ tay hướng dẫn nhận dạng và phương pháp phòng chống bênh trên ngô.

2.2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

- *Vật liệu*: Các vật liệu sử dụng trong điều tra cơ bản, làm mẫu và giám định dịch hại của chúng.

- *Phương pháp điều tra:* Điều tra thành phần các loài bệnh hại trên các cây trồng và sản phẩm sau thu hoạch được tiến hành theo phương pháp của Viện Bảo vệ thực vật (1997) và Quy chuẩn Kỹ thuật Quốc gia về Phương pháp điều tra, phát hiện dịch hại cây trồng QCVN 01-38 của Bộ Nông nghiệp và PTNT năm 2010 (Bộ Nông nghiệp và PTNT, 2010).

Phương pháp điều tra, thu thập bệnh hại trên các cây trồng và sản phẩm sau thu hoạch: Chọn ruộng điều tra: Đại diện cho vùng sản xuất và các yếu tố giống, thời vụ và mức độ thâm canh. Cách điều tra: Mỗi ruộng điều tra 5 điểm (5 cây)/điểm) theo hai đường chéo góc. Đánh giá tác hại: (Tổng số cây, lá, quả bị hại/tổng số cây điều tra) × 100. Đánh giá mức độ phổ biến của bệnh theo thang 4 cấp:

-: Rất thấp với độ bắt gặp < 5% cây (bộ phận) bị bệnh;

+: Thấp với độ bắt gặp > 5 - 10% cây (bộ phận) bị bệnh;

++: Trung bình với độ bắt gặp 11 - 25% cây (bộ phận) bị bệnh;

+++: Nhiều với độ bắt gặp 26-50% cây (bộ phận) bị bệnh;

++++: Rất nhiều với độ bắt gặp > 50% cây (bộ phận) bị bệnh.

Cách thu mẫu: Thu thập tất cả các loại triệu chứng bị hại trên đồng ruộng, bảo quản trong túi giấy hoặc túi nylon, sau đó phân lập trong phòng thí nghiệm để xác định tác nhân gây bệnh.

- *Xử lý số liệu*: Số liệu được xử lý với phần mềm Microsoft office Excel và phân tích bằng phần mềm MSTATC qua phép thử Duncan.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Trong giai đoạn từ năm 2012 - 2017, việc điều tra thành phần sâu hại, bệnh hại và thiên địch sâu hại ngô trên cây ngô trước thu hoạch và ngô hạt bảo quản sau thu hoạch đã được thực hiện ở các vùng sinh thái trung du miền núi Bắc Bộ (Lai Châu, Điện Biên, Sơn La, Hòa Bình, Bắc Kạn, Phú Thọ, Thái Nguyên, Lạng Sơn, Quảng Ninh), Đồng bằng sông Hồng (Vĩnh Phúc, Hà Nội, Hưng Yên, Hải Dương, Hải Phòng, Thái Bình, Nam Định), Duyên hải Bắc Trung Bộ (Thanh Hóa, Nghệ An, Hà Tĩnh, Thừa Thiên Huế), Duyên hải Nam Trung Bộ (Đà Nẵng, Quảng Nam, Quảng Ngãi, Bình Định, Phú Yên, Khánh Hòa), Tây Nguyên (Đắk Lắk, Đắk Nông, Lâm Đồng), Đông Nam Bộ (Đồng Nai, Tp. Hồ Chí Minh, Bà Rịa - Vũng Tàu) và Đồng bằng sông Cửu Long (Tiền Giang).

Kết quả điều tra thành phần bệnh hại chính trên ngô xác định được 17 loại bệnh hại thuộc 9 họ của 7 bộ nấm gây bệnh thực vật, 2 họ thuộc 2 bộ vi khuẩn hại thực vật và 1 họ thuộc bộ vi-rút Unassigned. Trong đó bộ nấm Hyphales có số lượng loài gây hại là nhiều nhất (7 loài), các bộ còn lại chỉ có từ 1 - 2 loài đại diện (Bảng 1).

Bảng 1. Thành phần bệnh hại trên ngô trước và sau thu hoạch đã thu thập được (điều tra năm 2012 - 2017)

TT	Tên bộ	Tổng số loài thu được	Số loài đã giám định được	Số loài chưa giám định được
1	Agonomycetales	1	1	0
2	Hyphales	7	7	0
3	Pleosporales	2	2	0
4	Pucciniales	1	1	0
5	Sclerosporales	1	1	0
6	Ustilaginales	1	1	0
7	Mucorales	1	1	0
8	Enterobacteriales	1	1	0
9	Pseudomonadales	1	1	0
10	Unassigned	1	1	0
	Tổng số	**17**	**17**	**0**

Danh lục của 17 loại bệnh hại trên ngô trước và sau thu hoạch được trình bày trong Bảng 2, trong đó có 10 loại bệnh gây hại trên cây ngô và 7 loại bệnh hại trên hạt ngô trong khu vực bảo quản. Trên cây ngô trước thu hoạch, các loại bệnh khô vằn *Rhizoctonia solani* Kühn, đốm lá nhỏ *Bipolaris maydis* Pas, đốm lá lớn *Exerohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs và gỉ sắt *Puccinia sorghi* Schwein là các bệnh hại phổ biến và chủ yếu ở hầu khắp các vùng trồng ngô được điều tra với mức độ phổ biến của bệnh từ trung bình (++) đến rất nhiều (++++). Trên ngô hạt bảo quản sau thu hoạch, các bệnh mốc hồng *Fusarium moniliforme* Sheld, mốc đen *Aspergillus niger* Van Tieghem có mức độ gây hại từ trung bình (++) đến phổ biến (+++). Kết quả điều tra năm 1967 - 1968 và năm 1977 - 1978 của Viện Bảo vệ thực vật đã ghi nhận có 32 loại bệnh gây hại trên ngô ở các tỉnh miền Bắc (trong đó có 26 bệnh nấm) và 20 loại bệnh gây hại ngô ở các tỉnh miền Nam (trong đó có 11 bệnh nấm). Theo điều tra gần đây, những bệnh hại chủ yếu trên ngô ở nước ta gồm bệnh khô vằn (*Rhizoctonia solani*), bệnh đốm lá lớn (*Exerohilum turcicum*), đốm lá nhỏ (*Bipolaris maydis*) và gỉ sắt (*Puccinia sorghi*) (Danh mục sâu, bệnh hại cây trồng ở Việt Nam, 2010). Như vậy, kết quả điều tra năm 2012 - 2017 một lần nữa đã khẳng định nhận xét nêu trên.

Bảng 2. Danh lục thành phần loài bệnh hại chính trên ngô trước và sau thu hoạch (điều tra năm 2012 - 2017)

TT	Tên tiếng Việt	Tên khoa học	Bộ phận bị hại	Mức độ phổ biến
Trước thu hoạch				
Bộ Agonomycetales				
Họ Agonomycetaceae				
1	Khô vằn	*Rhizoctonia solani* Kühn	Lá, bẹ lá, bắp	++ đến +++
Bộ Hyphales				
Họ Tuberculariaceae				
2	Mốc hồng	*Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg	Lá, thân, hạt	++
Bộ Pleosporales				
Họ Pleosporaceae				
3	Đốm lá nhỏ	*Bipolaris maydis* Pas	Lá	++
4	Đốm lá lớn	*Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs	Lá	++
Bộ Pucciniales				
Họ Pucciniaceae				
5	Gỉ sắt	*Puccinia sorghi* Schwein	Lá, bẹ lá, bắp	++ đến +++

TT	Tên tiếng Việt	Tên khoa học	Bộ phận bị hại	Mức độ phổ biến
Bộ Sclerosporales				
Họ Sclerosporaceae				
6	Bạch tạng	*Sclerospora maydis* Bult & Bisby	Lá	+
Bộ Ustilaginales				
Họ Ustilaginaceae				
7	Ung thư	*Ustilago maydis* (D.C.) Codra	Bắp	+
Bộ Enterobacteriales				
Họ Enterobacteriaceae				
8	Thối thân vi khuẩn	*Erwinia carotovora* (Jones) Bergey	Thân, lá	+
9	Cháy lá	*Pseudomonas avenae* Manns	Thân, lá	+
Virus				
Họ Reoviridae				
10	Lùn sọc đen phương nam	Southern rice black - streaked dwarf virus (SRBSDV)	Toàn cây	+
Sau thu hoạch				
Bộ Hyphales				
Họ Dematiaceae				
11	Mốc	*Curvularia* sp.	Hạt	+
Họ Moniliaceae				
12	Mốc vàng	*Aspergillus flavus* Link	Hạt	+
13*	Mốc đen	*Aspergillus niger* Van Tieghem	Hạt	+++
14	Mốc xanh	*Penicillium* sp.	Hạt	+
15	Mốc (Khô sọc lá)	*Cladosporium* sp.	Hạt	+
Họ Tuberculariaceae				
16*	Mốc hồng	*Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg	Hạt	++
Bộ Mucorales				
Họ Mucoraceae				
17	Mốc	*Rhizopus* sp.	Hạt	+

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Số lượng các bệnh hại chính trên cây ngô có 10 loại bệnh gây hại trên cây ngô và 7 loại bệnh hại trên hạt ngô trong khu vực bảo quản thuộc 9 họ của 7 bộ nấm gây bệnh thực vật, 2 họ thuộc 2 bộ vi khuẩn hại thực vật và 1 họ thuộc bộ vi-rút.

Bộ mẫu vật của các loài bệnh hại trên ngô được xây dựng và bảo quản tại Viện Bảo vệ thực vật trong đợt điều tra 2012 - 2017. Đã xây dựng được cơ sở dữ liệu về đặc điểm gây hại, triệu chứng gây hại, các đặc điểm nhận dạng, thời gian phát sinh, phân bố và mức độ gây hại của các loài bệnh hại chính trên cây ngô.

4.2. Đề nghị

Sử dụng kết quả điều tra bệnh chính hại ngô trong sản xuất và sau thu hoạch làm tài liệu tham khảo cho công tác nghiên cứu, chỉ đạo phòng chống sinh vật hại trong sản xuất ngô ở Việt Nam.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Tổng cục Phát triển nông thôn (RDA), Hàn Quốc và Trung tâm KOPIA tại Việt Nam đã tài trợ cho nhiệm vụ này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2010). Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về phương pháp điều tra phát hiện dịch hại cây trồng. QCVN-01-38:2010/BNNPTNT.
2. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2010). Danh lục sinh vật hại trên một số cây trồng và sản phẩm cây trồng sau thu hoạch ở Việt Nam (Điều tra 2006 - 2010). Nxb. Nông nghiệp. 1187 trang.
3. Hà Minh Trung, Lê Văn Thuyết và Đặng Vũ Thị Thanh (1999). Kết quả điều tra bệnh cây ở các tỉnh phía Nam 1977 - 1979. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
4. Viện Bảo vệ thực vật (1975). Kết quả điều tra bệnh cây 1967 - 1968. Nxb. Nông thôn.
5. Viện Bảo vệ thực vật (1977). Phương pháp nghiên cứu bảo vệ thực vật. Tập I: Phương pháp điều tra cơ bản dịch hại nông nghiệp và thiên địch của chúng. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.

PHÂN LẬP NẤM GÂY BỆNH THỐI CỔ RỄ TRÊN CÂY LAN THỦY TIÊN THÂN VUÔNG (*Dendrobium farmeri*) VÀ THỬ NGHIỆM TÁC DỤNG DIỆT NẤM CỦA MỘT SỐ CHẾ PHẨM

Nguyễn Thị Hải Yến, Nguyễn Thị Thu Huyền

Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên

ABSTRACT

Isolation of the fungi causing root rot diseases on species *Dendrobium farmeri* and testing the fungicidal effects of some products

The diseased specimen of species Dendrobium farmeri were collected from Thai Nguyen province, we have isolated and described some characteristics of root rot fungi. The results of isolation and identification by morphological characteristics of fungi colonies and spores found that they belong to genus Fusarium. The results of re-infection show that the fungi strain isolated the cause of root rot disease in the Thuy Tien orchid. Result of testing of fungicidal products showed that Ridomil gold plant protection has strongest fungicidal activity. However, in order to reduce harmful effects of chemical drugs to human health and environment, it is recommended to use silver nanoparticles solution and bordaux solution to prevent root rot disease.

Keywords: *Dendrobium farmeri, Thuy Tien, Root rot, Fusarium, Thai Nguyen.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Họ lan hay phong lan (Orchidaceae) là một trong những họ thực vật lớn nhất với khoảng trên 35.000 loài phân bố rộng rãi trên toàn thế giới (Dressler, 1993). Trong họ lan thì *Dendrobium* là một trong những chi lớn nhất với hơn 1100 loài trên toàn thế giới (Cameron *et al.*, 1999). Hoa của *Dendrobium* rất đa dạng về kiểu dáng và màu sắc nên đặc biệt được yêu thích. Ngoài tác dụng làm cảnh, rất nhiều loài *Dendrobium* được biết đến là những thảo dược. Đông Nam Á có thể được coi là quê hương của *Dendrobium* với hàng trăm loài, trong đó Việt Nam là một nước có độ đa dạng về *Dendrobium* cao với khoảng hơn 100 loài (Tran Hop, 1998), chúng được phân bố rộng rãi trên khắp các vùng miền của đất nước.

Trong những năm gần đây, hoa lan đã trở thành sản phẩm nông nghiệp có giá trị kinh tế cao, nó thúc đẩy ngành sản xuất kinh doanh phát triển mạnh mẽ. Thái Lan là một quốc gia đứng đầu về thuần hóa, lai tạo và xuất khẩu hoa lan với khoảng

Người phản biện: TS. Trịnh Đình Khá.

150 loài trong số 1230 loài đã được thuần hóa và nuôi trồng rộng rãi. Ở Việt Nam, ngành nghề trồng lan còn hết sức khiêm tốn, chỉ chiếm 10% diện tích các loại hoa cảnh đang được trồng. Ngành sản xuất và phát triển hoa lan ở Việt Nam chưa tạo ra được sản lượng cao, có khi còn thất thoát. Nguyên nhân chủ yếu là do ảnh hưởng của dịch bệnh. Bệnh hại trên phong lan có nhiều nguyên nhân trong đó bệnh do nấm thường gây thiệt hại nặng nề nhất. Nấm bệnh ảnh hưởng đến tất cả các bộ phận trên cây lan từ thân lá rễ đến hoa... làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng thành phẩm. Tiêu biểu như *Botrytis* và *Colletotrichum* gây thối rụi hoa *Dendrobium, Alternaria* và *Bipolaris* gây bệnh đốm lá và hoa (, *Pythium, Phytophthora* gây bệnh thối đen, *Fusarium, Zhizoctonia* gây thối, héo thân và rễ (Latiffah, 2009; Zhang *et al.*, 2017). Để phòng trừ nấm gây hại trên phong lan nói chung, hiện nay người trồng lan chủ yếu dùng các loại thuốc bảo vệ thực vật. Tuy nhiên đặc điểm nuôi trồng lan làm cảnh thường treo trên giàn cao ở sân, vườn nên khi sử dụng thuốc bảo vệ thực vật sẽ ảnh hưởng rất lớn đến sức khỏe con người và môi trường xung quanh, vì vậy việc nghiên cứu điều chế và thử nghiệm các chế phẩm tự nhiên diệt nấm không gây hại được đặc biệt quan tâm. Trên cơ sở đó chúng tôi tiến hành nghiên cứu "Phân lập nấm gây bệnh thối cổ rễ trên cây lan Thủy tiên thân vuông (*Dendrobium farmeri*) và nghiên cứu thử nghiệm khả năng diệt nấm của một số chế phẩm".

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu thân và rễ lan thủy tiên vuông (*Dendrobium amabile*) biểu hiện bị bệnh thối cổ rễ với các đặc điểm như gốc thân bị ủng vàng, có mùi ủng, rễ đen, xốp và mềm, tóp thân và héo lá.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu mẫu

Mẫu thu tại vườn lan tại phường Thịnh Đán, TP. Thái Nguyên. Lấy mẫu vào tháng 6, 7 là khoảng thời gian cây bị bệnh nhiều nhất. Chọn cây lan có những biểu hiện bệnh thối cổ rễ với các đặc điểm thối rễ, gốc thân vàng ủng và có mùi. Mẫu lấy về bảo quản trong điều kiện khô ráo ở nhiệt độ 14 - 20^{o}C và phân lập càng sớm càng tốt.

2.2.2. Phân lập nấm

Sử dụng phương pháp pha loãng (Nguyễn Lân Dũng, 1983): Thu phần bị bệnh, rửa dưới vòi nước đang chảy loại sạch bụi bẩn; khử trùng bề mặt bằng cồn 75% trong 30 giây, ngâm trong dung dịch clorua thủy ngân 0,1% trong 1 phút, tráng bằng nước vô trùng ba lần và để khô trên giấy thấm đã được khử trùng. Dùng dụng cụ đã khử trùng cắt mẫu lan theo từng miếng dài 1 - 2 mm sau đó cấy lên môi trường WA (agar 20 g trong 100 ml nước cất) có chứa kháng sinh; Đặt đĩa cấy vào tủ ấm 3 - 5 ngày cho đến khi các tản nấm phát triển; Tiến hành cấy chuyển khi sợi nấm mọc được khoảng 5 mm từ mẫu cấy.

2.2.3. Quan sát hình thái nấm

Nhận diện các dòng nấm thông qua đặc điểm hình thái (Nguyễn Lân Dũng *và cs.*, 2000; Maren, 2002; Nelson *et al.*, 1983).

2.2.3.1. Quan sát đặc điểm hình thái khuẩn lạc

Sử dụng môi trường PDA, nuôi 3 - 5 ngày ở 28^{o}C trong điều kiện chiếu sáng. Quan sát màu sắc tản nấm ở mặt trên và mặt dưới các mẫu nấm được quan sát bằng mắt thường và kính hiển vi. Các chỉ tiêu quan sát gồm: Hình dạng, kích thước, dạng mặt, dạng mép khuẩn lạc, màu sắc hệ sợi, màu sắc mặt dưới, giọt tiết, sắc tố khuếch tán ra môi trường.

2.2.3.2. Quan sát tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm

Sử dụng môi trường PDA Cắt miếng thạch (2 - 2 mm) chứa sợi nấm và áp lên đĩa môi trường PDA nuôi ở 28^{o}C. Đo tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm sau 24h, 48h, 72h, 96h.

2.2.3.3. Quan sát các đặc điểm vi học cần thiết

Sử dụng môi trường Czapeak nuôi 3 - 5 ngày ở 28^{o}C. Làm tiêu bản để quan sát bào tử dưới kính hiển với độ phóng đại 400 lần (Bào tử: hình dạng, kích thước, màu sắc, bề mặt....); Sợi nấm: có hay không có vách ngăn, màu sắc, bề mặt có hoặc không có bó sợi...). Dựa trên kết quả thu nhận được tra khoá phân loại, xác định tên chi tương ứng.

2.2.4. Phương pháp lây bệnh nhân tạo

Nuôi mẫu nấm thu được trong môi trường lỏng ½ PDA cho đến khi sinh bào tử. Sau đó tiến hành ly tâm thu bào tử, hòa vào nước cất khử trùng và tiến hành phun tưới trực tiếp vào cây lan đã được chuẩn bị. Triệu trứng biểu hiện bệnh được theo dõi sau các khoảng thời gian khác nhau.

2.2.5. Thử khả năng diệt nấm của một số chế phẩm

Tiến hành pha loãng mẫu, sử dụng pipet hút lấy 0,1 ml mẫu nấm pha loãng và cấy trang lên môi trường PDA (mỗi đĩa cấy chứa 25 ml PDA). Tiến hành đục 1 lỗ đường kính 1 cm và nhỏ 1 ml chế phẩm mỗi loại vào lỗ thạch; ủ 4^{o}C trong 2 - 4h để các chế phẩm khuếch tán ra môi trường, sau đó tiến hành nuôi 30h - 35h ở 28^{o}C và quan sát hoạt tính diệt nấm của các chế phẩm.

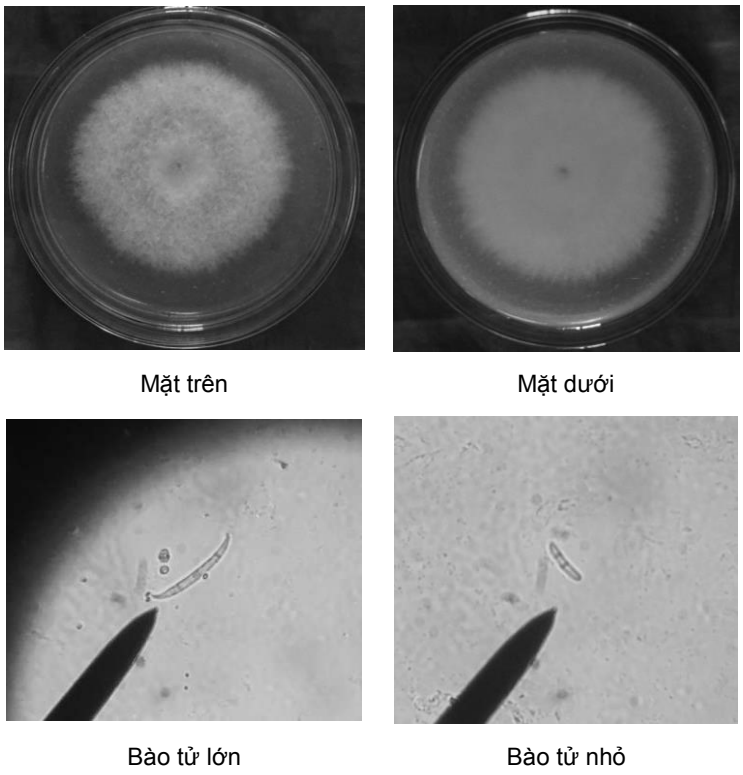
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và phân tích đặc điểm hình thái chủng nấm phân lập được

Từ mẫu lan có triệu chứng bị bệnh do nấm, sử dụng môi trường WA có bổ sung kháng sinh Hagimox 250 mg để ức chế vi khuẩn và hạn chế sự sinh trưởng của nấm nhằm tạo khuẩn lạc nhỏ. Sau 2 - 3 ngày đặt mẫu bệnh trên môi trường WA thấy từ mẫu bệnh xuất hiện các sợi nấm mọc lên và lan ra môi trường. Dùng que cấy chuyển một ít sợi nấm trên mẫu bệnh sang môi trường PDA, sau 2 - 3 ngày thấy tản nấm mọc lan kín môi trường. Tiếp tục cấy chuyển nhiều lần, sau 7 - 9 ngày thu được khuẩn lạc nấm có màu trắng ngà, mọc tỏa ra theo cấu trúc hình tròn, bề mặt khuẩn lạc xốp (Hình 1).

Sợi nấm trưởng thành có thành dày màu trắng ngà, khả năng hình thành khuẩn ty khí sinh nhiều, màu hệ sợi nấm trắng. Màu sắc mặt dưới của khuẩn lạc có màu trắng đục hơi ngả vàng nâu, đây là sắc tố chính, tập trung ở xung quanh, ở giữa khuẩn lạc có màu nâu nhạt và khó quan sát được hình thái của các sợi nấm.

Kết quả quan sát dưới kình hiển vi ở độ phóng đại 400 lần, chủng nấm phân lập được có đặc điểm sau: Bào tử nhỏ có 2 - 3 vách ngăn, với 1 đầu nhọn, hình quả thận, hình chùy hay hình liềm. Đây là dạng bào tử có nhiều nhất và được sản sinh trong tất cả các điều kiện thường, được sinh ra trong các mạch dẫn của cây bị bệnh. Bào tử lớn có 4 - 5 vách ngăn, các bào tử lớn đều có dạng hình lưỡi liềm, phần đầu hơi tù, hình chóp; phần cuối có dạng hình nón. Đây là các bào tử có hình dáng lớn nhất. Các bào tử này có thể lưu trong môi trường đến 30 năm và nó chính là nguồn lan truyền bệnh cho các năm sau và các cây chủ khác (Nelson *et al.*, 1983).



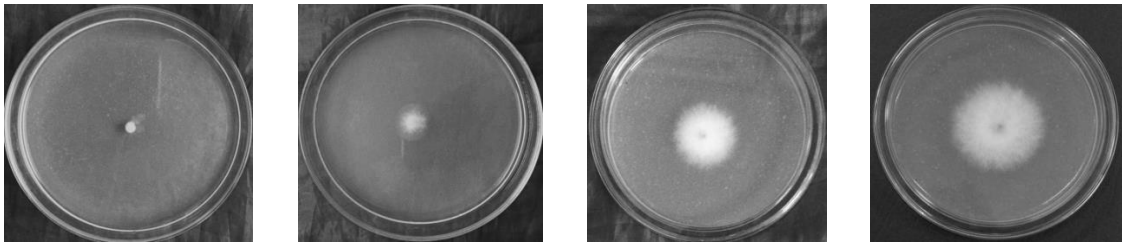
Hình 1. Hình ảnh khuẩn lạc và bào tử của chủng nấm phân lập được

Tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm có liên quan mật thiết đến khả năng gây bệnh nhanh hay chậm của loài nấm đó. Tiến hành theo dõi tốc độ sinh trưởng của các chủng nấm sau 24, 48, 72 và 96 giờ cho thấy, sau 24 giờ, các sợi nấm trắng bắt đầu phát triển và bao phủ lên miếng thạch đã cấy. Sau 48 giờ, các sợi nấm đã hình thành rõ hơn và lan ra môi trường nuôi cấy, đường kính khoảng 0,8 đến 0,9 cm, dễ dàng quan sát bằng mắt thường. Sau 72 giờ, hệ sợi nấm đã hình

thành rõ, khuẩn lạc có màu trắng ngà phân tán đều, sợi nấm tơi xốp. Tới thời điểm này, tản nấm trung bình có đường kính từ 1,9 - 2,2 cm. Sau 96 giờ, tản nấm phát triển nhanh với đường kính trung bình 3,8 - 4,1 cm. Như vậy, có thể kết luận rằng nấm phân lập được có tốc độ sinh trưởng nhanh, nhất là khoảng thời gian từ 72 - 96 giờ (hình 2), điều này cũng chứng tỏ khả năng gây bệnh của nấm tương đối nhanh, nếu kết hợp với điều kiện môi trường thuận lợi nấm sẽ hình thành bào tử và dễ gây ra dịch bệnh.

Bảng 1. Tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm nuôi cấy

	Thời gian nuôi cấy			
	24 h	**48h**	**72h**	**96h**
Đường kính (cm)	Bắt đầu xuất hiện	0,8 ± 0,1	1,9±0,2	3,8±0,2



24 giờ 48 giờ 72 giờ 96 giờ

Hình 2. Hình ảnh hệ sợi nấm sinh trưởng trong các khoảng thời gian khác nhau

Căn cứ vào kết quả khảo sát các đặc điểm của khuẩn lạc, bào tử, so sánh với các tài liệu phân loại định danh nấm bệnh thực vật (Nguyễn Lân Dũng *và cs.*, 2000; Maren A Klich, 2002; Nelson *et al.*, 1983), chúng tôi nhận thấy chủng nấm phân lập được mang các đặc điểm đặc trưng của chi nấm *Fusarium*. Đây là chi nấm gây bệnh hại phổ biến trên thực vật nói chung. Để phân loại đến cấp độ loài cần có những quan sát, phân tích sâu hơn về đặc điểm sinh lý, sinh hóa, đặc điểm vi học và đặc biệt là phân loại dựa trên trình tự gen (Sarsaiya *et al.*, 2019).

Lây nhiễm trở lại chủng nấm phân lập được lên cây chủ

Mẫu lan thủy tiên dùng để tiến hành lây bệnh nhân tạo được trồng thuần trong vườn lan, quan sát bề ngoài nhận thấy chậu lan sạch bệnh và đang phát triển tốt. Tiến hành lây nhiễm theo các bước trình bày ở mục 2, kết quả quan sát sau 4 tuần lây nhiễm lại chủng nấm phân lập được nhận thấy, cây lan bắt đầu có biểu hiện nhiễm nấm sau 3 tuần lây nhiễm, sau 4 tuần lây nhiễm thấy có biểu hiện của bệnh thối cổ rễ với các đặc điểm như gốc thân chỗ tiếp giáp rễ vàng ủng, các rễ có màu

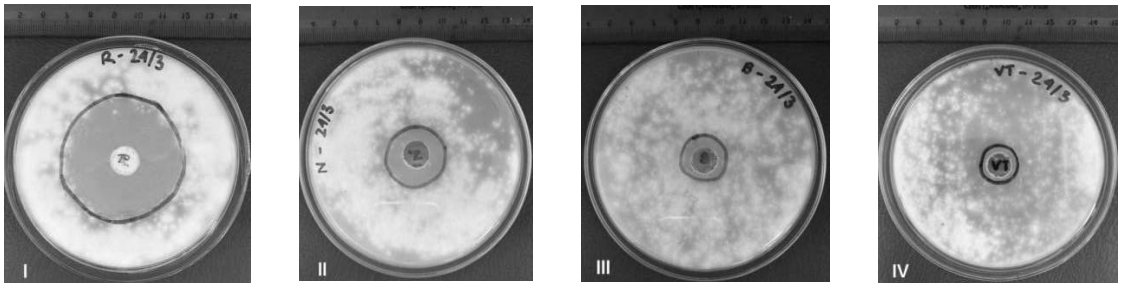
nâu trong đen, đầu rễ không còn xanh, lấy tay bóp thấy mềm và nhũn, quan sát kỹ thấy xung quanh lớp thân có các sợi nấm màu trắng. Như vậy, có thể nhận định chủng nấm phân lập được chính là nguyên nhân gây bệnh thối rễ trên lan thủy tiên.

3.2. Kiểm tra hoạt tính kháng nấm của một số chế phẩm nghiên cứu lên chủng nấm phân lập được

Hoạt tính kháng nấm được thử nghiệm với các dung dịch gồm: (1) Đối chứng Ridolmil (0,05 g/8 ml nước cất vô trùng); (2) Dung dịch đỏ Boóc-đô (0,05 g (đồng sulfat)/4 ml nước cất + 0,05 g (vôi sống)/1 ml nước cất vô trùng); (3) chế phẩm nano bạc (1 ml nano bạc/50 ml nước cất vô trùng) và (4) nước vôi trong (0,085 g vôi tôi/50 ml nước cất vô trùng để lắng). Các mẫu dung dịch được sử dụng để đánh giá khả năng diệt nấm gây bệnh bằng phương pháp khuyếch tán trên thạch. Kết quả được lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình. Số liệu được thống kê và xử lý trên Excel.

Bảng 2. Hoạt tính kháng nấm của một số chế phẩm thử nghiệm

	Ridolmil	Nano bạc	Boóc-đô	Nước vôi trong
Đường kính TB vòng kháng nấm và sai số (cm)	4,53 ± 0,252	2,3 ± 0,2	2,04 ± 0,15	1,3 ± 0,26



Hình 3. Kết quả thử hoạt tính kháng kháng nấm của đối chứng Ridolmil và các chế phẩm thí nghiệm
(I - Đối chứng thuốc diệt nấm hóa học Ridolmil, II - Chế phẩm nano bạc, III - Chế phẩm Boóc-đô, IV - Nước vôi trong)

Kết quả Bảng 1 cho thấy cả 4 loại dung dịch trên đều có khả năng ức chế và diệt nấm chủng gây bệnh phân lập được, đường kính vòng kháng nấm bình quân dao động từ 1,30 cm (với nước vôi trong) đến 4,53 cm (với đối chứng Ridolmil Gold 68WG). Với 3 lựa chọn phổ thông (Ridolmil Gold 68WG, nano bạc, đỏ Boóc-đô) thì đối chứng Ridolmil cho kết quả tốt nhất, vòng kháng nấm lớn nhất, 2 loại chế phẩm còn lại cũng cho kết quả khá tốt (đường kính vòng kháng nấm ≥ 2 cm) trong đó nano bạc có khả năng diệt tốt hơn đỏ Boóc-đô 1%. Nước vôi trong cũng có khả năng ức chế sinh nấm nhưng hoạt tính kém, vòng kháng nấm chỉ đạt 1,3 cm.

Trên thực tế, nước vôi trong thường được các nhà vườn phun phòng để tăng hàm lượng canxi và làm sạch môi trường nuôi trồng lan.

Kết quả thử nghiệm cho thấy, để diệt nấm khi cây đã bị bệnh thì sử dụng thuốc diệt nấm Ridolmil Gold 68WG vẫn là lựa chọn tốt nhất. Tuy nhiên, để giảm thiểu tác động do các chất hóa học đến sức khỏe con người và môi trường thì có thể phun phòng với các chất có nguồn gốc tự nhiên, an toàn với con người hơn, đỏ Boóc-đô và nano bạc có thể là lựa chọn hợp lý.

IV. KẾT LUẬN

1. Đã phân lập và mô tả được một số đặc điểm hình thái của chủng nấm gây bệnh thối cổ rễ trên lan thủy tiên thân vuông, chủng nấm phân lập được thuộc chi *Fusarium*.

2. Các chế phẩm thử nghiệm đều có khả năng diệt nấm, hiệu quả diệt tốt nhất là Ridomil gold. Dung dịch nano bạc và đỏ Boóc-đô được khuyên dùng trong phòng bệnh thối cổ rễ cho lan do nấm *Fusarium* gây ra.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cameron, K.M.; Chase, M.W.; Whitten, W.M.; Kores, P.J.; Jarrell, D.C.; Albert, V. A.; Goldman, D.H (1999). A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: Evidence from rbcL nucleotide sequences. *Am J Bot*. 1999, 86, 208-224.
2. Latiffah Z., Nur Hayati M.Z., Baharuddin S. and Maziah Z. (2009). Identification and Pathogenicity of Fusarium Species Associated with Root Rot and Stem Rot of *Dendrobium*, *Asian Journal of Plant Pathology* 3(1):14-21, DOI: 10.3923/ajppaj.2009.14.21.
3. Leslie J.F. and B. A. Summerell (2006). The Fusarium Laboratory Manual. 1st Edn., Blackwell Publishing, Iowa, USA., ISBN: 0-8138-1919-9.
4. Maren A Klich (2002). Identification of common *Aspergillus* species. Pulished by the Central bureau voor Schimmelcutues, Utrecht, the Nethrlands. 107 pp.
5. Nelson P.E., T. A. Toussoun and W.F.O. Marasas (1983). *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*. 1st Edn., Pennsylvania State University Press, University Park, University Park, PA., USA., ISBN-13: 978-0271003498, Pages: 226.
6. Nguyễn Lân Dũng (1983). *Thực tập vi sinh vật học*, Nxb. Đại học và Trung học Hà Nội.
7. Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty (2000). *Vi sinh vật học*, Nxb. Giáo dục.
8. Sarsaiya S., Jain A., Jia Q., Fan X., Shu F., Chen Z., Zhou Q., Shi J. and Chen J (2019). Molecular Identification of Endophytic Fungi and their Pathogenicity Evaluation Against Dendrobium nobile and Dendrobium officinale, *Int J Mol Sci* 21, 316; doi:10.3390/ijms21010316.
9. Sue Bottom Orchid Pests and Diseases Diagnosis, Treatment and Prevention. http://www.phelpsfarm.com/OrchidPestsandDiseases.pdf
10. T. Hop (1998). *Vietnamese Orchids*, Hanoi Agricultural Publishing House.
11. Zhang Y.Q., Lin B.Y., Zou M.Y., Liang J.X. and Hu, H.Q. (2017). First Report of Fusarium Wilt of *Dendrobium* officinale Caused by *Fusarium oxysporum* in China. https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1270-PDN.

HIỆU QUẢ PHÒNG TRỪ CỦA NẤM *Paecilomyces* sp. ĐỐI VỚI TUYẾN TRÙNG *Meloidogyne incognita* VÀ *Pratylenchus penetrans* TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM

Nguyễn Thị Duyên, Nguyễn Hữu Tiền,
Lê Thị Mai Linh, Trịnh Quang Pháp

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Học viện Khoa học và Công nghệ,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

ABSTRACT

Effects of Paecilomyces sp. to *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus penetrans* in laboratory conditions

Plant-parasitic nematodes are one of the main pathogens found in many different crops. In many agricultural regions of the world, plant-parasitic nematodes caused great harm to agricultural production, causing billions of tons of yield losses each year. Nematodes belong to the two genera Meloidogyne and Pratylenchus are one of the most dangerous groups, reducing the yield and quality of crops, indirectly causing significant economic losses. To prevent plant-parasitic nematodes while ensuring agricultural sustainable development without affecting human health as well as the environment, currently, the use of parasitic fungi to control plant-parasitic nematodes have been receiving great attention. Among the parasitic fungi, the fungus Paecilomyces spp. gained the most interest and attention due to its high parasitic potential and ability to control plant-parasitic nematodes. The strain Paecilomyces sp. in this study has a high potency in inhibiting egg hatching and high lethality to M. incognita and P. penetrans. After 120 hours, the hatching rate at 1.5 × 10^5 spores/ml was 22% compared to 77.2% at the control experiment. After 168 hours, the mortality rate at 4.5 × 10^5 spores/ml was highest (99% and 94% for M. incognita and P. penetrans, respectively), meanwhile, in the control experiment, the highest mortality rate of nematodes was 0.4 to 0.9%. Based on the above results, the fungal strain Paecilomyces sp. used in this study is considered to be a very potential strain in inhibiting egg hatching and killing plant-parasitic nematodes.

Người phản biện: TS. Lê Mai Nhất.

I. ĐẶT VẤT ĐỀ

Tuyến trùng thực vật là một trong những tác nhân gây hại chính trên nhiều loại cây trồng khác nhau (Perry *et al.*, 2009). Tại nhiều vùng sản xuất nông nghiệp trên thế giới, tuyến trùng thực vật gây tác hại lớn đối với sản xuất nông nghiệp, chúng gây thiệt hại hàng tỷ tấn hoa màu hàng năm (Luc *et al.*, 2005). Tổn thất kinh tế nông nghiệp do tuyến trùng thực vật gây ra ước tính khoảng 125 tỷ USD mỗi năm trên toàn thế giới (Chitwood, 2003). Tuyến trùng thực vật có thể gây hại trên nhiều bộ phận khác nhau của cây trồng như: thân, lá, hoa, quả hoặc rễ. Trong đó, nhóm tuyến trùng nội ký sinh (*Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp.,...) gây hại trên rễ là một trong những nhóm nguy hiểm nhất, làm suy giảm năng suất và chất lượng cây trồng từ đó gián tiếp gây nhiều thiệt hại về kinh tế (Luc *et al.*, 2005).

Để phòng trừ tuyến trùng thực vật mà vẫn đảm bảo phát triển nông nghiệp bền vững và không ảnh hưởng đến sức khỏe con người cũng như môi trường, việc sử dụng thiên địch tự nhiên để hạn chế sự phát triển cũng như tiêu diệt tuyến trùng thực vật đã và đang rất được quan tâm (Vagelas *et al.*, 2007; Sharman & Pandey, 2009). Có rất nhiều sinh vật trong tự nhiên như: nấm, vi khuẩn, virus, tuyến trùng ăn thịt, côn trùng,... đã được tìm thấy ký sinh hoặc săn mồi tuyến trùng thực vật (Stirling, 1991). Trong đó, nấm ký sinh là nhóm vi sinh vật có nhiều trong đất và có tiềm năng lớn trong phòng trừ tuyến trùng thực vật (Jatala, 1986; Siddiqui & Mahmood, 1996). Trong số các loài nấm ký sinh, nấm *Paecilomyces* spp. được quan tâm và nghiên cứu nhiều nhất, do tiềm năng ký sinh và khả năng kiểm soát quần thể tuyến trùng thực vật tốt (Khan *et al.*, 2006; Kiewnick & Sikora, 2006; Brand *et al.*, 2010). Nấm *Paecilomyces* spp. có phổ phân bố rộng, xuất hiện với tần suất cao ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới (Chen *et al.*, 1996), chúng được tìm thấy trong hầu hết hệ sinh thái đất nông nghiệp (Brand *et al.*, 2010). Cơ chế của nấm *Paecilomyces* spp. là ký sinh trực tiếp lên trứng, ấu trùng hoặc con trưởng thành bởi các sợi nấm, đồng thời sản sinh ra các hoạt chất, enzym như acid acetic, leucinotoxin, chitinase và protease có khả năng phân hủy lớp kitin bên ngoài của trứng và tuyến trùng trưởng thành (Khan *et al.*, 2004; Kiewnick & Sikora, 2006). Các enzym phân hủy lớp vỏ trứng, tạo điều kiện thuận lợi cho sợi nấm xâm nhập và phá hủy các giai đoạn phát triển ở giai đoạn sớm (Khan *et al.*, 2006; Mukhtar *et al.*, 2013).

Trên thế giới, nhiều thử nghiệm trong phòng thí nghiệm cũng như ngoài đồng ruộng, cho thấy nấm *Paecilomyces* spp. có hiệu quả cao trong việc kiểm soát mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* spp. và *Pratylenchus* spp. (Jonathan & Rajendran, 2000; Tiyagi & Shamim, 2004; Kiewnick & Sikora, 2006). Hiện nay, loài nấm *Paecilomyces lilacinus* được xem là một trong những tác nhân kiểm soát sinh học được thử nghiệm rộng rãi nhất trong việc quản lý tuyến trùng thực vật và đã được thương mại hóa (Atkins *et al.*, 2003; Haseeb & Kumar, 2006; Kumar *et al.*, 2009). Tuy nhiên, mỗi chủng *Paecilomyces* spp. khác nhau lại có hiệu lực phòng trừ khác nhau nhất định trên các nhóm tuyến

trùng khác nhau. Do vậy, việc phân lập các chủng nấm *Paecilomyces* bản địa từ tự nhiên và thử nghiệm hiệu quả phòng trừ của chúng trên các nhóm tuyến trùng là rất cần thiết để tìm ra đối tượng tối ưu trong phòng trừ sinh học tuyến trùng ở Việt Nam.

Trong nghiên cứu này chúng tôi thử nghiệm và báo cáo hiệu quả phòng trừ của chủng nấm *Paecilomyces* sp. phân lập ở Việt Nam đối với tuyến trùng *Meloidogyne incognita* và *Pratylenchus penetrans* trong điều kiện phòng thí nghiệm dựa trên khả năng ức chế nở trứng và tiêu diệt tuyến trùng.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Dịch bào tử của chủng nấm *Paecilomyces* sp. do Viện Thổ nhưỡng Nông hóa cung cấp.

- Trứng và ấu trùng tuyến trùng *M. incognita.*

- Tuyến trùng *P. penetrans.*

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nhân nuôi nấm Paecilomyces sp.

Nấm *Paecilomyces* sp. được nhân nuôi trong môi trường lỏng PDB (Potato Dextrose Borth) theo phương pháp của Gao *et al. (*1998), ở nhiệt độ 25ºC. Sau 7 ngày, dung dịch được lọc qua rây vải thô để loại bỏ sợi nấm, rồi ly tâm ở 5000 vòng/phút ở nhiệt độ 20ºC trong thời gian 20 phút. Sau đó, bào tử nấm trong phần lắng đọng ở ống ly tâm, được thu lại, đếm và điều chỉnh nồng độ bào tử nấm là 10^6 bào tử/ml.

2.2.2. Phương pháp nhân nuôi tuyến trùng

Phương pháp nhân nuôi tuyến trùng M. incognita: Tuyến trùng *M. incognita* được nhân nuôi trên cây cà chua theo mô tả của López-Pérez *et al.* (2011) có hiệu chỉnh: Hạt cà chua được khử trùng bề mặt bằng cồn 70% trong 5 phút, vớt ra rửa sạch rồi cho vào dung dịch natri hypochlorite 1% (Na^oCl) trong 15 phút. Sau đó, hạt cà chua được rửa lại nhiều lần với nước cất để loại bỏ hết dung dịch NaOCl. Các hạt này được gieo trong khay đất đã khử trùng, khi cây được hai lá thật thì chuyển vào các chậu đất (250 cm^3 đất). Sau khi cà chua bén rễ thì tiến hành chủng tuyến trùng *M. incognita* với số lượng 200 ấu trùng/chậu. Sau 30 - 60 ngày thu tuyến trùng. Rễ cây cà chua bị nhiễm tuyến trùng *M. incognita* được rửa sạch, sau đó cắt nhỏ thành từng đoạn 1 - 2 cm và cho vào dung dịch NaOCl 1,5%. Lắc đều trong 5 phút phá vỡ cấu trúc vỏ gelatin của túi trứng. Ấu trùng được thu qua rây lọc có đường kính lỗ rây 40 µm và trứng được thu ở rây lọc có đường kính lỗ rây 25 µm.

Phương pháp nhân nuôi tuyến trùng P. penetrans: Tuyến trùng *P. penetrans* được nhân nuôi theo phương pháp của Coyne *et al.* (2014): Chọn củ cà rốt tươi, không bị bệnh, rửa sạch. Ngâm cà rốt vào trong cồn 95ºC khoảng 1 - 2 giây rồi hơ trên ngọn lửa đèn cồn để khử trùng. Sau khi khử trùng cắt củ cà rốt thành các miếng nhỏ dày 0,5 cm. Gắp từng miếng cà rốt hơ qua trên ngọn lửa đèn cồn rồi cho vào đĩa petri tiệt trùng. Bảo quản các

đĩa cà rốt trong tủ môi trường ở nhiệt độ 25ºC. Sau đó, dùng pipet hút 20µl dung dịch có chứa tuyến trùng *P. penetrans* đã được khử trùng, bơm lên miếng cà rốt ở vị trí mô viền ngoài của đĩa cà rốt. Các đĩa petri có chứa cà rốt được băng kín bằng parafilm rồi đặt trong tủ môi trường ở 25°C. Sau 45 - 60 ngày tiến hành thu tuyến trùng. Tuyến trùng sau khi nhân nuôi được thu từ đĩa cà rốt bằng phương pháp xay nghiền: cà rốt sau nhân nuôi được cho vào máy xay với tốc độ 12.600 vòng/phút trong 3 lần, mỗi lần 10 giây. Dung dịch cà rốt sau xay được cho qua rây lọc có kích thước lỗ 100 µm để loại bỏ các mảnh mô cà rốt rồi thu tuyến trùng qua rây lọc có kích thước lỗ 25 µm. Phần mô cà rốt được đặt trên rây lọc tĩnh có kích thước lỗ rây 40 µm và thu tuyến trùng trong đĩa sau 24-48 giờ.

2.2.3. Phương pháp thử nghiệm đánh giá hiệu quả của nấm Paecilomyces sp. đối với tuyến trùng

- Thí nghiệm đánh giá khả năng ức chế nở trứng tuyến trùng *M. incognita:* được tiến hành theo phương pháp mô tả bởi Pau *et al.* (2012), có hiệu chỉnh: Thí nghiệm được tiến hành theo 3 công thức (CT) với 3 nồng độ dịch bào tử nấm khác nhau: $1,5 \times 10^5$, 3×10^5 và $4,5 \times 10^5$ bào tử/ml. Mỗi CT gồm 3 đĩa petri đường kính 3,5 cm, mỗi đĩa có 300 trứng tuyến trùng *M. incognita.* Sau khi gây nhiễm, đặt các đĩa petri ở trong tủ định ôn ở nhiệt độ 27ºC. Theo dõi tỷ lệ trứng nở sau 24, 72 và 120 giờ. Nước cất được sử dụng trong các CT đối chứng (ĐC). Thí nghiệm được nhắc lại 3 lần.

Tỷ lệ (%) trứng nở được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ (\%) trứng nở} = \frac{\text{Số lượng ấu trùng}}{\text{Số lượng trứng ban đầu}} \times 100$$

- Thí nghiệm đánh giá hiệu lực diệt ấu trùng *M. incognita:* Được tiến hành theo phương pháp mô tả bởi Pau *et al.* (2012), có hiệu chỉnh. Thí nghiệm được tiến hành theo 3 CT với 3 nồng độ dịch bào tử nấm khác nhau: $1,5 \times 10^5$, 3×10^5 và $4,5 \times 10^5$ bào tử/ml. Mỗi CT gồm 3 đĩa petri đường kính 3,5 cm, mỗi đĩa có 300 ấu trùng *M. incognita*. Sau khi gây nhiễm, đặt các đĩa petri ở trong tủ định ôn ở nhiệt độ 27ºC. Theo dõi tỷ lệ ấu trùng *M. incognita* chết sau 24, 72, 120 và 168 giờ. Nước cất được sử dụng trong các CT đối chứng. Thí nghiệm được nhắc lại 3 lần.

Tỷ lệ (%) ấu trùng chết được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ (\%) ấu trùng chết} = \frac{(\text{Số lượng ấu trùng ban đầu} - \text{Số lượng ấu trùng còn sống})}{\text{Số lượng ấu trùng ban đầu}} \times 100$$

- Thí nghiệm đánh giá hiệu lực diệt tuyến trùng *P. penetrans* được tiến hành theo phương pháp mô tả bởi Pau *et al.* (2012), có hiệu chỉnh: Thí nghiệm được tiến hành theo 3 CT với 3 nồng độ dịch bào tử nấm khác nhau: $1,5 \times 10^5$, 3×10^5 và $4,5 \times 10^5$ bào tử/ml. Mỗi CT gồm 3 đĩa petri đường kính 3,5 cm, mỗi đĩa có 300 tuyến

trùng *P. penetrans*. Sau khi gây nhiễm, đặt các đĩa petri ở trong tủ định ôn ở nhiệt độ 27^{o}C. Theo dõi tỷ lệ tuyến trùng *P. penetrans* chết sau 24, 72, 120 và 168 giờ. Nước cất được sử dụng trong các CT đối chứng. Thí nghiệm được nhắc lại 3 lần.

Tỷ lệ (%) tuyến trùng chết được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ (\%) tuyến trùng chết} = \frac{(\text{Số lượng tuyến trùng ban đầu} - \text{Số lượng tuyến trùng còn sống})}{\text{Số lượng tuyến trùng ban đầu}} \times 100$$

- Số liệu đánh giá sai khác giữa các công thức thí nghiệm về tỷ lệ chết và khả năng nở trứng được xử lý thống kê bằng ANOVA dựa trên phần mềm SPSS.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng dịch bào tử nấm *Paecilomyces* sp. đến tỷ lệ nở trứng của tuyến trùng *M. incognita*

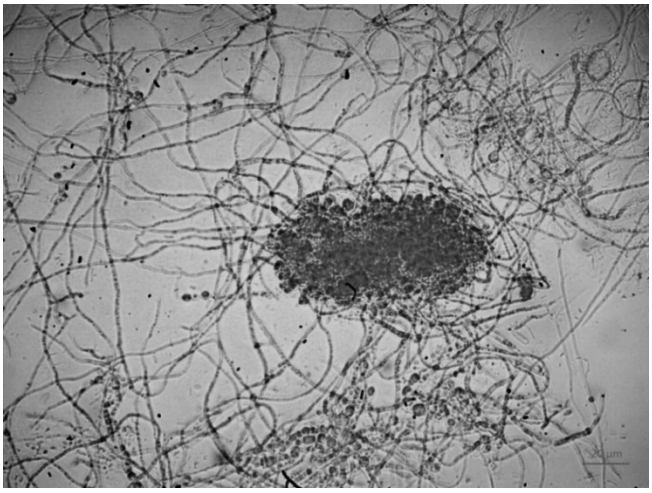
Thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng dịch bào tử nấm *Paecilomyces* sp. đến tỷ lệ nở trứng của tuyến trùng *M. incognita* được thử nghiệm ở ba nồng độ bào tử nấm khác nhau là: 1,5 × 10^5, 3 × 10^5 và 4,5 × 10^5 bào tử/ml. Kiểm tra tỷ lệ trứng nở sau các khoảng thời gian 24, 72 và 120 giờ được thể hiện ở bảng 3.1, sai khác có ý nghĩa thống kê ở các CT dịch bào tử nấm khác nhau.

Kết quả thử nghiệm cho thấy, sau 24 giờ tỷ lệ (%) trứng tuyến trùng *M. incognita* nở ở các CT thí nghiệm sai khác có ý nghĩa thống kê. Ở các CT1, CT2, CT3 tỷ lệ trứng nở lần lượt là 18,4, 16,4 và 15,8%, ở CT đối chứng tỷ lệ trứng nở cao nhất là 21,6%. Sau 72 giờ, tỷ lệ trứng nở đã có sự khác biệt đáng kể ở các CT thí nghiệm khác nhau, ở CT đối chứng tỷ lệ trứng nở là 54,3%, ở CT1 tỷ lệ trứng nở là 22%, 16,7% ở CT2. Sau 120 giờ, tỷ lệ trứng nở ở CT đối chứng vẫn tăng cao và đạt 77,2%, ở cả 3 CT thí nghiệm tỷ lệ trứng nở không tăng so với sau 72 giờ. Như vậy, tỷ lệ nở trứng tuyến trùng *M. incognita* có mối tương quan chặt chẽ và tỷ lệ nghịch với nồng độ bào tử nấm, khi nồng độ bào tử nấm tăng lên thì tỷ lệ trứng nở lại giảm đi.

***Bảng 1. Ảnh hưởng của nấm Paecilomyces* sp. đến tỷ lệ (%) nở trứng tuyến trùng M. incognita**

Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ (%) nở trứng tuyến trùng *M. incognita*		
	Sau 24 giờ	Sau 72 giờ	Sau 120 giờ
ĐC (nước cất)	21,6 ± 0,7 (a) (20,8 - 22,1)	54,3 ± 5,6 (a) (47,8 - 57,6)	77,2 ± 6,4 (a) (70,4 - 83,2)
CT1 (1,5 × 10^5 bào tử/ml)	18,4 ± 1,8 (ab) (16,9 - 20,3)	22 ± 2,3 (b) (20,1 - 24,4)	22 ± 2,3 (b) (20,1 - 24,4)
CT2 (3 × 10^5 bào tử/ml)	16,4 ± 0,6 (b) (15,7 - 17,1)	18,7 ± 1 (c) (17,9 - 19,3)	18,7 ± 1 (c) (17,9 - 19,3)
CT3 (4,5 × 10^5 bào tử/ml)	15,8 ± 1,6 (b) (13,9 - 16,8)	16,7 ± 1,3 (d) (14,5 - 17,8)	16,7 ± 1,3 (d) (14,5 - 17,8)

Ghi chú: Số liệu trung bình biểu diễn trong bảng được chuyển sang hàm Asin (x/100))^1/2 trước khi xử lý. Các số trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa với P ≤ 0,05.



Hình 1. Ảnh chụp trứng tuyến trùng *M. incognita* bị nấm *Paecilomyces* sp. ký sinh

3.2. Ảnh hưởng dịch bào tử nấm *Paecilomyces* sp. đến tỷ lệ chết của ấu trùng *M. incognita*

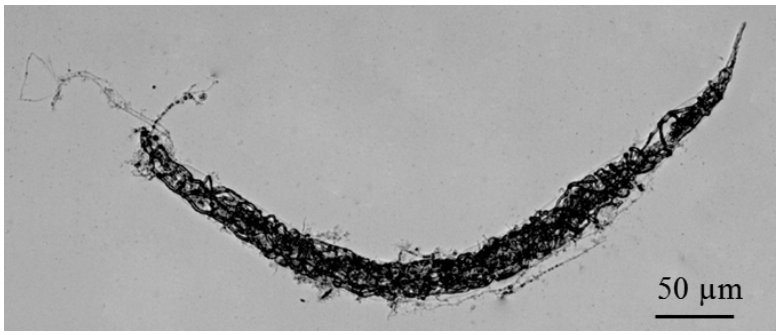
Thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng dịch bào tử nấm *Paecilomyces* sp. đến tỷ lệ chết của ấu trùng *M. incognita* được tiến hành ở ba CT nồng độ bào tử nấm khác nhau 1,5 × 10^5, 3 × 10^5 và 4,5 × 10^5 bào tử/ml, sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các công thức thí nghiệm. Kiểm tra tỷ lệ ấu trùng *M. incognita* chết sau các khoảng thời gian 24, 72, 120 và 168 giờ. Kết quả thử nghiệm được trình bày ở bảng 3.2 và hình 3.2 cho thấy, dịch bào tử nấm *Paecilomyces* sp. có hiệu lực gây chết đối với ấu trùng *M. incognita*. Tỷ lệ ấu trùng chết có mối tương quan chặt chẽ và tỷ lệ thuận với nồng độ bào tử nấm. Nồng độ bào tử nấm thử nghiệm càng cao thì tỷ lệ ấu trùng *M. incognita* chết càng cao.

***Bảng 2. Tỷ lệ (%) ấu trùng M. incognita chết do nấm Paecilomyces* sp.**

Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ (%) chết của ấu trùng *M. incognita*			
	Sau 24 giờ	Sau 72 giờ	Sau 120 giờ	Sau 168 giờ
ĐC (nước cất)	0(a)	0,3 ± 0,1 (a) (0,2 - 0,4)	0,5 ± 0,1 (a) (0,4 - 0,7)	0,9 ± 0,2 (a) (0,7 - 1,0)
CT1 (1,5 × 10^5 bào tử/ml)	13,1 ± 0,4 (b) (12,7 - 13,3)	39,9 ± 1,7 (b) (38,6 - 41,8)	67,1 ± 1,7 (b) (65,2 - 68,2)	75,1 ± 2,1 (b) (73,2 - 77,4)
CT2 (3 × 10^5 bào tử/ml)	15,4 ± 1,7 (bc) (14,2 - 17,3)	44,2 ± 2,5 (cd) (42,2 - 47,0)	93,7 ± 1,1 (c) (92,4 - 94,3)	98,4 ± 1,1 (c) (97,2 - 99,4)
CT3 (4,5 × 10^5 bào tử/ml)	16,7 ± 1,1 (c) (15,7 - 17,9)	50,7 ± 4,7 (d) (47,7 - 56,1)	98,7 ± 0,5 (d) (98,1 - 99,0)	99,1 ± 0,4 (c) (98,9 - 99,6)

Ghi chú: Số liệu trung bình biểu diễn trong bảng được chuyển sang hàm Asin (x/100))^1/2 trước khi xử lý. Các số trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa với P ≤ 0,05.

Sau 24 giờ tỷ lệ (%) ấu trùng chết ở các CT1, CT2 và CT3 không có sự sai khác nhiều, cụ thể ở các CT1, CT2 và CT3 tỷ lệ ấu trùng chết lần lượt là 13, 15,4 và 16,7%. Sau các khoảng thời gian 72 giờ tỷ lệ ấu trùng chết tăng lên đáng kể. Và sau 120 giờ, tỷ lệ ấu trùng chết cả 3 CT thí nghiệm đều đạt trên 50%. Sau 168 giờ, ở CT3 tỷ lệ ấu trùng chết đạt cao nhất là 99%. Trong khi đó, tỷ lệ ấu trùng chết ở CT đối chứng là 0,9%.



Hình 2. Ảnh chụp ấu trùng *M. incognita* chết do nấm *Paecilomyces* sp. ký sinh

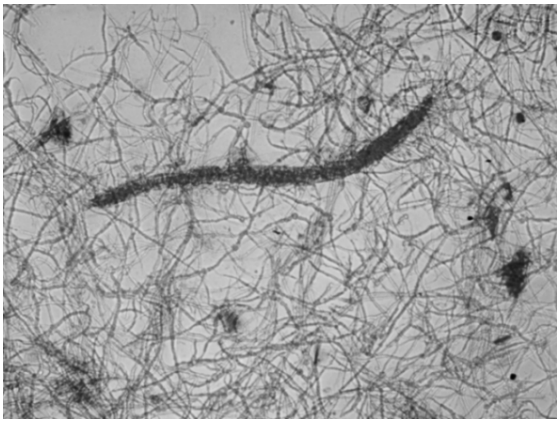
3.3. Ảnh hưởng dịch bào tử nấm *Paecilomyces* sp. đến tỷ lệ chết của tuyến trùng *P. penetrans*

Dịch bào tử nấm *Paecilomyces* sp. cũng có hiệu lực gây chết tuyến trùng *P. penetrans*. Kết quả thử nghiệm sai khác có ý nghĩa thống kê ở các CT thí nghiệm. Sau 24 giờ, tỷ lệ tuyến trùng *P. penetrans* chết ở các CT1, CT2 và CT2 tương ứng là 10,6; 14,8 và 16,3%. Sau 72 giờ, tỷ lệ này tăng lên là 29,1; 34,6 và 44,1%. Tỷ lệ tuyến trùng *P. penetrans* chết tiếp tục tăng lên sau các khoảng thời gian 120 và 168 giờ. Tỷ lệ tuyến trùng *P. penetrans* chết cao nhất là 94% ở CT3 sau 168 giờ. Như vậy, tỷ lệ tuyến trùng *P. penetrans* chết có mối tương quan chặt chẽ và tỷ lệ thuận với nồng độ bào tử nấm. Nồng độ bào tử nấm thử nghiệm càng cao, tỷ lệ tuyến trùng *P. penetrans* chết càng nhiều.

***Bảng 3. Tỷ lệ (%) tuyến trùng P. penetrans chết do nấm Paecilomyces* sp.**

Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ chết (%) tuyến trùng *P. penetrans*			
	Sau 24 giờ	Sau 72 giờ	Sau 120 giờ	Sau 168 giờ
ĐC (nước cất)	0(a)	0(a)	0,1 ± 0,2(a) (0,1 - 0,2)	0,4 ± 0,5(a) (0,2 - 0,7)
CT1 ($1,5 \times 10^5$ bào tử/ml)	10,6 ± 0,9 (b) (9,6 - 11,3)	29,1 ± 1,3 (b) (28,2 - 30,7)	43,5 ± 5,1 (b) (37,7 - 47,2)	68,6 ± 4,2 (b) (63,8 - 71,3)
CT2 (3×10^5 bào tử/ml)	14,8 ± 1,5 (c) (13,3 - 16,3)	34,6 ± 4,0 (c) (30,0 - 37,3)	61,4 ± 4,8 (c) (56,0 - 65,0)	81,6 ± 5,6 (c) (75,3 - 86,0)
CT3 ($4,5 \times 10^5$ bào tử/ml)	16,3 ± 1,6 (c) (14,6 - 17,7)	44,1 ± 2,2 (d) (42,4 - 46,6)	78,6 ± 5,4 (d) (72,6 - 82,8)	94,5 ± 4,2 (d) (90,0 - 98,2)

Ghi chú: Số liệu trung bình biểu diễn trong bảng được chuyển sang hàm Asin (x/100))^1/2 trước khi xử lý. Các số trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa với $P \leq 0,05$.



Hình 3. Ảnh chụp tuyến trùng *P. penetrans* bị nấm *Paecilomyces* sp. ký sinh

Một số loài nấm thuộc giống *Paecilomyces* đã được đánh giá cao về khả năng kiểm sinh học tuyến trùng ký sinh thực vật (Atkins *et al.*, 2003). Chúng ký sinh trực tiếp lên trứng, ấu trùng và con cái (Kiewnick & Sikora, 2006). Cơ chế gây bệnh của nấm là sau khi gây nhiễm, bào tử nấm nảy mầm và bắt đầu phát triển tạo thành sợi. Sợi nấm ngày càng phát triển tạo thành mạng lưới sợi nấm bao phủ trứng và tuyến trùng. Sau khi hình thành giác bám (appressoria), sợi nấm bám vào lớp vỏ trứng, vỏ tuyến trùng đồng thời sản sinh ra các hoạt chất và enzym như leucinotoxin, acid acetic, chitinase và protease (Khan *et al.*, 2004; Kiewnick & Sikora, 2006). Các enzym chitinase và protease có tác dụng hòa tan lớp vỏ trứng, tạo điều kiện thuận lợi cho sợi nấm thâm nhập vào trứng và phá hủy các giai đoạn phát triển phôi thai ở giai đoạn sớm (Khan *et al.*, 2006; Mukhtar *et al.*, 2013). Để xâm nhiễm vào tuyến trùng, sợi nấm *Paecilomyces* spp. cần phải xuyên qua lớp vỏ cutin của tuyến trùng. Các enzym này cũng có khả năng phân hủy lớp kitin bên ngoài của tuyến trùng (Khan *et al.*, 2004; Kiewnick & Sikora, 2006). Khi lớp vỏ cutin bị xâm nhập bởi sợi nấm, tuyến trùng sẽ bị tê liệt, sợi nấm sẽ xâm chiếu toàn bộ cơ thể và tiêu hóa tuyến trùng để làm nguồn dinh dưỡng (Evans, 2007). Theo Jatala, kết quả thử nghiệm trong phòng thí nghiệm cho thấy nấm *Paecilomyces* spp. lây nhiễm trứng của loài *M. incognita* và phá hủy phôi trong vòng 5 ngày (Jatala, 1986).

Như vậy, sau khi chủng nấm *Paecilomyces* sp. vào đĩa petri thử nghiệm, gặp điều kiện thuận lợi, sợi nấm mới bắt đầu sinh trưởng phát triển nên sau 24 giờ nấm chưa ảnh hưởng nhiều đến khả năng ức chết nở trứng và giết chết tuyến trùng. Tuy nhiên, sau 72 giờ, nấm đã phát triển mạnh, xâm nhập vào trong phôi trứng và tuyến trùng, các enzyme, hoạt chất được sản sinh nhiều hơn nên đã giết chết tuyến trùng và ức chế đáng kể lượng trứng nở. Sau 120 giờ, toàn bộ trứng đã bị nấm ký sinh và phân hủy, sau 168 giờ tuyến trùng cũng bị ký sinh và phân hủy gần hết.

Theo kết quả nghiên cứu của Sun *et al.* (2006), khi ông tiến hành thử nghiệm trong phòng thí nghiệm hiệu lực của 186 chủng nấm *P. lilacinus* đối với tuyến

trùng *M. hapla* cho thấy tỷ lệ trứng nở trung bình là 42% và tỷ lệ ấu trùng bị chết trung bình là 16% (Sun *et al.,* 2006). Trong khi Al Kader (2008), báo cáo hiệu quả gây chết của dịch bào tử nấm *Paecilomyces* đối với ấu trùng *M. incognita* là 99% sau 2 ngày gây nhiễm (Al Kader, 2008). Tương tự, Pau *et al.* (2012), cũng công bố ba chủng nấm *P. lilacinus* có khả năng làm giảm đáng kể lượng trứng nở tuyến trùng *M. incognita*. Cụ thể là trong thời gian 7 ngày tỷ lệ trứng nở là 12 - 11%, trong khi đó ở công thức đối chứng tỷ lệ trứng nở là 74% (Pau *et al.,* 2012). Al Ajrami (2016), đã tiến hành thử nghiệm khả năng ức chế nở trứng *M. incognita* của nấm *P. lilacinus* ở các nồng độ 1500 và 3000 bào tử/ml. Kết quả, sau 72 giờ tỷ lệ trứng nở ở nồng độ bào tử nấm 1500 bào tử/ml là 18% và ở nồng độ nấm 3000 bào tử/ml là 7%, ở công thức đối chứng là 88%. Tỷ lệ ấu trùng chết là 35% ở nồng độ bào tử nấm 1500 bào tử/ml và 57% ở nồng độ bào tử nấm 3000 bào tử/ml (Al Ajrami, 2016). Nghiên cứu của Lê Thị Mai Linh *và cs.* (2015), cũng cho thấy nấm *P. javanicus* có khả năng ức chế nở trứng và giết chết ấu trùng *M. incognita* sau 120h, ở các công thức nấm 5, 10 và 20% tỷ lệ trứng nở lần lượt là 11,8; 8,9; 3,8% và tỷ lệ ấu trùng chết là 52; 55 và 75% (L. T. M. Linh *và cs.*, 2015). Như vậy, so với các nghiên cứu trên thế giới cũng như ở Việt Nam, dịch bào tử nấm *Paecilomyces* sp. trong nghiên cứu này có hiệu lực cao đối với quá trình ức chế nở trứng và giết chết ấu trùng *M. incognita* và tuyến trùng *P. penetrans*.

IV. KẾT LUẬN

Trong điều kiện phòng thí nghiệm dịch bào tử nấm *Paecilomyces* sp. có hiệu lực cao trong việc ức chế trứng nở cũng như có khả năng gây chết 2 loài tuyến trùng *M. incognita* và *P. penetrans*. Ở các nồng độ dịch bào tử nấm khác nhau, tỷ lệ trứng nở và tuyến trùng chết là khác nhau. Sau 120 giờ, tỷ lệ trứng nở ở CT nồng độ bào tử nấm $1,5 \times 10^5$ bào tử/ml là 22%, ở CT đối chứng là 77,2%. Sau 168 giờ, ở CT nồng độ bào tử nấm $4,5 \times 10^5$ bào tử/ml, tỷ lệ ấu trùng *M. incognita* chết là cao nhất đạt 99% và tỷ lệ tuyến trùng *P. penetrans* chết cao nhất là 94%. Trong khi đó, ở CT đối chứng tỷ lệ tuyến trùng chết cao nhất từ 0,4 - 0,9%. Như vậy, dịch bào tử nấm *Paecilomyces* sp. trong nghiên cứu này có hiệu lực cao đối với quá trình ức chế nở trứng và giết chết ấu trùng *M. incognita* và tuyến trùng *P. penetrans*. Đây là một chủng nấm rất có tiềm năng trong ứng dụng sản xuất các chế phẩm sinh học phòng trừ tuyến trùng ký sinh thực vật. Tuy nhiên, để đánh giá chính xác tiềm năng của chủng nấm *Paecilomyces* sp. trong nghiên cứu này cần có thêm các thử nghiệm và đánh giá cụ thể hơn ở điều kiện nhà lưới và ngoài đồng ruộng.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí từ đề tài Nafosted mã số: 106.05-2019.323

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Al Ajrami, H.H.M. (2016). Master of Biological Sciences Microbiology, Evaluation the Effect of Paecilomyces lilacinus as a Biocontrol Agent of

Meloidogyne javanica on Tomato in Gaza Strip. The Islamic University-Gaza Research and Postgraduate Affairs Faculty of science.

2. Al Kader, M. A. A. (2008). In vitro studies on nematode interaction with their antagonistic fungi in the rhizosphere of various plants. Ph.D. Thesis, Albert-Ludwigs-Universität, Germany.
3. Atkins, S.D., Diaz, H. L., Kaslisz, H., Hirsch, P.R. & Kerry, B.R. (2003). Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. *Pest Manage, Sci*, 59, 183 - 189.
4. Brand, D., Soccol, C.R., Sabu, A. & Roussos, S. (2010). Production of fungal biological control agents through solid state fermentation: A case study on Paecilomyces lilacinus against root-knot nematodes. *Micol. Aplicada Int*, 22, 31 - 48.
5. Chen, Z.X., Dickson, D.W., McSorley, R., Mitchell, D.J. & Hewlett, T.E. (1996). Suppression of Meloidogyne arenaria race 1 by soil application of endospores of Pasteuria penetrans. *J. Nematol*, 28, 159 - 168.
6. Chitwood, D.J. (2003). Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service. *Pest Management Science*, 59, 748 - 753.
7. Coyne, D. L., Adewuyi, O. & Mbiru, E. (2014). Protocol for in vitro culturing of lesion nematodes*: Radopholus similis* and *Pratylenchus* spp. on carrot discs. *International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria*, 15.
8. Evans, A. (2007). Soil dwelling free-living nematodes as pests of crops. *Scottish Agricultural College Technical Note (TN603) ISBN*, 1854828959.
9. Gao, X., Zhou, H., Zhang, H., Chen, C. & Deng, S. (1998). Effical of the MCWA18 strain of *Paecilomyces lilacinus* on *Meloidogyne inognita*. *Chinese Journal of Biological Control*, 14(4), 163 - 166.
10. Jatala, P. (1986). Biological control of plant parasitic nematodes. Ann. Rev. *Pathopathol*, 24, 453 - 489.
11. Jonathan, E.I. & Rajendran, G. (2000). Biocontrol potential of the parasitic fungus *Paecilomyces lilacinus* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in banana. *Journal of Biological Control*, 14, 67 - 69.
12. Haseeb, A. & Kumar, V. (2006). Management of Meloidogyne incognita-Fusarium solani disease complex in brinjal by biological control agents and organic additives. *Annals of Plant Protection Sciences*, 14, 519 - 521.
13. Khan, A., Williams, K. L. & Nevalainen, H.K.M. (2006). Infection of plant-parastic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum*. *Biol. Cont*, 51, 659 - 678.
14. Khan, A., Williams, K. L. & Nevalainen, H.K.M. (2004). Effects of Paecilomyces lilacinus protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of Meloidogyne javanica juveniles. *BioControl*, 31, 346 - 352.
15. Kiewnick, S.& Sikora, R. (2006). Evaluation of Paecilomyces lilacinus strain 251 for the biological control of the northern root-knot nematode Meloidogyne hapla Chitwood. *Nematology*, 8, 69 - 78.
16. Kumar, V., Haseeb, A. & Sharma, A. (2009). Integrated management of Meloidogyne incognita-Fusarium solani disease complex of brinjal cv. *Pusa Kranti Ann. Plant Protection Science*, 17, 192 - 194.
17. Lê Thị Mai Linh, Nguyễn Thị Duyên, Trịnh Quang Pháp, Nguyễn Thị Phương Anh, Phạm Văn Ty (2015). Nghiên cứu khả năng ức chế tuyến trùng *Meloidogyne incognita* trên cà phê của nấm *Paecilomyces javanicus*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 13(4), 1025 - 1029.
18. López Pérez, J. A., Escuer, M., Díez Rojo, M. A., Robertson, L., Piedra-Buena, A., López Cepero, J. & Bello Pérez, A. (2011). Host range of Meloidogyne arenaria (Neal, 1889) Chitwood, 1949 (Nematoda: Meloidogynidae) in Spain. *Nematropica*, 41, 130 - 140.

19. Luc, M., Sikora, R. & Bridge, J. (2005). Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. *C. A.B International Institute of Parasitology*, 629 pp.

20. Mukhtar, T., Hussain, M. A. & Kayani, M.Z. (2013). Biocontrol potential of Pasteuria penetrans, Pochonia chlamydosporia, Paecilomyces lilacinus and Trichoderma harzianum against Meloidogyne incognita in okra. *Phytopathologia Mediterranea*, 52, 1, 66 - 76.

21. Pau, C.G., Leong, S., Teck, C., Wong, S.K., Eng, L., Jiwan, M. & Majid, N.M. (2012). Isolation of Indigenous Strains of Paecilomyces lilacinus with Antagonistic Activity against Meloidogyne incognita. *International Journal of Agriculture & Biology*, 14(2).

22. Perry, R., Moens, M. & Starr, J. L. (2009). Root-knot nematodes. *CABI*, 480pp.

23. Sharman, P. & Pandey, R. (2009). Biological control of root- knot nematodes; *Meloidogyne incognita* in the medicinal plant; Withania somnifera and the effect of biocontrol agents on plant growth. *African Journal of Agriculturan Research*, 4, 564 - 567.

24. Siddiqui, Z. A. & Mahmood, I. (1996). Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: A review. *Bioresource Technology*, 58, 229 - 239.

25. Stirling, G.R. (1991). Biological Control of Plant Parasitic Nematodes. Progress, Problems and Prospects. *CAB International, Wallingford, UK.*

26. Sun, M.H., Gao, L., Shi, Y.X., Li, B.J. & Liu, X.Z. (2006). Fungi and actinomycetes associated with Meloidogyne spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(1), 22 - 28.

27. Tiyagi, S. A. & Shamim, A. (2004). Biological control of plant parasitic nematodes associated with chickpea using oil cakes and *Paecilomyces lilacinus*. *Indian J. of Nematology* 34, 44 - 48.

28. Vagelas, I.K., Pembroke, B., Gowen, S.R. & Davies, K.G. (2007). The control of root-knot nematodes (Meloidogyne spp.) by Pseudomonas oryzihabitans an its immunological detection on tomato roots. *Nematology*, 9, 363 - 370.

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KÝ SINH TRỨNG TUYẾN TRÙNG *Meloidogyne* sp. TRONG ĐIỀU KIỆN *in vitro* CỦA NẤM *Trichoderma* spp. PHÂN LẬP TẠI ĐẮK LẮK

Nguyễn Văn Nam, Đỗ Thị Kiều An, Nguyễn Thị Hương Cẩm

Khoa Nông Lâm nghiệp, Trường Đại học Tây Nguyên
ĐT: 0766789268; Email: nguyenvannam@ttn.edu.vn

ABSTRACT

Meloidogyne sp. is one of the serious factors causing root-knots, adversely affecting the water and nutrient absorbility, leading to yellow leaves on coffee trees. In order to minimize the use of nematicides in coffee nematode control, antagonistic fungi, Trichoderma spp., has been isolated and assess their antagonism towards Meloidogyne sp.. Forty-four strains of Trichoderma spp. has been isolated from 22 coffee samples in Dak Lak. Of these, 7 strains showed high antagonism towards Meloidogyne sp (over 80%) in vitro. Four Trichoderma strains with the highest parasitic level were morphologically identified, including: T3 (Trichoderma koningii T3); T8 (Trichoderma erinaceum T8); T11 (Trichoderma hazianum T11); và T5 (Trichoderma astroviride T15).

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cà phê là một trong những mặt hàng nông sản chiến lược, đóng góp hơn 3,5 tỷ USD cho ngân sách nhà nước (Nguyễn Thị Lài & Đỗ Thị Mỹ Hiền, 2019). Chủ trương của Nhà nước là hình thành các vùng trồng cà phê lớn, sản xuất bền vững, đạt các tiêu chuẩn của cà phê chứng chỉ quốc tế đáp ứng nhu cầu xuất khẩu và mang lại giá trị lợi nhuận cao (Ủy ban nhân dân tỉnh Đắk Lắk, 2013). Tuy nhiên, sản xuất cà phê Việt Nam nói chung hiện đang phải đối mặt với nhiều thách thức, trong đó có vấn đề cà phê già cỗi cần tái canh. Tuy nhiên, tỷ lệ thành công khi tái canh cà phê trên nền đất cũ thường không cao do bị bệnh vàng lá (Chế Thị Đa, 2012). Một trong những nguyên nhân gây bệnh này là tuyến trùng sưng rễ *Meloidogyne* sp. Việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật hóa học để phòng trừ tuyến trùng ký sinh đã và đang làm gia tăng chi phí sản xuất và giảm khả năng chống chịu của cây cà phê dẫn đến bùng nổ dịch bệnh, ảnh hưởng không tốt đến chất lượng cà phê Việt Nam trên thị trường thế giới và cũng là nguyên nhân có thể dẫn đến thoái hóa đất canh tác, ô nhiễm nguồn nước và môi trường sống.

Chính vì vậy, việc tìm một giải pháp mới thay thế thuốc hóa học, thân

Người phản biện: TS. Nguyễn Ngọc Hữu.

thiện hơn với môi trường là một việc làm hết sức cần thiết hiện nay. Một trong những giải pháp thay thế đó là ứng dụng vi nấm trong canh tác cà phê. *Trichoderma* là một trong những tác nhân sinh học đã được sử dụng rộng rãi để kiểm soát nhiều tác nhân gây hại thực vật, như virus, vi khuẩn, nấm, tuyến trùng và côn trùng gây hại. Nó có thể nhanh chóng tấn công và ngăn chặn sự phát triển của các tác nhân gây bệnh thực vật, đồng thời cải thiện sự phát triển của cây trồng thông qua nhiều cơ chế khác nhau (Al-Ani, 2018).

Xuất phát từ thực tiễn trên, chúng tôi đã tiến hành phân lập nấm *Trichoderma* spp. từ các mẫu rễ cây cà phê tại Đắk Lắk và đánh giá khả năng ký sinh tuyến trùng *Meloidogyne* sp. của chúng trong điều kiện *in vitro*.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Các dòng nấm *Trichoderma* spp. thu thập từ rễ cây cà phê vối tại các vùng bị tuyến trùng gây bệnh vàng lá chính của tỉnh Đắk Lắk: huyện Krông Ana, huyện Cư M'gar, huyện Krông Păk và huyện Cư Kuin.

- Tuyến trùng hại rễ cây cà phê vối: *Meloidogyne* sp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu thập mẫu

Thu thập mẫu rễ cây cà phê có biểu hiện bị bệnh vàng lá do tuyến trùng tại tỉnh Đắk Lắk: huyện Krông Ana, Cư M'gar, Krông Păk và Cư Kuin. Thu mẫu bổ sung tại các địa điểm có vườn cà phê lâu năm, sinh trưởng tốt và có hệ thống canh tác phù hợp (cây che bóng, sử dụng phân hữu cơ, ép xanh...). Mẫu đất được lấy theo phương pháp của Kim *et al.* (1998): gạt bỏ lớp đất mặt, mẫu rễ được thu thập trên các cây cà phê có biểu hiện triệu chứng nhiễm tuyến trùng, lấy rễ vị trí giữa hình chiếu tán, độ sâu 0 - 20 cm, ít nhất 10 g rễ/mẫu. Bảo quản mẫu ở nhiệt độ 4^{o}C nếu chưa phân lập ngay được.

2.2.2. Phương pháp phân lập nấm ký sinh

Các rễ cây cà phê có triệu chứng u sưng được thu thập, cắt riêng lẻ và khử trùng bề mặt. U sưng được cắt nhỏ, vortex trong nước cất vô trùng để thu trứng và tuyến trùng cái. Trứng và tuyến trùng cái được khử trùng bề mặt trong dung dịch NaOCl 0,5% trong 5 phút, rửa sạch bằng nước cất vô trùng và chuyển sang môi trường WA 1,5% có bổ sung kháng sinh Streptomycine (50 mg/1 lít môi trường). Nấm phát triển từ trứng và tuyến trùng cái sẽ cấy chuyền và làm thuần trên môi trường CMA.

2.2.3. Phương pháp định danh nấm Trichoderma

Các dòng nấm *Trichoderma* được định danh dựa vào hình thái. Một số chỉ tiêu được theo dõi: đường kính khuẩn lạc, màu sắc và cách tạo khuẩn lạc (cách mọc, số vòng), bào tử, cành sinh bào tử, bào tử hậu... được quan sát và định danh dựa vào khóa phân loại của Domsch & Gams (1972) và Gary & Prakash (2015).

2.2.4. Phương pháp sàng lọc tính đối kháng trong điều kiện invitro

Dùng phương pháp thỏi thạch để xác định hoạt tính ký sinh. Nấm đã làm thuần được cấy lên môi trường PGA trong đĩa petri để tạo khuẩn lạc đơn, sau 3 - 9 ngày, dùng khoan đầu tròn có đường kính 5 mm để khoan các thỏi thạch có chứa sợi nấm đặt ngược vào đĩa petri có chứa môi trường 1,5% WA để đánh giá khả năng ký sinh. Cứ mỗi đĩa petri, đặt 09 thỏi nấm chia thành 03 nhóm, mỗi nhóm 03 thỏi. Sau đó đem ủ từ 3 - 5 ngày ở 25^{o}C trong vòng 3 - 5 ngày. Nhỏ 30 µm dịch tuyến trùng và trứng (chứa khoảng 80 - 100 trứng) đã ly trích lên trên bề mặt mỗi thỏi nấm trên đĩa môi trường WA và đem ủ ở 25^{o}C. Đến thời điểm đánh giá, dùng dao cắt nhẹ lớp trên của thỏi thạch nấm đã nhỏ dịch tuyến trùng, đưa lên kính hiển vi quan sát ở độ phóng đại X 10; X 40 lần và tính tỷ lệ trứng bị ký sinh sau 1, 2, 3 ngày xử lý (Nguyen *et al.*, 2007). Xác định kiểu ký sinh của từng loại nấm lên trứng tuyến trùng. Mức độ ký sinh trứng tuyến trùng của nấm được phân thành 4 cấp: Đánh giá theo phương pháp kí sinh trực tiếp trên đĩa thạch, mức độ đối kháng được phân thành 4 cấp: Ký sinh mạnh (+++): tỷ lệ trứng tuyến trùng bị ký sinh trên 80%; ký sinh trung bình (++): tỷ lệ trứng tuyến trùng bị ký sinh từ 50 - 80%; ký sinh yếu (+): tỷ lệ trứng tuyến trùng bị ký sinh dưới 50%; và không ký sinh (-): tỷ lệ trứng tuyến trùng bị ký sinh 0%.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần nấm *Trichoderma* ký sinh tuyến trùng *Meloidogyne* sp. hại rễ cây cà phê phân lập được tại Đắk Lắk

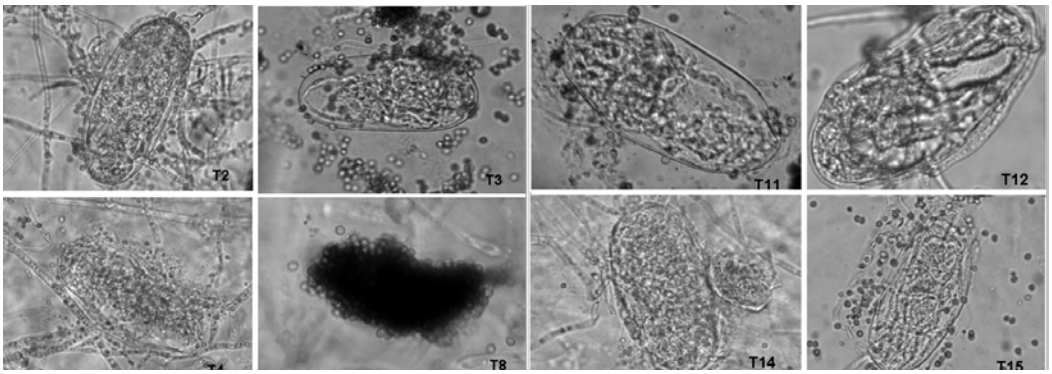
Từ 20 mẫu rễ cây cà phê, 44 dòng nấm *Trichoderma* đã được phân lập. Trong số đó, 10 dòng nấm có khả năng ký sinh trứng tuyến trùng *Meloidogyne* sp.. Thành phần nấm *Trichoderma* và khả năng ký sinh trứng tuyến trùng *Meloidogyne* sp. của chúng được ghi nhận trong bảng 3.1.

Kết quả cho thấy, sau 3 ngày theo dõi, 10 dòng nấm *Trichoderma* đã thể hiện khả năng ký sinh trứng tuyến trùng *Meloidogyne* sp.. Trong số đó, 7 dòng có mức độ ký sinh trứng tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong điều kiện in vitro mạnh (trên 80%) và 3 dòng có mức độ ký sinh yếu (dưới 50%). Mức độ ký sinh trứng tuyến trùng *Meloidogyne* sp. của tất cả các dòng nấm ký sinh đều tăng dần theo thời gian theo dõi. Kết quả này cũng tương đồng với các kết quả nghiên cứu trước đây về mức độ ký sinh của nấm *Trichoderma viride* và *Trichoderma harzianum* đối với tuyến trùng *Scutellonema* spp. và *Helicotylenchus* spp. theo thời gian (Chanu *et al.*, 2015).

Kiểu ký sinh trứng tuyến trùng *Meloidogyne* sp. của nấm *Trichoderma* spp. được chia thành 2 nhóm: làm tan trứng, xâm nhập vào bên trong trứng và tạo thành cụm bào tử (Hình 1).

Bảng 1. Khả năng ký sinh trứng tuyến trùng Meloidogyne sp. của nấm Trichoderma* spp. *phân lập tại Đắk Lắk

TT	Kí hiệu mẫu phân lập	Tỷ lệ kí sinh (%)			Khả năng ký sinh	Kiểu ký sinh
		Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3		
1	T1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
2	T2	18,5 ± 2,67	31,1 ± 2,57	81,5 ± 1,33	+++	Tan
3	T3	45,4 ± 3,41	80,83 ± 2,54	92,5 ± 2,60	+++	Xâm nhập, tạo búi
4	T4	37,0 ± 2,89	48,67 ± 1,76	82,0 ± 3,46	+++	Xâm nhập, tan
5	T5	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
6	T6	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
7	T7	13,7 ± 2,89	23,70 ± 0,98	22,2 ± 1,28	+	Tan
8	T8	56,7 ± 2,53	66,67 ± 1,10	85,0 ± 2,60	+++	Tan
9	T9	20,7 ± 1,6	31,85 ± 3,23	38,9 ± 2,80	+	Tan
10	T10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
11	T11	46,3 ± 2,60	74,17 ± 0,42	85,4 ± 1,10	+++	Xâm nhập, tạo búi
12	T12	37,4 ± 2,25	48,52 ± 3,03	82,0 ± 2,67	+++	Xâm nhập, tạo búi
13	T13	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
14	T14	30,0 ± 4,02	32,50 ± 3,31	40,0 ± 1,44	+	Búi, tan
15	T15	36,9 ± 3,98	71,50 ± 0,72	84,3 ± 3,15	+++	Xâm nhập, tạo búi
16	T16	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
17	T17-T44	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-



Hình 1. Kiểu kí sinh trứng tuyến trùng *Meloidogyne* sp. của các dòng nấm *Trichoderma* spp. phân lập được tại Đắk Lắk

Nghiên cứu của Sahebani và Hadavi (2008) cho biết nấm đối kháng *T. harzianum* BI kiểm soát tuyến trùng *Meloidogyne* sp. bằng cách xâm nhập vào bên trong trứng tuyến trùng và làm giảm đáng kể tỷ lệ nở của trứng. Các enzyme liên quan đến hoạt động này bao gồm peroxidase (POX), polyphenol oxidase (PPO) và phenylalanine ammonia lyase (PAL). Các sợi nấm *Trichoderma koningii* xâm nhập vào lớp biểu bì cơ thể của tuyến trùng và hút các chất dinh dưỡng bên trong cơ thể và gây ảnh hưởng đến tuyến trùng. Kết quả này

có thể là do nấm sản xuất các endo- và exo-chitinase, nhờ đó sợi nấm xâm nhập được vào lớp biểu bì của tuyến trùng Chanu *et al.* (2015).

3.2. Đặc điểm hình thái và phân loại của các dòng nấm *Trichoderma* spp. có mức độ ký sinh trứng tuyến trùng *Meloidogyne* sp. cao

3.2.1. Đặc điểm hình thái nấm Trichoderma

Qua các thí nghiệm thử tính ký sinh của các mẫu phân lập nấm phân lập được, chúng tôi đã tuyển chọn được 4 dóng nấm có khả năng ký sinh trứng tuyến trùng *Meloidogyne* sp. cao là các dòng T3, T8, T11, T15. Để có cơ sở nghiên cứu sâu hơn và định danh các dòng nấm *Trichoderma* spp. có mức độ ký sinh cao đối với trứng tuyến trùng *Meloidogyne* sp., chúng tôi đã nghiên cứu đặc điểm hình thái và định danh tên của bốn dòng nấm *Trichoderma,* gồm: T3, T8, T11 và T15. Nhân nuôi trên môi trường PGA, đặc điểm hình thái của 4 dòng nấm được trình bày trong Bảng 2.

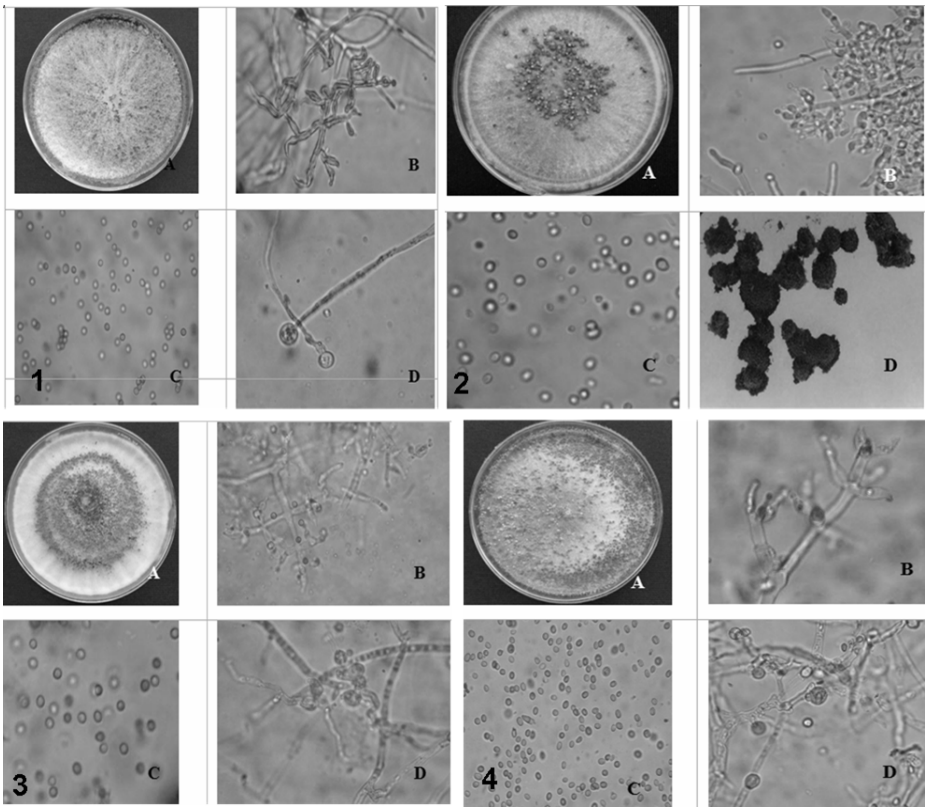
Bảng 2. Đặc điểm hình thái của một số dòng nấm Trichoderma trên môi trường PGA (sau 5 ngày nuôi cấy)

Ký hiệu nấm	Khuẩn lạc		Cành sinh bào tử	Bào tử		Hậu bào tử	
	KT (cm)	Hình thái	Đặc điểm	KT (µm)	Hình thái	KT (µm)	Hình thái
T3	9,0	Bột trắng hơi xanh, hệ sợi phát triển mạnh, mọc lan khắp đĩa tỏa đồng tâm.	Không màu, phân nhánh ít, đơn giản; Thể bình nhỏ, đơn độc.	3,0-5,0 × 1,9-4,3	Hình trứng hơi thuôn dài, xanh	6,7 x 8,5	Hình tròn đến gần tròn, xanh.
T8	9,0	Bột xanh nhạt, tạo thành 1 vòng đồng tâm lớn ở giữa đĩa và 1 vòng mọc lan ngoài mép đĩa.	Không màu, phân nhánh hình cây; Mang các thể bình lớn, tạo cụm lại với nhau.	3,5-5,1 × 2,7-3,5	Hình elip đến gần tròn, màu xanh	8,5 x 10,0	Hình tròn đến gần tròn, xanh
T11	9,0	Bột xanh đậm, tạo thành 1 vòng đồng tâm lớn ở giữa đĩa.	Không màu, phân nhánh hình cây, hơi vuông góc; Mang các thể bình tạo cụm lại với nhau.	2,0-5,0 × 1,8-4,0	Gần tròn, màu xanh	6,0 x 9,7	Tròn - gần tròn, xanh
T15	9,0	Bột xanh hơi trắng tạo thành các ụ, mọc lan khắp đĩa, môi trường màu vàng.	Không màu, phân nhánh ít và đơn giản; Mang các thể bình lớn đơn độc.	2,5-5,0 × 1,5-3,2	Hình trứng hoặc hơi thuôn dài, xanh	10,5 x 11,5	Tròn -gần tròn, màu xanh

Một số cơ chế có thể có liên quan đến khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma* spp. bao gồm: Sản sinh chất kháng sinh dễ bay hơi hoặc không bay hơi, cạnh tranh không gian sống hoặc chất dinh dưỡng (cacbon, nitơ, sắt, v.v.) với vật chủ và ký sinh trực tiếp làm cho thành tế bào ký chủ bị phân hủy bởi các enzym thủy phân do nấm *Trichoderma* tiết ra (Chet, 1987). *Trichoderma harzianum* sản sinh kháng sinh 6-pentyl-α-pyrone, có tác dụng kép ức chế sự phát triển của tác nhân gây bệnh và gen điều hòa sinh tổng hợp trichothecenes, một nhóm độc tố nấm mốc

có hoạt tính kháng khuẩn phổ rộng (Duffy *et al.*, 1996). *Trichoderma koningii* sản sinh enzym phân hủy thành tế bào - chitinase, β-1, 3- glucanase và cellulose - hỗ trợ quá trình xâm chiếm tế bào ký chủ của chúng (Chanu *et al.*, 2015). Enzyme thủy phân chitin *N*-acetyl-*β*-D-glucosamine (GlcNAc) sản sinh bởi nấm *Trichoderma aureoviride* DY-59 phân hủy thành tế bào của tác nhân gây bệnh (Nguyen *et al.*, 2008).

Ngoài khả năng đối kháng tốt với các tác nhân gây bệnh, *Trichoderma* spp. còn được đặc trưng bởi khả năng phân hủy tàn dư thực vật khá tốt, rất dễ được nuôi cấy trên nhiều loại môi trưởng khác nhau, phát triển khuẩn lạc nhanh chóng và sản sinh nhiều bào tử xanh lục. *Trichoderma* spp. cũng rất dễ bảo quản nên khả năng ứng dụng chúng ở điều kiện đồng ruộng là rất lớn.



Hình 2. Đặc điểm hình thái của 4 dòng nấm *Trichoderma* ký sinh mạnh

1. *Trichoderma koningii* T3; 2. *Trichoderma erinaceum* T8; 3. *Trichoderma hazianum* T11; 4. *Trichoderma astroviride* T15 ; A: khuẩn lạc; B: cành sinh bào tử (x400); C: bào tử đính (x1.000); D: bào tử hậu (x400)

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Đã phân lập được 44 dòng nấm *Trichoderma* spp. từ 20 mẫu đất và rễ trong vườn cây cà phê có biểu hiện vàng lá do tuyến trùng *Meloidogyne* sp.. Kết quả định danh hình thái và sàng lọc khả năng ký sinh trứng tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong điều kiện *in vitro*

đã xác định được 4 dòng nấm có triển vọng gồm: *Trichoderma koningii* T3; *Trichoderma erinaceum* T8; *Trichoderma hazianum* T11; và *Trichoderma astroviride* T15.

4.2. Đề nghị

Nghiên cứu sâu về sinh học phân tử, cơ chế đối kháng tuyến trùng *Meloidogyne* sp. hại rễ cây cà phê của bốn dòng nấm *Trichoderma* trên và khả năng áp dụng vào thực tiễn của các dòng nấm *Trichoderma* spp. này trong canh tác cà phê bền vững.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chế Thị Đa (2012). Báo cáo tổng kết đề tài Nghiên cứu biện pháp kỹ thuật tổng hợp trong tái canh cà phê vối ở Tây Nguyên, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên, Đắk Lắk.
2. Nguyễn Thị Lài và Đỗ Thị Mỹ Hiền (2019). "Thách thức trong xuất khuẩn cà phê tại Việt Nam hiện nay", Tạp chí Công thương, Vol. 9: 85 - 89.
3. Ủy ban nhân dân tỉnh Đắk Lắk (2013). Báo cáo Đề án tiếp tục phát triển cà phê bền vững tỉnh Đắk Lắk đến năm 2020, tầm nhìn 2030, Đắk Lắk.
4. Al-Ani, Laith (2018). "*Trichoderma*: Beneficial role in sustainable agriculture by plant disease management", in Dilfuza, Egamberdieva and Parvaiz, Ahmad, Plant microbiome: Stress response, Springer Nature Singapore Pte Ltd., Singapore, pp. 105 - 126.
5. Chanu, L. Bina, Mohilal, N. and Shah, M. Manjur (2015). "Evaluation of the efficiency of some antagonistic trichoderma spp. in the management of plant parasitic nematodes", in Mohammad, Manjur Shah, Microbiology in Agriculture and Human Health, pp. 3 - 30.
6. Chet, I. (1987). "Trichoderma - application, mode of action and potential as biocontrol agent of soil borne plant pathogenic fungi", in Chet, I., Innovative approaches to plant disease control, John Wiley & Sons, New York, pp. 137 - 160.
7. Domsch, K. H. and Gams, W. (1972). Fungi in agricultural soils, Longmans Green, London.
8. Duffy, B. K., Simon, A. and Weller, D. M. (1996). "Combination of Trichoderma koningii with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat", Phytopathol., Vol. 86: 188 - 194.
9. Gary, J Samuels and Prakash, K Hebbar (2015). Trichoderma: Identification and agricultural applications, American Phytopathological Society.
10. Kim, D. G., Riggs, R. D. and Correll, J. C. (1998). "Isolation, characterization, and distribution of a biocontrol fungus from cysts of Heterodera glycines", Phytopathology, Vol. 88(5): 465 - 471.
11. Nguyen, Van Nam, Kim, Young-Ju, Oh, Kyung-Taek, Jung, Woo-Jin and Park, Ro-Dong (2007). "The role of chitinase from Lecanicillium antillanum B-3 in parasitism to root-knot nematode Meloidogyne incognita eggs", Biocontrol Science and Technology, Vol. 17(10): 1047 - 1058.
12. Nguyen, Van Nam, Kim, Young-Ju, Oh, Kyung-Taek, Jung, Woo-Jin and Park, Ro-Dong (2008). "Antifungal activity of chitinases from Trichoderma aureoviride DY-59 and Rhizopus microsporus VS-9", Current Microbiology, Vol. 56(1): 28 - 32.
13. Sahebani, N. and Hadavi, N. (2008). "Biological control of the root-knot nematode Meloidogyne javanica by Trichoderma harzianum", Soil Biology and Biochemistry, Vol. 40(8): 2016 - 2020.

HIỆU QUẢ CỦA MỘT SỐ CHẾ PHẨM SINH HỌC TRONG PHÒNG TRỊ TUYẾN TRÙNG GÂY BỆNH VÀNG LÁ CHẾT CHẬM TRÊN CÂY TIÊU (*Piper nigrum* L.) TẠI HẬU GIANG

Nguyễn Quốc Thái[1], Lê Hoàng Xuyên[2], Nguyễn Thanh Phong[1], Phạm Vũ Linh [1] và Ngô Thị Kim Ngọc[1]

[1]Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Đại học Cửu Long
[2]Ban Quản lý Khu Nông nghiệp Ứng dụng công nghệ cao Hậu Giang

ABSTRACT

Bioproducts of SH-BV1, Tricô-ĐHCT and Agri-Fos 400 were used to evaluate the ability to control nematodes in soil and black pepper roots in Hau Giang province. The experiments in 2 black pepper orchards in Long My district and Vi Thanh city showed that all 3 bioproducts reduced nematode populations from 3 to 5 months after treatment (MAT), and could extend up to 7 MAT. In black pepper orchard in Long My district, the highest nematode control in soil was 97.1%; 93.0% and 90.7% in SH-BV1, Tricô-ĐHCT and Agri-Fos 400 from 1-3 MAT; while it reached 85.9%, 99.7% and 99.1% in black pepper roots in 5 MAT. In the black pepper orchard in Vi Thanh city, the efficiency of control efficacy in the soil of SH-BV1 was high from 3 to 7 MAT (efficiency at 78.4-99.3%); 75.8-99.3% with Agri-Fos 400 from 1-3 MAT and 62.8-78.4% with Tricô-ĐHCT at 1-5 MAT. At that time, the effectiveness of nematode prevention of these products in black pepper roots is also very high, up to over 95% in all 3 products from 3-7 MAT.

Keywords: *Agri-Fos 400, root knot nematode, pepper, Tricô-ĐHCT, SH-BV1.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hồ tiêu là cây công nghiệp có giá trị kinh tế cao, đem lại nhiều lợi nhuận cho người trồng trọt. Vì vậy, diện tích hồ tiêu trong giai đoạn 2010 - 2017 tăng rất nhanh, từ 51,500 ha (năm 2010) lên đến 152,668 ha (năm 2017), với năng suất và sản lượng cũng tăng cao. Kim ngạch xuất khẩu hồ tiêu năm 2017 đạt 1,117 triệu USD đưa Việt Nam trở thành quốc gia hàng đầu thế giới về sản xuất và xuất khẩu hồ tiêu. Tại Hậu Giang, nông dân ở các vùng đất phèn là Long Mỹ và Vị Thủy đã thành công khi đưa cây hồ tiêu trồng tại đây. Độc đáo nhất là nông dân đã cho cây tiêu leo trên cây trụ sống là

Người phản biện: TS. Lê Thanh Toàn.

cây tràm, một loại cây chỉ thị trên đất phèn ở Đồng bằng sông Cửu Long mà từ trước đến nay chưa ai nghĩ đến. Tuy nhiên, thực trạng sản xuất hồ tiêu vẫn còn nhiều tồn tại như sản xuất hồ tiêu thiếu bền vững, nông dân đầu tư thâm canh cao độ, sử dụng phân bón mất cân đối, thuốc bảo vệ thực vật,... Chính vì vậy, dịch bệnh trên cây tiêu ngày càng trở nên nghiêm trọng, đặc biệt là bệnh chết nhanh, chết chậm diễn ra phổ biến, mức độ ngày càng nặng, gây thiệt hại cho người trồng tiêu. Trong các bệnh hại trên tiêu thì bệnh chết nhanh do nấm *Phytophthora*, chết chậm hoặc héo vàng tiêu do nấm *Fusarium* hoặc tuyến trùng bướu rễ là những bệnh hại nghiêm trọng nhất trên cây trồng này. Tuyến trùng gây bướu rễ tiêu thông thường là do chi *Meloidogyne* gây ra, ngoài tác hại trực tiếp, tuyến trùng còn tạo vết thương dẫn đường cho nấm xâm nhập như *Phytopthora* gây bệnh chết nhanh, *Fusarium* sp. gây vàng lá thối rễ dẫn đến hại nghiêm trọng đến sinh trưởng và phát triển của cây hồ tiêu, thậm chí có thể gây chết. Biện pháp phòng trừ tuyến trùng gây hại của nông dân chủ yếu vẫn là sử dụng các loại thuốc hóa học. Tuy nhiên, việc sử dụng các loại thuốc hóa học liên tục và trong thời gian dài sẽ làm sẽ dẫn đến các hiện tượng kháng thuốc, mất cân bằng sinh thái và vi sinh vật đất, dễ dẫn đến hiện tượng bộc phát các dịch bệnh khác và đặc biệt là ảnh hưởng môi trường và tồn dư thuốc trong nông sản. Đứng trước tình hình đó, đánh giá hiệu quả của các chế phẩm sinh học lên tuyến trùng gây hại trên cây tiêu ở mô hình canh tác tiêu tràm tại Hậu Giang là vấn đề cấp thiết cần thực hiện để có khuyến cáo phù hợp cho nông dân trồng tiêu theo hướng an toàn sinh học, nâng cao năng suất, giá trị kinh tế cũng như chất lượng tiêu.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu thí nghiệm

Chế phẩm sinh học SH-BV1, bao gồm các thành phần: thảo mộc trừ tuyến trùng Saponin, Alkaloid, Azadirachtin và dầu thực vật có độc tính mạnh với tuyến trùng ký sinh thực vật, nấm đối kháng (*Trichoderma hazianum*), VSV ức chế bệnh (*Bacillus subtilis*), nấm trừ sâu hại trong đất (*Metarhizium anisopliae*), vi khuẩn cố định nitơ (*Azotobacter beijerinckii*); vi khuẩn phân giải lân khó tan (*Bacillus gisengihumi*), xạ khuẩn phân giải Cellulose (*Streptomyces owasiensis*) và các phụ gia khác. SH-BV1 có tác dụng phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh hại rễ cây hồ tiêu, cà phê. SH-BV1 do Viện Bảo vệ thực vật và Viện Thổ những Nông hóa sản xuất.

Chế phẩm sinh học Tricô-ĐHCT có thành phần chủ yếu là các chủng nấm đối kháng *Trichoderma* có khả năng ký sinh tuyến trùng gây hại thực vật, đối kháng với các loài nấm trong đất gây bệnh cây trồng, đặc biệt là các loài cây có múi. Bên cạnh đó, nấm *Trichoderma* còn có khả năng phân giải chất hữu cơ, giúp cây trồng sinh trưởng và phát triển mạnh hơn. Chế phẩm do Trường Đại học Cần Thơ nghiên cứu và sản xuất.

Chế phẩm Agri-Fos 400 có hoạt chất là Phosphonate trong hỗn hợp 2 muối KH_2PO_3 (Mono - potassium phosphonate) và K_2HPO_3 (di - potassium phosphonate) có vai trò chính như là chất kích thích tính kháng bệnh ở cây trồng nhờ vào ion HPO_3^{2-}, thuốc có hiệu quả làm giảm sự tấn công gây hại của tuyến trùng và kích kháng đối với nấm *Phytopthora* và các nấm khác. Chế phẩm được sản xuất bởi Công ty Dona-Techno.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện đồng thời và riêng biệt tại 2 vườn trồng tiêu tràm 3,5 năm tuổi tại huyện Long Mỹ và thành phố Vị Thanh của tỉnh Hậu Giang. Ở mỗi vườn, thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 nghiệm thức và 5 lần lặp lại (6 nọc tiêu/lặp lại), những cây được chọn có những biểu hiện đặc trưng về bệnh tuyến trùng gây bướu rễ. Các nghiệm thức gồm:

- Nghiệm thức 1: Tưới chế phẩm nấm Tricô - ĐHCT (40g/nọc tiêu tương đương 8 kg/1.000 m^2). Cách xử lý: hòa chế phẩm nấm Tricô - ĐHCT với nước và tưới xung quanh gốc tiêu, cách gốc tiêu khoảng 30 - 40 cm.

- Nghiệm thức 2: Chế phẩm Agri - Fos 400. Cách xử lý: tưới đều cách gốc tiêu khoảng 30 - 40 cm. Cách ly thuốc bảo vệ thực vật và phân bón trước sau 72 giờ (6l cho 1 ha tương đương 0,6l cho 1.000 m^2 cho một lần).

- Nghiệm thức 3: Chế phẩm sinh học SH-BV1, bón 0,5 kg/nọc. Cách ly thuốc bảo vệ thực vật và phân bón trước sau 72 giờ.

- Nghiệm thức 4 (đối chứng): Không sử dụng chế phẩm.

Các chế phẩm được xử lý một lần vào đầu mùa mưa.

**** Thu mẫu đất và rễ***

Các mẫu đất và rễ tiêu được thu vào các thời điểm 1 ngày trước xử lý (TXL) chế phẩm và 1 tháng, 3 tháng, 5 tháng, 7 tháng sau khi xử lý (SXL) chế phẩm. Tiến hành thu mẫu đất và mẫu rễ cây tiêu để đếm mật số tuyến trùng gây hại. Mẫu đất được thu bằng khoan đất, đục 4 lỗ có đường kính 3 cm, sâu 20 cm ở xung quanh gốc của nọc tiêu, cách gốc tiêu 30 cm, mỗi mẫu đất thu ở 4 điểm được trộn chung với nhau để lấy ra 100 g đất đem đi phân tích. Rễ tiêu cũng được thu ở vị trí tương tự, cách gốc tiêu 30 cm, rễ tiêu được thu lên và cắt các đoạn có chiều dài khoảng 5 - 10 cm ở mỗi điểm thu mẫu đối xứng qua gốc tiêu, trọng lượng rễ tiêu trên 5 g. Sau đó tiến hành xác định mật số tuyến trùng trong đất và rễ tiêu bằng phương pháp lọc tĩnh.

Ghi nhận số lượng tuyến trùng ly trích được từ các mẫu rễ và đất thu thập. Từ đó tính hiệu quả phòng trị tuyến trùng của các chế phẩm theo công thức Henderson-Tilton.

2.3. Xử lý số liệu

Các số liệu được tổng hợp với phần mềm Excel 2010 và phân tích phương sai một chiều, trắc nghiệm phân hạng qua phép thử Duncan 5% với phần mềm SPSS 16.0.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đối với tuyến trùng trong đất trồng tiêu

3.1.1. Tại vườn tiêu ở huyện Long Mỹ

Kết quả ghi nhận tại Bảng 1 về mật số tuyến trùng có trong 50 g đất vùng rễ tiêu cho thấy ở cả 3 nghiệm thức sử dụng các chế phẩm SH-BV1, Agri - Fos 400 và Tricô - ĐHCT đều làm giảm mật số tuyến trùng sau khi sử dụng. Trong khi ở nghiệm thức đối chứng mật số tuyến trùng gần như là không thay đổi trong thời gian thí nghiệm. Theo đó, hiệu quả của SH-BV1, Tricô-ĐHCT và Agri-Fos 400 lần lượt tăng lên đến 97,1%; 93,0% và 90,7%.

Ở các nghiệm thức có sử dụng các chế phẩm đều đạt hiệu quả cao nhất trong khoảng từ sau 1 - 5 tháng sau khi xử lý, đến tháng thứ 7 bắt đầu có sự giảm hiệu quả của các chế phẩm. Sự giảm hiệu quả của SH-BV1 và Tricô-ĐHCT có thể do nguồn phân hữu cơ bón từ khi xử lý ban đầu không còn đủ cung cấp cho nấm sinh trưởng và phát triển nên hiệu quả của các chế phẩm có dấu hiệu giảm.

3.1.2. Tại vườn tiêu ở thành phố Vị Thanh

Kết quả ghi nhận tại Bảng 2 cho thấy các chế phẩm đều có hiệu quả trong việc làm giảm mật số tuyến trùng trong đất. Theo đó, chế phẩm SH-BV1 có hiệu quả làm giảm tuyến trùng từ 3 tháng SXL (sau xử lý) và kéo dài đến 7 tháng SXL, chế phẩm Agri-Fos 400 có thời gian duy trì hiệu quả ngắn hơn khi ghi nhận có hiệu quả trên 75% ở 1 và 3 tháng SXL, các thời điểm sau đó, mật số tuyến trùng ở nghiệm thức xử lý chế phẩm này không khác biệt với ở nghiệm thức đối chứng. Tương tự, việc xử lý Tricô-ĐHCT trong đất trồng tiêu cũng có hiệu quả giảm tuyến trùng theo ghi nhận từ thời điểm 1 tháng SXL đến 5 tháng SXL.

Bảng 1. Hiệu quả phòng trị tuyến trùng trong đất rễ tiêu của các chế phẩm sinh học tại Long Mỹ, Hậu Giang, 2018 - 2019

Nghiệm thức	Mật số tuyến trùng trong đất (con/50g)					Hiệu quả phòng trị (%)			
	1 ngày TXL	1 tháng SXL	3 tháng SXL	5 tháng SXL	7 tháng SXL	1 tháng SXL	3 tháng SXL	5 tháng SXL	7 tháng SXL
SH-BV1	327,4	25,0^{b}	6,4^{c}	40,2^{b}	164,6	88,6	97,1	77,5	0,0
Agri - Fos 400	329,6	15,4^{b}	26,2^{b}	36,0^{b}	89,8	93,0	88,2	80,0	39,7
Tricô - ĐHCT	334,4	52,2^{b}	21,0^{b}	41,2^{b}	222,6	76,7	90,7	77,4	0,0
Đối chứng	280,4	187,6^{a}	189,0^{a}	153,2^{a}	126,6	0,0	0,0	0,0	0,0
Mức ý nghĩa	*ns*	**	**	**	*ns*	-	-	-	-
CV (%)	*7,7*	*20,0*	*9,0*	*8,2*	*18,5*	-	-	-	-

Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có cùng chữ theo sau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê; mật số tuyến trùng được chuyển sang log(x) trước khi phân tích thống kê, (**): khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1%, ns: không khác biệt.

Bảng 2. Hiệu quả phòng trị tuyến trùng trong đất rễ tiêu của các chế phẩm sinh học tại Vị Thanh, Hậu Giang 2018 - 2019

Nghiệm thức	Mật số tuyến trùng trong đất (con/50 g)					Hiệu quả phòng trị (%)			
	1 ngày TXL	1 tháng SXL	3 tháng SXL	5 tháng SXL	7 tháng SXL	1 tháng SXL	3 tháng SXL	5 tháng SXL	7 tháng SXL
SH-BV1	133,8^{b}	172,0^{a}	1,0^{b}	34,0^{b}	1,0^{c}	0,0	99,3	78,4	98,7
Agri - Fos 400	144,0^{b}	39,2^{b}	1,0^{b}	92,0^{a}	63,6^{b}	75,8	99,3	45,7	26,0
Tricô - ĐHCT	369,8^{a}	155,2^{a}	143,2^{a}	94,0^{a}	167,6^{a}	62,8	63,1	78,4	24,1
Đối chứng	131,0^{b}	147,6^{a}	137,4^{a}	154,0^{a}	78,2^{b}	0,0	0,0	0,0	0,0
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**	-	-	-	-
CV (%)	*7,2*	*6,7*	*13,1*	*8,0*	*8,3*	-	-	-	-

Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có cùng chữ theo sau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê; mật số tuyến trùng được chuyển sang log(x) trước khi phân tích thống kê, (**): khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1%.

3.2. Đối với tuyến trùng trong rễ tiêu

3.2.1. Tại vườn tiêu ở huyện Long Mỹ

Kết quả Bảng 3 cho thấy, mật số tuyến trùng trong rễ tiêu cũng giảm mạnh sau khi xử lý các chế phẩm. Trong khi đó ở nghiệm thức đối chứng mật số tuyến trùng có dấu hiệu tăng lên cao hơn trong sau 7 tháng.

Sau 1 tháng xử lý, cả 3 chế phẩm đều cho kết quả tốt khi hiệu quả phòng trị đều đạt trên 78%. Hiệu quả này được duy trì và tăng lên cao nhất ở thời điểm 5 tháng sau xử lý, SH-BV1, Tricô-ĐHCT và Agri-Fos 400 lần lượt đạt đến 85,9%, 99,7% và 99,1%.

3.2.2. Tại vườn tiêu ở thành phố Vị Thanh

Kết quả ghi nhận tại Bảng 4 cũng ghi nhận các chế phẩm cũng có hiệu quả trong việc làm giảm mật số tuyến trùng trong rễ tiêu, trong khi đối chứng có xu hướng tăng số lượng tuyến trùng. Tuy nhiên, hiệu quả phòng trị tuyến trùng trong rễ của các chế phẩm thể hiện chậm hơn so với vườn ở Long Mỹ, khi các chế phẩm đạt hiệu quả cao và rõ rệt là ở thời điểm 3 tháng sau xử lý, lên tới trên 95%. Đồng thời hiệu quả phòng trị tốt này cũng được duy trì đến 7 tháng sau xử lý.

Bảng 3. Hiệu quả phòng trị tuyến trùng trong rễ tiêu của các chế phẩm sinh học tại Long Mỹ, Hậu Giang, 2018 - 2019

Nghiệm thức	Mật số tuyến trùng trong rễ (con/5 g)					Hiệu quả phòng trị (%)			
	1 ngày TXL	1 tháng SXL	3 tháng SXL	5 tháng SXL	7 tháng SXL	1 tháng SXL	3 tháng SXL	5 tháng SXL	7 tháng SXL
SH-BV1	177,0^{a}	95,8^{b}	133,0^{a}	41,0^{b}	165,8	78,2	68,2	85,9	75,3
Agri - Fos 400	190,0^{a}	101,8^{b}	1,0^{b}	1,0^{c}	309,4	78,4	99,8	99,7	57,1
Tricô - ĐHCT	141,6^{a}	58,0^{c}	138,2^{a}	2,0^{c}	407,0	83,5	58,7	99,1	24,3
Đối chứng	59,2^{b}	147,0^{a}	139,8^{a}	97,4^{a}	224,8	0,0	0,0	0,0	0,0
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	*ns*	-	-	-	-
CV (%)	*7,1*	*4,6*	*8,2*	*20,8*	*8,3*	-	-	-	-

Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có cùng chữ theo sau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê; mật số tuyến trùng được chuyển sang log(x) trước khi phân tích thống kê, (**): khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1%, ns: không khác biệt.

Bảng 4. Hiệu quả phòng trị tuyến trùng trong rễ tiêu của các chế phẩm sinh học tại Vị Thanh, Hậu Giang 2018 - 2019

Nghiệm thức	Mật số tuyến trùng trong rễ (con/5 g)					Hiệu quả phòng trị (%)			
	1 ngày TXL	1 tháng SXL	3 tháng SXL	5 tháng SXL	7 tháng SXL	1 tháng SXL	3 tháng SXL	5 tháng SXL	7 tháng SXL
SH-BV1	118,2^{a}	305,2^{a}	195,0^{a}	1,0^{b}	76,4^{b}	0,0	96,8	100,0	99,3
Agri - Fos 400	115,6^{a}	84,2^{b}	81,6^{b}	108,0^{a}	94,0^{b}	27,2	98,6	98,9	99,1
Tricô - ĐHCT	91,4^{a}	49,8^{c}	1,0d	86,0^{a}	172,4^{a}	45,5	100,0	98,9	97,8
Đối chứng	1,0^{b}	1,0^{d}	52,0^{c}	82,0^{a}	86,2^{b}	0,0	0,0	0,0	0,0
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**	-	-	-	-
CV (%)	*4,7*	*6,8*	*5,4*	*6,8*	*6,2*	-	-	-	-

Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có cùng chữ theo sau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê; mật số tuyến trùng được chuyển sang log(x) trước khi phân tích thống kê, (**): khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1%.

Với các kết quả trên, cho thấy chế phẩm SH-BV1, Agri-Fos 400 và Tricô-ĐHCT có hiệu quả trong việc khống chế tuyến trùng gây bướu rễ cây tiêu tại Hậu Giang và khi bón 1 lần thì các chế phẩm này thể hiện hiệu quả cao từ 3 đến 5 tháng hoặc lâu hơn tùy vào chế phẩm và điều kiện canh tác, đặc biệt là sự bổ sung phân hữu cơ từ nông dân trong quá trình chăm sóc sẽ giúp chế phẩm sinh học SH-BV1 và Tricô-ĐHCT gia tăng khả năng nhân mật số vi sinh vật có lợi (nấm và vi khuẩn), từ đó gia tăng khả năng đối kháng, khả năng cạnh tranh thức ăn hoặc khả năng cạnh tranh về không gian sống với nấm và tuyến trùng gây bệnh, duy trì hiệu quả lên đến 5 hoặc 7 tháng sau xử lý. Trong khi chế phẩm Agri-Fos 400 tác động vào bên trong cây theo cơ chế kích kháng nên ít chịu sự ảnh hưởng từ việc bón bổ sung phân hữu cơ. Ngoài ra, việc nông dân để lá tràm trên liếp trồng tiêu cũng có ảnh hưởng tích cực trong việc hạn chế sự phát triển của tuyến trùng (Lê Hoàng Xuyên *et al.*, 2019). Theo Đỗ Thị Kiều An *et al.* (2015), các sợi nấm *Trichoderma* spp. bao lấy trứng tuyến trùng tạo thành búi, làm tan hoàn toàn trứng. Sợi nấm *Trichoderma* có khả năng phát triển trên bề mặt trứng tuyến trùng và tiết enzyme chitinase và xâm nhiễm qua vỏ trứng tuyến trùng (Fatemeh Naserinasab *et al.*, 2011). Đồng thời, *Trichoderma* còn có khả năng tấn công tuyến trùng bằng cách tạo ra các bẫy để siết chết tuyến trùng gây hại cây trồng (Phạm Văn Kim, 2000). Ngoài *Trichoderma,* trong thành phần của SH-BV1 còn có các vi sinh vật có lợi khác như *A. beijerinckii, B. gisengihumi, S. owasiensis, B. subtilis* và *M. anisopliae*, các vi sinh vật này góp phần sinh ra các chất kháng sinh để tiêu diệt tuyến trùng và các nấm gây hại khác. Kết quả thử nghiệm SH-BV1 tại vùng đất cao nguyên Gia Lai của

Nguyễn Thị Chúc Quỳnh *et al.* (2016) cho thấy, khi bón định kỳ 2 lần/năm và liên tục trong 3 năm thì chế phẩm SH-BV1 có hiệu lực phòng trừ tuyến trùng hại rễ hồ tiêu đạt 59,60 - 82,98%, cao nhất ở thời điểm 24 - 29 tháng sau lần bón đầu, đồng thời tiêu sinh trưởng khỏe, không bị tụt trụ so với đối chứng của nông dân sử dụng Nokaph 25EC. Kết quả này có chậm hơn so với thử nghiệm tại Hậu Giang, có thể do nông dân có tăng cường sử dụng phân hữu cơ và duy trì lớp lá tràm rụng trên nền liếp trồng tiêu, giúp tăng cường sự phát triển của các vi sinh vật trong chế phẩm. Mặt khác, các nghiên cứu của Ngô Văn Dũng *et al.* (2016) và Nguyễn Thị Chúc Quỳnh *et al.* (2016) cũng xác định SH-BV1 có hiệu quả cao trong phòng trừ tuyến trùng hại cà rốt tại Lâm Đồng và Hải Dương, hoặc tuyến trùng hại cà phê tại Đắk Nông. Với chế phẩm Agri-Fos 400, hoạt chất Phosphonate trong hỗn hợp 2 muối KH_2PO_3 và K_2HPO_3 giúp thuốc được hấp thụ vào cây sẽ phân ly thành các loại ion K^+ và HPO_3^{2-} lưu dẫn 2 chiều. Các anion trong Agri-fos 400 sẽ sản sinh các PR-protein cũng như các chất làm dày vách tế bào Polysaccharides để hạn chế sự xâm nhập của tuyến trùng gây hại. Vì vậy, thuốc có tác dụng hạn chế bệnh do tuyến trùng (Phạm Ngọc Dung, 2011).

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Các chế phẩm thử nghiệm ở Long Mỹ và Vị Thanh thể hiện rõ rệt hiệu quả trong việc làm giảm mật số tuyến trùng trong rễ tiêu và đất trồng tiêu trong khoảng thời gian từ 3 đến 5 tháng sau xử lý, và còn có thể kéo dài đến 7 tháng sau xử lý. Tại vườn tiêu ở huyện Long Mỹ, hiệu quả phòng trừ tuyến trùng cao nhất trong đất trồng tiêu lần lượt là 97,1%; 93,0% và 90,7% ở SH-BV1, Tricô-ĐHCT và Agri-Fos 400 từ 1-3 tháng SXL; trong khi ở rễ tiêu đạt đến 85,9%, 99,7% và 99,1% ở 5 tháng SXL. Trong khi đó, kết quả tại vườn tiêu ở thành phố Vị Thanh ghi nhận hiệu quả phòng trừ tuyến trùng trong đất trồng của SH-BV1 cao ở 3 đến 7 tháng SXL (đạt hiệu quả 78,4-99,3%); Agri-Fos 400 đạt 75,8 - 99,3% ở 1 - 3 tháng SXL, Tricô-ĐHCT đạt 62,8 - 78,4% ở 1 - 5 tháng SXL. Đồng thời, hiệu quả phòng trị tuyến trùng trong rễ cũng đạt ở mức rất cao, lên đến trên 95% ở cả 3 chế phẩm từ 3 - 7 tháng SXL.

4.2. Đề nghị

Sử dụng Agri-Fos 400, SH-BV1 và Tricô-ĐHCT trong quá trình canh tác cây hồ tiêu để giúp khống chế tuyến trùng gây hại rễ.

Lời cám ơn

Nhóm thực hiện chân thành cám ơn Ban Quản lý Khu Nông nghiệp Ứng dụng công nghệ cao Hậu Giang đã cấp kinh phí để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Thị Kiều An, Hoàng Ngọc Duyên, Nguyễn Văn Nam (2015). Sàng lọc và đánh giá khả năng đối kháng của một số chủng vi nấm đối với tuyến trùng *Meloidogyne incognita* gây hại cây hồ tiêu. Kỷ yếu Hội nghị Khoa học BVTV toàn quốc năm 2015.

2. Fatemeh N., Sahebani N. and Etebarian H. R. (2011). Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum* BI and salicylic acid on Tomato. African Journal of Food Science Vol. 5(3) pp. 276 - 280 April 2011.

3. Lê Hoàng Xuyên, Nguyễn Quốc Thái, Nguyễn Nhật Trường và Lưu Hoàng Hội (2019). Ảnh hưởng của dịch trích lá, dịch trích rễ và đất vùng rễ của cây tràm ta (*Melaleuca cajuputi* Powel.) lên tuyến trùng gây bướu rễ, nấm *Phytophthora* spp. và *Fusarium* spp. gây hại trên cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) trong điều kiện *in vitro*. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Trà Vinh

4. Ngô Văn Dũng, Phạm Thị Vượng, Đặng Thị Lan Anh, Phạm Văn Sơn và Hà Thị Kim Thoa (2016). Kết quả ứng dụng một số chế phẩm sinh học trong phòng chống tuyến trùng hại cà rốt. Hội thảo Quốc gia về Khoa học cây trồng, lần thứ 2. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Tr. 948 - 954.

5. Nguyễn Thị Chúc Quỳnh, Trần Văn Huy, Nguyễn Thu Hà, Lê Văn Trình, Vũ Thị Hiền, Phạm Thị Minh Thắng và Phùng Quang Tùng (2016). Nghiên cứu sản xuất, ứng dụng chế phẩm sinh học SH-BV1 phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh hại rễ hồ tiêu, cà phê ở Gia Lai và Đăk Nông. Hội thảo quốc gia về khoa học cây trồng, lần thứ 2. Nhà xuất bản nông nghiệp. Tr. 960 - 965.

6. Phạm Ngọc Dung (2011). Báo cáo tổng kết "Nghiên cứu ứng dụng các giải pháp khoa học công nghệ quản lý tổng hợp bệnh hại chủ yếu trên cây hồ tiêu nhằm nâng cao hiệu quả sản xuất và thu nhập cho người dân nghèo tỉnh Quảng Trị". Viện Bảo vệ thực vật, Hà Nội.

7. Phạm Văn Kim (2000). Nguyên lý bệnh hại cây trồng, Trường Đại học Cần Thơ.

MỘT SỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TUYẾN TRÙNG HẠI CHÈ *Pratylenchus* spp. Ở VÙNG MIỀN NÚI PHÍA BẮC

Nguyễn Văn Thiệp, Nguyễn Thị Kim Oanh, Trịnh Thị Kim Mỹ, Trần Đặng Việt, Nguyễn Huy Thịnh

Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp miền núi phía Bắc

ABSTRACT

Nowadays, tea production has been facing many challenges due to epidemics. Nematodes are pests of the roots of tea plants. They cause of stunted plants, leaves smaller and turn yellow which lead to reduce productivity. The survey results of tea gardens in Phu Tho, Yen Bai and Thai Nguyen provinces in 2018 demonstrate that there are 23,44% to 30,12% of the gardens infected with Pratylenchus spp. The nematode density ranged from 28,37 to 35,23 individuals/100g of soil and from 36,35 to 48,29 individuals/2g tea roots. After 6 months, in greenhouse conditions, infection of Pratylenchus spp in plants with the density of 10, 100 and 500 individuals/pot, disease indexes were 25,42%, 52,14% and 74,8%, respectively.

Keywords: *Tea garden, nematode, Pratylenchus spp., nematode density, stunt.*

I. GIỚI THIỆU

Chè là cây công nghiệp quan trọng ở vùng trung du, miền núi, trong gần 130 ngàn ha chè, có khoảng 70% ở vùng miền núi phía Bắc. Sản xuất chè mặc dù đạt nhiều thành tựu, nhưng cũng đối diện nhiều khó khăn do biến đổi khí hậu và dịch bệnh ngày càng phức tạp. Đặc biệt những bệnh ở rễ thường nguy hiểm và khó phòng trừ. Theo Nguyễn Văn Hùng *và cộng sự* (1998) bệnh hại rễ chè do một số loài nấm và tuyến trùng gây ra. Tuyến trùng hại làm cho cây mọc yếu, lá chè nhỏ lại mầu vàng, năng suất và chất lượng chè bị giảm sút. Có 2 loại tuyến trùng hại chè là nhóm gây nốt sần ở rễ và nhóm gây hại rễ tơ của cây chè. Tuyến trùng hại rễ tơ cây chè phát hiện ở Chí Linh và Phú Thọ được xác định là loài *Pratylenchus loosi* (Nguyễn Văn Hùng *và cs.*, 2000).

Trên thế giới, bệnh tuyến trùng hại rễ chè khá phổ biến. Tuyến trùng ký sinh tạo thành khối u trên rễ chè được phát hiện ở Ceylon năm 1928 bởi Stuart Light, loài này phá hoại mạnh trong các vườn ươm chè con. Tuyến trùng gây thối rễ chè xác nhận năm 1930 được đặt tên là *Anguillulina pratensis* sau này gọi là *Pratylenchus loosi* Loof (1960). Loài này gây hại cả chè con trong vườn ươm và cây trưởng thành, là loài phổ biến nhất, được coi là nguy cơ gây thiệt hại kinh tế

Người phản biện: PGS.TS. Trần Quang Tấn.

nghiêm trọng cho cây chè ở Sri Lanka (Hutchinson M. T., 1960; Sivapalan P., 1964). Loài *Pratylenchus loosi* cũng phổ biến và nghiêm trọng ở nhiều nước trồng chè như Iran (Rahanandeh *et al.,* 2012), Ấn Độ (Mukherjee B., Dasgupta M.K., 1982), Nigeria (Samuel B. Orisaja, 2012)... Để phòng trừ hiệu quả bệnh tuyến trùng hại chè, cần tìm hiểu cặn kẽ loài tuyến trùng trong hệ sinh thái vườn chè. Trong phạm vi bài viết này, chúng tôi trình bày một số kết quả nghiên cứu về tình hình gây hại của tuyến trùng *Pratylenchus* spp. trên chè ở một số tỉnh vùng miền núi phía Bắc.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Cây cà chè *Camellia sinensis*, tuyến trùng *Pratylenchus* spp. phân lập từ đất và rễ cây chè nhiễm tuyến trùng.

- Điều tra thực hiện trên các vườn chè có tuổi từ 8 - 20 năm.

2.2. Phương pháp điều tra, thu thập mẫu chè thối rễ

Điều tra, thu thập mẫu thực hiện từ tháng 6/2018 đến tháng 12/2018 trên các vườn chè ở Phú Thọ; Yên Bái và Thái Nguyên. Ở mỗi tỉnh khảo sát 15 vườn chè đại diện cho vùng chè chính của địa phương. Đánh giá vườn chè, cây chè có biểu hiện triệu chứng bị bệnh tuyến trùng như lá vàng, chậm phát triển. Mẫu đất và rễ được lấy ở vùng rễ non, độ sâu từ 0 - 20 cm ở 4 hướng của cây, trộn đều lấy 1 kg đất. Mỗi vườn lấy 15 cây ở 5 vị trí theo đường chéo góc, mỗi vị trí lấy ngẫu nhiên 3 cây. Tỷ lệ bệnh (%) = Số cây bị bệnh/Tổng số cây điều tra × 100.

2.3. Phương pháp phân lập, xác định mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* spp.

Tách tuyến trùng từ mẫu đất thheo phương pháp dùng khay Whitehead kết hợp kỹ thuật phễu Baermann cải tiến (Roger Shivas *et al.,* 2005). Cho 100 g đất vào khay nhựa có lót lưới thô và giấy thấm, dàn đều đất thành một lớp mỏng, đổ nước cho thấm ướt đất. Sau 3 - 4 ngày lấy nước dưới đáy khay cho vào cốc thủy tinh, gạn bỏ phần nước không có tuyến trùng, giữ lại khoảng 5 - 20 ml để đếm tuyến trùng.

Tuyến trùng được phân lập từ rễ chè bằng phương pháp chiết xuất sương mù. Nước được thu thập trong một ống nghiệm mà tuyến trùng lắng đọng sau 2 - 4 ngày. Gạn nước trong ống cẩn thận theo phương pháp của Bezooijen (2006) cải tiến. Đếm số lượng tuyến trùng trên kính hiển vi. Xác định tuyến trùng *Pratylenchus* spp. dựa vào đặc điểm hình thái thực hiện theo Cristina and Herrera S. (2011).

2.4. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* spp. đến bệnh thối rễ cây chè

Thí nghiệm lây nhiễm tuyến trùng vào cây chè con trồng trong chậu có đất đã được khử trùng gồm 4 công thức: (1) Đối chứng, không thả tuyến trùng; (2) Thả 10 cá thể tuyến trùng/chậu; (3) Thả 100 con/chậu và (4) Thả 500 con/chậu. Mỗi công thức 15 chậu cây. Thí nghiệm bố trí theo khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh. Sau khi nhiễm tuyến trùng 3 tháng, 6 tháng nhổ cây đánh giá, mỗi lần nhổ 5 cây/công thức, tương ứng với 5 lần nhắc lại. Đánh giá các chỉ tiêu sau:

Tỷ lệ cây nhiễm tuyến trùng (%) = (số cây nhiễm/tổng số cây quan sát) × 100;

Chỉ số bệnh (%) = (∑ab) × 100/N × 4, trong đó: a là số cây bị thối rễ ở các cấp, b là cấp bệnh tương ứng, N là số cây quan sát, 4 là cấp bệnh cao nhất. Quy ước rễ cây bị tổn thương như sau: cấp 1- rễ cây bị tổn thương từ 1 - 25%, cấp 2- rễ bị tổn thương từ 26 - 50%, cấp 3- rễ bị tổn thương từ 51 - 75%, cấp 4- rễ bị tổn thương > 75%; Đo sinh trưởng chiều cao cây, chiều dài rễ cọc; cân khối lượng thân, rễ cây; mật độ tuyến trùng trong rễ, đất.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Điều tra bệnh hại rễ cây chè do tuyến trùng

Kết quả điều tra cho thấy tỷ lệ vườn chè có biểu hiện triệu chứng bệnh tuyến trùng bệnh hại rễ ở các tỉnh là tương đương nhau do sai khác không có ý nghĩa (Bảng 1) từ 22,14 - 30,12%. Tuy vậy, tỷ lệ cây có triệu chứng bị hại trong vườn lại khác nhau, theo đó ở Phú Thọ có 18,12% số cây trong vườn có triệu chứng bệnh tuyến trùng, Yên Bái có 15,16% tương đương ở Phú Thọ, ở Thái Nguyên là 12,08%, tương tự như Yên Bái, nhưng thấp hơn ở Phú Thọ. Kiểm tra rễ của các cây có triệu chứng biểu hiện qua lá, cành chè, thấy tỷ lệ cây bị thối rễ do tuyến trùng có khác nhau ở các địa phương. Phú Thọ có tỷ lệ cây bị thối rễ chiếm 85,42% trong số cây có triệu chứng ở phần trên mặt đất, ở Yên Bái là 76,22% tương đương như ở Phú Thọ, tỷ lệ này ở Thái Nguyên thấp hơn là 62,6%.

Bảng1. Kết quả điều tra bệnh thối rễ do tuyến trùng hại chè ở một số tỉnh vùng miền núi phía Bắc, 2018

Địa điểm	Số vườn điều tra	Tuổi cây (năm)	Tỷ lệ vườn chè nhiễm bệnh (%)	Tỷ lệ cây nhiễm/vườn (%)	Tỷ lệ cây thối rễ/cây nhiễm (%)
Phú Thọ	15	15 - 20	30,12^{a}	18,12^{a}	85. 42^{a}
Yên Bái	15	13 - 18	25,64^{a}	15,16^{ab}	76,22^{ab}
Thái Nguyên	15	8 - 10	23,44^{a}	12,08^{b}	62.60^{b}
CV (%)			*14,76*	*15,90*	*12,80*
$LSD_{0,05}$			*6,79*	*5,15*	*8,09*

Tỷ lệ cây chè bị vàng lá, rễ thối ở Phú Thọ và Yên Bái cao hơn ở Thái Nguyên có thể là do những vườn chè khảo sát ở Thái Nguyên mới đang ở thời kỳ đầu của sản xuất kinh doanh, cây chè sinh trưởng khỏe, chống chịu tốt.

3.2. Phân lập và xác định mật độ tuyến trùng

Kết quả phân lập tuyến trùng từ mẫu đất thu thập ở các vườn chè của 3 tỉnh khảo sát đã xác định là tuyến trùng *Pratylenchus*, mật độ của chúng khá cao (Bảng 2) và ở các địa điểm khác nhau có sự khác nhau. Mật độ cao nhất thuộc các vườn chè ở Phú Thọ, trung bình 35,23 con/100 g đất và 48,29 con/2 g rễ. Mật độ ở các vườn chè ở Yên Bái và Thái Nguyên tương tự nhau ở cả trong đất vùng rễ và ở trong rễ chè.

Bảng 2. Mật độ Pratylenchus* spp. *ở một số tỉnh miền núi phía Bắc, 2018

Địa điểm	Số vườn điều tra	Mật độ tuyến trùng (con/100 g đất)	Mật độ tuyến trùng (con/2 g rễ)
Phú Thọ	15	35,23[a]	48,29[a]
Yên Bái	15	25,36[b]	36,35[b]
Thái Nguyên	15	28,37[b]	38,35[b]
CV (%)		*12,03*	*13,49*
$LSD_{0,05}$		*4,92*	*9,27*

Các vườn chè được điều tra ở Phú Thọ có mật độ *Pratylenchus* spp. cao là do các vườn chè trồng đã lâu vừa có sẵn nguồn bệnh, mặt khác cây chè nhiều tuổi hơn. Ngoài ra, còn do ảnh hưởng của các điều kiện sinh thái. Tuy nhiên, cần nghiên cứu làm rõ thêm nhằm phòng trừ hiệu quả *Pratylenchus* spp. hại chè.

3.3. Ảnh hưởng của mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* spp. đối với chè con ở điều kiện nhà lưới

Những cây chè con cao khoảng 20 cm, trồng trong chậu đặt trong nhà lưới, cách ly với nguồn lây nhiễm tự nhiên. Sau trồng 2 tuần khi rễ cây đã ổn định và bắt đầu phát triển, tiến hành lây nhiễm tuyến trùng *Pratylenchus* spp. từ nguồn đã được chuẩn bị trước đó. Tuyến trùng xâm nhập và gây hại ở rễ ảnh hưởng đến sinh trưởng cây chè. Kết quả đánh sau khi lây nhiễm tuyến trùng 6 tháng ở Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tuyến trùng Pratylenchus spp lên cây chè con ở điều kiện nhà lưới sau lây nhiễm 6 tháng, 2019

Công thức	Tỷ lệ rễ nhiễm (%)	Chỉ số rễ tổn thương (%)	Chiều dài (cm)		Khối lượng (g)		Mật độ tuyến trùng (con)	
			Thân	Rễ	Thân lá	Rễ	100 g đất	2 g rễ
0	0	0	38,48[a]	36,16[a]	18,46[a]	3,15[a]	0b	0[c]
10	100	25,42	30,27[b]	24,25[b]	14,27[b]	2,20[b]	70,05[a]	82,17[b]
100	100	52,14	24,20[c]	20,06[c]	9,22[c]	1,52[b]	62, 24[a]	98,06[a]
500	100	74,80	22,16[c]	18,64[c]	7,56[c]	1,06[b]	66,14[a]	106,24[a]
CV (%)			*12,46*	*16,25*	*12,00*	*16,52*	*15,60*	*13,60*
$LSD_{0,05}$			*3,29*	*3,28*	*2,16*	*0,89*	*12,70*	*14,18*

Khi lây nhiễm vào chậu có cây chè, tuyến trùng tiếp tục sinh sản làm tăng mật độ. Những cây chè bị tuyến trùng hại có biểu hiện còi cọc, lá kích thước nhỏ và chuyển mầu vàng. Công thức nhiễm mật độ càng cao thì triệu chứng biểu hiện trên lá càng rõ. Hệ thống rễ bị tổn thương đã không cung cấp đủ dinh dưỡng cho cây, dẫn đến cây còi cọc, lá nhỏ và chuyển dần sang mầu vàng. Kiểm tra rễ, chỉ số bệnh

tăng lên rõ rệt 25,42%, 52,14% và 74,8% tương ứng với nhiễm 10, 100 và 500 con/chậu. Chỉ số bệnh tăng cao, hệ thống rễ bị phá hủy nên các cây chè hầu như không tăng trưởng thêm. Chiều cao thân cây, khối lượng thân rễ đều giảm rõ rệt so với đối chứng. Bộ rễ hầu như không có rễ tơ, như công thức nhiễm 100 và 500 con/chậu, khối lượng rễ chỉ có 1.52 và 1.06 g. Mật độ tuyến trùng ở giai đoạn 6 tháng không còn cao như ở thời điểm 3 tháng sau lây nhiễm. Lúc này mật độ tuyến trùng trong đất tăng hơn, còn mật độ ở rễ cây thấp hơn. Xảy ra hiện tượng này là do mật độ tuyến trùng tăng nhanh, tập trung vào rễ cây hút dinh dưỡng đã tàn phá hệ thống rễ cây, làm cho cây còi cọc có thể bị chết. Điều đó có nghĩa là nguồn thức ăn giảm không đủ để duy trì và tăng mật độ tuyến trùng.

IV. KẾT LUẬN

Kết quả điều tra bệnh do tuyến trùng hại chè ở các tỉnh Phú Thọ, Yên Bái và Thái Nguyên có từ 23,44 - 30,12% số vườn bị nhiễm bệnh tuyến trùng; tỷ lệ cây nhiễm bệnh ở các vườn từ 12,08 - 18,12%; tỷ lệ cây bị thối rễ trong số các cây có biểu hiện triệu bệnh từ 62,6 - 85,42%.

Phân lập tuyến trùng hại rễ cây chè ở Phú Thọ, Yên Bái và Thái Nguyên đã xác định tuyến trùng hại chè ở các vườn khảo sát thuộc chi *Pratylenchus* với mật độ từ 28,37 - 35,23 con/100g đất và 36,35 - 48,29 con/2 g rễ.

Lây nhiễm tuyến trùng lên cây chè con đã ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng của cây. Sau 6 tháng lây nhiễm với các mật độ 10, 100, 500 con/chậu, cây chè còi còi cọc, lá bé, chuyển mầu vàng. Chỉ số bệnh tương ứng là 25,42%, 52,14% và 74.48%. Chiều cao cây và khối lượng rễ rất thấp, nhiễm 100 và 500 con/chậu, khối lượng rễ chỉ đạt 1,52 và 1,06 g/cây.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Boda Vijayalaxmi, Vanita Das V and Venkanna Bhanothu. *Isolation and Identification of root knot Nematodes associated with Sofghum bicolour (L) Moench crop.* International Journal of Recent Scientific Research Vol. 8, Issue, 6, pp. 18019-18022, June, 2017
2. Campos V.P., Sivapalan P.; Gnanapragasam N.C., *Nematodea Parasites of Coffee, Cocoa and Tea*. Chapter book: Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 1990 387 - 430.
3. Nguyễn Ngọc Châu, *Tuyến trùng thực vật và cơ sở phòng trừ*, NXB. KHKT, 2003, Hà Nội. NXB Giáo dục
4. European and Mediterranean Plant Protection Organization, *Nematode extraction*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2013) 43 (3), 471 - 495.
5. Nguyễn Văn Hùng, Đoàn Hùng Tiến, Nguyễn Khắc Tiến (1998). *Sâu bệnh, cỏ dại hại chè và biện pháp phòng trừ.* NXB. Nông nghiệp,.
6. Nguyễn Văn Hùng, Đoàn Hùng Tiến (2000). Sử dụng hợp lý thuốc bảo vệ thực vật trên chè. NXB. Nông nghiệp, 172 tr.
7. Hutchinson M. T., *Nematode samples from estates*. Tea Quaterly, Vol. 31, part 1, March 1960, p.116 - 118.
8. J. van Bezooijen, Manual book: *Methods and Techniques for Nematology*. Wageningen, December 2006.
9. Samuel B. Orisaja (2012). Distribution of Plant-Parasitic Nematodes Associated with Tea in Nigeria. *Biology.*
10. Zafa A. Handoo, Lynn K. Carta and Andrea M. Skantar, Chapter 3: Taxonomy, Morphology and Phylogenetics of Coffee-Associated Root-Lesion Nematodes, *Pratylenchus* spp.

CÁC NHÓM TUYẾN TRÙNG QUAN TRỌNG TRÊN MỘT SỐ CÂY DƯỢC LIỆU Ở VIỆT NAM

Nguyễn Hữu Tiền, Nguyễn Thị Duyên, Lê Thị Mai Linh, Trịnh Quang Pháp

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

ABSTRACT

Important plant-parasitic nematode groups associated with some medicinal plants in Vietnam

Medicinal plants are one of the most valuable crops for humans. In addition to the values of health, culture, and society, medicinal plants have also contributed a high economic value. Currently, the production of medicinal plants has been threatened by the presence of various pests, including plant-parasitic nematodes. In this study, we provide an overview of the most important plant-parasitic nematode groups associated with 23 studied medicinal plants based on density, frequency, and level of damage. Helicotylenchus spp. were found to be the most prevalent group, while Rotylenchulus was the most abundant genera. Together with Pratylenchus spp. and Meloidogyne spp. Rotylenchulus reniformis was the most damaging nematode based on symptoms recorded. The morphology and molecular characters of important plant parasitic nematodes such as R. reniformis, Pratylenchus coffeae and Meloidogyne incognita were given.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây dược liệu là một trong những nhóm cây trồng quan trọng hàng đầu đối với con người. Ngoài các giá trị về sức khỏe, văn hóa xã hội, cây dược liệu còn mang lại giá trị kinh tế cao (Nguyen, 2018). Theo các báo cáo gần đây, 5.000 đến gần 10.000 tấn dược liệu được xuất khẩu với giá trị khoảng 15 triệu USD mỗi năm (Nguyen, 2018). Đáng chú ý, cường độ tiêu thụ của cây dược liệu đang ngày càng gia tăng, tuy nhiên, hầu hết các cây dược liệu trên thị trường được thu thập từ các nguồn tự nhiên dẫn đến nhiều loài cây dược liệu quý hiếm bị đẩy vào tình trạng nguy cấp hoặc thậm chí bị tuyệt chủng. Do đó, chính phủ Việt Nam đã ban hành quyết định số 1976/QĐ-TTg để ưu tiên phát triển cây dược liệu ở Việt Nam với kỳ vọng sẽ xuất khẩu 2.500 tấn cây dược liệu hàng năm trên tổng diện tích 28.200 ha trồng chuyên canh cây dược liệu vào năm 2020 và định hướng phát triển đến năm 2030.

Người phản biện: TS. Lê Mai Nhất.

Để khai thác thành công cây dược liệu, việc kiểm soát các loại bệnh hại là mối quan tâm hàng đầu để hạn chế sự bùng phát của chúng, đặc biệt là dịch hại gây ra bởi tuyến trùng ký sinh thực vật (Jones *et al.*, 2013; Perry & Moens, 2013). Tuyến trùng ký sinh thực vật đang đe dọa nghiêm trọng đến an ninh lương thực của thế giới và gây thiệt hại kinh tế ước tính ít nhất 12,3% (157 tỷ đô la) hàng năm trên toàn thế giới (Hassan *et al.*, 2013). Đặc biệt, đã có nhiều báo cáo về khả năng ký sinh gây hại của tuyến trùng ký sinh thực vật trên các cây dược liệu như: báo cáo của Eapen và Pandey (2018) chỉ ra rằng tuyến trùng có khả năng ký sinh và gây hại đáng kể trên hầu hết các loại cây dược liệu đã nghiên cứu, trong đó các nhóm tuyến trùng như tuyến trùng gây sần rễ (*M. incognita* và *M. javanica*), tuyến trùng gây tổn thương rễ (*Pratylenchus thornei*) và tuyến trùng làm cây còi cọc (*Tylenchorhynchus vulgaris*) được báo cáo là các nhóm gây ảnh hưởng lớn nhất đến năng suất và chất lượng cây dược liệu; Eapen và Pandey (2018) đã báo cáo thiệt hại gây ra bởi tuyến trùng trên cây dược liệu có thể lên tới 30%; Khanzada *et al.* (2007) đã báo cáo sự có mặt của 6 giống tuyến trùng ký sinh trên cây dược liệu; Abtahi and Bakooie (2017) đã báo cáo sự gây hại của tuyến trùng ký sinh trên 28 loài cây dược liệu khác nhau với các triệu chứng điển hình; Gupta và Mondal (2018) đã ghi nhận 37 loài tuyến trùng có liên quan đến cây dược liệu trong đó có 7 loài tuyến trùng ký sinh thực vật. Các nghiên cứu về tuyến trùng ký sinh thực vật trên cây dược liệu ở Việt Nam cho thấy sự hiện diện của *Tylenchorhynchus brassicae, Hirschmanniella mucronata, H. shamini* và *Pratylenchus teres* trên cây bạc hà (Nguyễn Ngọc Châu & Nguyễn Vũ Thanh, 2000). Ngô Thị Xuyên (2000) đã báo cáo về sự gây hại của *Meloidogyne incognita* trên các cây dược liệu như ngưu tất, bạch truật, bạch chỉ, hoắc hương (Ngo, 2000). Nguyễn Hữu Tiền và cộng sự cũng đã ghi nhận 13 loài thuộc 8 giống tuyến trùng ký sinh thực vật gây còi cọc, vàng lá, hoại tử trên rễ và sần rễ trên các cây dược liệu ở tỉnh Quảng Ninh (Nguyễn Hữu Tiền, 2015). Mặc dù tuyến trùng ký sinh thực vật đã được biết đến là mối đe dọa nghiêm trọng đối với các cây dược liệu ở Việt Nam, các dẫn liệu hình thái và phân tử và triệu chứng gây bệnh của các loài ký sinh gây hại quan trọng vẫn còn tản mản và hạn chế.

Nghiên cứu này đưa ra dẫn liệu về các loài nhóm tuyến trùng ký sinh gây hại quan trọng nhất trên cây dược liệu, đồng thời cung cấp các triệu chứng gây hại điển hình cũng như các đặc điểm nhận dạng hình thái và phân tử của chúng.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Phương pháp thu mẫu vật

mẫu tuyến trùng được thu tại vùng trồng cây dược liệu (23 loài cây: đinh lăng, nghệ vàng, bạch trinh, ba kích, cát cánh,...) tại Lào Cai, Vĩnh Phúc và Tây Nguyên (49 điểm) Mẫu rễ và mẫu đất sẽ được thu ở những cây có biểu hiện bệnh (như vàng lá, thối rễ, sần rễ...) và các cây khỏe mạnh theo hình ô bàn cờ, đất được gạt bỏ lớp bề mặt quanh vùng rễ, lấy mẫu từ 15 - 20 cm với 1 kg đất, 10 g rễ. Đất và rễ được giữ trong túi bóng và để vào thùng mát vận chuyển về phòng thí nghiệm phân tích (Nguyen *et al.*, 2015).

2.2. Phương pháp xác định nhóm tuyến trùng ký sinh gây hại quan trọng nhất (Coyne *et al.*, 2018)

Dựa trên nhóm có tần suất bắt gặp cao nhất, dựa trên nhóm có mật độ bắt gặp cao nhất và dựa vào triệu chứng: là nhóm tuyến trùng gây ra các triệu chứng nghiêm trọng nhất ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất chất lượng của cây như chỉ số như sần rễ, hoại tử và vàng lá.

2.3. Phương pháp tách lọc tuyến trùng

Tách lọc tuyến trùng từ mẫu rễ và đất theo phương pháp tách lọc được mô tả trong Nguyễn Ngọc Châu (2003). Mỗi mẫu đất và rễ định lượng 250 g đất hoặc 5 g rễ để tách lọc. Các loài tuyến trùng béo phị có trong rễ được tách trực tiếp trên kính hiển vi soi nổi để phục vụ cho phân loại (Nguyễn Ngọc Châu, 2003).

2.4. Phương pháp tính mật độ và tần suất bắt gặp tuyến trùng

Mẫu đất và rễ sau khi định lượng được tách lọc thu tuyến trùng, số lượng tuyến trùng mỗi giống được đếm trên kính hiển vi soi nổi. Mật độ trung bình của mỗi giống tuyến trùng = (tổng số tuyến trùng bắt gặp của giống/tổng số mẫu bắt gặp/250 g đất). Tần suất bắt gặp của mỗi giống tuyến trùng = (số mẫu bắt gặp giống đó/tổng số mẫu điều tra) × 100% (Nguyen *et al.*, 2019a).

2.5. Phương pháp phân loại hình thái

Để phục vụ cho việc lưu giữ lâu dài cũng như đo vẽ và phân loại trên kính hiển vi thường, tuyến trùng cần được xử lý và làm tiêu bản cố định. Tuyến trùng được xử lý bằng nước nóng 60 - 70ºC trong khoảng 30 giây sau đó chuyển sang cố định 4 - 5 ngày trong dung dịch TAF, sau đó được chuyển qua glycerin theo phương pháp bay hơi chậm. Quy trình xử lý tuyến trùng để làm tiêu bản cố định được mô tả trong Nguyễn (2003). Tuyến trùng sau khi lên tiêu bản được đo vẽ, chụp ảnh trên kính hiển vi Carl Zeiss Axio Lab A1 và phân loại dựa theo các tài liệu của Nguyen and Nguyen (2000), Siddiqi (2000). Các loài có sai khác nhiều so với các loài đã công bố được tiếp tục tra cứu dựa trên các tài liệu mới hơn như tài liệu của Castillo and Vovlas (2007), Perry *et al.* (2009).

2.6. Phương pháp phân tích phân tử

Phương pháp phân tích phân tử dựa trên các vùng gen nhân như 28S rDNA và gen ty thể như *Cox1* (Janssen *et al.*, 2016; Le *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2019c; Trinh *et al.*, 2018) có thể được sử dụng như một phương pháp phân loại nhanh bằng cách Blast trên GenBank để so sánh với các loài gần gũi nhất đã được công bố (Nguyen *et al.*, 2019b). Đối với các loài thuộc giống *Meloidogyne*, phản ứng Multiplex-PCR được sử dụng để giám định nhanh các loài *M. arenaria, M. incognita, M. javanica* với các cặp mồi đặc hiệu Far/Rar, Mi2F4/Mi1R1, Fjav/Rjav (Kiewnick *et al.*, 2013).

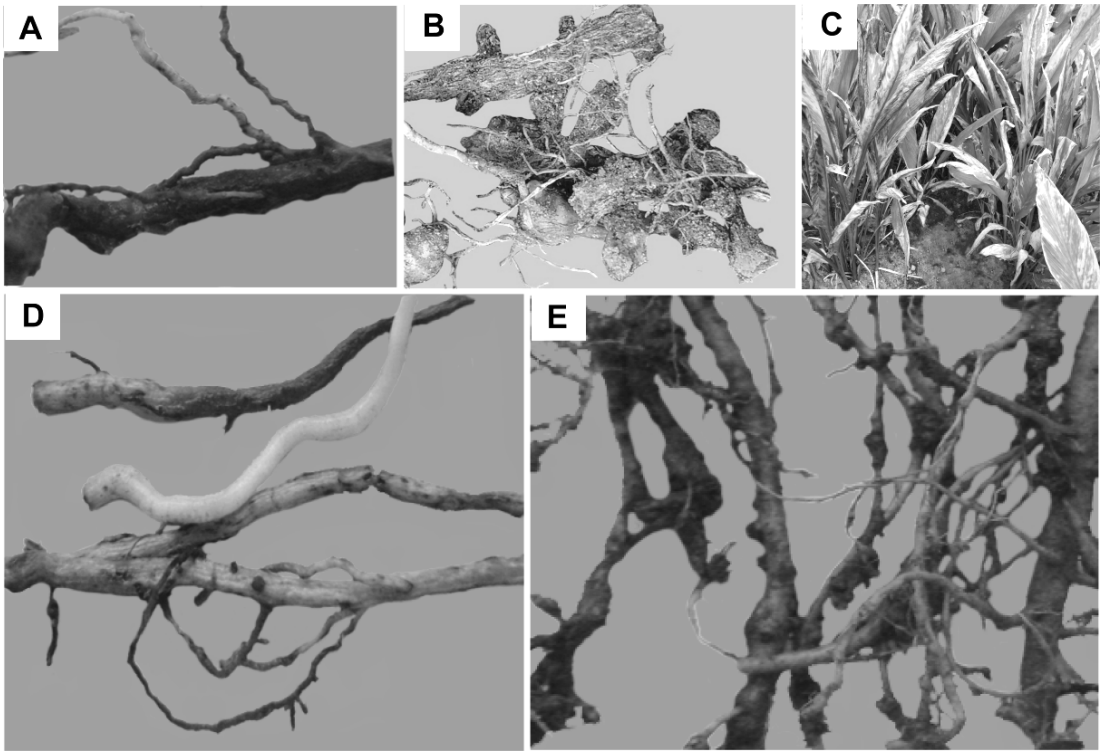
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Các nhóm tuyến trùng ký sinh gây hại quan trọng và triệu chứng gây bệnh

Trên tổng số 23 loài cây dược liệu nghiên cứu (49 điểm thu mẫu), tất cả các mẫu đều phát hiện tuyến trùng ký sinh

thực vật. Nhiều triệu chứng như còi cọc, vàng lá, sần rễ, thối rễ được phát hiện trên các loại cây dược liệu quý như nghệ vàng, đinh lăng, ba kích,... Đợt khảo sát này đã phát hiện 19 giống tuyến trùng ký sinh trên cây dược liệu bao gồm:

Aphelenchoides, *Criconemella*, *Discocriconemella*, *Ditylenchus*, *Helicotylenchus*, *Hemicriconemoides*, *Heterodera*, *Hirschmaniella*, *Meloidogyne*, *Paratrichodorus*, *Paratylenchus*, *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Scutellonema*, *Trichodorus*, *Trophonema*, *Trophorus*, *Tylenchus*, *Tylenchorhynchus*, *Tylenchulus* và *Xiphinema*.



Hình 1. A: Triệu chứng gây ra bởi tuyến trùng giống *Helicotylenchus*;
B - C: Triệu chứng gây ra bởi tuyến trùng giống *Rotylenchulus*;
D: Triệu chứng gây ra bởi tuyến trùng giống *Pratylenchus*;
E: Triệu chứng gây ra bởi tuyến trùng giống *Meloidogyne*

Tần suất bắt gặp của giống *Helicotylenchus* là cao nhất với xấp xỉ 39% tổng số mẫu điều tra (19/49 mẫu). Triệu chứng gây bệnh điển hình do tuyến trùng giống *Helicotylenchus* gây ra là các vết châm chích nhỏ màu nâu hoặc đen trên bề mặt rễ (Hình 1), các cây bị nhiễm tuyến trùng *Helicotylenchus* ở mật độ cao có biểu hiện còi cọc và vàng lá trên một số cây dược liệu như: ba kích và đinh lăng. Mặc dù, mức độ gây hại của tuyến trùng *Helicotylenchus* chưa được đánh giá đầy đủ, kết quả của đợt khảo sát này cho thấy tần suất bắt gặp của tuyến trùng *Helicotylenchus* là khá cao, tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Hữu Tiền *và cs.* (2015).

Mật độ cá thể trung bình của giống *Rotylenchulus* trong các mẫu cao nhất là 473 cá thể/250 g đất. Đặc biệt tuyến trùng *Rotylenchulus* xuất hiện với mật độ cao và gây triệu chứng nghiêm trọng nhất trên cây nghệ với các biểu hiện như thối củ, còi cọc và vàng lá (Hình 1). Trong các báo cáo trước đây, *R. reniformis* được đánh giá là một trong những loài tuyến trùng gây hại nghiêm trọng nhất trên thế giới (Jones *et al.*, 2013; Robinson *et al.*, 1997), thậm chí ở mật độ giữa 0.1 đến 5 cá thể trên 1g đất nhóm tuyến trùng này đã có khả năng gây hại mạnh (Gaur & Perry, 1991). Do vậy, mật độ trung bình của tuyến trùng *Rotylenchulus* được bắt gặp trong nghiên cứu này là tương đối cao và cần có các biện pháp phòng trừ thích hợp.

Dựa trên triệu chứng gây bệnh, tuyến trùng giống *Meloidogyne* tạo nhiều nốt sần trên bộ rễ và làm cây còi cọc trên gừng gió và nghệ vàng; tuyến trùng *Pratylenchus* gây triệu chứng thối rễ rõ ràng ở mật độ cao trên cây đinh lăng; tuyến trùng *Rotylenchulus* gây các triệu chứng nghiêm trọng trên cây nghệ vàng như đã nêu ở trên (Hình 1). Như vậy, các nhóm tuyến trùng gây ra triệu chứng nghiêm trọng trên cây dược liệu cũng nằm trong nhóm 10 nhóm tuyến trùng thực vật gây hại nghiêm trọng nhất trên thế giới theo báo cáo của Jones *et al.* (2013).

3.2. Đặc điểm chẩn loại của một số loài tuyến trùng ký sinh quan trọng trên cây dược liệu

Trong nghiên cứu này chúng tôi mô tả 3 loài gây hại quan trọng trên các cây dược liệu được điều tra gồm: *Rotylenchulus reniformis, Pratylenchus coffeae, Meloidogyne incognita.*

3.2.1. Rotylenchulus reniformis Linford & Oliveira, 1940

Hình 2. *Rotylenchulus reniformis*. A - D: Con cái chưa thành thục. A: Vùng đầu; B: Vùng bên; C: Vùng thực quản; D: Vùng đuôi. E: Vùng đuôi con đực (Scalebar: 10 µm)

Số đo:

Con cái chưa thành thục (n = 20): L = 409 ± 21 (380 - 430) µm, Stylet = 16.5 ± 0.8 (15 - 17) µm, V = 71 ± 2 (69 - 74)%, a = 27.3 ± 1.4 (25.4 - 28.8), b = 4.2 ± 0.2 (3.8 - 4.5), c = 14.5 ± 1.2 (13.3 - 16.4).

Đặc điểm hình thái (Hình 2):

Con cái chưa trưởng thành: Cơ thể có dạng chữ C sau khi cố định bằng nhiệt. Vùng môi kitin hoá trung bình, có dạng hình chóp với 5 vòng cutin rất nhỏ và không phân biệt với đường viền cơ thể. Kim hút mảnh với gốc kim hút tròn. Diều trước thon dài, diều giữa hình tròn hoặc oval, có van bên trong kitin hoá mạnh. Thực quản tuyến phủ lên phần đầu của ruột về phía bên và phía bụng. Lỗ bài tiết nằm giữa phần eo thắt của thực quản. Đuôi hình chóp với mút đuôi tròn tù. Vùng bên có 4 đường bên.

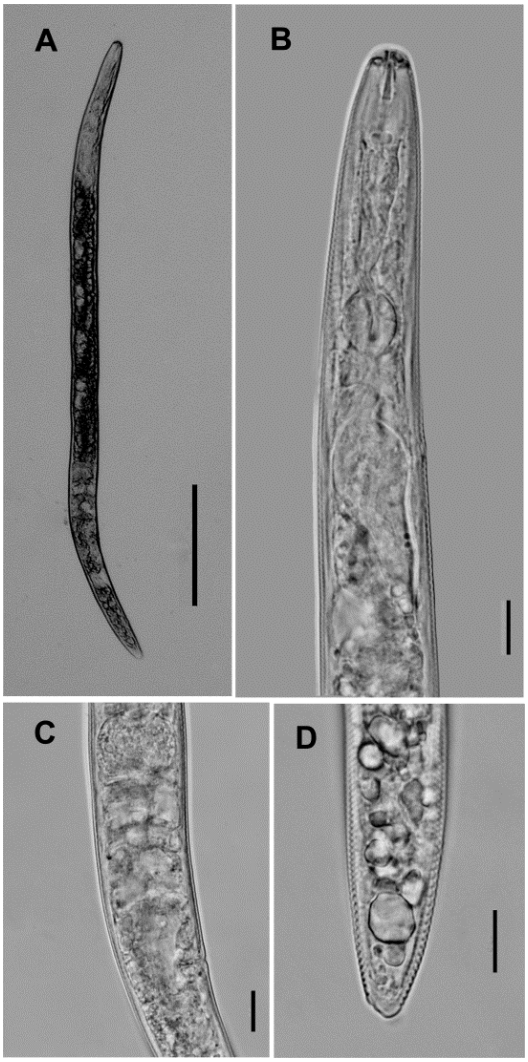
Con đực chưa trưởng thành: Có các đặc điểm hình thái và giải phẫu giống con cái chưa trưởng thành ngoại trừ đặc điểm về giới tính.

Đặc điểm phân tử:

Vùng gien D2-D3 rDNA và *COI* mtDNA của quần thể *R. reniformis* trong nghiên cứu này có chiều dài lần lượt 374 bp và 691 bp, tương đồng lần lượt 99.5 và 100% với các trình tự của loài *R. reniformis* gần nhất trên GenBank.

Cây chủ (trong nghiên cứu này): Gặp ở đất quanh rễ và trên rễ của các loại cây dược liệu như: đinh lăng, nghệ vàng, lá lốt, mẫu đơn.

3.2.2. Pratylenchus coffeae (Zimmermann 1898) Filipjev & Schuurmans 1941



Hình 3. Con cái *Pratylenchus coffeae*. A: Toàn bộ cơ thể; B: Vùng thực quản; C: Vùng Vulva; D: Vùng đuôi. (Scalebar: A: 100 µm, B - D: 10 µm)

Số đo:

Con cái (n = 12): 1.315 ± 46 (1.261-1.342) µm, V = 79 ± 2.2 (77 - 81)%, Stylet = 15.5 ± 0.7 (15 - 16.3) µm, Tail = 28.3 ± 1.3 (27.2 - 29.7) µm, a = 54 ± 6.7 (47 - 61), b = 4.8 ± 0.1 (4.7 - 4.9), c = 46 ± 1.4 (45 - 48). c’ = 1.9 ± 0.1 (1.8 - 2.0).

Đặc điểm hình thái (Hình 3):

Con cái: Cơ thể dạng thẳng hoặc hơi cong về phía bụng sau khi xử lý nhiệt. Vùng môi kitin hoá mạnh, hơi tách biệt với đường viền cơ thể với 2 vòng cutin. Kim hút khỏe, các núm gốc kim hút có dạng tròn hoặc hơi vát về phía trước. Diều trước của thực quản thuôn dài, hơi hẹp lại ở phía trước của diều giữa. Diều giữa dạng tròn hoặc oval, có van kitin hoá rõ ràng. Thực quản tuyến bao phủ lên phần đầu của ruột về phía bụng. Lỗ bài tiết nằm về phía trước so với van thực quản - ruột. Hemizonid nằm ngay phía trước của lỗ bài tiết. Hệ sinh sản dạng monoprodelphic, có một nhánh phát triển về phía trước dài, các noãn bào xếp thành một hàng. Túi chứa tinh hình oval, chứa đầy tinh trùng. Vị trí của vulva thấp. Tử cung sau ngắn, bằng 1 - 1,5 chiều rộng cơ thể tại vulva. Đuôi hình trụ hoặc hình chóp tù với 20 - 28 vòng cutin ở mặt bụng. Hình dạng mút đuôi biến đổi: mút đuôi dạng cụt, vát, nửa bán cầu, bán cầu, nhọn, cụt lồi, nhẵn hoặc xẻ. Vùng bên có 4 đường bên tạo thành ba dải bằng nhau.

Con đực: Có cấu tạo hình thái tương tự con cái trừ đặc điểm giới tính.

Đặc điểm phân tử:

Các trình từ *COI* mtDNA của quần thể *P. coffeae* thu được trong nghiên cứu này có chiều dài từ 400 - 422 bp và tương đồng 100% với các trình tự gần gũi nhất của loài *P. coffeae* trên GenBank. Với vùng gen D2 - D3, chiều dài của các trình tự thu được từ 959 - 1002 bp với độ tương đồng là 100% với các trình tự gần gũi nhất của loài *P. coffeae* trên GenBank.

Cây chủ (trong nghiên cứu này): Gặp ở đất quanh rễ và trên rễ của các loại cây dược liệu như: đinh lăng, bạch trinh, ba kích, cát cánh.

3.2.3. Meloidogyne incognita (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949

Số đo:

Con cái (n = 10): L = 809 ± 121 (680 - 993) µm, chiều dài cổ = 228 ± 35 (199 - 255) µm, rộng cơ thể = 552 ± 134 (345 - 707) µm, a = 1.5 ± 0.3 (1.4 - 2.0), chiều dài kim hút = 12.4 ± 0.1 (12.3 - 12.6) µm, DGO = 4.2 ± 0.4 (3.8 - 4.7) µm, chiều dài từ đầu đến lỗ bài tiết = 18 ± 0.5 (17.1 - 18.6) µm, chiều dài vulva = 23 ± 1.5 (20.5 - 24) µm, khoảng cách vulva-anus = 17 ± 0.7 (17.8 - 19.3) µm, khoảng cách Anus-tail tip = 15.5 ± 1.9 (13.5 - 18.3) µm, khoảng cách Phasmid = 19 ± 0.5 (18 - 20.1) µm, EP/ST = 1.4 ± 0.1 (1.3 - 1.5).

Ấu trùng tuổi 2 (n = 20): L = 367 ± 15 (334 - 393) µm, Stylet = 10.3 ± 0.5 (9.0 - 11.2) µm, DGO = 3 ± 0.6 (2 - 4.5) µm, chiều dài từ đầu - Diều giữa = 50 ± 2.9 (42 - 53) µm, NR = 59 ± 3.4 (51 - 64) µm, chiều dài từ đầu - van ruột thực quản = 68 ± 7 (59 - 76) µm, EP = 82 ± 9.4 (68 - 103) µm, ABD = 9.6 ± 1 (7.7 - 10.6) µm, T = 48 ± 6.9 (35 - 54), H = 13 ± 1.7 (11 - 17.6) µm, ES = 145 ± 13.6 (126 - 176) µm, a = 29 ± 2.4 (24 - 34), b = 5.4 ± 0.4 (4.6 - 6.4), b' = 2.6 ± 0.2 (2.1 - 2.9), c = 7.6 ± 1.3 (6.7 - 10), c' = 5.1 ± 0.6 (3.7 - 6.2).

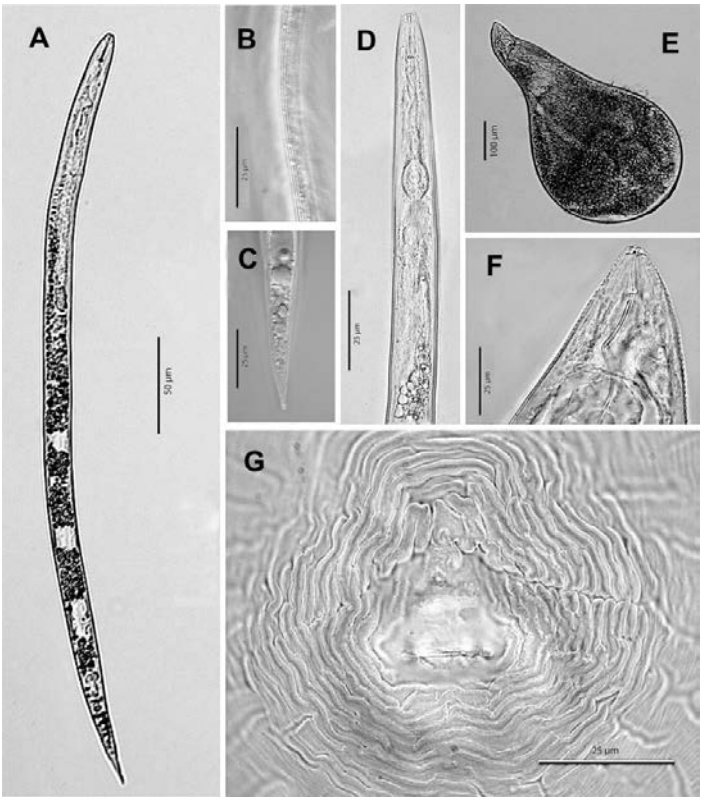
Đặc điểm hình thái (Hình 4):

Con cái: Cơ thể dạng quả lê hay quả chanh không cân đối. Vùng chậu bằng phẳng hoặc chỉ hơi lồi ra. Stylet có núm gốc tròn và phần chóp stylet cong về phía lưng hoặc có dạng thẳng. Lỗ bài tiết nằm sau gốc stylet. Vùng môi kitin hoá rõ

ràng. Diều giữa có kích thước lớn dạng tròn hoặc oval. Perineal pattern có dạng oval, hơi kéo dài về hướng lưng bụng, luôn có vòm lưng cao và hơi vuông, các đường vân không liên tục và có dạng gợn sóng. Vùng bên không có hoặc chỉ biểu hiện dạng fork ở chỗ nối các vân giữa 2 vùng lưng bụng. Mút đuôi thường dễ quan sát.

Con đực: Cơ thể dạng giun, kích thước lớn. Vùng đầu cao với 2 đến 4 vòng cutin; đĩa môi tròn lớn, đôi khi lõm ở phần giữa với các môi lồi lên. Kim hút to khỏe, chóp kim hút có dạng tù. Vùng bên có 4 đường bên nổi bật và thường xoắn vặn ở vùng đuôi.

Ấu trùng tuổi 2: Có dạng giun, thuôn dần về hai đầu. Stylet mảnh với núm gốc khá nhỏ. Diều giữa kitin hoá yếu. Lỗ bài tiết nằm ở khoảng dưới van thực quản ruột. Đuôi dài hình chóp nhọn với mút đuôi tròn tù.



Hình 4. *Meloidogyne incognita*. A - D: Ấu trùng tuổi 2. A: Toàn thân; B: Vùng bên; C: Đuôi; D: Vùng thực quản. E - G: con cái. E: Toàn thân; F: Vùng đầu; G: Perineal pattern

Đặc điểm phân tử:

Sản phẩm điện di Multiplex-PCR của *Meloidogyne incognita* có kích thước khoảng 300 bp phù hợp với kết quả nghiên cứu của Kiewnick *et al.* (2013).

Cây chủ (trong nghiên cứu này): Gặp ở đất quanh rễ và trên rễ của các loại cây dược liệu như: gừng gió, nghệ vàng.

IV. KẾT LUẬN

Như vậy, nghiên cứu này cho thấy tất cả các loại cây dược liệu nghiên cứu đều là đối tượng bị ký sinh gây hại bởi tuyến trùng ký sinh thực vật. Trong đó, tuyến trùng thuộc giống *Helicotylenchus* được bắt gặp với tần suất cao nhất, giống *Rotylenchulus* đại diện là loài *R. reniformis* có mật độ cao nhất đồng thời cũng gây ra các triệu chứng gây bệnh nghiêm trọng như các nhóm *Pratylenchus* và *Meloidogyne* được báo cáo trước đó. Các triệu chứng gây bệnh nghiêm trọng gây ra bởi tuyến trùng có thể là một trong những nguyên nhân gây giảm năng suất và chất lượng của cây nghệ vàng, đinh lăng, cát cánh. Do đó, cần có những biện pháp thích hợp để phòng trừ tuyến trùng khi bắt gặp với mật độ và tần suất lớn.

Điều tra này cung cấp các dẫn liệu sơ bộ về khả năng gây hại, hình thái và phân tử của tuyến trùng ký sinh trên cây dược liệu của 3 loài gây hại chính *Rotylenchulus reniformis, Pratylenchus coffeae, Meloidogyne incognita*. Tuy nhiên, cần có các nghiên cứu chuyên sâu hơn, tập trung về từng loại cây cụ thể và từng nhóm tuyến trùng cụ thể để có đánh giá đầy đủ nhất về tác hại của chúng đối với cây dược liệu. Ngoài ra, các nghiên cứu về phát sinh nguồn bệnh cũng cần được chú ý để làm cơ sở cho các biện pháp phòng trừ tuyến trùng.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí từ đề tài Nafosted mã số: 106.05-2019.323.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abtahi, F. & Bakooie, M. (2017). Medicinal Plant Diseases Caused by Nematodes. Pp 426. *in:* Ghorbanpour, M. & Varma, A. (Eds.) Medicinal Plants and Environmental Challenges. Switzerland: Springer.
2. Castillo, P. & Vovlas, N. (2007). Nematology Monographs and Perspectives 6. *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae): diagnosis, biology, pathogenicity and management. Brill.
3. Coyne, D. L., Nicol, J. M. & Claudius-Cole, B. (2018). Practical plant nematology: A field and laboratory guide. Cotonou, Benin: International Institute of Tropical Agriculture (IITA).
4. Eapen, S. J. & Pandey, R. (2018). Nematode Parasites of Spices and Medicinal Plants. Pp 877. *in:* Sikora, R. A., Coyne, D., Hallmann, J. & Timper, P. (Eds.) Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 3rd ed. UK: Cabi.
5. Gaur, H. S. & Perry, R. N. (1991). The biology and control of the plant parasitic nematode *Rotylenchulus reniformis*. Agricultural Zoology Reviews 4: 177 - 212.
6. Gupta, S. K. & Mondal, S. (2018). Study on nematodes associated with medicinal plants in west Bengal. Journal of Entomology and Zoology Studies 6: 409 - 419.
7. Hassan, M. A., Pham, T. H., Shi, H. & Zheng, J. (2013). Nematodes threats to global food security. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science 63: 420 - 425.
8. Janssen, T., Karssen, G., Verhaeven, M., Coyne, D. & Bert, W. (2016). Mitochondrial coding genome analysis of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne*) supports haplotype based diagnostics and reveals evidence of recent reticulate evolution. Scientific Reports 6: 1 - 13.
9. Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares- Rius, J. E., Wesemael, W. M. & Perry, R. N.

(2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 14: 946 - 961.

10. Khanzada, S. A., Munir, A., Jamal, A., Ahmed, Z. & Bashir, M. (2007). Nematode fauna associated with medicinal plants. Pakistan Journal of Nematology 25: 53 - 58.
11. Kiewnick, S., Wolf, S., Willareth, M. & Frey, J.-E. (2013). Identification of the tropical root-knot nematode species *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using a multiplex PCR assay. Nematology 15: 891 - 894.
12. Le, T. M. L., Nguyen, T. D., Nguyen, H. T., Liebanas, G., Nguyen, T. a. D. & Trinh, Q. P. (2019). A new root-knot nematode, *Meloidogyne moensi* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), parasitizing Robusta coffee from Western Highlands, Vietnam. Helminthologia: (accepted).
13. Ngo, T. X. (2000). Study on biological characterisation and prevention ability of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita (*Kofoid et White, 1919) Chitwood, 1949) on some crops in Hanoi and surrounding areas. Doctoral thesis,
14. Nguyễn Hữu Tiền, Nguyễn Thị Duyên, Lê Thị Mai Linh, Trịnh Quang Pháp, Nguyễn Thị Tuyết (2015). Bước đầu khảo sát tuyến trùng ký sinh thực vật trên một số cây dược liệu tại Đông Triều (Quảng Ninh). Hội ghị KHTQ về ST&TNSV lần thứ 6, 928 - 933.
15. Nguyen, H. T., Nguyen, T. D., Le, D. H., Nobleza, N. & Trinh, Q. P. (2019a). Diversity of plant-parasitic nematodes on medicinal plants in Melinh station for biodiversity, Vinh Phuc province, Vietnam. Academia Journal of Biology 41: 19 - 24.
16. Nguyen, H. T., P., T. Q., Couvreur, M., Singh, P. R., Decraemer, W. & Bert, W. (2019b). Molecular and morphological characterisation of a new root-lesion nematode, *Pratylenchus horti* n. sp. (Tylenchomorpha: Pratylenchidae) from Ghent University Botanical Garden. Nematology 21: 739-752.
17. Nguyễn Ngọc Châu (2003). Tuyến trùng thực vật và cơ sở phòng trừ. NXB. Khoa học Kỹ thuật Hà Nội.
18. Nguyen Ngọc Châu & Nguyen Vũ Thanh (2000). Động vật chí Việt Nam, phần 4: Tuyến trùng ký sinh thực vật, NXB. Khoa học Kỹ thuật Hà Nội, 400 trang..
19. Nguyen, T. D., Nguyen, H. T., Nobleza, N., Le, T. M. L. & Trinh, Q. P. (2019c). Morphological diversity of *Meloidogyne* spp. from carrot (Daucus carota subsp. Sativus) in Vietnam. UTTAR PRADESH Journal of zoology 9: 43 - 53.
20. Nguyen, T. H. (2018). Research on medicinal plant resources to propose solutions for conservation and sustainable use of some valuable species in Na Hang nature reserve, Ttuyen Quang province. Doctoral thesis in Biology, Graduate University of Science and Technology, Hanoi.
21. Perry, R. N. & Moens, M. (2013). Plant nematology. London, UK: CABI.
22. Perry, R. N., Moens, M. & Starr, J. L.(2009). Root-knot nematodes. CABI.
23. Robinson, A. F., Inserra, R. N., Caswell-Chen, E. P., Vovlas, N. & Troccoli, A. (1997). *Rotylenchulus* species: Identification, distribution, host ranges, and crop plant resistance. Nematropica 27: 127-180.
24. Siddiqi, M. R. (2000). Tylenchida: parasites of plants and insects. London, UK: CABI.
25. Trinh, Q. P., Le, T. M. L., Nguyen, T. D., Nguyen, H. T., Liebanas, G. & Nguyen, T. a. D. (2018). *Meloidogyne daklakensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root-knot nematode associated with Robusta coffee *(Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) in the Western Highlands, Vietnam. Journal of helminthology: 1 - 13.

HIỆU LỰC CỦA MỘT SỐ LOẠI THUỐC PHÒNG CHỐNG BỆNH ĐỐM NÂU (*Alternaria sesami)* HẠI CHANH LEO TẠI NGHỆ AN

Võ Thị Dung[1], Hà Minh Thanh[2], Vũ Triệu Mân[3], Nguyễn Đình Tiến[1]

[1]Trường Đại học Kinh tế Nghệ An

[2]Viện Bảo vệ thực vật

[3]Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam

ABSTRACT

Efficacy of some chemical drugs in preventing Brown spots disease (*Alternaria sesami)* on passion fruit in Nghe An

When assessing the inhibitory ability of certain chemical drugs in the invitro condition for Alternaria sesami fungi, Antracol 70WP, Dithane M-45 80WP and Metaxyl 500WP have inhibitory effect of 100% after 24 hours and 48 hours. The inhibitory effect of Viroval 50WP, Amistar 250SC, Polyram 80WG, Antracol 70WP, Polysuper 32 WP fluctuated between 73.33% and 93.33% after 48 hours. In terms of nethouse conditions and production conditions using Antracol 70WP with the concentration of 0.3%, Dithane M- 45 80WP with the concentration of 0.225% and Metaxyl 500WP the concentration of 0.1% have good control over Alternaria sesami fungi causing Brown spots on passion fruit in Nghe An.

Keywords: *Alternaria sesami, Nghe An, Passion fruit.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sử dụng thuốc hóa học vẫn là một trong những biện pháp phòng chống bệnh hại cây trồng nhanh và hiệu quả, đặc biệt trong trường hợp bệnh phát triển mạnh, cây trồng mẫn cảm với sâu bệnh. Những nghiên cứu về bệnh hại chanh leo hiện nay chưa nhiều nên việc sử dụng thuốc hóa học để phòng chống bệnh còn chưa được hiệu quả, đặc biệt tại Nghệ An, nơi bệnh đốm nâu do nấm *Alternaria sesami* gây ra là bệnh hại phổ biến và rất nghiêm trọng. Do đó một số loại thuốc hóa học đã được thử nghiệm ở trong phòng, nhà lưới và ngoài sản xuất để tìm ra bộ thuốc với liều lượng và nồng độ thích hợp có thể sử dụng để phòng chống bệnh đốm nâu chanh leo an toàn và hiệu quả tại Nghệ An.

Người phản biện: TS. Lê Mai Nhất.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Giống chanh leo tím (Đài Nông1) (*Passiflora edulis*), hiện là giống trồng chủ yếu ở Nghệ An và các tỉnh khác ở Việt Nam.

- Nguồn nấm *A. sesami* gây bệnh đốm nâu chanh leo tại Nghệ An.

- Các hoạt chất Metalaxyl (Metaxyl 500WP); Iprodione (Viroval 50WP); Mancozeb (Dithane M- 45 80WP); Zineb (Zithane 80WP); Azoxystrobin (Amistar 250SC); Metiram complex (Polyram 80WG); Propineb (Antracol 70WP) và Polyoxin (Polysuper 32WP).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số thuốc hóa học đến khả năng nảy mầm của bào tử nấm Alternaria sesami

- Môi trường WA sau khi được hấp khử trùng trong thời gian từ 30 phút ở nhiệt độ 121^{o}C (1,5 atm), để nguội (45 - 50^{o}C) và đặt trong buồng nuôi cấy vi sinh vật. Sử dụng phương pháp cấy đơn bào tử lên bề mặt đĩa petri có chứa thuốc, cấy 30 bào tử nấm *Alternaria sesami* vào mỗi đĩa petri. Các đĩa petri sau khi cấy được để trong tủ định ôn ở điều kiện nhiệt độ 30^{o}C. Công thức đối chứng là công thức chỉ cấy nấm nhưng không sử dụng thuốc.

Thí nghiệm theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 9 công thức, mỗi công thức lặp lại 3 lần, 3 đĩa petri/lần nhắc, mỗi lần theo dõi 30 bào tử/đĩa.

CT1: Viroval 50WP nồng độ 0,25%.

CT 2: Metaxyl 500WP nồng độ 0,1%

CT 3: Dithane M-45 80WP nồng độ 0,3%

CT 4: Zithane 80WP nồng độ 0,25%

CT 5: Amistar 250SC nồng độ 0,02%

CT 6: Polyram 80WG nồng độ 0,25%

CT 7: Antracol 70WP nồng độ 0,3%

CT 8: Polysuper 32 WP nồng độ 0,1%

CT 9 (Đ/C): Nước cất vô trùng

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ bào tử nẩy mầm (%), hiệu lực ức chế (%) sau 12 giờ, 24 giờ và 48 giờ nuôi cấy.

2.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc hóa học đến khả năng gây bệnh của nấm Alternaria sesami trong điều kiện invitro

Phương pháp 1: Xử lý thuốc Metaxyl 500WP, Antracol 70WP và Dithane M-45 80WP lên lá và quả. Sau 24 giờ tiến hành lây bệnh với nồng độ 10^5 cfu/ml lên lá và quả đã xử lý thuốc và đặt lại trong hộp nhựa. Lá và quả được lây bệnh nhân tạo nhưng không xử lý thuốc là công thức đối chứng.

Phương pháp 2: Lây bệnh nhân tạo trên lá và quả, nồng độ 10^5 cfu/ml. Sau 24 giờ, xử lý thuốc Metaxyl 500WP, Antracol 70WP và Dithane M-45 80WP. Lá và quả được lây bệnh nhân tạo nhưng không xử lý thuốc là công thức đối chứng.

Thí nghiệm đối với thuốc Metaxyl 500WP, Antracol 70WP, Dithane M-45 80WP ở nồng độ 3/4; 4/4 và 5/4 so với khuyến cáo, được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi công thức 3 lần

nhắc lại, mỗi lần nhắc 5 lá và 5 quả chanh leo.

2.2.3. Đánh giá hiệu lực phòng chống của thuốc hóa học đối với Alternaria sesami gây bệnh trên chanh leo trong điều kiện nhà lưới

CT1-3: Metaxyl 500WP nồng độ 0,075%, 01% và 0,125%

CT4-6: Antracol 70WP nồng độ 0,225%, 0,3% và 0,375%

CT7-9: Dithane M-45 80WP nồng độ 0,225%, 0,3% và 0,375%

CT10: Phun nước lã

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ bệnh trên lá, quả (%), chỉ số bệnh trên lá, quả (%).

2.2.4. Đánh giá hiệu lực của của thuốc hóa học đến khả năng phòng chống bệnh đốm nâu trên cây chanh leo ngoài sản xuất tại Nghệ An

- Thí nghiệm xử lý thuốc Antracol 70WP nồng độ 0,3%, Dithane M-45 80WP nồng độ 0,225% và Metaxyl 500WP nồng độ 0,1% tại trên vườn chanh leo 6 tháng tuổi, 1năm và vườn 2 năm tuổi. Thí nghiệm bố trí theo khối ngẫu nhiên hoàn toàn, gồm 4 công thức, mỗi công thức nhắc lại 3 lần, 10 cây/lần nhắc.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ bệnh trên lá, quả (%), chỉ số bệnh trên lá, quả (%) sau 14 ngày xử lý thuốc. Đối với công thức 2 và công thức 3 phun sau thu hoạch quả lần đầu kết hợp với cắt tỉa cành lá.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của thuốc hóa học đến khả năng nảy mầm của bào tử nấm *Alternaria sesami*

Bảng 1. Ảnh hưởng của thuốc hóa học đến khả năng nảy mầm của bào tử nấm Alternaria sesami (Viện BVTV - 2017)

CT	Tên thuốc	Nồng độ (%)	Tỷ lệ bào tử nảy mầm (%)			Hiệu lực (%)		
			12h	24h	48h	12h	24h	48h
1	Viroval 50WP	0,1%	0,00	0,00	13,33	100	100	86,67 ^{bc}
2	Metaxyl 500WP	0,25%	0,00	0,00	0,00	100	100	100^{a}
3	Dithane M-45 80WP	0,3%	0,00	0,00	0,00	100	100	100^{a}
4	Zithane 80WP	0,25%	0,00	0,00	6,70	100	100	93,33^{b}
5	Amistar 250SC	0,02%	0,00	0,00	26,67	100	100	73,33^{c}
6	Polyram 80WG	0,25%	0,00	0,00	13,33	100	100	86,67^{bc}
7	Antracol 70WP	0,3%	0,00	0,00	0,00	100	100	100^{a}
8	Polysuper 32 WP	0,1%	0,00	0,00	6,70	100	100	93,33^{b}
	Đ/C	-	*100*	*100*	*100*	-	-	-
	LSD							*6,32*

Ghi chú: Những chữ cái giống nhau trong cùng một cột biểu thị sự sai khác không có ý nghĩa ở mức $P \leq 0.05$.

Kết quả Bảng 1 cho thấy 8 loại thuốc tham gia thí nghiệm sau 12 giờ và sau 24 giờ có hiệu lực ức chế 100% đối với sự nảy mầm của bào tử nấm *A. sesami*.

Sau 48 giờ hiệu lực ức chế đối với sự nảy mầm bào tử nấm *A. sesami* của thuốc Dithane M-45 80WP, Metaxyl 500WP, Antracol 70WP ở mức tuyệt đối 100%, hiệu lực ức chế của thuốc Polysuper 32 WP và Zithane 80WP đều bằng nhau (93,33%), tiếp đến là thuốc Viroval 50WP và Polyram 80WG (86,67%) và hiệu lực ức chế thấp nhất trong tất cả các loại thuốc tham gia thí nghiệm là Amistar 250SC (73,33%).

Trong 8 loại thuốc tham gia thí nghiệm có 3 loại thuốc Dithane M-45 80WP, Antracol 70WP và Metaxyl 500WP có hiệu ức chế đối cao nhất đối với sự nảy mầm của bào tử *A. sesami*.

3.2. Đánh giá ảnh hưởng của một số loại thuốc hóa học ảnh hưởng đến khả năng gây bệnh của nấm *Alternaria sesami* trong điều kiện invitro

- Trước lây bệnh 24 giờ:

Thời gian ủ bệnh ở các công thức thuốc Dithane M-45 80WP dao động từ 6,79 ngày - 6,94 ngày (trên lá) và 6,46 ngày - 6,68 ngày (trên quả), khi xử lý Dithane M-45 80WP thời gian ủ bệnh trên lá và quả chanh leo đều tỷ lệ thuận với chiều tăng của nồng độ, thời gian ủ bệnh trên lá dài hơn so với thời gian ủ bệnh trên quả, tuy nhiên giữa các công thức về nồng độ thuốc khác nhau nhưng thời gian ủ bệnh giữa các công thức chưa có sự sai khác ở mức ý nghĩa thống kê (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của thuốc Metaxyl 500WP, Antracol 70WP, Dithane M-45 80WP đến khả năng gây bệnh của nấm A. sesami trong điều kiện invitro (Viện Bảo vệ thực vật - 2017)

Công thức	Nồng độ (%)	Thời điểm phun thuốc	*Dithane M-45 80WP*				*Antracol 70WP*				*Metaxyl 500WP*			
			Trên lá		Trên quả		Trên lá		Trên quả		Trên lá		Trên quả	
			Thời gian ủ bệnh (ngày)	ĐK vết bệnh (mm)	Thời gian ủ bệnh (ngày)	ĐK vết bệnh (mm)	Thời gian ủ bệnh (ngày)	ĐK vết bệnh (mm)	Thời gian ủ bệnh (ngày)	ĐK vết bệnh (mm)	Thời gian ủ bệnh (ngày)	ĐK vết bệnh (mm)	Thời gian ủ bệnh (ngày)	ĐK vết bệnh (mm)
CT1	3/4 khuyến cáo	Trước lây bệnh 24 giờ	6,79^{a}	4,59^{a}	6,46^{b}	2,49^{a}	7,25^{c}	4,61^{a}	6,45^{c}	2,60^{a}	11,94^{a}	4,11^{b}	10,28^{a}	2,10^{b}
CT2	khuyến cáo		6,90^{a}	4,56^{a}	6,67^{a}	2,49^{a}	7,73^{c}	4,60^{a}	6,46^{c}	2,58^{a}	12,39^{a}	4,17^{b}	10,29^{a}	2,22^{b}
CT3	5/4 khuyến cáo		6,94^{a}	4,09^{b}	6,68^{a}	2,44^{b}	9,41^{a}	4,48^{a}	8,33^{a}	2,57^{a}	12,46^{a}	4,17^{b}	10,32^{a}	2,24^{b}
CT4	3/4 khuyến cáo	Sau lây bệnh 24 giờ	6,14^{b}	4,66^{a}	6,02^{b}	2,60^{a}	6,18^{d}	4,63^{a}	6,01^{c}	2,60^{a}	8,14^{b}	4,54^{a}	7,82^{b}	2,52^{a}
CT5	khuyến cáo		6,15^{b}	4,66^{a}	6,14^{b}	2,59^{a}	6,21^{d}	4,63^{a}	6,16c^{c}	2,59^{a}	8,16^{b}	4,53^{a}	7,96^{b}	2,56^{a}
CT6	5/4 khuyến cáo		6,15^{b}	4,59^{a}	6,14^{b}	2,58^{a}	8,04^{b}	4,58^{a}	7,13^{b}	2,59^{a}	8,16^{b}	4,41^{a}	7,96^{b}	2,46^{a}
Đ/C		Nước lã	5,02	5,28	4,13	3,78	5,02	5,28	4,13	3,78	5,02	5,28	4,13	3,78
$LSD_{0.05}$			0,62	0,38	0,53	0,22	0,57	0,39	0,44	0,19	2,67	0,34	1,39	0,28

Ghi chú: Những chữ cái giống nhau trong cùng một cột biểu thị sự sai khác không có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,05$ theo phân tích Duncan.

Đối với thuốc Antracol thời gian ủ bệnh trên lá dài hơn so với thời gian ủ bệnh trên quả, thời gian ủ bệnh trên lá dài nhất là 9,41 ngày (CT3) thấp nhất là 7,25 ngày (CT1), thời gian ủ bệnh trên quả dài nhất là 8,33 ngày (CT3) và thấp nhất là 6,45 ngày (CT1). Đường kính vết bệnh trên lá cũng lớn so với đường kính vết bệnh trên quả ở tất cả các công thức, nhưng đường kính vết bệnh giữa các công thức nồng độ thuốc khác nhau chưa có sự sai khác ở mức ý nghĩa thống kê.

Thời gian ủ bệnh trên lá (11,9 - 12,46 ngày) và trên quả (10,28 - 10,32 ngày) ở các CT của Metaxyl 500WP dài hơn so với các CT của Antracol 70WP và Dithane M-45 80WP.

- Sau lây bệnh 24 giờ:

Khi xử lý thuốc Dithane M-45 80WP thời gian ủ bệnh trên lá ở các công thức dao động từ 6,14 ngày - 6,15 ngày, trên quả 6,02 ngày - 6,14 ngày, giữa các công thức thí nghiệm nồng độ thuốc khác nhau nhưng thời gian ủ bệnh và giữa các công thức trên lá và trên quả chưa có sự sai khác ở mức ý nghĩa 0,05%.

Khi xử lý thuốc Antracol 70WP thời gian ủ bệnh trên lá dài hơn so với thời gian ủ bệnh trên quả và thời gian ủ bệnh trên lá và trên quả giữa CT1 và CT2 chưa có sự sai khác còn ở CT3 đã có sự sai khác ở mức ý nghĩa thống kê.

Khi xử lý thuốc Metaxyl 500WP sau 24 giờ lây bệnh thời gian ủ bệnh trên lá và trên quả, đã giảm từ 12,46 ngày xuống còn 8,16 ngày (CT3 và CT6), trên quả 10,32 ngày xuống còn 7,96 ngày so với trước 24 giờ xử lý (CT3 và CT6).

3.3. Đánh giá hiệu lực của của một số loại thuốc hóa học đến khả năng phòng chống bệnh đốm nâu *A. sesami* gây bệnh trên cây chanh leo trong điều kiện nhà lưới

Để lựa chọn đúng thuốc và nồng độ của thuốc ra thí nghiệm ngoài sản xuất, tiếp tục tiến hành thí nghiệm đánh giá hiệu lực của thuốc Metaxyl 500WP, Antracol 70WP và Dithane M-45 80WP đến khả năng phòng chống bệnh đốm nâu *Alternaria sesami* gây bệnh trên cây chanh leo trong điều kiện nhà lưới.

Bảng 3. Hiệu lực phòng chống nấm Alternaria sesami gây bệnh đốm nâu trên cây chanh leo của thuốc hóa học trong điều kiện nhà lưới (Viện Bảo vệ thực vật - 2017)

CT	Thuốc	Nồng độ		Trên lá			Trên quả		
				TLB (%)	CSB (%)	HLPT (%)	TLB (%)	CSB (%)	HLPT (%)
CT1	Metaxyl 500WP	0,075	3/4KC	100	5.53	72,85^{b}	100	9.48	66,27^{bc}
CT2		0,1	KC	100	4,20	79,39^{a}	100	8,68	69,15^{a}
CT3		0,125	5/4KC	100	3,67	82,03^{a}	100	7,78	72,33^{a}
CT4	Antracol 70WP	0,225	3/4KC	100	8,10	60,26^{c}	100	13,82	50,83^{c}
CT5		0,3	KC	100	6,59	67,64^{bc}	100	13,04	53,61^{b}
CT6		0,375	5/4KC	100	6,07	70,18^{b}	100	9,79	65,18^{bc}
CT7	Dithane M-45 80WP	0,225	3/4KC	100	4,81	76,39^{a}	100	9,19	67,32^{a}
CT8		0,3	KC	100	4,68	77,03^{a}	100	8,99	68,04^{a}
CT9		0,375	5/4KC	100	4,65	77,10^{a}	100	8,95	68,16^{a}
Đ/C	Nước cất				20,37			28,12	
$LSD_{0,05}$						5,64			4,07

Đối với thuốc Metaxyl 500WP thí nghiệm nồng độ 0,075% và 0,1% HLPT trên lá ở CT1, CT2, CT 3 lần lượt là 72,85%, 79,39% và 82,03% và trên quả là 66,27%, 69,15%, 72,33%. Hiệu lực phòng chống ở cả 3 CT đều có tác dụng rất tốt đối với nấm *Alternaria sesami* trong trong điều kiện nhà lưới, hơn nữa HLPT giữa CT2 và CT3 chưa có sự khác biệt, khi tăng nồng độ Metaxyl 500WP từ 0,1% lên 0,125% HLPT *Alternaria sesami* trên lá và trên quả chưa có sự sai khác (Bảng 3).

So với Metaxyl 500WP, hiệu lực trừ bệnh của thuốc Antracol 70WP và Dithane M-45 80WP ở các nồng độ 0,225; 0,3 và 0,375% khác nhau trên là và quả chanh leo đều thấp hơn. Đối với Antracol 70WP, HLPT trên lá và trên quả ở các công thức đều có sự sai khác, HLPT trên lá dao động 60,26 - 80,18% và trên quả 50,83 - 61,15%. Đối với thuốc Dithane M-45 80WP thí nghiệm các nồng độ trên lá và trên quả chanh leo, HLPT (trên lá từ 76,39 - 77,10%, trên quả từ 66,32 - 67,18%) cao hơn nhiều so với HLPT của Antracol 70WP (Bảng 3).

3.4. Hiệu lực phòng chống của thuốc Antracol 70WP, Metaxyl 500WP và Dithane M-45 80WP đối với bệnh đốm nâu *Alternaria sesami* trên vườn chanh leo ngoài sản xuất tại Nghệ An

Từ kết quả thí nghiệm trong điều kiện nhà lưới lựa chọn Antracol 70WP 0,03% (KC), Dithane M-45 80WP 0,3% (KC) và Metaxyl 500WP 0,1% để đánh giá hiệu lực của thuốc trên vườn cây chanh leo ngoài sản xuất ở giai đoạn cây thời kỳ kiến thiết cơ bản (6 tháng tuổi) và thời kỳ kinh doanh.

** Hiệu lực của Antracol 70WP 0,3% (KC) phòng chống bệnh đốm nâu trên cây chanh leo ngoài sản xuất:*

Bảng 4. Hiệu lực của thuốc Antracol 70WP trong phòng chống nấm A. sesami gây bệnh đốm nâu trên cây chanh leo ngoài sản xuất (Nghệ An 2017 - 2018)

Công thức	Thời điểm xử lý thuốc	Trên quả					Trên lá				
		TXL		SXL		HLPT (%)	TXL		SXL		HLPT (%)
		TLB (%)	CSB (%)	TLB (%)	CSB (%)		TLB (%)	CSB (%)	TLB (%)	CSB (%)	
1	6 tháng tuổi	-	-	-	-	-	12,21	2,97	18,06	5,12	76,27[a]
2	1 năm tuổi	22,42	5,26	44,8	10,09	63,44[a]	19.95	3,15	21,87	7,91	65,39[b]
3	2 năm tuổi	23,95	5,73	58,18	17,81	40,81[b]	23,16	3,20	27,73	11,97	49,38[c]
4(Đ/C)	Phun nước lã	22,16	5,74	64,82	30,09	-	20,04	3,15	30,78	22,85	-
$LSD_{0,05}$						*2,92*					*3,25*

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột biểu hiện các chữ cái giống nhau không sai khác có ý nghĩa ở mức xác xuất $P \leq 0.05$.

Kết quả Bảng 4 cho thấy ở thời kỳ sau trồng 1 năm tuổi hiệu lực của thuốc Antracol 70WP trên lá là 65,39% còn ở trên quả là 63,44% (thấp hơn so với HLPT ở thời kỳ kiến thiết cơ bản). Khi vườn chanh leo bước sang năm thứ 2, HLPT nấm *Alternaria sesami* gây bệnh đốm nâu trên lá và quả chanh leo rất thấp, HLPT lá là 49,38% còn ở trên quả chỉ đạt 40,81%

** Hiệu lực của Dithane M- 45 80WP 0,225% (3/4KC) trong phòng chống nấm Alternaria sesami gây bệnh đốm nâu trên cây chanh leo ngoài sản xuất:*

Kết quả thử nghiệm đối với thuốc Dithane M-45 80WP cho thấy khi sử dụng nồng độ 0,225% HLPT ở tất cả các thời kỳ đều cao hơn so với thuốc Antracol 70WP. Ở thời kỳ kiến thiết cơ bản HLPT trên lá lên tới 81,38%, theo thời gian sinh trưởng của cây nguồn bệnh trên cây ngày càng tăng HLPT của thuốc Dithane M-45 80WP có giảm tuy nhiên ở thời kỳ sau trồng 6 tháng đến 1 năm tuổi HLPT trên lá và trên quả vẫn đạt mức cao > 70%, ở thời kỳ cây 2 năm tuổi HLPT trên lá là 62,15% và trên quả là 57,32% (Bảng 5).

Bảng 5. Hiệu lực của thuốc Dithane M -45 80WP trong phòng chống nấm Alternaria sesami gây bệnh đốm nâu trên cây chanh leo ngoài sản xuất (Nghệ An 2017 - 2018)

Công thức	Tuổi cây	Trên quả					Trên lá				
		TXL		SXL		HLPT (%)	TXL		SXL		HLPT (%)
		TLB (%)	CSB (%)	TLB (%)	CSB (%)		TLB (%)	CSB (%)	TLB (%)	CSB (%)	
1	6 tháng tuổi	-	-	-	-	-	13,05	3,14	21,03	4,25	81,38[a]
2	1 năm tuổi	21,94	5,14	41.13	9,00	70,06[a]	19,63	3,15	24.80	5,66	75,24[b]
3	1 năm tuổi	24,58	5,73	60.06	12,84	57,32[b]	23,22	3,25	28.62	8,95	62,15[c]
4 (Đ/C)	Phun nước lã	22,16	5,74	64,82	30,09	-	20,04	3,15	30,78	22,85	-
	$LSD_{0,05}$					*4,61*					*5,34*

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột biểu hiện các chữ cái giống nhau không sai khác có ý nghĩa ở mức xác xuất $P \leq 0,05$.

** Hiệu lực của thuốc Metaxyl 500WP phòng chống bệnh đốm nâu chanh leo:*

Khi sử dụng Metaxyl 500WP 0,1% (KC) đối với vườn chanh leo ở thời kỳ kiến thiết cơ bản và thời kỳ kinh doanh HLPT giữa các công thức đã có sự khác biệt. Hiệu lực của thuốc phòng chống nấm *A. sesami* trên lá cao hơn so với trên quả. Ở thời kỳ kiến thiết cơ bản (từ trồng đến 6 tháng) HLPT ở CT1 (81,98%) cao nhất so với HLPT của các công thức còn lại, ở thời kỳ kinh doanh 1 năm tuổi HLPT trên lá và trên quả lần lượt là 77,37% và 72,01%.

Khi vườn chanh leo bước sang năm thứ 2, do nguồn bệnh tồn tại trên cây nhiều, nấm *Alternaria sesami* tiếp tục xâm nhiễm và gây hại trở lại trên lá và trên quả nên HLPT Metaxyl 500WP 0,1% giảm so với thời kỳ trước, HLPT trên lá và trên quả chỉ đạt 69,25% và 61,82%.

Bảng 6. Hiệu lực của thuốc Metaxyl 500WP trong phòng chống nấm *Alternaria sesami* gây bệnh đốm nâu trên cây chanh leo ngoài sản xuất (Nghệ An 2017 - 2018)

Công thức	Tuổi cây	Trên quả					Trên lá				
		TXL		SXL		HLPT (%)	TXL		SXL		HLPT (%)
		TLB (%)	CSB (%)	TLB (%)	CSB (%)		TLB (%)	CSB (%)	TLB (%)	CSB (%)	
1	6 tháng tuổi			-	-	-	12,48	3,13	20.06	4,12	81,98[a]
2	1 năm tuổi	21,69	5,75	56.32	8,42	72,01[a]	19,31	3,14	27.87	5,17	77,37[b]
3	2 năm tuổi	27,72	6,24	61.90	12,49	61,82[b]	23,58	3,16	30.73	7,07	69,25[c]
4 (Đ/C)	Phun nước lã	22,16	5,74	64,82	30,09	-	20,04	3,15	30,78	22,85	-
	$LSD_{0,05}$					**3,84**					**4,23**

Kết quả thử nghiệm cho thấy thuốc Antracol 70WP nồng độ 0,375%, Dithane M-45 80WP nồng độ 0,3% và Metaxyl 500WP nồng độ 0,1% có hiệu quả cao trong phòng chống bệnh đốm nâu chanh leo tại Nghệ An.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

- Thuốc Antracol 70WP, Dithane M-45 80WP và Metaxyl 500WP có hiệu lực ức chế khả năng nảy mầm của bào tử nấm *Alternaria sesami* đạt 100% sau 24 giờ và sau 48 giờ xử lý.

- Trong điều kiện sản xuất, ba loại thuốc Antracol 70WP nồng độ 0,3%, Dithane M-45 80WP nồng độ 0,225% và Metaxyl 500WP nồng độ 0,1% có hiệu quả cao trong phòng chống bệnh đốm nâu chanh leo tại Nghệ An.

4.2. Đề nghị

Có thể sử dụng Antracol 70WP nồng độ 0,3%, Dithane M-45 80WP nồng độ 0,225% và Metaxyl 500WP nồng độ 0,1% để phòng chống bệnh đốm nâu trên chanh leo, khi sử dụng cần luân phiên các loại thuốc trên tùy thuộc vào điều kiện sản xuất và tình hình bệnh hại trên vườn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dipak T. Nagrale, Lalan Sharma, Sunil Kumar, Shailesh P. Recent Diagnostics and Detection Tools: Implications for Plant Pathogenic *Alternaria* and Their Disease Management. Gawande Biology (2016).
2. Woudenberg JHC, Groenewald JZ, Binder M, Crous PW (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* 75: 171 - 212.
3. Manicom B, Ruggiero C, Ploetz RC, Goes A de (2003). Diseases of Passion fruit. In: Ploetz RC (Ed) Diseases of Tropical fruit crops, CAB international, Wallingford, pp 413 - 441.
4. Fischer Ivan H, Rezende Jorge AM (2008). Diseases of Passion Flower (Passiflora ssp.) Pest Technology, Global Science Books.
5. Rheinlander PA, Fullerton RA, Sale PR (2009). Current fungicide options for control of canopy diseases in commercial passionfruit orchards in New Zealand. Brochure. Distributed by The N.Z. Passionfruit Growers Association Incorporated.

KHẢO SÁT HIỆU QUẢ PHÒNG TRỊ BỆNH BẠC LÁ TRÊN RUỘNG LÚA CỦA VI KHUẨN *Serratia nematodiphila* CT-78 SAU 12 THÁNG TỒN TRỮ

Nguyễn Thị Thùy Dung[1], Nguyễn Nguyệt Ánh[2], Nguyễn Đắc Khoa[2]*

[1]Trường Trung học Phổ thông Lương Định Của, TP. Cần Thơ

[2]Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

***Tác giả liên hệ: ndkhoa@ctu.edu.vn*

ABSTRACT

Disease-reducing effects of the 12-month formulations of *Serratia nematodiphila* CT-78 against rice bacterial leaf blight under field conditions

The aim of this study was to test for the disease-reducing effects of the 12-month formulations of the antagonistic Serratia nematodiphila CT-78 against rice bacterial leaf blight (Xanthomonas oryzae pv. oryzae) under field conditions. Three formulations composed of rice bran, rice husk and talc powder were tested. Experiments were carried out during the wet and dry seasons of 2019-2020. Rice seeds were treated with the formulations and pathogen inoculation was done at 45 days after sowing. The effects were shown and maitained until 15 days after pathogen inoculation by the formulations of rice bran, rice husk in both seasons.

Keywords: *bacterial leaf blight, formulation, rice, Serratia nematodiphila, Xanthomonas oryzae pv. oryzae*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78 đã được phân lập từ đất trồng lúa tại Cần Thơ có khả năng đối kháng mạnh với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) gây bệnh bạc lá lúa (cháy bìa lá lúa) trên đĩa thạch, và khả năng làm giảm bệnh bac lá lúa? trong điều kiện nhà lưới và ngoài đồng (Nguyễn Đặng Ngọc Giàu, 2014; Phạm Trút My, 2015). Trong nghiên cứu tiếp theo, Hồ Nguyễn Lam Linh (2018) đã tuyển chọn được cám, trấu và bột talc để làm chất mang tồn trữ vi khuẩn *S. nematodiphila* CT-78 đến 12 tháng. Vi khuẩn trong các túi chất mang này vẫn duy trì mật số và hiệu quả giảm bệnh tốt trong điều kiện nhà lưới. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện để tiếp tục khảo sát hiệu quả làm giảm bệnh bạc lá của chủng vi khuẩn *S. nematodiphila* CT-78 sau 12 tháng tồn trữ trong điều kiện ngoài đồng.

Người phản biện: TS. Lê Phước Thạnh.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên vật liệu

Vi khuẩn đối kháng *S. nematodiphila* CT-78 và vi khuẩn *Xoo* được Nhóm Nghiên cứu Bệnh cây, Phòng Thí nghiệm Sinh học Phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ cung cấp. Giống lúa được sử dụng là Đài thơm (vụ Đông Xuân) và OM380 (vụ Hè Thu).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tạo chế phẩm dạng bột

Mỗi loại chất mang gồm bột talc thương mại, vỏ trấu và cám được trộn riêng lẻ với $CaCO_3$ và CMC theo công thức của Vidhyasekaran và Muthamilan (1995). Tiếp theo, khử trùng nhiệt ướt 2 lần (mỗi lần cách nhau 24 giờ) sau khi đã phân phối chất mang vào các túi nylon với khối lượng 25 g/túi.

Thí nghiệm được chia thành 2 nhóm nghiệm thức là *(1)* nhóm chất mang cám và trấu với 50% độ ẩm và *(2)* nhóm chất mang bột talc 50 - 20% độ ẩm. Các túi chất mang ở nhóm *(1)* được chủng 2×10^6 CFU/mL (Colony Forming Unit) huyền phù vi khuẩn, điều chỉnh độ ẩm đạt khoảng 50%, tiến hành ủ cho đến khi mật số đạt đến 10^9 CFU/g thì tiến hành tồn trữ trong điều kiện phòng thí nghiệm (25 ± 2^oC). Các túi chất mang ở nhóm *(2)* được thực hiện tương tự như trên, nhưng độ ẩm được điều chỉnh xuống dưới 20% (bằng cách cách sấy ở 38^oC) sau khi vi khuẩn đối kháng đạt mật số 10^9 CFU/g và tiến hành tồn trữ trong điều kiện phòng thí nghiệm (25 ± 2^oC).

2.2.2. Khảo sát hiệu quả giảm bệnh của vi khuẩn Serratia nematodiphila CT-78 ở điều kiện ngoài đồng sau 12 tháng tồn trữ

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức khối hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 5 nghiệm thức cám, trấu, bột talc, Starner 20WP (đối chứng dương) và nước cất (đối chứng âm). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần gồm 15 lô (20 m^2/lô). Vi khuẩn trong các túi chất mang cám, trấu và bột talc được pha loãng đến mật số 10^5 CFU/mL, sau đó được sử dụng để ngâm hạt lúa giống trong 2 giờ trước khi sạ (400 g/lô thí nghiệm). Lúa được canh tác theo quy trình của nông dân địa phương.

Đối với phương pháp chủng bệnh, huyền phù vi khuẩn *Xoo* với mật số 10^9 CFU/mL được phun tại thời điểm 45 ngày sau sạ (640 mL/lô thí nghiệm). Chỉ tiêu được ghi nhận tại thời điểm 5, 10 và 15 ngày sau chủng bệnh (NSCB) tại 9 điểm/lô, mỗi điểm được đặt khung kim loại có kích thước 20 cm × 20 cm. Những chỉ tiêu được ghi nhận bao gồm tổng số chồi, tổng số lá, tổng số chồi bệnh, số lá bệnh, phần trăm diện tích lá nhiễm bệnh để xác định mức độ bệnh theo thang đánh giá IRRI (1996), trọng lượng hạt trong mỗi ô, tổng số hạt, số hạt chắc, số hạt chắc bị lem và số hạt lép.

2.2.3. Phân tích số liệu

Số liệu được xử lý sơ bộ bằng phần mềm Microsoft Excel 2013. Sau đó, các số liệu này được phân tích phương sai một chiều (One-way ANOVA) bằng phần mềm R (vesion 3.5.3), kiểm định Duncan với $\alpha = 5\%$.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

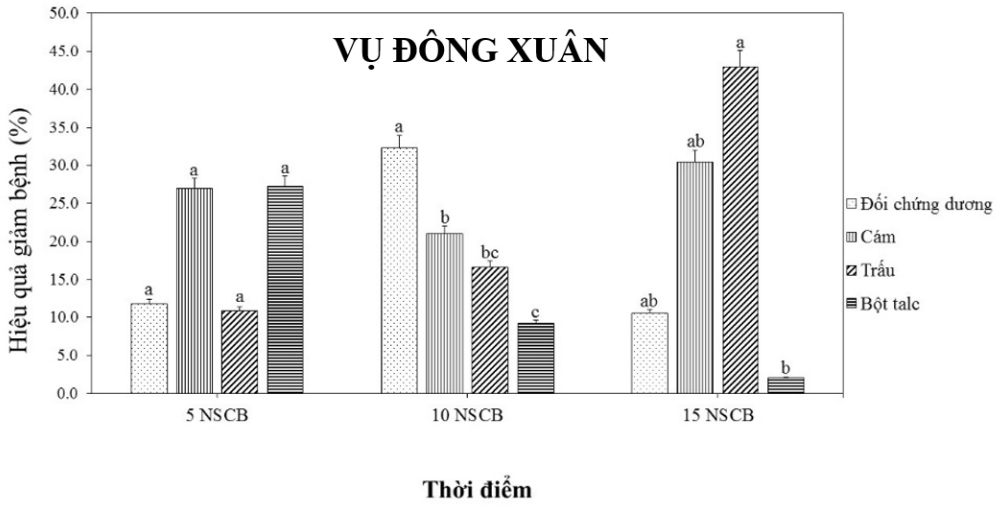
3.1. Tỷ lệ chồi bệnh, tỷ lệ lá bệnh và mức độ bệnh của lúa ở các nghiệm thức tại các thời điểm 5, 10 và 15 ngày sau chủng bệnh

Chỉ tiêu tỷ lệ chồi bệnh và tỷ lệ lá bệnh được ghi nhận tại thời điểm 5, 10 và 15 NSCB của cả hai mùa vụ đều khác biệt không có ý nghĩa so với đối chứng. Tuy nhiên, kết quả khảo sát tỷ lệ chồi bệnh và tỷ lệ lá bệnh của các nghiệm thức có sử dụng chất mang cho thấy vụ Hè Thu có tỷ lệ cao hơn so với vụ Đông Xuân.

Kết quả khảo sát mức độ bệnh tại vụ Đông Xuân cho thấy lúa ở nghiệm thức cám, trấu và bột talc đều có mức độ bệnh thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với đối chứng âm. So với vụ Đông Xuân thì vụ Hè Thu có mức độ bệnh cao hơn ở tất cả các nghiệm thức do điều kiện thời tiết vụ Hè Thu thuận lợi cho vi khuẩn gây bệnh bạc lá phát triển mạnh.

3.2. Hiệu quả làm giảm bệnh của vi khuẩn đối kháng ở các nghiệm thức vào thời điểm 5, 10 và 15 ngày sau chủng bệnh

Kết quả ở vụ Đông Xuân cho thấy vi khuẩn đối kháng trong cả ba nghiệm thức khảo sát vẫn còn duy trì hiệu quả hiệu làm quả giảm bệnh đến 15 NSCB (Hình 1). Trong đó, hiệu quả làm giảm bệnh của vi khuẩn trong nghiệm thức trấu (43,0%) và cám (30,5%) là tốt nhất.

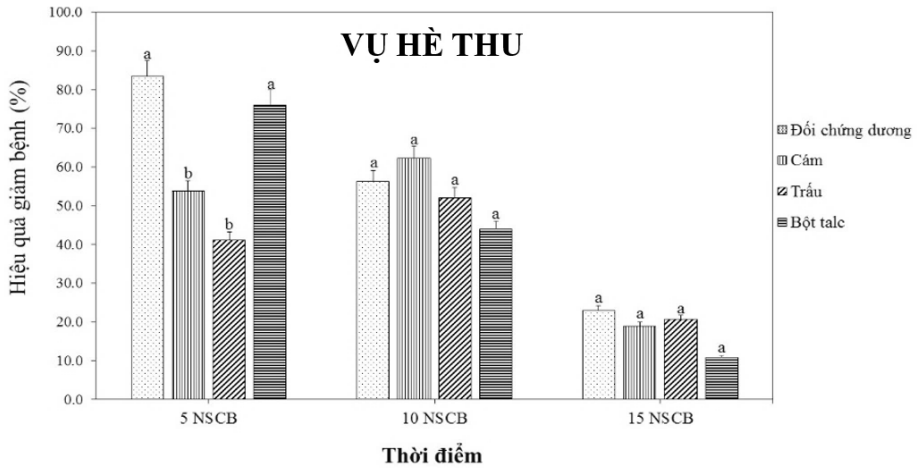


Hình 1. Hiệu quả làm giảm bệnh của vi khuẩn đối kháng được tồn trữ trong các nghiệm thức sau 12 tháng trong vụ Đông Xuân 2019 - 2020

Ghi chú: Trong cùng một thời điểm khảo sát, các cột có một hay nhiều chữ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%. NSCB: ngày sau chủng bệnh.

Trong vụ Hè Thu 2019, vi khuẩn đối kháng trong nghiệm thức bột talc (76,1%) có hiệu quả làm giảm bệnh tốt nhất, tương đương với đối chứng dương (83,4%) tại

thời điểm 5 NSCB. Vi khuẩn đối kháng trong các nghiệm thức cám (53,8%) và trấu (41,2%) cho hiệu quả làm giảm bệnh thấp hơn có ý nghĩa so với nghiệm thức bột talc. Tại thời điểm 10 và 15 NSCB, vi khuẩn trong các nghiệm thức cám, trấu, talc đều cho hiệu quả làm giảm bệnh tương đương nhau. Tóm lại, các chất mang cám, trấu và bột talc đều có khả năng giúp vi khuẩn đối kháng duy trì hiệu quả làm giảm bệnh đến 15 NSCB trong vụ Hè Thu (Hình 2).



Hình 2. Hiệu quả làm giảm bệnh của vi khuẩn đối kháng được tồn trữ trong các nghiệm thức sau 12 tháng trong vụ Hè Thu 2019

Ghi chú: Trong cùng một thời điểm khảo sát, các cột có một hay nhiều chữ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%. NSCB: ngày sau chủng bệnh.

Năng suất lúa sau khi thu hoạch ở tất các nghiệm thức trong hai vụ lúa đều khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Tuy nhiên năng suất thực tế ở vụ Đông Xuân cao hơn nhiều so với vụ Hè Thu do điều kiện canh tác vụ Đông xuân thuận lợi hơn so với Hè Thu.

Nhìn chung, vi khuẩn *S. nematodiphila* CT-78 được tồn trữ trong ba loại chất mang cám, trấu và bột talc sau 12 tháng đều có hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa trong vụ Đông Xuân và Hè Thu. Trong đó vi khuẩn trong nghiệm thức cám và trấu cho hiệu quả giảm bệnh tốt ở vụ Đông Xuân. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Ou (1972) về đặc điểm thời tiết mưa nhiều kèm theo bão ở vụ Hè Thu tạo điều kiện thuận lợi cho bệnh bạc lá phát triển mạnh hơn so với vụ Đông Xuân. Điều này cũng là một trong các nguyên nhân gây giảm hiệu quả của chế phẩm tồn trữ.

Vi khuẩn *S. nematodiphila* CT-78 được tồn trữ trong chất mang cám, trấu có hiệu quả làm giảm bệnh cao tương đương với thuốc hóa học và kéo dài đến 15 NSCB. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Phạm Trút My (2015) trong điều kiện vi khuẩn đối kháng chưa qua tồn trữ trong chất mang đã kết luận rằng khi xử lý vi khuẩn *S. nematodiphila* cho hiệu quả giảm bệnh bạc lá tốt.

Các chỉ tiêu chất lượng hạt lúa trong ba nghiệm thức khảo sát tại vụ Hè Thu thì ở nghiệm thức trấu đạt tỷ lệ cao hơn đối chứng âm. Trong vụ Đông Xuân, nghiệm thức trấu cho thấy kém hiệu quả hơn khi tỷ lệ hạt chắc lại thấp hơn so với đối chứng âm. Riêng nghiệm thức bột talc thể hiện được hiệu quả với tỷ lệ hạt lem thấp hơn so với đối chứng dương. Tỷ lệ hạt lép của các nghiệm thức tại hai mùa vụ khảo sát đều không cho thấy sự khác biệt thống kê.

IV. KẾT LUẬN

Vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78 được tồn trữ trong ba nghiệm thức chất mang sau 12 tháng đều duy trì được hiệu quả phòng trị bệnh bạc lá lúa trong hai vụ Hè Thu 2019 và Đông Xuân 2019 - 2020. Trong đó, chất mang cám và trấu giúp vi khuẩn duy trì hiệu quả giảm bệnh cao và kéo dài đến 15 NSCB trong vụ Đông Xuân.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hồ Nguyễn Lam Linh (2018). Tuyển chọn chất mang tồn trữ vi khuẩn *Serratia nematodiphila* đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh cháy bìa lá lúa. Luận văn Đại học ngành Công nghệ Sinh học. Đại học Cần Thơ. Cần Thơ
2. IRRI (1996). Standard evaluation and utilization system for rice in Manila. International Rice Research Institute. Phillippines.
3. Nguyễn Đặng Ngọc Giàu (2014). Phân lập, định danh và khảo sát khả năng phòng trừ bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn đối kháng trong đất thành phố Cần Thơ, Hậu Giang. Luận văn Thạc sĩ ngành Công nghệ Sinh học. Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.
4. Ou, S.H. (1972). Bacterial disease. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surey, England. 51 - 79.
5. Phạm Trút My (2015). Khảo sát hiệu quả phòng trừ bệnh cháy bìa lá của vi khuẩn *Serratia nematodiphila* trên ruộng lúa. Luận văn Thạc sĩ ngành Công nghệ Sinh học. Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.
6. Vidhyasekaran, P. and Muthamilan, M. (1995). Development of formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. *Plant Disease*, 79: 782 - 786.

ẢNH HƯỞNG CỦA CHẾ PHẨM HTD-CNSH-CF LÊN SINH TRƯỞNG CÂY CÀ PHÊ

Nguyễn Thị Hồng Hà[1], Trần Thị Hoa[1], Đỗ Thị Gấm[3], Hà Việt Sơn[3], Hoàng Thị HuyềnTrang[1], Chu Hoàng Hà[1, 2] Đỗ Tiến Phát[1, 2], Phạm Bích Ngọc[1, 2 *]

[1] Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

[2] Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

[3] Trung tâm Phát triển công nghệ cao, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

ABSTRACT

Effects of HTD-CNSH-CF products on coffee growth

HTD-CNSH-CF is a beneficial microorganism product consisting different microorganisms isolated from roots of coffee plants in Tay Nguyen region. These microorganisms are all classified to the biosafety level 1 group and showed capacity to produce plant growth hormones and other biological active compounds. At the standard density (TCN 6167-1997; TCVN 6166: 2002), this product can be stored at room temperature and used in6 months. We have applied and evaluated the effects of this product on coffee plants at different growth stages. All tested coffee plants displayed enhancements in plant growth and development indicating by longer stem, dark green and shiny coffee leaves as compared to the plants which were not added this product. The clear enhancements was observed on coffee plants at the field condition. This premary results indicated the poteintial in development of a beneficial microorganism product for coffee cultivation.

Keywords: *Probiotics, HTD-CNSH-CF, coffee, stimulate growth.*

I. GIỚI THIỆU

Phân bón vi sinh có nhiều ưu điểm so với phân bón hóa học, ngoài tác dụng nâng cao năng suất và chất lượng cây trồng, tiết kiệm phân vô cơ, giảm chi phí sản xuất thì phân vi sinh còn góp phần quan trọng trong việc bảo vệ môi trường và phát triển bền vững. Việc sử dụng các vi sinh vật để sản xuất phân vi sinh đang được coi là tiềm năng để nâng cao năng suất cây trồng làm cho cây sinh trưởng mạnh mẽ bằng cách tăng lượng dinh dưỡng. Sử dụng phân hữu cơ vi sinh làm tăng năng suất cây trồng, chất lượng sản

Người phản biện: TS. Phan Thị Hồng Thảo

phẩm tốt hơn, giảm hàm lượng nitrat tôn dư trong cây, góp phần đáp ứng yêu cầu của một nền nông nghiệp hữu cơ bền vững, xanh sạch và an toàn [2]. Trong canh tác cây cà phê ở nước ta có nhiều loại phân bón đã được sử dụng, trong đó có cả các chế phẩm vi sinh vật như phân hữu cơ vi sinh Sông Gianh của Tổng Công ty Sông Gianh, phân hữu cơ vi sinh Quế Lâm của Tập đoàn Quế Lâm, chế phẩm vi sinh FUSA-USA nhập khẩu từ Mỹ... Các loại chế phẩm vi sinh vật này được sản xuất đại trà và sử dụng chung cho nhiều loại cây trồng. Vì vậy, tính đặc hiệu đối với từng đối tượng cây trồng cụ thể thường không cao. Việc sử dụng các chế phẩm này chưa cho thấy hiệu quả tốt vớisự sinh trưởng, phát triển của cây cà phê. Hiện nay, trên thị trường ở nước ta chưa có loại phân vi sinh nào chuyên dùng cho chăm sóc cây cà phê [3].

Trong khuôn khổ đề tài nghiên cứu,KHCN-TN/16-20, chúng tôi đã phân lập, đánh giá và xác định được hoạt tính của một số chủng vi sinh vật tiềm năng trên cây cà phê. Thông qua đánh giá hình thái, phân định loài, phân tích hoạt tính enzyme và khả năng sản sinh chất điều hòasinh trưởng, đã lựa chọn được các chủng vi sinh vật tiềm năng để phát triển chế phẩm sinh học HTD-CNSH-CF dùng cho cây cà phê. Chế phẩm bao gồm các chủng *Bacillus* sp. và xạ khuẩn *Streptomyces.* sp., được nuôi cấy và bảo quản trong hỗn hợp chất mang bao gồm than bùn, cám trấu, chất dinh dưỡng vàvi lượng. Sản phẩm cuối cùng được bảo quản ở nhiệt độ phòng và có thể sử dụng trong 6 tháng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày các kết quả đánh giá hiệu quả của chế phẩm này đối với sinh trưởng và phát triển của cây cà phê ở các giai đoạn khác nhau. Kết quả cho thấy hiệu quả của chế phẩm này trong kích thích sinh trưởng của rễ, thân lá cây cà phê. Kết quả này là cơ sở để chúng tôi mở rộng thử nghiệm và phát triển ứng dụng trong tương lai.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Chế phẩm HTD-CNSH- CF gồm các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. và xạ khuẩn *Streptomyces* sp. nội sinh phân lập từ cây cà phê tái canh có trong bộ sưu tập Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chế phẩm NOLATRI chứa thành phần chính là nấm *Trichoderma* và các enzyme thủy phân như cellulase, chitinase, xylanase, hemicellulase, giúp cho cây trồng kháng bệnh do Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh sản xuất. Cây cà phê 10 ngày tuổi.

2.2. Phương pháp

Trộn chế phẩm có độ ẩm khoảng 50 - 60% sau đó bón trực tiếp lên cây cà phê với tỉ lệ chế phẩm/giá thể đóng bầu cây là 5% (50 g chế phẩm/1000 g đất), định kỳ 10 - 15 ngày bổ sung một lượt. Các công thức thí nghiệm bao gồm: ĐC (Đối chứng) - Không bổ sung chế phẩm; TN1 - Bổ sung chế phẩm HTD-CNSH- CF; TN2 - Bổ sung chế phẩm NOLATRI chuyên dùng cho cây cà phê. Thí nghiệm gồm 3 công thức bố trí theo khối ngẫu nhiên, 3 lần nhắc lại.

Chỉ tiêu theo dõi bao gồm: Chiều cao cây, số cành, chiều dài cành, số rễ, chiều dài rễ, số cặp lá mới. Các số liệu này được đo đạc và thu thập từ ít nhất 10 cây ngẫu nhiên trên mỗi công thức. Số liệu được xử lý thống kê bằng chương trình Excel 2010 và SPSS.

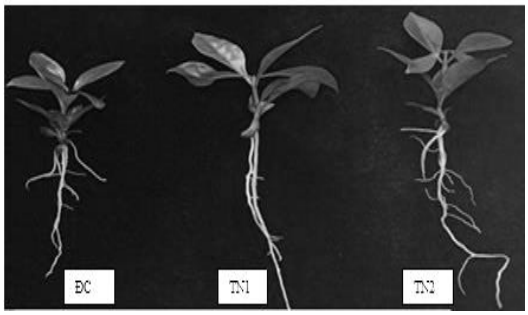
III. KẾT QUẢ

3.1. Ảnh hưởng của chế phẩm lên sinh trưởng của cây cà phê ở giai đoạn cây con

Kết quả theo dõi chiều cao cây và sự xuất hiên lá mới của các cây cà phê trêncác công thức thí nghiệm được chỉ ra trong Bảng 1.

Bảng 1. Chiều cao thân và số cặp lá của cây cà phê có bổ sung chế phẩm

Thời gian	Chiều cao thân (cm)			Số lá (cặp)		
	ĐC	TN1	TN2	ĐC	TN1	TN2
0 ngày	1,3 ± 0,1	1,29 ± 0,1	1,29 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,20 ± 0,1
7 ngày	1,3 ± 0,1	1,31 ± 0,1	1,33 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,10 ± 0,1
14 ngày	1,3 ± 0,1	1,29 ± 0,2	1,36 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,4 ± 0,2	3,40 ± 0,1
21 ngày	1,3 ± 0,1	1,45 ± 0,2	1,48 ± 0,1	3,3 ± 0,2	3,6 ± 0,1	3,60 ± 0,2
28 ngày	1,5 ± 0,2	1,96 ± 0,1	1,84 ± 0,1	3,5 ± 0,2	3,76 ± 0,3	3,80 ± 0,2
3 tháng	39,2 ± 1,1	39,10 ± 0,9	39,0 ± 0,5	4,6 ± 0,2	4,68 ± 0,1	4,64 ± 0,1
6 tháng	41,1 ± 0,8	42,50 ± 0,7	45,20 ± 0,6	5,2 ± 0,1	5,43 ± 0,1	5,51 ± 0,2
9 tháng	51,7 ± 1,2	60,30 ± 1,7	62,40 ± 1,5	6,2 ± 0,2	7,10 ± 0,2	7,30 ± 0,3



Hình 1. Hình ảnh cây cà phê sau 28 ngày thí nghiệm. ĐC: Đối chứng không bón chế phẩm; TN1 (sử dụng chế phẩm HTD-CNSH- CF) và TN2. (sử dụng chế phẩm NOLATRI)

Trong giai đoạn đầu (trước 28 ngày), ở công thức TN1 và TN2, không có sự khác biệt đáng kể về tốc độ ra lá cũng như hình thái lá của cây được bón chế phẩm so với công thức đối chứng. Lá ở tất cả các công thức thí nghiệm đều có màu xanh nhạt, bóng. Tuy nhiên ở những giai đoạn sau, cây ở công thức TN1 và TN2 cho thấy ưu thế hơn về sinh trưởng phát triển so với cây ở công thức không sử dụng chế phẩm, cụ thể:

Lá: Ở hai công thức sử dụng chế phẩm, lá có màu xanh nhạt và sáng bóng, không có biểu hiện triệu chứng thiếu dinh dưỡng hay bệnh hại, trong khi đó, ở thí nghiệm đối chứng, lá không có sự thay đổi về kích thước nhưng màu sắc kém

xanh, thiếu độ bóng và có những triệu chứng về thiếu dinh dưỡng. Ở giai đoạn 9 tháng tuổi, cây được chăm bón với chế phẩm TN1 và TN2 có nhiều hơn 1 cặp lá mới so với cây ở công thức không sử dụng chế phẩm (ĐC). Tuy nhiên, không có sự sai khác khi so sánh 2 loại chế phẩm TN1 và TN2.

Thân: Sau 28 ngày sử dụng chế phẩm, cây cà phê ở công thức sử dụng chế phẩm thể hiện sự sinh trưởng và kéo dài thân tốt hơn. Cụ thể, sau 9 tháng chăm sóc, cây cà phê trên công thức bổ sung chế phẩm TN1 và TN2 có chiều cao tăng trên 10 cm khi so sánh với công thức đối chứng. Ở thời điểm này, chúng tôi cũng ghi nhận sự sai khác về sinh trưởng giữa hai công thức TN1 và TN2. Tuy nhiên, mức độ chênh lệch là không lớn.

Bảng 2. Chiều dài rễ chính và số rễ nhánh của cây cà phê sau khi bổ sung chế phẩm

Thời gian	Số rễ nhánh			Chiều dài rễ chính (cm)		
	ĐC	TN1	TN2	ĐC	TN1	TN2
0 ngày	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1
7 ngày	2,3 ± 0,1	2,6 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1	4,1 ± 0,2	4,2 ± 0,1
14 ngày	2,3 ± 0,1	3,1 ± 0,1	4,5 ± 0,2	3,8 ± 0,1	4,6 ± 0,3	4,7 ± 0,2
21 ngày	2,4 ± 0,1	3,4 ± 0,2	5,1 ± 0,1	3,9 ± 0,1	4,9 ± 0,1	5,0 ± 0,1
28 ngày	2,6 ± 0,2	4,3 ± 0,2	5,1 ± 0,3	4,1 ± 0,1	5,5 ± 0,3	5,8 ± 0,2

Về sự phát triển của bộ rễ, chúng tôi ghi nhận rễ phát triển tốt hơn trên các công thức dùng chế phẩm (Hình 1 và Bảng 2). Số lượng rễ nhánh phát sinh nhiều hơn, chiều dài rễ tăng nhanh hơn so với công thức không dùng chế phẩm. Cụ thể, sau 7 ngày theo dõi, chiều dài rễ và số rễ nhánh trên các công thức dùng chế phẩm đã cho thấy ưu việt so với đối chứng. Tới ngày thứ 28, chiều dài rễ chính ở công thức TN1 là 5,5 ± 0,3 cm, công thức TN2 là 5,8 ± 0,2 cm so với công thức đối chứng chỉ đạt 4,1 ± 0,1 cm. Số rễ nhánh trung bình ở công thức TN2 và TN1 lần lượt là 5,1 ± 0,3 và 4,3 ± 0,2, trong khi công thức đối chứng chỉ thu được 2,6 ± 0,2 rễ. Công thức TN2 cũng cho thấy ưu việt khi so sánh với TN1 ở các chỉ tiêu phát triển bộ rễ.

Như vậy, ở giai đoạn cây con, chế phẩm TN1 (HTD-CNSH- CF) giúp tăng cường khả năng sinh trưởng của cây cà phê cả về thân, rễ và lá. Hiệu quả của chế phẩm này tương đương hoặc thấp hơn không đáng kể khi so sánh với chế phẩm thương mại TN2 (NOLATRI).

3.2. Ảnh hưởng của chế phẩm lên sinh trưởng và phát triển của cây cà phê ở giai đoạn vườn thực nghiệm

** Ảnh hưởng đến chiều dài rễ chính và số rễ nhánh*

Tiến hành theo dõi sinh trưởng phát triển của các cây cà phê ở các công thức nghiên cứu sau khi sử dụng chế phẩm.

Bảng 3. Chiều cao thân, số lá và chiều dài rễ nhánh của cây cà phê 3 tháng tuổi sau khi bổ sung chế phẩm

Thời gian sau lây nhiễm	Số lá (cặp)			Chiều cao thân (cm)			Chiều dài rễ (cm)		
	Đối chứng	HTD-CNSH-CF	NOLATRI	Đối chứng	HTD-CNSH-CF	NOLATRI	Đối chứng	HTD-CNSH-CF	NOLATRI
0	4,7 ± 0,3	4,8 ± 0,4	4,8 ± 0,4	30,68 ± 0,36	31,04 ± 0,10	31,08 ± 0,19	8,6 ± 0,51	8,6 ± 0,28	8,6 ± 0,31
15	4,9 ± 0,4	5,8 ± 0,75	4,8 ± 0,4	32,03 ± 0,89	36,36 ± 1,03	35,98 ± 0,39	8,96 ± 0,52	10,06 ± 1,06	9,16 ± 0,69
30	5,0 ± 0,3	7,2 ± 0,75	5,2 ± 0,4	37,48 ± 0,68	45,82 ± 1,32	42,78 ± 0,60	9,46 ± 0,61	13,22 ± 1,52	10,16 ± 0,67
45	6,2 ± 0,5	8,6 ± 1,02	7,2 ± 0,4	42,26 ± 0,79	57,04 ± 1,68	50,78 ± 0,68	10,96 ± 0,5	17,22 ± 2,62	12,92 ± 1,86
60	7,8 ± 0,6	11,4 ± 0,8	9,4 ± 0,8	49,58 ± 0,72	61,98 ± 2,37	55,66 ± 0,52	12,61 ± 0,6	20,5 ± 4,01	15,08 ± 1,38

Kết quả Bảng 3 cho thấy, ở giai đoạn vườn thực nghiệm, chế phẩm HTD-CNSH-CF mang lại hiệu quả cao nhất trong kích thích sinh trưởng, phát triển của cây cà phê. Sự khác biệt được thể hiện rõ sau 60 ngày sử dụng chế phẩm. Chiều dài rễ chính ở công thức thí nghiệm HTD-CNSH-CF đạt 20,5 ± 4 cm, trong khi đó công thức sử dụng chế phẩm NOLATRI và đối chứng đạt 15,08 ± 1 cm và 12,61 ± 0,6 cm. Số cặp lá nhánh ởcông thức thí nghiệm HTD-CNSH-CF đạt cao nhất (11,4 ± 0,8 cm). Thêm vào đó, chiều cao thân cây cà phê trong công thức bổ sung HTD-CNSH-CF đạt 61,98 ± 2,37, vượt trội khi so sánh với hai công thức còn lại.

Như vậy, ở giai đoạn vườn thực nghiệm, cây cà phê sinh trưởng phát triển tốt hơn khi được bổ sung chế phẩm vi sinh. Ngoài ra, các chỉ tiêu sinh trưởng cũng cho thấy tính ưu việt của chế phẩm HTD-CNSH-CF so với chế phẩm thương mại NOLATRI.

3.3. Ảnh hưởng của chế phẩm HTD-CNSH-CF tới khả năng sinh trưởng và phát triển của cây cà phê 1,5 tuổi

Đánh giá khả năng ứng dụng của chế phẩm HTD-CNSH-CF cho cây cà phê 1,5 năm tuổi tại vườn trồng và so sánh với chế phẩm thương mại, chúng tôi thu được kết quả sau, tương tự như kết quả thu được ở giai đoạn vườn thực nghiệm, cây cà phê được trồng tại vườn sản xuất có sử dụng chế phẩm vi sinh có tốc độ sinh trưởng, phát triển nhanh hơn so với công thức đối chứng. Số cành cấp 1 có trên cây cà phê sử dụng chế phẩm HTD-CNSH-CF là 25,86 ± 0,52 cành, chế phẩm NOLATRI là 22,53 ± 0,41. Trong khi công thức đối chứng chỉ đạt 19,25 ± 0,36 cành. Thêm vào đó, các chỉ tiêu về chiều dài cành, số cặp lá trên cành số 3 và số 5 cũng cho thấy tính ưu việt của chế phẩm HTD-CNSH-CF so với chế phẩm NOLATRI cũng như công thức đối chứng.

Bảng 4. Ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh tới khả năng sinh trưởng và phát triển của cây cà phê

TT	Số cành cấp 1/cây	Chiều dài cành số 3 (cm)	Chiều dài cành số 5 (cm)	Số cặp lá/ cành 3	Số cặp lá/ cành 5
Đối chứng	19,25 ± 0,36	18,23 ± 0,42	25,16 ± 0,89	2,6 ± 0,1	5,03 ± 0,2
HTD-CNSH-CF	25,86 ± 0,52	29,42 ± 0,68	41,3 ± 1,02	5,3 ± 0,2	7,6 ± 0,3
NOLATRI	22,53 ± 0,41	22,67 ± 0,56	32,87 ± 0,69	3,6 ± 0,1	6,03 ± 0,2

IV. KẾT LUẬN

Chế phẩm vi sinh vật đa chức năng HTD-CNSH-CF đã được thử nghiệm lên cây cà phê ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau đều cho thấy hiệu quả trong kích thích sinh trưởng và phát triển của cây cà phê.

So sánh với chế phẩm thương mại trên thị trường NOLATRI, chế phẩm có nguồn gốc vi khuẩn nội sinh trên cây cà phê HTD-CNSH-CF cho kết quả thấp hơp hoặc tương đương ở giai đoạn vườn ươm. Tuy nhiên, chế phẩm HTD-CNSH-CF tỏ ra vượt trội ở các giai đoạn sinh trưởng phát triển tiếp sau của cây cà phê bao gồm cả giai đoạn vườn sản xuất. Từ kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi tiếp tục xây dựng quy trình sản xuất phân hữu cơ vi sinh đa chức năng phù hợp và đề xuất sử dụng phân hữu cơ vi sinh cho cây cà phê ở Tây Nguyên.

Lời cảm ơn

Kinh phí nghiên cứu được hỗ trợ bởi đề tài "Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ sản xuất chế phẩm vi sinh CAFE-HTD01 và HOTIEU-HTD03 và sử dụng tích hợp các chế phẩm sinh, hóa học nhằm phát triển hiệu quả và bền vững cây cà phê và hồ tiêu ở Tây Nguyên" mã số KHCN-TN/16-20.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Atkinson, D. and Watson, C. A. (2000). The beneficial rhizosphere: A dynamic entity. Appl. Soil Ecol., 15, 99 - 104.
2. Nguyễn Thu Hà, Phạm Văn Toản *và cs*. (2005). Phân lập tuyển chọn chủng *Bacillus* cho sản xuất phân bón vi sinh vật chức năng. Khoa học Công nghệ và Phát triển nông thôn 20 năm đổi mới, Tập 1 - Trồng trọt BVTV, Bộ Nông nghiệp và PTNT, Nhà xuất bản Chính trị quốc gia.
3. Trần Kim Loang (2002). Nghiên cứu một số nguyên nhân gây hiện tượng vàng lá, thối rễ trên cà phê vối (Coffea canephora pierre exfroehner) tại Đắk Lắk và khả năng phòng trừ, Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp.
4. Daod & Aslam (1996). Source of income from fruits and vegetables. Proceedings of National Workshop on Horticultural Crops and their Importance in Pakistan. 1(1): 3.
5. Higginbotham SJ, Arnold AE, Ibañez A, Spadafora C, Coley PD,Kursar TA. (2013). Bioactivity of fungal endophytes as a function of endophyte taxonomy and the taxonomy and distribution of their host plants.PLoS One 8: 73192.
6. Huang R.h, *et al.*. Survey of Endophytes and Host Plants [J]. Journal of Xinjiang Norma.l
7. Huang, W.-Y., *et al.*. Endophytic fungi from Nerium oleander L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23(9), P.1253 - 1263.
8. Inahashi Y, Iwatsuki M, Ishiyama A, Namatame M, Nishihara-Tsukashima A, Matsumoto A, Hirose T, Sunazuka T, Yamada H,Otoguro K, Takahashi Y, Omura S, Shiomi K. (2011). 54. Spoxazomicins A-C, novel antitrypanosomal alkaloids produced by an endophytic actinomycete, *Streptosporangium oxazolinicum* K07-0460(T). J Antibiot 64: 303 - 307.
9. Iniguez AL, Dong YM, Carter HD, Ahmer BMM, Stone JM, Triplett EW. (2005). Regulation of enteric endophytic bacterial colonization byplant defenses. Mol Plant Microbe Interact 18:169 - 178.
10. Kajula M, Tejesvi MV, Kolehmainen S, Makinen A, Hokkanen J, Mattila S, Pirttilä AM. (2010). The siderophore ferricrocin produced by specific foliar endophytic fungi in vitro. Fungal Biol 114: 248 - 254.

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ PHÒNG TRỪ CỦA NANO BẠC ĐỐI VỚI BỆNH THÁN THƯ ỚT DO NẤM *Colleteotrichum* sp. GÂY RA

Nguyễn Thị Hai, Lê Danh Lam

Trường Đại học Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh

ABSTRACT

Evaluation of silver nanoparticles against *Colletotrichum* sp. causing anthranose on chilli

The study was carried out to evaluate the effect of silver nanoparticles against chilli anthracnose caused by Colletotrichum under invitro and on potted chilli. The result shows that in vitro conditions, the efficacy of silver nanoparticles at 2ppm reached 63% at 3 days after inoculation and decreased to 21% and 10% at 7 and 9 days after inoculation. The inhibitory effect of silver nanoparticles at 5ppm reaches to 100% at 3 days after inoculation and > 75% at 7 and 9 days after inoculation, respectively. Silver nanoparticles at 10ppm and 15ppm completely inhibited fungal pathogens in in vitro conditions. In the field (potted chilli), silver nanoparticles at 10ppm achieved control effect of 75.43% after 15 days and 84.23 spraying and more effective than commercial fungicides antracol 70WP 0.32%.

Keywords: *Colletotrichum sp., silver nanoparticles, anthranose.*

Trong số các bệnh hại ớt, bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* spp. gây ra được xem là nguy hiểm nhất (Than *et al.*, 2008; Nguyễn Duy Hưng *và ctv.*, 2017). Để phòng trừ bệnh thán thư, nông dân đã sử dụng rất nhiều hóa chất bảo vệ thực vật. Việc sử dụng các hóa chất trừ bệnh trong thời gian dài ngoài tác hại đến vi sinh vật đất còn làm cho nấm bệnh phát triển tính kháng thuốc.

Ứng dụng công nghệ nano trong sản xuất nông nghiệp là một giải pháp mới đã được nghiên cứu và áp dụng thành công ở nhiều nước trên thế giới (Madhuri Sharon *et al.,* 2010; Huang *et al.,* 2015). Trong các vật liệu nano, bạc là chất có tính kháng khuẩn, kháng nấm, có tác dụng phòng trừ các yếu tố gây bệnh, thúc đẩy quá trình sinh trưởng, phát triển, ức chế quá trình già hóa đối với cây trồng (Shah and Belozerova, 2009). Các hạt nano bạc đã cho thấy các hoạt động kháng khuẩn, kháng nấm mạnh chống lại các tác nhân gây bệnh và kích thích sự phát triển dẫn đến tăng sản lượng, nâng cao chất lượng, và đồng thời giảm chất thải, giảm sự ô

Phản biện khoa học: GS. TS. Nguyễn Thơ.

nhiễm môi trường. Các hạt nano bạc có diện tích bề mặt lớn, làm gia tăng khả năng tiếp xúc của chúng với vi khuẩn hoặc nấm và nâng cao hiệu quả diệt khuẩn và diệt nấm.

Bài viết này trình bày kết quả khảo sát khả năng kháng nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên cây ớt trong điều kiện phòng thí nghiệm và trên đồng ruộng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Vật liệu nghiên cứu: Nano bạc được cung cấp bởi Phòng Thí nghiệm Cao Minh Thì, Đại học Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh.

- Nấm *Colletotrichum* sp. được phân lập trên cây ớt bị bệnh thán thu thu tại Kiên Giang và được nuôi cấy trên môi trường PDA để làm thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đánh giá khả năng ức chế của nano bạc đối nấm Colletotrichum sp. gây bệnh thán thư trên cây ớt trong điều kiện phòng thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí như sau:

NT1: ĐC - Môi trường PDA không bổ sung dung dịch nano bạc

NT2: Môi trường PDA bổ sung dung dịch nano bạc nồng độ 2 ppm

NT3: Môi trường PDA bổ sung dung dịch nano bạc nồng độ 5 ppm

NT4: Môi trường PDA bổ sung dung dịch nano bạc nồng độ 10 ppm

NT5: Môi trường PDA bổ sung dung dịch nano bạc nồng độ 15 ppm

NT6: Antracol 70WP theo liều kháng cáo (0,32% W/V).

+ Tiến hành: Môi trường PDA sau khi được hấp khử trùng để nguội khoảng 50^{o}C rồi cho dung dịch nano bạc và Antracol 70WP theo các nồng độ vào, lắc đều. Tiến hành đổ đĩa, để cho đĩa môi trường đông lại hoàn toàn. Dùng cây đục lỗ đường kính 5 mm, đục lỗ thạch trên đĩa petri có chứa sinh khối nấm bệnh từ đĩa petri đã nhân giống trước đó và đạt sang môi trường PDA có pha thuốc thí nghiệm. Sau đó các đĩa petri này được ủ trong điều kiện nhiệt độ phòng. Thí nghiệm lặp lại 3 lần, mỗi lần là 01 đĩa petri.

Chỉ tiêu theo dõi: Đường kính tản nấm (cm) ở các ngày sau khi cấy cho đến khi đường kính tản nấm ở đĩa ĐC mọc chạm thành đĩa.

Hiệu lực ức chế tính theo công thức:

$$HL = \frac{d_{ĐC} - d}{d_{ĐC}}$$

Trong đó: d là ĐKTN trung bình;

d_1, d_2 là hai đường chéo ĐKTN phân bố ở đĩa thí nghiệm;

$d_{ĐC}$ là ĐKTN ở đĩa đối chứng.

2.2. Đánh giá hiệu lực của nano bạc đối với bệnh thán thư hại ớt (Theo QCVN 01 - 160: 2014/BNNPTNT)

Trồng ớt trong chậu và đặt trên đồng để bệnh tấn công tự nhiên. Khi cây bắt đầu bị bệnh thì tiến hành bố trí thí nghiệm theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 công thức và 3 lần lặp lại, cây ớt ở 15 ngày tuổi. Cụ thể có các công thức như sau:

NT1: Phun nước cất.

NT2: Phun nano bạc nồng độ 10 ppm (từ kết quả thí nghiệm 2.4.3).

NT3: Phun Antracol 70WP theo liều kháng cáo (0,32% W/V).

Tiến hành phun thuốc 3 lần, mỗi lần cách nhau 5 ngày. Thời gian theo dõi 30 ngày.

❖ Chỉ tiêu theo dõi:

Tỷ lệ bệnh (%), chỉ số bệnh (%) trước và sau khi phun 5, 7, 10, 15, 20, 30 ngày.

Hiệu lực phòng trừ (%) của thuốc và nano bạc.

❖ Chỉ tiêu theo dõi:

Tỷ lệ bệnh tính theo công thức:

$$\text{TLB (\%)} = \frac{\text{Số cây (lá hoặc quả) bị bệnh}}{\text{Tổng số cây (lá hoặc quả) điều tra}} \times 100$$

Chỉ số bệnh tính theo công thức:

$$\text{CSB (\%)} = \frac{9n_9 + 7n_7 + 5n_5 + 3n_3 + n_1}{9\ \text{N}} \times 100$$

Trong đó: + n_1: số quả (lá) bị bệnh ở cấp 1 với < 5% diện tích quả (lá) bị bệnh.

+ n_3: số quả (lá) bị bệnh ở cấp 3 với > 5 - 15% diện tích quả (lá) bị bệnh.

+ n_5: số quả (lá) bị bệnh ở cấp 5 với >15 - 25% diện tích quả (lá) bị bệnh.

+ n_7: số quả (lá) bị bệnh ở cấp 7 với > 25 - 50% diện tích quả (lá) bị bệnh.

+ n_9: số quả (lá) bị bệnh ở cấp 9 với > 50% diện tích quả (lá) bị bệnh.

+ N: tổng số quả (lá) điều tra.

Hiệu lực phòng trừ của thuốc và chế phẩm nano bạc được tính bằng công thức Abbott:

$$\text{HLPT (\%)} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

+ C: TLB (%) của công thức không xử lý.

+ T: TLB (%) ở công thức xử lý.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Colletotrichum* sp. của nano bạc

Nấm *Colletotrichum* sp. là một trong những loài nấm gây bệnh thán thư trên cây ớt và nhiều loại cây trồng khác. Trên môi trường PDA, nấm phát triển nhanh, sau 3 ngày nuôi cấy đường kính tản nấm đã được 40,17 mm và lan ra đầy đĩa sau 9 ngày nuôi cấy (Bảng 1). Kết quả ở Bảng 1 cho thấy nano bạc có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Colletotrichum* sp. Với nồng độ 2 ppm, hiệu lực ức chế nấm *Colletotrichum* sp. của nano bạc đạt 63% ở 3 ngày sau khi nhiễm và giảm chỉ còn 21% và 10% theo thứ tự vào ngày 7 và 9 sau khi nhiễm. Khi tăng nồng độ lên đến 5ppm, hiệu lực ức chế đạt đến 100% ở 3 ngày sau khi nhiễm và duy trì > 75% sau 7 và 9 ngày sau khi nhiễm và ở môi trường có nồng độ nano bạc 10 ppm, nấm *Colletotrichum* sp. không mọc được (hiệu lực đạt 100% ở các thời điểm quan sát. Kết quả ở Bảng 1 cũng cho thấy trong điều kiện đĩa môi trường thạch, so với thuốc hóa học Antracol 70WP (nồng độ 0,32%) hiệu lực ức chế nấm *Colletotrichum* sp. của nano bạc 2 ppm kém hơn nhưng nano bạc nồng độ 5 ppm, 10 ppm và 15 ppm đều cao hơn hẳn. Như vậy, trong điều kiện *in vitro*, nano bạc nồng độ 10 ppm và 15 ppm ức chế hoàn toàn nấm *Colletotrichum* sp.

Bảng 1. Đường kính tản nấm Colletotrichum sp$_1$ bị nano bạc ức chế

Nghiệm thức	Đường kính tản nấm (mm)			Hiệu lực (%)		
	3 NSN	7 NSN	9 NSN	3 NSN	7 NSN	9 NSN
Đối chứng	40,17^{a}	68,33^{a}	80,00^{a}	-		
Nano bạc 2 ppm	14,83^{b}	53,83^{b}	71,83^{b}	63,07^{c}	21,22^{d}	10,21^{d}
Nano bạc 5 ppm	0,00^{d}	12,00^{d}	19,83^{d}	100,00^{a}	75,14^{b}	75,21^{b}
Nano bạc 10 ppm	0,00^{d}	0,00^{e}	0,00^{e}	100,00^{a}	100,00^{a}	100,00^{a}
Nano bạc 15 ppm	0,00^{d}	0,00^{e}	0,00^{e}	100,00^{a}	100,00^{a}	100,00^{a}
Antracol 70WP 0,32%	6,83^{c}	39,00^{c}	44,33^{c}	82,99^{b}	42,91^{c}	44,48^{c}

Ghi chú: Số liệu được tính giá trị trung bình của các lần lặp lại trong cùng một cột có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 99%.

Nhận xét này cũng tương tự như kết quả của Kabir Lamsal *và cộng sự* (2011). Nhóm tác giả cho biết, nano bạc có khả năng ức chế tốt sự phát triển của nấm *Colletotrichum* trong thí nghiệm *in vitro.*

Như vậy, nano bạc nồng độ ≥ 10 ppm ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm *Colletotrichum* sp$_1$ ở điều kiện *in vitro*. Nano bạc nồng độ 10 ppm được chọn để khảo sát khả năng trừ bệnh thán thư trên cây ớt trồng trong chậu.

3.2. Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh thán thư của nano bạc trên cây ớt trồng trong chậu

Trước khi phun chọn những cây ớt có mức độ bị bệnh đồng đều nhau với tỷ lệ bệnh cao. Phun nano bạc với nồng độ 10 ppm và Antracol 70WP theo liều kháng cáo (0,32% W/V), phun ướt đều 2 bề mặt lá. Mỗi lần phun cách nhau 5 ngày.

Bảng 2. Tỷ lệ bệnh của ớt trước phun và sau khi phun

Nghiệm thức	Tỷ lệ bệnh (%)						
	TP	5 NSP	7 NSP	10 NSP	15 NSP	20 NSP	30 NSP
Đối chứng	53,59^{ns}	64,26^{a}	67,98^{a}	67,59 ^{a}	100,00^{a}	100,00^{a}	100,00^{a}
Nano bạc 10 ppm	48,77^{ns}	45,42 ^{b}	45,69 ^{b}	42,66 ^{b}	24,57 ^{b}	20,12 ^{c}	15,77 ^{c}
Antracol 70WP 0,32%	52,32^{ns}	47,22 ^{b}	45,91 ^{b}	50,33 ^{b}	37,55 ^{b}	40,72 ^{b}	39,17 ^{b}

Ghi chú: Số liệu được tính giá trị trung bình của các lần lặp lại trong cùng một cột có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%; TP: trước phun; NSP: ngày sau phun.

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, ở nghiệm thức đối chứng, tỷ lệ bệnh tăng dần qua các ngày theo dõi (53,59 - 67,59%) và đến 15 ngày thì cây ớt nghiệm thức đối chứng đã chết. Còn ở nghiệm thức phun nano bạc, tỷ lệ bệnh trước khi phun 48,77% và sau phun 5,7 và 10 ngày, tỷ lệ bệnh giảm dần theo các ngày theo dõi (45,42 - 42,66%). Đến ngày thứ 30 sau phun, tỷ lệ bệnh giảm chỉ còn 15,17%. Đối với nghiệm thức phun Antracol 70WP (0,32% W/V), tỷ lệ bệnh trước

phun là 52,32%, sau phun tỷ lệ bệnh có xu hướng giảm dần và còn 39,17% ở 30 ngày sau phun. Kết quả trên cũng cho thấy, phun nano bạc nồng độ 10 ppm cho cây ớt trồng trong chậu đã làm giảm bệnh thán thư tốt hơn so với Antracol 70WP (0,32% W/V) (Bảng 2).

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, chỉ số bệnh ở nghiệm thức trước khi phun là tương đương nhau. Sau đó, chỉ số bệnh thán thư ở nghiệm thức đối chứng tăng dần đến 15 ngày sau phun thì chỉ số bệnh đã lên đến 100% và toàn bộ cây ớt ở nghiệm thức đối chứng đã chết. Trong khi đó, chỉ số bệnh ở nghiệm thức phun nano bạc lại giảm dần và chỉ còn 10,93% vào 15 ngày sau phun và 5,98% vào 30 ngày sau phun và thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với phun thuốc Antracol 70WP (0,32% W/V).

Bảng 3. Chỉ số bệnh của ớt trước và sau khi phun nano bạc

Nghiệm thức	Chỉ số bệnh (%)						
	TP	5 NSP	7 NSP	10 NSP	15 NSP	20 NSP	30 NSP
Đối chứng	33,54 ^{ns}	47,56 ^{a}	50,25 ^{a}	61,41 ^{a}	100^{a}	100^{a}	100^{a}
Nano bạc 10 ppm	32,31 ^{ns}	27,97 ^{b}	25,47 5^{b}	23,45 ^{b}	10,93 ^{b}	9,92 ^{c}	5,98 ^{c}
Antracol 70WP 0,32%	33,15 ^{ns}	31,24 ^{b}	28,99^{b}	27,41 ^{b}	15,75^{b}	19,41 ^{b}	14,50 ^{b}

Ghi chú: Số liệu được tính giá trị trung bình của các lần lặp lại trong cùng một cột có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%.

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy nano bạc và thuốc Antracol 70WP (0,32% W/V) đều có hiệu lực đối với bệnh thán thư hại ớt. Sử dụng nano bạc nồng độ 10 ppm cho hiệu quả phòng trừ bệnh đạt đến 75,43% sau khi phun 15 ngày và 84,23% sau khi phun 30 ngày. Nano bạc nồng độ 10 ppm cho hiệu lực phòng trừ bệnh thán thư cao hơn so với thuốc Antracol 70WP (0,32% W/V). Nhận xét này cũng tương tự như kết quả của Kabir Lamsal *và cộng sự* (2011) về ứng dụng của hạt nano bạc để kiểm soát nấm *Colletotrichum* sp. *in vitro* và bệnh thán thư của ớt trên đồng. Theo các tác giả, xử lý nano bạc đã ngăn chặn sự tấn công của mầm bệnh trước khi dịch bệnh bùng phát trên cây. Ngoài ra, kết quả chỉ ra rằng các hạt nano bạc có hiệu quả cao hơn thuốc Fenari trong các thử nghiệm ngoài đồng ruộng.

Bảng 4. Hiệu lực phòng trừ bệnh thán thư của ớt trước và sau khi phun nano bạc

Nghiệm thức	Hiệu lực phòng trừ (%)					
	5 NSP	7 NSP	10 NSP	15 NSP	20 NSP	30 NSP
Nano bạc 10 ppm	29,32^{a}	32,79^{a}	36,88^{a}	75,43^{a}	79,88^{a}	84,23^{a}
Antracol 70WP (0,32% W/V)	26,52^{b}	32,47^{b}	25,54^{b}	62,45^{b}	59,28^{b}	60,30^{b}

Ghi chú: Số liệu được tính giá trị trung bình của các lần lặp lại trong cùng một cột có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%.

IV. KẾT LUẬN

Trong điều kiện *in vitro* với nồng độ 10 ppm và 15 ppm nano bạc ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm *Colletotrichum* sp. Trên cây ớt trồng trong chậu, nano bạc nồng độ 10 ppm có khả năng phòng trừ bệnh thán thư tốt hơn Antracol 70WP (0,32% W/V).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Than (2008). Chilli anthracnose disease caused by Colletotrichum species. Journal of Zhejiang University Science B 9(10):764-78.
2. Nguyễn Duy Hưng, Hà Viết Cường, Hoàng Chủng Lâm, Nguyễn Đức Huy (2017). Xác định nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư hại ớt ở Đồng bằng sông Hồng. Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam, số 12 (85).
3. Madhuri Sharon, Ajoy Kr. Choudhary and Rohit Kumar (2010). Nanotechnology in agricultural diseases and food safety. *journal of phytology 2010, 2(4): 83 - 92.*
4. Huang S., Wang L., Liu L., Hou L., and Li L. (2015). Nanotechnology in agriculture, livestock, and aquaculture in China. A review, *Agronomy for Sustainable Development*, 35 (2): 369 - 400.
5. Shah and Belozerova (2009). Influence of Metal Nanoparticles on the Soil Microbial Community and Germination of Lettuce Seeds. *Water, Air, and Soil Pollution* volume 197, pages 143 - 148.
6. Kabir Lamsal, Sang Woo Kim, Jin Hee Jung, Yun Seok Kim, Kyong Su Kim and Youn Su Lee. Application of Silver Nanoparticles for the Control of Colletotrichum Species In Vitro and Chili Anthracnose Disease in Field. The Korean Society of Mycology. Mycobiology 39(3):194 - 199 (2011).

MỘT SỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CƠ CHẾ ĐỐI KHÁNG VÀ KÍCH KHÁNG TRONG PHÒNG TRỊ BỆNH BẠC LÁ LÚA, LÚA VON VÀ THỐI NHŨN HÀNH TÍM

Nguyễn Đắc Khoa[1]* và Nguyễn Thị Phi Oanh[2]

[1] Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử,
Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học
[2] Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên,
Trường Đại học Cần Thơ
**Tác giả liên hệ: ndkhoa@ctu.edu.vn*

ABSTRACT

Recent studies using antagonism and induced resistance to control rice bacterial leaf blight, rice bakanae and shallot bulb rot

This paper presents the recent results of the Plant Pathology Research Group at Can Tho University during 2020. Six bacterial strains showing high disease-reducing effects against rice bacterial leaf blight (Xanthomonas oryzae pv. oryzae) were identified as Bacillus safensis AG-131, B. stratosphericus AG-62, B. aerophilus HG-33, B. pumilus TG-71, B. subtilis ST-115 and Serratia nematodiphila CT-78. The effects involve not only antagonism but also induced resistance. Indeed, treatments with the bacterial strains increased activities of the four enzymes in rice plants, i.e., phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxydase, catalase and peroxiadse. These enzymes are responsible for defence respsonses against the disease. Formulation study has therefore been carried out to make bio-control products. Different carrier materials were tested to select those capable of maintaining bacterial cell densities, the antagonistic and disease-reducing effects after storage. Those of the Bacillus spp. *were shown to be well maintained after 12-month storage in the carrier materials suplemented by yeast extract. For rice bakanae (Fusarium moniliforme), the two bacterial isolates VT-23 and CTA-30 showing high antagonistic and disease-reducing effects under greenhouse conditions were selected and identified as Bacillus haikouensis and B. safensis. For shallot, different pathogens causing bulb rot have been identified, among those, Citrobacter murliniae has additionally been identified causing the disease. The bacterial isolate CT-21 showing high antagonistic and disease-reducing effects under greenhouse conditions was selected for further disease control study.*

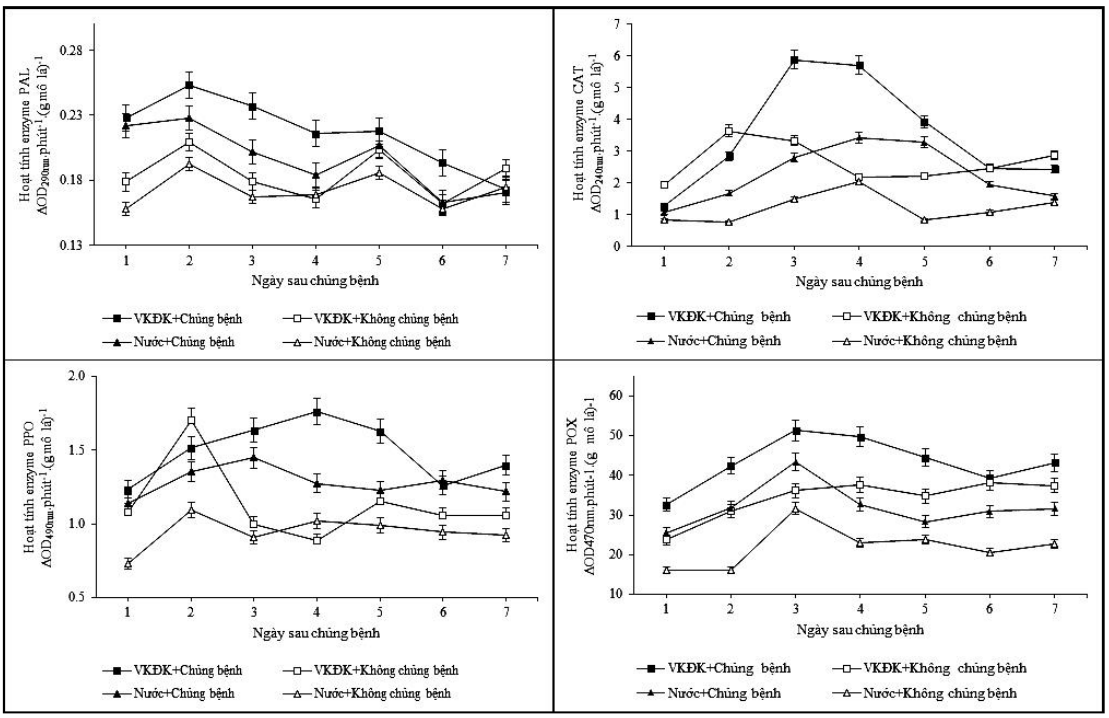
Keywords: *Antagonism, induced resistance, rice, bacterial leaf blight, bakanae, shallot, bulb rot.*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Nga.

I. PHÒNG TRỪ BỆNH HẠI TRÊN LÚA

Bệnh bạc lá (cháy bìa lá) do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) gây ra là một trong những bệnh phổ biến và nghiêm trọng nhất trên ruộng lúa, đặc biệt vào mùa mưa. Phòng trừ sinh học sử dụng vi sinh vật đối kháng hiện đang là giải pháp được quan tâm vì có tính bền vững và thân thiện với môi trường (Nguyễn Đắc Khoa *và ctv.*, 2010). Sáu chủng vi khuẩn đối kháng được phân lập từ đất ruộng lúa tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) có khả năng giúp giảm bệnh trong điều kiện ngoài đồng đã được định danh lần lượt là *Bacillus safensis* AG-131, *B. stratosphericus* AG-62, *B. aerophilus* HG-33, *B. pumilus* TG-71, *B. subtilis* ST-115 và *Serratia nematodiphila* CT-78 (Võ Thị Phương Trang, 2013; Nguyễn Đặng Ngọc Giàu, 2014; Nguyễn Mộng Huyền Trang, 2015; Phạm Trút My, 2015; Trần Kim Thoa, 2015; Khoa *et al.*, 2016; Nguyễn Ngọc Lộc, 2018).

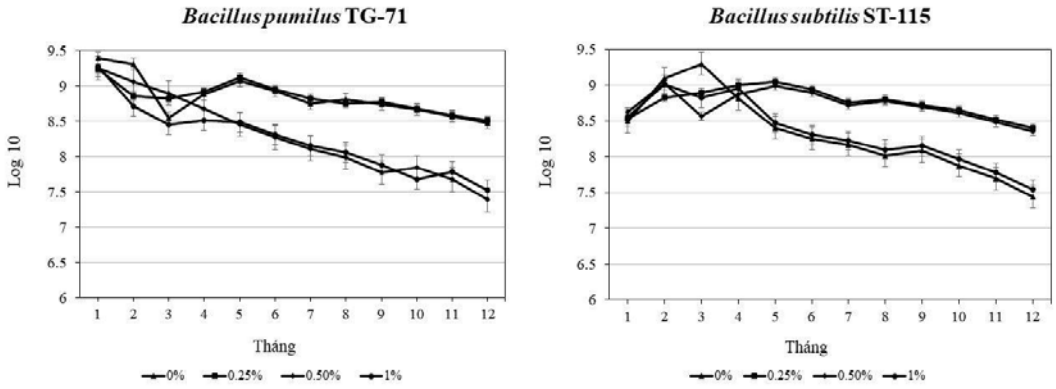
Ngoài khả năng đối kháng với mầm bệnh *Xoo*, hiệu quả của sáu chủng vi khuẩn nêu trên còn liên quan đến cơ chế kích thích tính kháng bệnh bạc lá của cây lúa (kích kháng) thông qua kết quả khảo sát hoạt tính của 4 enzyme là phenylalanine ammonia-lyase (PAL), polyphenol oxydase (PPO), catalase (CAT) và peroxiadse (POX). Vi khuẩn kích thích cây trồng tiết ra các enzyme này để hình thành cơ chế tự vệ về mặt cơ học và hóa học, ngăn chặn sự tấn công của mầm bệnh (Vidhyasekaran *et al.*, 1997; van Loon *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2010; Lijuan và Yuxing, 2013). PAL là enzyme quan trọng, có vai trò xúc tác các phản ứng sinh tổng hợp các hợp chất hữu cơ (lignins, flavanols, isoflavanoids, anthocyanins và stilbenes) cấu tạo nên vách tế bào và tăng cường sự biểu hiện của các gen tự vệ của cây (Vidhyasekaran *et al.*, 1997; Pal *et al.*, 2011; Govindappa *et al.*, 2011). Enzyme PPO xúc tác cho sự phát triển của lignin, xúc tác sinh tổng hợp các hợp chất *ortho*-diphenol và *ortho*-quinone có trong tế bào thực vật, giúp củng cố cấu trúc tế bào trong các phản ứng kháng bệnh (Thilagavathi *et al.*, 2007). Enzyme CAT có vai trò xúc tác phản ứng phân hủy H_2O_2 giúp giải độc cho cây, bảo vệ tế bào khỏi bị hư hại quá trình oxy hóa của H_2O_2 khi có mầm bệnh tấn công (Rani và Yasur, 2010). Cũng như CAT, enzyme POX được kích hoạt để tham gia xúc tác phản ứng khử H_2O_2; ngoài ra, POX còn kích thích sự tăng lignin hóa làm vững chắc tế bào và tích tụ extensin kích hoạt biểu hiện kích kháng lưu dẫn (Dann *et al.*, 1996; Wendehenne *et al.*, 1998). Các nghiên cứu kích kháng trên cây trồng cho thấy hoạt tính của cả 4 enzyme này đều tăng khi có mầm bệnh xâm nhiễm (Rani và Yasur, 2010; Pal *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011; Khoa *et al.*, 2017); do đó, đây là các enzyme được chọn để khảo sát hoạt tính trong nghiên cứu này. Kết quả khảo sát cho thấy giá trị hoạt tính enzyme trong các nghiệm thức xử lý với vi khuẩn đối kháng như ngâm hạt hay chủng vào đất đều tăng qua các thời điểm khảo sát và cao hơn so với các nghiệm thức hạt lúa chỉ được xử lý với nước. Đối với vi khuẩn *B. safensis* AG-131, hoạt tính enzyme CAT tăng cao ngay sau khi chủng bệnh và giữ giá trị đến 5 NSCB. Các chủng vi khuẩn *B. stratosphericus* AG-62, *B. aerophilus* HG-33, *B. pumilus* TG-71, *B. subtilis* ST-115 và *S. nematodiphila* CT-78 làm tăng nhanh hoạt tính enzyme PAL ở giai đoạn đầu, sau đó đến các enzyme CAT và POX và PPO (Hình 1) (Hà Minh Ngọc, 2019; Hồ Nguyễn Minh Phúc, 2019; Lê Thanh Mẫn, 2019).



Hình 1. Sự thay đổi hoạt tính các enzyme PAL, CAT, PPO và POX trong lá lúa khi được xử lý với vi khuẩn *B. subtilis* ST-115 qua các thời điểm khảo sát

Các nghiên cứu trên cho thấy sáu chủng vi khuẩn đều có khả năng đối kháng với mầm bệnh *Xoo* và kích thích tính kháng bệnh bạc lá của cây lúa. Bước tiếp theo là nghiên cứu tuyển chọn chất mang để tạo chế phẩm sinh học chứa vi khuẩn đối kháng, giúp nông dân hạn chế dần việc sử dụng thuốc hóa học, tiết kiệm chi phí sản xuất, hạn chế ô nhiễm môi trường và bảo vệ sức khỏe cộng đồng. Đối với 5 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp., các chất mang được chọn để nghiên cứu gồm bột talc, cám, gạo xay, lúa xay và trấu (Đặng Hoài An *và ctv.*., 2017; An *et al.*, 2019; Nguyễn Đắc Khoa, 2019a); đối với vi khuẩn *S. nematodiphila* CT-78, các chất mang được chọn gồm bột talc, cám, trấu, than bùn và mùn cưa (Nguyễn Đắc Khoa, 2018). Kết quả nghiên cứu cho thấy sau 9 tháng tồn trữ, các chủng vi khuẩn đối kháng trong các túi chế phẩm đều duy trì được mật số cao hơn 10^6 CFU/g chế phẩm, khả năng đối kháng với vi khuẩn *Xoo* trên đĩa thạch và hiệu quả giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới đến 15 NSCB. Tồn trữ vi khuẩn kết hợp phương pháp lên men rắn được nghiên cứu tiếp theo để giảm lượng sinh khối của các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. ban đầu cung cấp vào chất mang, từ đó giúp giảm chi phí sản xuất chế phẩm. Cám và trấu xay được chọn để tồn trữ 6 chủng vi khuẩn đối kháng. Ngoài ra, ảnh hưởng của dịch trích nấm men (yeast extract, YE) 0%, 0,25%, 0,5% và 1% lên quá trình lên men rắn trong chế phẩm cũng được khảo sát. Quá trình lên men rắn được thực hiện trước khi tiến hành tồn trữ

vi khuẩn trong chất mang cám. Sau 96 giờ lên men rắn, khi mật số vi khuẩn đạt 10^9 CFU/g (so với 2×10^6 CFU/mL ban đầu), các túi chế phẩm được đóng gói, tồn trữ và khảo sát mật số mỗi tháng. Sau 12 tháng tồn trữ, tất cả nghiệm thức đều duy trì được mật số vi khuẩn cao hơn 10^7 CFU/g chế phẩm (Hình 2) và khả năng đối kháng với *Xoo* trên đĩa thạch. Trong điều kiện nhà lưới, các nghiệm thức vi khuẩn *B. aerophilus* không bổ sung YE, vi khuẩn *B. subtilis* bổ sung 0,5% YE, vi khuẩn *B. pumilus* bổ sung 0,25% YE, vi khuẩn *B. stratosphericus* bổ sung 0,5% YE và vi khuẩn *B. safensis* bổ sung 0,5% YE có hiệu quả làm giảm bệnh tốt nhất (Dương Hoàng Minh Thư, 2019).



Hình 2. Mật số được thể hiện ở dạng Log10 của vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71 và *Bacillus subtilis* ST-115 trong chế phẩm có bổ sung yeast extract sau 12 tháng tồn trữ

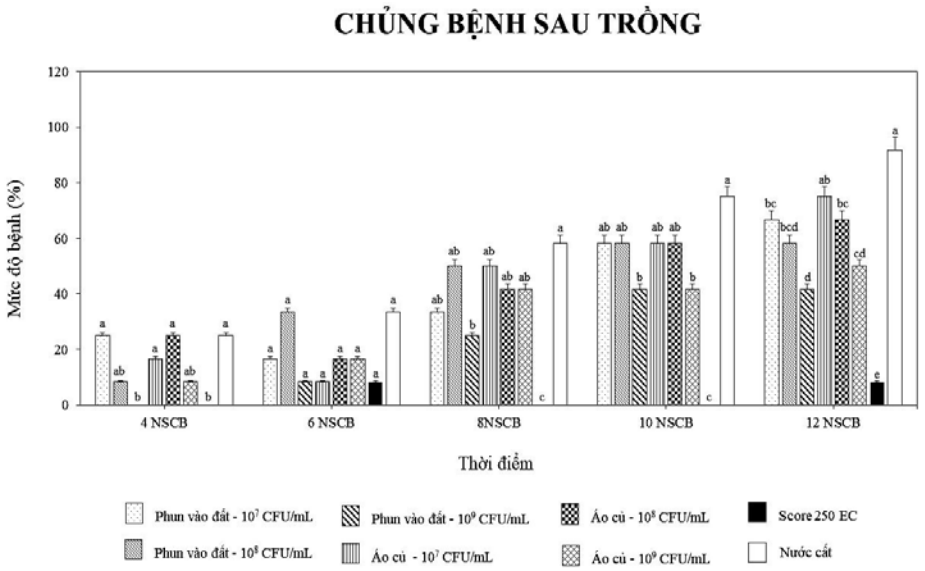
Ngoài bệnh bạc lá, trên ruộng lúa còn xuất hiện nhiều bệnh có thể lây truyền qua hạt lúa giống, bao gồm lúa von, đạo ôn, lem lép hạt và vàng lá... Chín loài nấm (*Alternaria padwickii*, *Aspergillus* sp., *Bipolaris oryzae*, *Fusarium moniliforme*, *Sarocladium oryzae*, *Penicilium* sp., *Rhizopus* sp., *Curvularia* spp., và *Mucor* sp.) và một loài vi khuẩn (*Pseudomonas glumae*, còn có tên khác là *Burkholderia glumae*) đã được xác định gây bệnh truyền qua hạt ở hai giống lúa OM 5451 và IR 50404 tại Hậu Giang (Nguyễn Thị Ngọc Ngân, 2017). Trong số 87 chủng vi khuẩn đất được phân lập, bốn chủng VT-22, VT-23, CTA-30 và CTA-32 có khả năng đối kháng mạnh nhất với nấm bệnh *F. moniliforme* gây bệnh lúa von. Hai chủng vi khuẩn VT-23 và CTA-30 có hiệu quả giảm bệnh lúa von tốt nhất trên giống lúa OM 5451 trong điều kiện nhà lưới. Bằng cách kết hợp phương pháp giải trình tự vùng 16S rRNA và khảo sát hình thái, sinh lý và sinh hóa dựa vào hệ thống phân loại Bergey, VT-23 được định danh là *Bacillus haikouensis* và CTA-30 được định danh là *Bacillus safensis* (Vương Lê Thanh Hà, 2020).

II. PHÒNG TRỪ BỆNH HẠI TRÊN HÀNH TÍM

Hành tím là đối tượng xâm nhiễm của nhiều loại mầm bệnh khác nhau, gây hại

trong suốt quá trình từ canh tác cho đến tồn trữ. Các loại mầm bệnh thường gặp nhất bao gồm nấm *Aspergillus niger* (bệnh thối đen), *Fusarium oxysporum* (thối đế củ) và *Colletotrichum gloeosporioides* (đốm đen), vi khuẩn *Erwinia carotovora* (thối ướt) và *Pseudomonas aeruginosa* (thối nhũn) (Nguyễn Thái Học, 2016). Các nghiên cứu trước cho thấy sử dụng biện pháp sinh học (vi khuẩn đối kháng, dịch trích thực vật và cao chiết thực vật) để kiểm soát bệnh thối đế củ hành tím (*F. oxysporum*), thối ướt (*E. carotovora*) và thối nhũn (*P. aeruginosa*) đều cho kết quả khả quan (Nguyễn Thị Mai Trinh, 2019; Huỳnh Hữu Hậu, 2019; Nguyễn Đắc Khoa, 2019b; Trịnh Anh Khoa, 2019).

Ngoài các mầm bệnh đã được xác định, *Citrobacter murliniae* cũng vừa được xác định có khả năng gây thối nhũn hành tím ở thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Mầm bệnh này được xác định bằng cách kết hợp quy trình Koch, phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S rRNA và hệ thống phân loại của Bergey (Nguyễn Nhật Bình, 2020). Trong số 113 chủng vi khuẩn được phân lập từ đất trồng hành ở thị xã Vĩnh Châu và 40 chủng vi khuẩn đối kháng ở Cần Thơ, chủng vi khuẩn CT-21 được xác định có khả năng đối kháng với mầm bệnh trên đĩa thạch. Trong điều kiện nhà lưới, vi khuẩn CT-21 có hiệu quả làm giảm bệnh tốt nhất ở mật số 10^9 CFU/mL đến 12 NSCB bằng cả hai phương pháp xử lý là phun vào đất và áo củ ở cả 2 thời điểm chủng bệnh trước trồng và chủng bệnh sau trồng 30 ngày (Hình 3).



Hình 3. Mức độ bệnh (%) của củ hành tím khi được xử lý bằng phương pháp phun vào đất và áo củ với vi khuẩn đối kháng ở các mật số khác nhau qua các thời điểm khảo sát trong điều kiện nhà lưới

Ghi chú: Trong cùng một thời điểm khảo sát, các cột có một hay nhiều chữ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%. NSCB: ngày sau chủng bệnh.

IV. KẾT LUẬN

Ngoài khả năng đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, hiệu quả phòng trị bệnh bạc lá lúa của 6 chủng vi khuẩn (*Bacillus safensis* AG-131, *B. stratosphericus* AG-62, *B. aerophilus* HG-33, *B. pumilus* TG-71, *B. subtilis* ST-115 và *Serratia nematodiphila* CT-78) còn được thể hiện qua sự kích thích tính kháng bệnh của cây lúa, làm tăng hoạt tính của 4 enzyme phenylalanine ammonia-lyase (PAL), polyphenol oxydase (PPO), catalase (CAT) và peroxiadse (POX) đến 5 NSCB. Trong nghiên cứu tuyển chọn chất mang tồn trữ vi khuẩn đối kháng đến 12 tháng, vi khuẩn trong tất cả các nghiệm thức đều duy trì được mật số cao hơn 10^7 CFU/g chế phẩm, khả năng đối kháng với vi khuẩn *Xoo* trên đĩa thạch và hiệu quả làm giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới. Đối với nghiên cứu phòng trị bệnh lúa von, hai chủng vi khuẩn VT-23 và CTA-30 có hiệu quả làm giảm bệnh tốt nhất trong điều kiện nhà lưới, được định danh là *Bacillus haikouensis* và *Bacillus safensis.*

Trong nghiên cứu phòng trừ bệnh hại trên hành tím, ngoài các mầm bệnh đã được xác định, *Citrobacter murliniae* cũng được xác định có khả năng gây thối nhũn hành tím ở thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Chủng vi khuẩn CT-21 được phân lập tại Cần thơ có khả năng đối kháng với mầm bệnh trên đĩa thạch và hiệu quả làm giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới ở mật số 10^9 CFU/mL đến 12 NSCB.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. An, D. H, Thanh, L. N. X and Khoa, N. D. (2019). Selection of carrier materials for formulation of the antagonistic *Bacillus* spp. Against rice bacterial leaf blight. *Can Tho University Journal of Science*. 11(3): 19 - 27.
2. Chen, N. L., Hu, M., Dai, C.Y. and Yang, S. M. (2010). The effects of inducing treatments on phenolic metabolism of melon leaves. *Acta Horticulturae Sinica*. 37: 1759 - 1766.
3. Dann, E. K., Meuwly, P., Métraux, J. P. and Deverall, B. J. (1996). The effect of pathogen inoculation or chemical treatment on activities of chitinase and β-1, 3-glucanase and accumulation of salicylic acid in leaves of green bean, *Phaseolus vulgarisL*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 49(5): 307 - 319.
4. Dương Hoàng Minh Thư (2019). Khảo sát mật số và hiệu quả giảm bệnh cháy bìa lá của vi khuẩn *Bacillus aerophilus*, *Bacillus pumilus* và *Bacillus subtilis* sau thời gian lên men bán rắn và tồn trữ. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.
5. Đặng Hoài An, Nguyễn Thị Phi Oanh và Nguyễn Đắc Khoa (2017). Tuyển chọn chất mang để tồn trữ vi khuẩn *Bacillus aerophilus* đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh cháy bìa lá lúa. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 52(B): 8 - 15.
6. Govindappa, M., Umesha, S. and Lokesh, S. (2011). Adathoda vasica leaf extract induces resistance in rice against bacterial leaf blight disease (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Internationnal Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. 3(1): 6 - 14.
7. Hà Minh Ngọc (2019). Khảo sát cơ chế kích kháng thông qua hoạt tính các enzyme phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase, peroxidase và catalase của vi khuẩn *Bacillus pumilus* và *Bacillus subtilis* đối với bệnh cháy bìa lá lúa. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

8. Hồ Nguyễn Minh Phúc (2019). Khảo sát cơ chế kích kháng thông qua hoạt tính các enzyme phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase, peroxidase và catalase của vi khuẩn *Bacillus aerophilus* và *Serratia nematodiphila* đối với bệnh cháy bìa lá lúa. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

9. Huỳnh Hữu Hậu (2019). Khảo sát hiệu quả phòng trị bệnh thối đế củ hành tím của xạ khuẩn *Streptomyces albaduncus* trong điều kiện ngoài đồng và tồn trữ. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

10. Khoa, N. Đ., Giàu, N. Đ. N. and Tuấn, T. Q. (2016). Effects of *Serratia nematodiphila* CT-78 on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological control*. 103: 1 - 10.

11. Khoa, N. Đ., Xạ, T. V. and Hào, L. T. (2017). Disease-reducing effects of aqueous leaf extract of *Kalanchoe pinnata* on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* involve induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 100: 57 - 66.

12. Lê Thanh Mẫn (2019). Khảo sát cơ chế kích kháng thông qua hoạt tính các enzyme phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase, peroxidase và catalase của vi khuẩn *Bacillus safensis* và *Bacillus stratosphericus* đối với bệnh cháy bìa lá lúa. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

13. Lijuan, G. and Yuxing, Z. (2013). Effect of Salicylic Acid on Pear Leaf Induced Resistance to Pear Ring Rot. *World Applied Sciences Journal*. 22(11): 1534 - 1539.

14. Nguyễn Đắc Khoa (2018). Phòng trừ sinh học bệnh bạc lá lúa và thối củ hành tím bằng vi sinh vật đối kháng và dịch trích thực vật. Hội thảo Quốc gia Bệnh hại Thực vật Việt Nam lần thứ 17, ngày 20/7/2018. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Hà Nội. Việt Nam.

15. Nguyễn Đắc Khoa (2019a). Tuyển chọn chất mang tạo chế phẩm sinh học chứa vi khuẩn đối kháng để phòng trừ bệnh bạc lá lúa. Hội thảo Quốc gia Bệnh hại Thực vật Việt Nam lần thứ 18, ngày 3 - 4/8/2019. Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam. Thành phố Hồ Chí Minh. Việt Nam.

16. Nguyễn Đắc Khoa (2019b). Phòng trừ sinh học bệnh thối nhũn hành tím do vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*. Hội thảo Quốc gia Bệnh hại Thực vật Việt Nam lần thứ 18, ngày 3 - 4/8/2019. Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam. Thành phố Hồ Chí Minh. Việt Nam.

17. Nguyễn Đắc Khoa, Dương Minh và Phạm Văn Kim (2010). Sản xuất các sản phẩm sinh học để quản lí bệnh hại lúa, cây ăn quả và rau màu theo hướng bền vững và không ô nhiễm môi trường. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 16b: 117 - 126.

18. Nguyễn Đặng Ngọc Giàu (2014). Phân lập, định danh và khảo sát khả năng phòng trừ bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn trong đất thành phố Cần Thơ và tỉnh Hậu Giang. Luận văn tốt nghiệp Cao học ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

19. Nguyễn Mộng Huyền Trang (2015). Khảo sát hiệu quả phòng trừ bệnh cháy bìa lá của vi khuẩn *Bacillus aerophilus* trên ruộng lúa. Luận văn tốt nghiệp Cao học ngành Sinh Thái học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

20. Nguyễn Ngọc Lộc (2018). Khảo sát hiệu quả phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn *Bacillus subtilis* và *Bacillus pumilus* trên đồng ruộng. Luận văn tốt nghiệp Cao học ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

21. Nguyễn Nhật Bình (2020). Xác định mầm bệnh gây thối nhũn củ hành tím và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng để phòng trị bệnh. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

22. Nguyễn Thái Học (2016). Phân lập và xác định các mầm bệnh phổ biến trên hành tím (*Allium ascalonicum*) tại thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Luận văn tốt nghiệp Cao học ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

23. Nguyễn Thị Mai Trinh (2019). Phân lập, tuyển chọn và định danh các chủng vi khuẩn đối kháng trong đất có khả năng phòng trị bệnh thối củ hành tím do vi khuẩn *Pseudomonas aeruginoas*. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. Tập 55, Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học (2019) (2): 151 - 157.

24. Nguyễn Thị Ngọc Ngân (2017). Xác định mầm bệnh trên hạt lúa giống tại Hậu Giang và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng trong đất để phòng trị bệnh. Luận văn tốt nghiệp Cao học ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

25. Pal, T. K., Bhattacharya, S. and Chakraborty, K. (2011). Induction of Systemic Resistance in Rice by Leaf Extract of *Cymbopogan citrus* and *Ocimum sanctum* against Sheath Blight Disease. *Archives of Applied Science Research*. 3(1): 392 - 400.

26. Phạm Trút My (2015). Khảo sát hiệu quả phòng trừ bệnh cháy bìa lá của vi khuẩn *Serratia nematodiphila* trên ruộng lúa. Luận văn tốt nghiệp Cao học ngành Sinh thái học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

27. Rani, P. U. and Yasur, J. (2010). Biochemical and enzymatic changes in rice as a mechanism of defense. *Acta Physiologiae Plantarum*. 32(4): 695 - 701.

28. Sun, J. B., Peng, M., Wang, Y. G., Zhao, P. J. and Xia, Q. Y. (2011). Isolation and characterization of antagonistic bacteria against Fusarium wilt and induction of defense related enzymes in banana. *African Journal of Microbiology Research*. 5(5): 509 - 515.

29. Thilagavathi, R., Saravanakumar, D., Ragupathi, N. and Samiyappan, R. (2007). A combination of biocontrol agents improves the management of dry root rot (*Macrophomina phaseolina*) in greengram. *Phytopathologia Mediterranea*. 46(2): 157 - 167.

30. Trần Kim Thoa (2015). Phân lập, định danh và khảo sát khả năng phòng trừ bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn trong đất hai tỉnh Tiền Giang và Sóc Trăng. Luận văn tốt nghiệp Cao học ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

31. Trịnh Anh Khoa (2019). Khảo sát hiệu quả phòng trị bệnh thối đế củ hành tím của dịch trích sài đất ba thùy trong điều kiện ngoài đồng và tồn trữ. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

32. van Loon, L. C., Rep, M. and Pieterse C. M. J. (2006). Significance of Inducible Defenserelated Protein in Infected Plant. *Annual Review of Phytopathology*. 44: 135 - 62.

33. Vidhyasekaran, P., Ponmalar, T. R., Samiyappan, R., Velazhahan, R., Vimala, R. and Ramanathan, A. (1997). Host specific toxyn production by *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Phytopathology*. 87: 1258 - 1263.

34. Võ Thị Phương Trang (2013). Phân lập, định danh và khảo sát khả năng phòng trừ bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn đối kháng trong đất tỉnh An Giang. Luận văn tốt nghiệp Cao học ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

35. Vương Lê Thanh Hà (2020). Định danh vi khuẩn đối kháng với nấm *Fusarium moniliforme* gây bệnh lúa von nhiễm qua hạt giống. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

36. Wendehenne, D., Durner, J., Chen, Z. and Klessig, D. F. (1998). Benzothiadiazole, an inducer of plant defenses, inhibits catalase and ascorbate peroxidase. *Phytochemistry*. 47(4): 651 - 657.

ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI ĐIỂM PHUN NANO BẠC ĐẾN HIỆU QUẢ PHÒNG TRỪ BỆNH PHẤN TRẮNG TRÊN CÂY DƯA LEO

Chu Trung Kiên[1], Nguyễn Hiếu Hạnh[1], Trần Anh Tuấn[1], Hồ Thị Thanh Huyền[1], Huỳnh Hữu Tín[1], Chu Văn Khương[1] và Mai Hải Châu[2]

[1]Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam
[2]Vietnam National University of Forestry

ABSTRACT

Influence of silver-nanoparticles applying time for controlling powdery mildew disease on cucumber

The field trial for evaluating the effect of application times of silver nanoparticles to control powdery mildew disease on cucumber was carried out from November 2018 to February 2019 in Ba Ria - Vung Tau province. Results showed that spraying Mifum 0.6SL (silver nanoparticles with 60ppm concentration) 10 days interval from 10 to 20DAP (day after planting), then apllication 7 days interval until 55DAP has decreased AUDPC (area of under the disease progress circle) index to 83.73% as well as reducing yield losses up to 75.20% compared with untreated control and non metal residues in fresh product.

Keywords: *Powdery mildew disease, silver nanoparticles, cucumber, AUDPC index.*

I. MỞ ĐẦU

Cây dưa leo *Cucumis sativus* L. thuộc họ Cucurbitaceae, bộ Cucurbitales là cây rau ăn quả được trồng rất phổ biến ở nước ta. Trong quá trình sinh trưởng và phát triển, cây thường bị gây hại bởi nhiều loại bệnh hại như phấn trắng do nấm *Erysiphe cichoracearum,* giả sương mai do nấm *Pseudoperonospora cubensis* và bệnh héo vàng do *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum,...*

Hiện nay, bệnh phấn trắng là một trong những nguyên nhân gây thiệt hại nặng năng suất dưa leo trên thế giới và Việt Nam. Sử dụng thuốc bảo vệ thực vật để phòng trừ bệnh phấn trắng vẫn được thực hiện phổ biến trong sản xuất nông nghiệp trên thế giới. Mặc dù có ưu điểm là dễ sử dụng, hiệu quả nhanh nhưng việc sử dụng hóa chất bảo vệ thực vật liên tục trong thời gian dài gây ảnh hưởng xấu tới sức khỏe con người và môi trường, đồng thời thúc đẩy nguồn

Người phản biện: GS.TS. Nguyễn Thơ.

bệnh sớm hình thành gen kháng thuốc và không phù hợp với xu hướng phát triển nông nghiệp bền vững.

Các loại nano kim loại như bạc, đồng, kẽm,... đang là những nguồn vật liệu mới có khả năng đáp ứng được yêu cầu quản lý hiệu quả dịch bệnh trên cây trồng và thân thiện với môi trường. Trên thế giới, nano bạc đã được nghiên cứu và ứng dụng khá phổ biến trong sản xuất nông nghiệp từ hàng chục năm qua, nhưng các nghiên cứu tương tự ở nước ta còn khá hạn chế, nhất là các nghiên cứu ứng dụng nano bạc trong phòng trừ bệnh hại trên cây rau. Bài viết này đề cấp đến kết quả thí nghiệm sử dụng nano bạc trong quản lý bệnh phấn trắng gây hại trên cây dưa leo tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu thí nghiệm

- Vật liệu nano: Mifum 0.6SL (nồng độ nano bạc là 1.000 ppm) do Viện Khoa học vật liệu ứng dụng đăng ký với Bộ Nông nghiệp và PTNT.

- Giống dưa leo: Dưa leo F1 Hunter 1.0 do Công ty Hai Mũi Tên Đỏ phân phối. Mật độ trồng là 16.000 cây/ha, khoảng cách 1,2 m × 0,5 m.

2.2. Phương pháp thí nghiệm

- Thời gian và địa điểm: Tháng 11/2018 - 2/2019 tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu.

- Phương pháp bố trí: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên với 5 nghiệm thức và 3 lần lặp lại, mỗi ô nghiệm thức 50 m^2. Các nghiệm thức gồm:

Nghiệm thức	Ký hiệu	Thời điểm xử lý (ngày sau trồng - NST)	Số lần phun
1	NT 1	Phun Mifum 0,6SL định kỳ 10 ngày/lần từ 10 - 60 NST	6
2	NT 2	Phun Mifum 0,6SL định kỳ 10 ngày/lần từ 10 - 20 NST, sau đó phun định kỳ 7 ngày/lần đến 55 NST	7
3	NT 3	Phun Mifum 0,6SL định kỳ 7 ngày/lần từ 20 - 55 NST	6
4	NT 4	Phun Ridomil Gold 68WG theo nồng độ khuyến cáo của nhà sản xuất định kỳ 7 ngày/lần từ 20 - 55 NST	6
5	NT 5	Phun nước lã	7

- Phương pháp xử lý nano: Dung dịch Mifum 0.6SL ở nồng độ 60 ppm và thuốc bảo vệ thực vật Ridomil Gold 68WG được phun ướt đều cây dưa leo vào buổi chiều mát với lượng dung dịch thuốc từ 350 - 450 lít/ha/lần.

- Phương pháp theo dõi:

+ Theo dõi định kỳ 7 ngày/lần từ khi bệnh xuất hiện đến cuối vụ tại mỗi ô điều tra 5 điểm cố định được chọn ngẫu nhiên, mỗi điểm chọn 2 dây chính, mỗi dây theo dõi tất cả các lá để xác định tỷ lệ và chỉ số lá bệnh/cây (%) ở từng thời điểm điều tra và chỉ số bệnh hại tích luỹ theo chỉ số AUDPC từ khi bệnh xuất hiện đến kết thúc theo dõi.

+ Đánh giá năng suất thương phẩm (tấn/ha): Năng suất quả thương phẩm của mỗi nghiệm thức được quy ra từ năng suất quả thương phẩm của ô nghiệm thức thu được từ 3 lần thu hoạch ở thời điểm bắt đầu thu hoạch, thu hoạch rộ và kết thúc thu hoạch.

+ Đánh giá tồn dư thuốc trừ bệnh: Mẫu quả được lấy ngẫu nhiên từ 3 ô của mỗi nghiệm thức tại thời điểm thu hoạch rộ để phân tích dư lượng thuốc trừ bệnh. Tổng số mẫu phân tích là 5, khối lượng mỗi mẫu là 01 kg.

- Các chỉ tiêu theo dõi:

+ Tỷ lệ bệnh (%) = (Số lá bị bệnh/Tổng số lá điều tra) × 100

+ Chỉ số hại (CSH) được tính theo công thức của Townsend - Heuberger:

+ $CSH(\%) = \frac{\sum(a \times b)}{N \times T} \times 100$

Trong đó: ∑(a × b) là tổng của tích số lá bị hại với cấp hại tương ứng; N là tổng số lá điều tra; T là cấp hại cao nhất trong bảng phân cấp.

Thang phân cấp bệnh như sau:

Cấp 1: ≤ 5% diện tích lá bị hại.

Cấp 3: 1 - 5% diện tích lá bị hại.

Cấp 5: > 5 - 25% diện tích lá bị hại.

Cấp 7: > 25 - 50% diện tích lá bị hại.

Cấp 9: > 50% diện tích lá bị hại.

+ Chỉ số tích luỹ bệnh theo thời gian được tính theo công thức AUDPC (The area under disease progressive curve) của Shanner và Finney (1997) như sau:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \times (t_{i+1} - t_i)$$

Trong đó: y_i là chỉ số bệnh hại ở lần theo dõi thứ i.

t_i là số ngày của lần theo dõi i.

n là tổng số lần theo dõi.

III. KẾT QUẢ THÍ NGHIỆM

Sự tích lũy bệnh phấn trắng gây hại cây dưa leo từ thời điểm bệnh chớm xuất hiện (34 ngày sau trồng - NST) đến thời điểm kết thúc theo dõi (70 NST) ở các nghiệm thức phun nano bạc (NT1, NT2, NT3) và nghiệm thực phun Ridomil Gold 68WG (NT4) thấp hơn có ý nghĩa thống kê ở mức 95% so với nghiệm thức đối chứng (NT5) không phun nano bạc và hóa chất trừ nấm. Mức giảm sự tích lũy tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh của các nghiệm thức phun nano hoặc thuốc BVTV tương ứng từ 62,03 - 77,15% và 70,01 - 83,73%. Trong đó, NT2 có mức giảm cao hơn so với các nghiệm thức phun thuốc khác (Bảng 1).

Bảng 1. Mức độ bệnh phấn trắng trên cây dưa leo tại tỉnh Bà Rịa Vũng Tàu

Nghiệm thức	Tỷ lệ bệnh		Chỉ số bệnh	
	AUDPC (%*ngày)	Mức giảm so với ĐC (%)	AUDPC (%*ngày)	Mức giảm so với ĐC (%)
NT 1	410,97[b]	62,03	220,36[b]	70,01
NT 2	247,32[b]	77,15	119,57[b]	83,73
NT 3	365,42[b]	66,23	180,10[b]	75,49
NT 4	347,30[b]	67,91	198,11[b]	73,04
NT5 (ĐC)	1.082,24[a]		734,76[a]	
CV (%)	*22,47*		*23,37*	
$LSD_{0,05}$	*207,57*		*127,68*	

Ghi chú: AUDPC là giá trị tích lũy của 6 lần theo dõi, các giá trị trung bình trong cùng cột theo sau bởi cùng ký tự khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua trắc nghiệm phân hạng LSD ở mức ý nghĩa 95%; ĐC là đối chứng.

Năng suất quả dưa leo thương phẩm ở các nghiệm thức phun nano bạc hoặc thuốc BVTV trừ nấm thu được từ 28,74 - 32,73 tấn/ha cao hơn có ý nghĩa thống kê ở mức 95% so với nghiệm thức đối chứng (18,68 tấn/ha), tương ứng mức tăng năng suất từ 53,83 - 75,20%, trong đó NT2 có mức tăng năng suất cao hơn các nghiệm thức khác. Kết quả phân tích tồn dư nano bạc và hóa chất BVTV trong quả dưa leo không cho thấy có sự hiện diện của kim loại Ag và hóa chất trừ bệnh trong quả (Bảng 2).

Bảng 2. Năng suất thương phẩm và dư lượng Ag, hóa chất trừ nấm bệnh trên quả dưa leo

Nghiệm thức	Năng suất quả thương phẩm (tấn/ha)	Mức tăng so với ĐC (%)	Dư lượng nano hoặc thuốc BVTV
NT 1	28,74[a]	53,83	KPH
NT 2	32,73[a]	75,20	KPH
NT 3	30,18[a]	61,54	KPH
NT 4	31,17[a]	66,86	KPH
NT 5 (ĐC)	18,68[b]		KPH
CV (%)	*8,25*		
$LSD_{0,05}$	*4,39*		

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong cùng cột theo sau bởi cùng ký tự khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua trắc nghiệm phân hạng LSD ở mức ý nghĩa 95%; ĐC là đối chứng. KPH là không phát hiện.

Như vậy, kết quả thí nghiệm cho thấy thực hiện phun Mifum 0.6SL định kỳ 10 ngày/lần từ thời điểm 10 - 20 NST sau đó phun thường xuyên 7 ngày/lần cho đến 55 NST (tổng số 7 lần phun) có khả năng phòng trừ hiệu quả đối với bệnh phấn trắng hại trên cây dưa leo, góp phần tăng năng suất quả thương phẩm đồng thời không để lại dưa lượng kim loại bạc trong sản phẩm.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

- Phun Mifum 0.6SL với nồng độ 60 ppm định kỳ 10 ngày/lần từ thời điểm 10 - 20 ngày sau trồng sau đó phun định kỳ 7 ngày/lần cho đến 55 ngày sau trồng có khả năng phòng trừ hiệu quả bệnh phấn trắng trên cây dưa leo, làm tăng năng suất thương phẩm và không để lại tồn dư kim loại nặng trong sản phẩm.

- Bổ sung kết quả nghiên cứu này vào quy trình sản xuất dưa leo ở tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu và các vùng sản xuất dưa leo có điều kiện sinh thái tương tự để áp dụng vào sản xuất.

ĐÁNH GIÁ HIỆU LỰC PHÒNG TRỪ BỆNH BẠC LÁ LÚA CỦA NANO Cu_2O-Cu/Alginate TẠI TỈNH TIỀN GIANG

Chu Trung Kiên[1], Nguyễn Hiếu Hạnh[1], Trần Anh Tuấn[1], Hồ Thị Thanh Huyền[1] Huỳnh Hữu Tín[1], Chu Văn Khương[1], Bùi Duy Du[2], Lê Nghiêm Anh Tuấn[2], và Mai Hải Châu[3]

ABSTRACT

Influence of nano Cu_2O-Cu/Alginate on rice bacterial leaf blight disease caused by *Xanthomonas oryzae* in Tien Giang province

The studies were conducted to evaluate influence of nano Cu_2O-Cu/Alginate on Rice Bacterial Leaf Blight disease that caused by Xanthomonas oryzae in the Summer - Autumn crop of 2019 in Tien Giang province. Results showed that application nano Cu_2O-Cu/Alginate at concentration from 20ppm to 30ppm was able to prevent this severe disease from 74.61% to 81.74% for the small scale experiment and from 78.77% to 85.08% for the large scale trial at 14 days after the second applications compared with untreated control and equivalent to Xantocin 40WP at 0.6‰ concentration with the same amounts and times of application.

Keywords: *Rice bacterial leaf blight disease, Xanthomonas oryzae, nano Cu_2O-Cu/Alginate.*

I. MỞ ĐẦU[1]

Ở Việt Nam, cho tới 2016 có khoảng 11,5 triệu ha diện tích đất sản xuất nông nghiệp chiếm gần 1/3 diện tích lãnh thổ, trong đó vùng Đồng bằng sông Cửu Long diện tích canh tác lúa 1,8 triệu ha (4,3 triệu ha/năm) đạt tổng sản lượng lúa khoảng 25,8 triệu tấn/năm. Trong canh tác lúa, bệnh bạc lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* thường xuất hiện và gây hại nặng cho tất cả các vụ lúa trong năm, và ngày càng trở nên khó kiểm soát hơn do ảnh hưởng của thâm canh trong sản xuất nông nghiệp. Nhiều nghiên cứu, biện pháp kỹ thuật như tạo giống lúa kháng bệnh, canh tác tuân thủ các biện pháp kỹ thuật chăm sóc, bón phân hợp lý, phát hiện sớm, xử lý sâu bệnh kịp thời, dùng các loại thuốc bảo vệ thực vật đặc trị,... để phòng trừ bệnh bạc lá lúa, nhưng do tập quán canh tác của người nông dân dẫn đến xảy ra hiện tượng kháng thuốc nên hiệu quả của việc phòng trị bệnh chưa đem lại kết quả như mong muốn.

Mặt khác, việc sử dụng thường xuyên và nhiều thuốc bảo vệ thực vật có nguồn

Người phản biện: GS. Nguyễn Thơ

gốc hóa học, đặc biệt là các loại thuốc kháng sinh để lại tồn dư trên nông sản gây rất nhiều khó khăn cho việc xuất khẩu gạo vào các thị trường yêu cầu chất lượng cao như Mỹ, Úc, các nước châu Âu, Nhật Bản,...

Ngày nay, với sự phát triển của công nghệ nano đã tạo ra các nano kim loại (Au, Ag, Se, Fe, Cu,...), các nano oxit kim loại (CuO, Cu_2O, FeO, Fe_2O_3, TiO_2,...) được ứng dụng trong rất nhiều lĩnh vực, trong đó có lĩnh vực kháng khuẩn, kháng nấm sử dụng cho việc phòng, trừ bệnh thực vật (Huang *và cs.*, 2015). Gần đây, các hợp chất nano của kim loại đồng như nano Cu_2O, CuO, CuCl đã được một số nhà nghiên cứu phát triển làm chất phòng trừ vi sinh vật gây hại do chúng có hiệu lực cao và chi phí thấp. Vật liệu Cu_2O-Cu ở kích thước nano có hoạt lực phòng trừ nấm bệnh cao hơn vật liệu khối do diện tích bề mặt lớn nên chỉ cần sử dụng ở nồng độ nhỏ (Giannousi, 2014; Du *và cs.*, 2017). Cu_2O-Cu ở kích thước nano có tính linh động, hoạt tính xúc tác mạnh trong các phản ứng hữu cơ như gắn các nhóm chức enzyme (đặc biệt là nhóm sulfhydryl, rất nhạy cảm với Cu^+) làm bất hoạt nấm bệnh (Rusjan, 2012; Michael Hans *và cs.*, 2013).

Vì vậy, việc nghiên cứu sử dụng thuốc bảo vệ thực vật nano Cu_2O-Cu/Alginate trong sản xuất lúa có tính khả thi cao, tạo ra nông sản an toàn, gia tăng giá trị xuất khẩu.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Cu_2O-Cu/Alginate, Xantocin 40WP, DAP, Ure, NPK16-16-8.

2.2. Phương pháp

Thời gian và địa điểm: Tháng 6 - 9/2019, tại tỉnh Tiền Giang.

- Cây trồng thí nghiệm: Giống lúa OM 5451 được gieo sạ với lượng thóc giống 180 kg/ha/vụ.

- Bón phân cho lúa trong 1 ha/vụ:

+ Bón lần 1: Sau sạ 10 ngày, bón 50 kg DAP/ha + 50 kg Urea/ha.

+ Bón lần 2: Sau sạ 22 ngày, bón 80 kg DAP/ha + 100kg Urea/ha.

+ Bón lần 3: Sau sạ 36 ngày, bón 100 kg/ha NPK 16-16-8 + 40 kg Urea/ha.

- Phương pháp bố trí thí nghiệm:

+ Thí nghiệm diện hẹp: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu RCBD, với 4 nghiệm thức, 3 lần lặp, diện tích mỗi ô là 100 m^2. Dải bảo vệ và cách ly là 2 m.

+ Thử nghiệm diện rộng: Thử nghiệm diện rộng được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 nghiệm thức và không lặp lại, diện tích mỗi ô là 1.000 m^2. Dải bảo vệ và cách ly là 2 m.

+ Các nghiệm thức gồm:

CT 1: Phun dung dịch nano Cu_2O-Cu/Alginate (20 ppm Cu).

CT 2: Phun dung dịch nano Cu_2O-Cu/Alginate (30 ppm Cu).

CT 3: Thuốc so sánh Xantocin 40WP (0,6‰), hoạt chất Bronopol 40%.

CT 4: Đối chứng phun nước lã.

+ Phương pháp xử lý thuốc: Thực hiện 2 lần phun cách nhau 7 ngày bằng bình bơm chuyên dụng, lần đầu phun khi tỷ lệ bệnh bạc lá trên cây là 10 - 12%. Lượng nước phun khoảng 400 lít/ha/lần.

+ Phương pháp thu thập số liệu: Ở các thời điểm 1 ngày trước phun lần 1 và 7, 14 ngày sau phun lần 2. Mỗi ô nghiệm thức theo dõi cố định 5 điểm được chọn ngẫu nhiên trên hai đường chéo góc, mỗi điểm là một khung có kích thước 40 × 50 cm cách mép ngoài ô tối thiểu 1m. Tại mỗi điểm chọn 10 dảnh lúa cao nhất, mỗi dảnh theo dõi 3 lá trên cùng để ghi nhận lá bị nhiễm bệnh theo thang phân 9 cấp bệnh ở dưới.

+ Các chỉ tiêu theo dõi:

Tỷ lệ lá bệnh/cây (%) = (Số lá bị bệnh/Tổng số lá điều tra) × 100

Chỉ số lá bệnh (%): Chỉ số lá bệnh được tính theo công thức Townsend-Heuberger:

$$\text{Chỉ số lá bệnh (\%)} = \frac{9n_9 + 7n_7 + 5n_5 + 3n_3 + n_1}{9N} \times 100$$

Trong đó: N: Tổng số lá điều tra.

n_1: Số lá bị bệnh ở cấp 1 có diện tích bệnh < 5%

n_3: Số lá bị bệnh ở cấp 3 có diện tích bệnh 5 - < 10%

n_5: Số lá bị bệnh ở cấp 5 có diện tích bệnh 10 - < 25%

n_7: Số lá bị bệnh ở cấp 7 có diện tích bệnh 25 - < 50%

n_9: Số lá bị bệnh ở cấp 9 có diện tích bệnh ≥ 50%

Hiệu lực sinh học của thuốc (%): Được tính theo công thức Henderson-Tilton.

Hiệu lực (%) = [1-(Ta x Cb)/(Tb x Ca)] × 100

Trong đó: Ta: Chỉ số bệnh ở nghiệm thức xử lý thuốc sau phun.

Tb: Chỉ số bệnh ở nghiệm thức xử lý thuốc trước phun.

Ca: Chỉ số bệnh ở nghiệm thức đối chứng sau phun.

Cb: Chỉ số bệnh ở nghiệm thức đối chứng trước phun.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Mức độ bệnh bạc lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* gây ra ở các nghiệm thức phun nano Cu_2O-Cu/Alginate ở nồng độ 20 - 30ppm và Xantocin 40WP ở nồng độ 0,6‰ là tương đương nhau và ở mức thấp hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng chỉ phun nước lã ở các thời điểm theo dõi từ 7 - 14 ngày sau xử lý (NSXL) lần 2 (Bảng 1).

Bảng 1. Mức độ bệnh bạc lá lúa ở thí nghiệm diện hẹp trong vụ Hè Thu 2019 tại tỉnh Tiền Giang

Nghiệm thức	Tỷ lệ bệnh (%)			Chỉ số bệnh (%)		
	TXL lần 1	7 NSXL lần 2	14 NSXL lần 2	TXL lần 1	7 NSXL lần 2	14 NSXL lần 2
NT 1	11,56	13,33^b	13,33^b	2,37	3,26^b	3,16^b
NT 2	11,11	11,11^b	9,78^b	2,52	2,72^b	2,47^b
NT 3	10,67	12,00^b	12,00^b	2,47	3,01^b	3,06^b
NT 4	11,11	27,11^a	36,44^a	2,52	9,33^a	13,43^a
Prob.	0,793	0,000	0,000	0,864	0,000	0,000
CV (%)	*9,59*	*10,92*	*13,15*	*9,95*	*10,90*	*12,82*

Ghi chú: NT 1 và 2 là nano Cu_2O-Cu/Alginate ở nồng độ Cu 20 ppm và 30 ppm, NT 3 là Xantocin 40WP (0,6‰), NT 4 là phun nước lã; TXL là trước xử lý thuốc, NSXL là ngày sau xử lý thuốc.

Kết quả thí nghiệm diện rộng được ghi nhận ở Bảng 2 cũng cho thấy mức độ bệnh bạc lá lúa ở các nghiệm thức phun nano Cu_2O-Cu/Alginate ở nồng độ 20 - 30 ppm là tương đương với Xantocin 40WP ở nồng độ 0,6‰ và duy trì ở mức thấp hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng chỉ phun nước lã ở các thời điểm theo dõi như ở thí nghiệm diện hẹp.

Bảng 2. Mức độ bệnh bạc lá lúa thử nghiệm diện rộng vụ Hè Thu 2019 tại tỉnh Tiền Giang

Nghiệm thức	Tỷ lệ bệnh (%)			Chỉ số bệnh (%)		
	TXL lần 1	7 NSXL lần 2	14 NSXL lần 2	TXL lần 1	7 NSXL lần 2	14 NSXL lần 2
NT 1	11,33	12,67^b	11,33^b	3,19	3,70^b	2,74^b
NT 2	12,00	10,67^b	10,00^b	2,37	3,70^b	2,15^b
NT 3	11,33	11,33^b	10,67^b	2,74	2,96^b	2,37^b
NT 4	12,00	26,00^a	37,33^a	2,81	7,04^a	13,63^a
Prob.	0,937	0,000	0,000	0,797	0,000	0,000
CV (%)	*12,51*	*11,49*	*16,30*	*18,43*	*18,48*	*13,45*

Ghi chú: NT 1 là nano Cu_2O-Cu/Alginate (Cu 20ppm), NT 2 là nano Cu_2O-Cu/Alginate (Cu 30ppm), NT 3 là Xantocin 40WP (0,6‰), NT 4 là phun nước lã; TXL là trước xử lý thuốc, NSXL là ngày sau xử lý thuốc.

Bảng 3. Hiệu lực phòng trừ bệnh bạc lá lúa của nano Cu_2O-Cu/Alginate vụ Hè Thu 2019 tại tỉnh Tiền Giang

Nghiệm thức	Hiệu lực ở thí nghiệm diện hẹp (%)		Hiệu lực ở thử nghiệm diện rộng (%)	
	7 NSXL lần 2	14 NSXL lần 2	7 NSXL lần 2	14 NSXL lần 2
NT 1	61,95	74,61	64,80	78,77
NT 2	70,86	81,74	73,40	85,08
NT 3	67,16	76,74	68,46	81,96
Prob.	0,164	0,080	0,358	0,418
CV%	*6,79*	*3,62*	*12,95*	*8,71*

Ghi chú: NT 1 và 2 là nano Cu_2O-Cu/Alginate ở nồng độ Cu 20 ppm và 30 ppm, NT 3 là Xantocin 40WP (0,6‰), NSXL là ngày sau xử lý thuốc.

Kết quả nghiên cứu được ghi nhận ở Bảng 3 cho thấy hiệu lực phòng trừ bệnh bạc lá lúa của các nghiệm thức phun nano Cu_2O-Cu/Alginate ở nồng độ 20 - 30 ppm tương đương với Xantocin 40WP ở nồng độ 0,6‰ và đạt 74,61 - 81,74% ở thời điểm 14 NSXL lần 2 đối với thí nghiệm diện hẹp và đạt 78,77 - 85,08% đối với thử nghiệm diện rộng ở cùng thời điểm theo dõi.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

- Hiệu lực phòng trị bệnh bạc lá lúa của nano Cu_2O-Cu/Alginate ở nồng độ 20 - 30 ppm đạt mức khá cao sau 2 lần phun và tương đương với Xantocin 40WP ở nồng độ 0,6‰ với cùng số lần và thời điểm phun.

- Tiếp tục thực hiện các thí nghiệm đánh giá hiệu lực phòng trừ bệnh bạc lá lúa của Cu_2O-Cu/Alginate trong vụ Đông Xuân ở tỉnh Tiền Giang và ở các vùng sinh thái khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bui Duy Du, Dang Van Phu, Le Anh Quoc, and Nguyen Quoc Hien (2017). Synthesis and investigation of antimicrobial activity of Cu_2O nanoparticles/zeolite, *Journal of Nanoparticles*: 1 - 6.
2. Rusjan D. (2012): *Copper in horticulture, In "Fungicides for Plant and Animal Diseases"*. Published by Intech, Rijecka, Croatia: 257 - 278.
3. Giannousi K., Sarafidis G., Mourdikoudis S., Pantazaki A., and Dendrinou-Samara C. (2014). Selective synthesis of Cu_2O and Cu/Cu_2O NPs: antifungal activity to yeast saccharomyces cerevisiae and DNA interaction, *Inorganic Chemistry*, 53 (18): 9657 - 9666.
4. Michael Hans, Andreas Erbe, Salima Mathews, Ying Chen, Marc Solioz, and Frank Mü cklich (2013). Role of copper oxides in contact killing of bacteria, *Langmuir*: 16160 - 16166.
5. Huang S., Wang L., Liu L., Hou L., and Li L. (2015). Nanotechnology in agriculture, livestock, and aquaculture in China. A review, *Agronomy for Sustainable Development*, 35 (2): 369 - 400.

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ GIẢM BỆNH THÁN THƯ TRÊN DƯA CHUỘT CỦA HAI CHỦNG VI KHUẨN *Bacillus* sp. TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI

Nguyễn Thị Liên[1], Nguyễn Thị Phi Oanh[2] và Nguyễn Đắc Khoa[1]*

[1] Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học,
[2] Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ
**Tác giả liên hệ: ndkhoa@ctu.edu.vn*

ABSTRACT

Disease-reducing effects against cucumber anthracnose (*Colletotrichum lagenarium*) of the two antagonistic *Bacillus* sp. strains STI2 và STIII1 under net house conditions

This study aimed at testing for the disease-reducing effects against cucumber anthracnose (Colletotrichum lagenarium) of the two antagonistic Bacillus sp. strains STI2 và STIII1 under net house conditions. Two application methods were tested including soil drenching and foliar spraying using 10^8, 10^6 and 10^4 cells/mL bacterial suspensions. The soil drenching application was done at one day before sowing, one day after sowing and the combination of these two application time points. The foliar spraying application was done at one day before pathogen inoculation, one day after inoculation and their combination. Both bacterial strains showed significant effects compared to that of the non-treated control where 10^8 cells/mL suspensions showed better effects among the suspensions tested. The combination of soil drenching applications at one day before and after sowing showed the highest effects among those tested.

Keywords: *Antagonistic bacteria, anthracnose, Bacillus sp., Colletotrichum lagenarium, cucumber.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh thán thư trên dưa chuột (dưa leo) là bệnh phổ biến không chỉ ở Việt Nam mà còn trên toàn thế giới. Tác nhân gây bệnh do nấm *Colletotrichum lagenarium* gây ra làm ảnh hưởng tới năng suất rất nghiêm trọng, nhất là vào mùa mưa (Võ Thanh Hoàng và Nguyễn Thị Nghiêm, 1999). Hiện nay, biện pháp phòng trị bệnh thán thư chủ yếu là sử dụng thuốc hóa học. Điều này gây nhiều hệ lụy như ảnh hưởng xấu đến môi trường đất, nước, hệ vi sinh vật trong đất và thiên địch... đồng thời dư lượng thuốc bảo vệ thực vật trong nông sản gây ảnh hưởng trực tiếp tới người sử dụng. Ngoài ra, khi sử dụng

Người phản biện: TS. Nguyễn Đức Độ.

thuốc hóa học để phòng trị bệnh còn làm mầm bệnh phát sinh nòi mới, gây khó khăn trong công tác phòng trừ (Maymon *et al*., 2006). Phòng trừ bệnh hại trên thực vật không sử dụng thuốc hóa học đã và đang nhận được sự quan tâm của cả xã hội. Một trong những biện pháp phòng trừ được xem là an toàn và có hiệu quả là sử dụng vi khuẩn đối kháng với nấm *C. lagenarium* gây ra trên dưa chuột. Vi khuẩn đối kháng với mầm bệnh thông qua một số cơ chế như tạo kháng sinh, cạnh tranh nguồn thức ăn hoặc tiết enzyme phân hủy vách tế bào của mầm bệnh (Someya *et al*., 2002; Silva *et al*., 2004; Siddiqui, 2006; Nguyễn Thị Liên *và ctv*., 2019). Từ những cơ sở trên, nghiên cứu "Đánh giá hiệu quả giảm bệnh thán thư trên dưa chuột của hai chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. trong điều kiện nhà lưới" được thực hiện nhằm mục đích tiến tới thử nghiệm hiệu quả giảm bệnh của các chủng vi khuẩn đối kháng này trên quy mô lớn hơn ở điều kiện ngoài đồng.

II. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm và nhà lưới của Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Hai chủng vi khuẩn đối kháng là *Bacillus* sp. STI2 và *Bacillus* sp. STIII1 được phân lập từ đất vùng rễ cây dưa chuột. Hai chủng vi khuẩn đã được phân lập và đã được khảo sát khả năng đối kháng với nấm *C. lagenarium* trong điều kiện phòng thí nghiệm (Nguyễn Thị Liên *và ctv*., 2019).

Chuẩn bị nấm bệnh

Nấm bệnh được nuôi cấy trên đĩa petri chứa môi trường Potato dextrose agar ở nhiệt độ phòng (28 ± 2ºC) khoảng 10-14 ngày để nấm tạo bào tử. Huyền phù bào tử nấm được chuẩn bị bằng cách cho nước cất vô trùng vào đĩa nấm và cạo nhẹ bằng kim mũi giáo trên bề mặt môi trường. Lược bỏ phần sợi nấm qua lớp vải thưa để thu huyền phù bào tử nấm và hiệu chỉnh về mật số khoảng 4×10^5 bào tử/mL bằng phương pháp đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu.

Chuẩn bị vi khuẩn

Vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường Nutrient agar ở nhiệt độ phòng thí nghiệm (28 ± 2ºC) 2 ngày trước khi sử dụng. Tạo huyền phù vi khuẩn bằng cách cho nước cất thanh trùng vào đĩa và cạo hết sinh khối vi khuẩn bằng kim cấy. Xác định mật số của vi khuẩn trong huyền phù dựa theo phương pháp đo độ đục chuẩn McFarland bằng cách đo giá trị OD ở bước sóng 625 nm. Giá trị OD_{625} = 0,08 - 0,1 tương đương với mật số khoảng 10^8 tế bào/mL.

Xử lý vi khuẩn đối kháng

Xử lý huyền phù vi khuẩn đối kháng vào đất: Mỗi cây tưới khoảng 5 mL huyền phù vi khuẩn với 3 mật số 10^8, 10^6 và 10^4 tế bào/mL. Thời điểm xử lý huyền phù vi khuẩn vào đất là 1 ngày trước khi gieo hạt, 1 ngày sau khi gieo hạt và kết hợp 1 ngày trước và sau khi gieo hạt.

Phun huyền phù vi khuẩn đối kháng lên lá: Phun huyền phù vi khuẩn đối kháng với mật số 10^8, 10^6 và 10^4 tế bào/mL đều lên bề mặt của lá dưa. Thời điểm phun huyền phù vi khuẩn đối kháng là 1 ngày trước khi chủng bệnh, 1 ngày sau khi chủng bệnh và kết hợp 1 ngày trước và sau khi chủng bệnh.

Cách chủng bệnh nhân tạo

Khi cây dưa chuột lên được 3 - 5 lá thật thì bắt đầu chủng bệnh nhân tạo bằng cách phun huyền phù bào tử nấm (10^5 bào tử/mL) lên bề mặt của lá dưa.

Đánh giá hiệu quả giảm bệnh của 2 chủng vi khuẩn:

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với hai chủng vi khuẩn đối kháng và các nghiệm thức xử lý vi khuẩn đối kháng gồm *(1)* tưới đất ở thời điểm trước khi gieo hạt 1 ngày, *(2)* tưới đất ở thời điểm sau khi gieo hạt 1 ngày, *(3)* kết hợp tưới trước và sau khi gieo hạt 1 ngày, *(4)* phun huyền phù vi khuẩn đối kháng 1 ngày trước khi chủng bệnh, *(5)* phun huyền phù vi khuẩn đối kháng 1 ngày sau khi chủng bệnh và *(6)* kết hợp phun huyền phù vi khuẩn đối kháng 1 ngày trước và sau khi chủng bệnh. Ngoài ra còn có nghiệm thức đối chứng dương là sử dụng thuốc trừ nấm trị bệnh thán thư Antracol 70WP và nghiệm thức đối chứng âm chỉ phun nước cất thay cho vi khuẩn đối kháng.

Chỉ tiêu theo dõi

Chỉ tiêu ghi nhận là phần trăm diện tích lá bị nhiễm bệnh ở thời điểm 4, 5 và 6 ngày sau khi chủng bệnh. Mỗi đơn vị thí nghiệm được ghi nhận và đánh giá trên 3 lá thật. Giá trị trung bình của 3 lá là 1 lần lặp lại của 1 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần.

$$\text{Tỷ lệ diện tích lá bệnh (\%)} = \frac{\text{Diện tích lá bị bệnh}}{\text{Tổng diện tích lá}} \times 100$$

(Bộ Nông nghiệp Phát triển nông thôn, 2013)

Xử lý số liệu

Số liệu thô được xử lý bằng phần mềm Microsof Excel 2016 và phần mềm Minitab 16 để tính toán các số liệu thống kê.

III.KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hiệu quả giảm bệnh của hai chủng vi khuẩn đối kháng của biện pháp tưới huyền phù vi khuẩn đối kháng vào đất trước khi gieo hạt 1 ngày

Thời điểm bốn ngày sau khi chủng bệnh (SKCB), tỷ lệ diện tích lá bệnh được đánh giá trên tất cả các nghiệm thức. Số liệu được trình bày trong Bảng 1 cho thấy cả 2 chủng vi khuẩn đối kháng đều cho hiệu quả giảm bệnh tốt và tương đương nhau ở mật số 10^8 tế bào/mL, trong khi các nghiệm thức còn lại đều khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng dương và không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng âm. Ở thời điểm 5 ngày SKCB, tất cả các nghiệm thức có xử lý vi khuẩn đều có tỷ lệ diện tích lá bệnh thấp hơn so với đối chứng âm, tuy nhiên có 2 nghiệm thức của 2 chủng vi khuẩn ở mật số vi khuẩn 10^8 tế bào/mL cho tỷ lệ diện tích lá bệnh thấp và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng âm. Thời điểm 6 ngày sau khi chủng bệnh, tỷ lệ diện tích lá bệnh ở tất cả các nghiệm thức tiếp tục tăng, kể cả nghiệm thức đối chứng dương. Nghiệm thức có tỷ lệ diện tích lá bệnh thấp nhất (28,8%) là chủng vi khuẩn STIII1 ở mật số 10^8 tế bào/mL.

Bảng 1. Tỷ lệ diện tích lá bị nhiễm bệnh ở biện pháp tưới huyền phù vi khuẩn đối kháng vào đất trước khi gieo hạt 1 ngày

Nghiệm thức	Tỷ lệ diện tích lá bệnh (%)		
	Ngày 4 SKCB	Ngày 5 SKCB	Ngày 6 SKCB
STI2 10^4	33,7^{a}	42,6^{a-c}	47,7^{ab}
STI210^6	31,1^{a}	38,8^{a-d}	40,7^{bc}
STI2 10^8	17,8^{bc}	28,9^{c-e}	35,1^{bc}
STIII1 10^4	32,6^{a}	43,5^{ab}	45,2^{a-c}
STIII110^6	27,3^{ab}	33,4^{b-d}	37,8^{bc}
STIII1 10^8	16,9^{bc}	19,5^{ef}	28,8^{c}
Đối chứng âm	36,5^{a}	49,9^{a}	60,3^{a}
Đối chứng dương	7,5^{c}	8,9^{f}	13,9^{d}
P-value	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CV%	37,7	37,3	34,6

Giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trong cùng một cột được theo sau bởi các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép kiểm định Tukey ở mức ý nghĩa 5%.

3.2. Hiệu quả giảm bệnh của hai chủng vi khuẩn đối kháng của biện pháp tưới huyền phù vi khuẩn đối kháng vào đất sau khi gieo hạt 1 ngày

Số liệu trong Bảng 2 thể hiện thời điểm 4 ngày sau khi chủng bệnh, tất cả các nghiệm thức có xử lý vi khuẩn đối kháng đều chưa phát huy được tác dụng, mặc dù tỷ lệ diện tích lá bệnh có thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng âm nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 2. Tỷ lệ diện tích lá bị nhiễm bệnh ở biện pháp tưới huyền phù vi khuẩn đối kháng vào đất sau khi gieo hạt 1 ngày

Nghiệm thức	Tỷ lệ diện tích lá bệnh (%)		
	Ngày 4 SKCB	Ngày 5 SKCB	Ngày 6 SKCB
STI2 10^4	35,9^{a}	43,2^{ab}	58,1^{ab}
STI210^6	34,4^{a}	40,3^{ab}	49,4^{ab}
STI2 10^8	27,3^{a}	35,3^{ab}	40,1^{ab}
STIII1 10^4	33,3^{a}	42,3^{ab}	55,6^{ab}
STIII110^6	31,7^{a}	38,8^{ab}	48,9^{ab}
STIII1 10^8	22,0^{ab}	29,5^{b}	36,1^{b}
Đối chứng âm	36,5^{a}	50,0^{a}	60,3^{a}
Đối chứng dương	7,5^{b}	8,9^{c}	13,9^{c}
P-value	0,031	0,001	0,004
CV%	38,16	33,41	37,77

Giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trong cùng một cột được theo sau bởi các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép kiểm định Tukey ở mức ý nghĩa 5%.

Trong hai ngày tiếp theo cũng chỉ có nghiệm thức là chủng vi khuẩn STIII1 ở mật số 10^8 tế bào/mL cho hiệu quả giảm bệnh tốt nhất so với những mật số khảo sát trong nghiên cứu này và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng âm và so với các nghiệm thức còn lại. Theo một số tác giả, vi khuẩn đối kháng ngoài khả năng kháng lại các mầm bệnh còn có các đặc tính có lợi như kích kháng (Siddiqui, 2006), khi ứng dụng vi khuẩn vùng rễ vào đất có thể làm giảm nhiều bệnh trên lá dưa chuột (Wei *et al*., 1991; Liu *et al*., 1995) và trên cà chua (Silva *et al*., 2004). Nguồn gốc của hai chủng vi khuẩn đối kháng trong nghiên cứu này được phân lập từ đất vùng rễ của dưa chuột (Nguyễn Thị Liên *và ctv*., 2019), do vậy ngoài khả năng đối kháng thì 2 chủng vi khuẩn trong nghiên cứu còn có thể có những đặc tính tốt khác nữa.

3.3. Hiệu quả giảm bệnh của hai chủng vi khuẩn đối kháng của biện pháp kết hợp tưới huyền phù vi khuẩn đối kháng vào đất trước và sau khi gieo hạt 1 ngày

Ở cả 3 thời điểm khảo sát, các nghiệm thức cho thấy hiệu quả giảm bệnh (Bảng 3). Tỷ lệ diện tích lá bệnh ở hầu hết các nghiệm thức có xử lý vi khuẩn đối kháng đều thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng âm.

Nhìn chung về kết quả của biện pháp tưới huyền phù vi khuẩn đối kháng vào đất ở các thời điểm khác nhau cho thấy cả 2 chủng vi khuẩn ở mật số thấp (10^4, 10^6 tế bào/mL) thì không có hiệu quả giảm bệnh. Nghiệm thức chủng vi khuẩn STIII1 ở mật số 10^8 tế bào/mL cho hiệu quả giảm bệnh tốt nhất trong số các nghiệm thức được khảo sát trong nghiên cứu này và ổn định ở các thời điểm được khảo sát, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các mật số khác của 2 chủng vi khuẩn được khảo sát trong nghiên cứu này. Vi khuẩn đối kháng với nấm bệnh có thể theo nhiều cơ chế khác nhau (Nguyễn Thị Liên *và ctv*., 2019). Theo Raaijmarkers *et al*., (2002) thì khả năng ức chế nấm bệnh của các chủng vi khuẩn đối kháng có liên quan đến khả năng sản sinh các kháng sinh. Hơn nữa, khả năng định vị của vi khuẩn đối kháng bên trong cây chủ sẽ có lợi thế khi chúng có thể tăng sinh và nhân mật số tại vị trí mầm bệnh tấn công (Nga và *ctv*., 2010).

Bảng 3. Tỷ lệ diện tích lá bị nhiễm bệnh ở biện pháp kết hợp tưới huyền phù vi khuẩn đối kháng vào đất trước và sau khi gieo hạt 1 ngày

Nghiệm thức	Tỷ lệ diện tích lá bệnh (%)		
	Ngày 4 SKCB	Ngày 5 SKCB	Ngày 6 SKCB
STI2 10^4	$28,2^{ab}$	$34,0^{b}$	$42,9^{b}$
STI210^6	$23,4^{b-d}$	$28,3^{b-d}$	$37,9^{b-d}$
STI2 10^8	$16,2^{c-e}$	$22,2^{d-e}$	$28,3^{b-d}$
STIII1 10^4	$26,4^{a-c}$	$34,5^{b}$	$40,9^{bc}$
STIII110^6	$20,2^{b-d}$	$28,8^{b-d}$	$29,4^{b-d}$
STIII1 10^8	$13,3^{de}$	$16,2^{ef}$	$20,5^{de}$
Đối chứng âm	$36,5^{a}$	$50,0^{a}$	$60,3^{a}$
Đối chứng dương	$7,5^{f}$	$8,9^{f}$	$13,9^{e}$
P-value	*<0,0001*	*<0,0001*	*<0,0001*
CV%	*43,6*	*41,9*	*36,8*

Giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trong cùng một cột được theo sau bởi các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép kiểm định Tukey ở mức ý nghĩa 5%.

3.4. Hiệu quả giảm bệnh của hai chủng vi khuẩn đối kháng ở biện pháp phun qua lá ở thời điểm trước khi chủng bệnh 1 ngày

Hiệu quả giảm bệnh của hai chủng vi khuẩn đối kháng ở biện pháp phun qua lá ở thời điểm trước khi chủng bệnh 1 ngày được trình bày trong Bảng 4. Nhìn chung, hầu hết các nghiệm thức có xử lý vi khuẩn đều cho hiệu quả giảm bệnh so với đối chứng âm ở thời điểm ngày thứ 4 sau khi chủng bệnh. Sang ngày thứ 5 nghiệm thức còn có hiệu quả giảm bệnh có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng âm chỉ còn 3, đó là nghiệm thức chủng vi khuẩn STI2 mật số 10^8; STIII1 mật số 10^6 và STIII1 mật số 10^8 tế bào/mL. Các nghiệm thức còn lại có tỷ lệ diện tích lá bệnh tương đương với đối chứng âm. Đặc biệt là ở thời điểm khảo sát ngày thứ 6 sau khi chủng bệnh thì tất cả các nghiệm thức đều không còn hiệu quả giảm bệnh nữa. Tỷ lệ diện tích lá bệnh của các nghiệm thức tương đương với đối chứng âm.

Bảng 4. Tỷ lệ diện tích lá bệnh của hai chủng vi khuẩn đối kháng ở biện pháp phun qua lá ở thời điểm trước khi chủng bệnh 1 ngày

Nghiệm thức	Tỷ lệ diện tích lá bệnh (%)		
	Ngày 4 SKCB	Ngày 5 SKCB	Ngày 6 SKCB
STI2 10^4	18,06^{a}	58,33^{a}	95,83^{a}
STI210^6	14,53^{ab}	48,61^{ab}	94,45^{a}
STI2 10^8	10,77^{bc}	43,75^{b}	97,22^{a}
STIII1 10^4	16,67^{a}	50,64^{ab}	100,00^{a}
STIII110^6	10,62^{bc}	43,75^{b}	98,09^{a}
STIII1 10^8	10,12^{bc}	41,67^{b}	95,83^{a}
Đối chứng âm	19,10^{a}	59,72^{a}	100,00^{a}
Đối chứng dương	6,45^{c}	25,70^{c}	34,72^{b}
P-value	*<0,0001*	*<0,0001*	*<0,0001*
CV%	*10,62*	*8,94*	*3,96*

Giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trong cùng một cột được theo sau bởi các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép kiểm định Tukey ở mức ý nghĩa 5%.

3.5. Hiệu quả giảm bệnh của hai chủng vi khuẩn đối kháng ở biện pháp phun qua lá ở thời điểm sau khi chủng bệnh 1 ngày

Kết quả từ Bảng 5 cho thấy những nghiệm thức có mật số vi khuẩn càng cao thì hiệu quả giảm bệnh càng tốt và ngược lại. Do áp lực lớn của việc chủng bệnh nhân tạo nên tỷ lệ diện tích lá bệnh tăng rất nhanh ở các ngày được khảo sát. Ở thời điểm sau 6 ngày sau khi chủng bệnh xuất hiện chủng STI2 ở mật số 10^8 tế bào/mL có hiệu quả giảm bệnh khá tốt so với đối chứng âm.

Bảng 5. Tỷ lệ diện tích lá bệnh của hai chủng vi khuẩn đối kháng ở biện pháp phun qua lá ở thời điểm sau khi chủng bệnh 1 ngày

Nghiệm thức	Tỷ lệ diện tích lá bệnh (%)		
	Ngày 4 SKCB	Ngày 5 SKCB	Ngày 6 SKCB
STI2 10^4	17,71^{a}	48,96^{ab}	97,92^{a}
STI210^6	9,38^{bc}	34,38^{bc}	88,89^{b}
STI2 10^8	8,33^{c}	29,86^{bc}	70,14^{d}
STIII1 10^4	16,84^{ab}	58,33^{a}	100,00^{a}
STIII110^6	12,16^{abc}	46,53^{ab}	93,75^{ab}
STIII1 10^8	9,38^{bc}	40,97^{ab}	81,25^{c}
Đối chứng âm	9,38^{bc}	59,12^{a}	100,00^{a}
Đối chứng dương	5,56^{c}	16,67^{c}	26,56^{e}
P-value	*<0,0001*	*<0,0001*	*<0,0001*
CV%	*23,59*	*18,33*	*3,48*

Giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trong cùng một cột được theo sau bởi các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép kiểm định Tukey ở mức ý nghĩa 5%.

3.6. Hiệu quả giảm bệnh của hai chủng vi khuẩn đối kháng ở biện pháp kết hợp phun qua lá ở thời điểm trước và sau khi chủng bệnh 1 ngày

Trong các biện pháp được khảo sát thì biện pháp kết hợp phun qua lá ở thời điểm trước và sau khi chủng bệnh 1 ngày cho kết quả hiệu quả giảm bệnh rất khả quan, thông qua tỷ lệ diện tích lá bệnh thấp hơn nhiều so với đối chứng âm (Bảng 6). Cả hai nghiệm thức cho hiệu quả giảm bệnh tốt nhất vẫn là 2 chủng vi khuẩn ở mật số 10^8 tế bào/mL. Vi khuẩn đối kháng với nấm bệnh theo nhiều cơ chế khác nhau. *Bacillus* sp. được ghi nhận có khả năng tiết kháng sinh, phức chất kháng nấm hoặc enzyme phân hủy vách tế bào nấm bệnh (Fernando *et al*., 2006; Nguyễn Thị Liên *và ctv*., 2019) như sinh siderophore, chitinase và protease...

Bảng 6. Tỷ lệ diện tích lá bệnh của hai chủng vi khuẩn đối kháng ở biện pháp kết hợp phun qua lá ở thời điểm trước và sau khi chủng bệnh 1 ngày

Nghiệm thức	Tỷ lệ diện tích lá bệnh (%)		
	Ngày 4 SKCB	Ngày 5 SKCB	Ngày 6 SKCB
STI2 10^4	22,22^{a-c}	59,72^{a-c}	94,45^{a}
STI210^6	20,14^{a-c}	48,61^{b-d}	76,39^{b}
STI2 10^8	13,89^{bc}	38,03^{d}	68,75^{b}
STIII1 10^4	26,19^{ab}	65,28^{ab}	99,31^{a}
STIII110^6	19,45^{a-c}	43,75^{cd}	90,28^{a}
STIII1 10^8	15,28^{bc}	36,80^{d}	69,44^{b}
Đối chứng âm	33,33^{a}	60,06^{a}	100,00^{a}
Đối chứng dương	7,99^{c}	17,71^{e}	29,86^{c}
P-Value	*0,001*	*<0,0001*	*<0,0001*
CV%	*25,79*	*14,15*	*5,39*

Giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trong cùng một cột được theo sau bởi các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép kiểm định Tukey ở mức ý nghĩa 5%.

Qua các thời điểm khảo sát cho thấy hầu hết các biện pháp phun qua lá trước khi chủng bệnh đều không còn hiệu quả giảm bệnh. Ở biện pháp phun qua lá sau khi chủng bệnh thì chủng STI2 cho hiệu quả phòng trị bệnh cao. Biện pháp kết hợp phun qua lá trước khi chủng và sau khi chủng bệnh 1 ngày thì cả 2 chủng đều có hiệu quả giảm bệnh. So sánh giữa các mật số vi khuẩn đối kháng được khảo sát thì ở mật số 10^8 tế bào/mL cho hiệu quả giảm bệnh tốt hơn so với các mật số của vi khuẩn trong phạm vi nghiên cứu và ổn định qua các ngày khảo sát.

IV, KẾT LUẬN

Cả hai chủng vi khuẩn đối kháng STI2 và STIII1 đều thể hiện hiệu quả giảm bệnh so với đối chứng âm. Ở mật số vi khuẩn 10^8 tế bào/mL cho hiệu quả giảm bệnh tốt nhất và ổn định ở các biện pháp xử lý vi khuẩn. Biện pháp xử lý vi khuẩn tưới đất kết hợp trước và sau khi chủng bệnh 1 ngày cho hiệu quả giảm bệnh tốt nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fernando, W.G.D., Nakkeeran, S.N and Zang, Y. 2006. Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant disease. In PGPR: Biocontrol and biofertilization siddiqui, Z.A (ed). Springer Publisher, pp 67-109.
2. Liu, L., Kloepper, J.W. and Tuzun, S. 1995. Induce of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growth promoting rhizobacteria. Phytopathology 85: 695-698.
3. Maymon, M., Zveibil, A., Pivonia, S., Minz, D. and Freeman, S. 2006. Identification and Characterization of Benomyl-Resistance and Sensitive population of *Colletotrichum gleosporioides* from Statice (*Limonium* spp.). Phytopathology. 96: 542-548.
4. Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Thị Phi Oanh và Nguyễn Đắc Khoa, 2019. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng với nấm *Colletotrichum lagenarium* gây bệnh thán thư trên dưa chuột. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Số 10/2019. Trang: 15-20.
5. Raajimakers, J.M., Vlami, M. and de Souza, J.T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents, Antonie Leeuwenhoek 81, pp 537 - 547.
6. Siddiqui, Z.A, 2006. PGPR prospective biocontrol agent of plant pathogens, In PGPR: Biocontrol and Biofertilization, Siddiqui, Z.A. (ed.). Springer, The Netherlands, pp 111-142.
7. Silva H.S., Romeiro, R.S, Filho, R.C., Pereira, J.L.A., Mizubuti, E.S.G. and Mounteer, A.2004. Induce of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar disease under field condition. Journal of Phytopathology. 152: 371-375.
8. Somaya, N., Nakazima, M., Hibi, T., Yamaguchi, I. and Akutsu, K. 2002. Induced resistance to rice blast by antagonistic bacterium, *Serratia marcescens* strains B2. Journal of General Plant pathology. 68: 177-182.
9. Võ Thanh Hoàng và Nguyễn Thị Nghiêm, 1993. Bệnh hại dưa bầu bí. Giáo trình Bệnh hại cây trồng, trang:177-183.
10. Wei, G., Klopoepper, J.W. and Tuzun, S. 1991. Induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth promoting rhizobacteria. Phytopathology. 81: 1508-1512.

HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CAO CHIẾT THỰC VẬT ĐỐI VỚI BỆNH CHÁY BÌA LÁ LÚA DO *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI

Dương Thành Lộc[1], Đào Thị Hồng Xuyến[2], Nguyễn Chí Cương[2], Trần Thị Thu Thủy[3]

[1] Học viên cao học ngành Bảo vệ thực vật
[2] Bộ môn Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Cần Thơ
[3] Hội Nghiên cứu Bệnh hại Thực vật Việt Nam

ABSTRACT

The results showed that among the biological activity of the ten ethanol crude extracts, leave of Eucalyptus camaldulensis and Piper betle had the ability to inhibit the growth of Xanthomonas oryzae pv. oryzae under laboratory conditions and lasting up to 72 hours (after 72 hours the effect is no longer apparent), even the lowest concentration (5 mg/ml), the inhibitory zone of Piper betle and Eucalyptus camaldulensis were 14.7 mm and 14.0 mm respectively, and increasing gradually at higher concentration (20 mg/ml), reaching to 23.0 and 20.5 mm. In additions, these two plants had still highly effective in reducing disease in the net house conditions. At 6 days after inoculation, the diseased reducing-percentage of Eucalyptus camaldulensis and Piper betle were (62,1% and 50.1%). The extract of Eucalyptus camaldulensis at concentration 20mg/ml had showed disease reducing effect was up to 15 days after inoculation (40.4%) and similar to those control.

Keywords: *Xanthomonas oryzae pv. oryzae, crude extracts.*

I. MỞ ĐẦU

Bệnh cháy bìa lá lúa (hay còn gọi là bạc lá lúa) do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) gây ra và được phát hiện đầu tiên ở Nhật Bản vào năm 1884, là một trong những tác nhân gây hại nghiêm trọng ở những vùng trồng lúa ở khu vực Châu Á (Ou, 1985). Ở Việt Nam, bệnh gây hại nghiêm trọng vào mùa mưa, là nguyên nhân làm giảm năng suất từ 25 - 65% (Tạ Minh Son, 1993). Bệnh thường xuyên xuất hiện và gây hại nghiêm trọng đến năng suất cây lúa ở Đồng bằng sông Cửu Long (Phạm Văn Kim, 2016).

Việc sử dụng dịch trích thực vật để quản lý bệnh hại trên cây trồng đã được nghiên cứu và ứng dụng có hiệu quả. Tại Việt Nam, một số báo cáo cho thấy việc sử dụng dịch trích cỏ hôi (*Eupatorium*

Người phản biện: PGS.TS. Trần Vũ Phến,
TS. Lê Thanh Toàn.

odoratum), sống đời (*Kalanchoe pinnata*) bằng phương pháp ngâm hạt đã có hiệu quả đối với bệnh cháy bìa lá (Trần Thị Thu Thủy và Hans Jorgen Lyng Jorgensen, 2015; Khoa *et al.*, 2017). Tuy nhiên, dùng cao chiết thực vật để phòng trừ bệnh này chưa được nghiên cứu nhiều. Do đó thí nghiệm được thực hiện nhằm đánh giá khả năng phòng trị bệnh cháy bìa lá do vi khuẩn *Xoo* với một số loài thực vật theo hướng nông nghiệp hữu cơ đang phát triển mạnh hiện nay.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

- Nguồn vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) được cung cấp từ Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long.
- Giống lúa: Jasmine 85 (Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long).
- Streptomycin (Đối chứng dương) và Dimethyl sulfoxide (DMSO): Pha loãng cao chiết.
- Ethanol 99%.

Bảng 1. Danh sách các loại thực vật được dùng trong thí nghiệm

TT	Tên Việt Nam	Tên khoa học	Địa điểm thu mẫu
1	Bạch đàn (lá)	*Eucalyptus camaldulensis* Dehnhart.	Thuận Thới, Trà Ôn, Vĩnh Long
2	Cỏ cứt heo răng cưa (thân, lá)	*Praxelis clematide* Griseb.	Thành phố Cần Thơ
3	Cỏ cứt heo (thân, lá)	*Ageratum conyzoides* L.	Phú Thịnh, Tam Bình, Vĩnh Long
4	Mù u (lá)	*Calophyllum inophyllum* L.	Thành phố Cần Thơ
5	Rau má (lá)	*Centella asiatica* (L.) Urb.	Tam Hiệp, Châu Thành, Tiền Giang
6	Trầu không (lá)	*Piper betle* L.	Long Thạnh, Giồng Riềng, Kiên Giang
7	Quế hồi (lá)	*Cinnamomum verum* Presl	Thành phố Cần Thơ
8	Cỏ hôi (thân, lá)	*Eupatorium odoratum* L.	Thành phố Cần Thơ
9	Xuân hoa đỏ (lá)	*Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk	Thuận Thới, Trà Ôn, Vĩnh Long
10	Cây chó đẻ (thân, lá)	*Phyllanthus niruri* L.	Phú Thịnh, Tam Bình, Vĩnh Long

2.2. Phương pháp thí nghiệm

2.2.1. Chuẩn bị

❖ Thu và chuẩn bị mẫu:

Các loài thực vật (Bảng 1) được rửa sạch, cắt nhỏ và đem phơi khô. Sau đó nghiền thành bột và trữ ở điều kiện 4^{o}C.

❖ Phương pháp ly trích mẫu:

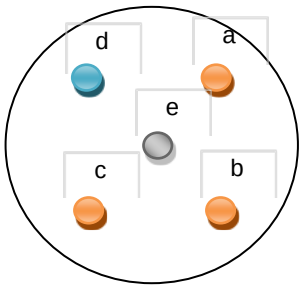
Bột thực vật (1,5 kg) cho vào bình thủy tinh, ngâm với 3 lít Ethanol 99%, trong 5 ngày. Lọc lấy nước và cô quay chân không ở nhiệt độ 40^{o}C và áp suất 15 - 30 atm, thu cao chiết và bảo quản ở 4^{o}C.

2.2.2. Đánh giá khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn Xoo bằng một số loại cao chiết thực vật trong điều kiện phòng thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện theo Shafiei *et al.* (2017). Ống nghiệm chứa 15 ml môi trường Wakimoto cải tiến ổn định

ở 55^{o}C sau đó 300 µl huyền phù vi khuẩn (10^8 cfu/ml) cho vào, lắc đều, đổ ra đĩa petri. Cao chiết gốc hòa tan với DMSO (0,2 g cao chiết/ml) và pha loãng với nước cất vô trùng ở nồng độ cần sử dụng.

Trên mỗi đĩa petri đục 5 lỗ (Hình 1), đường kính lỗ 5 mm, mỗi lỗ bơm 45 µl cao chiết ở 3 nồng độ (5, 10 và 20 mg cao chiết/ml), DMSO 10% và Streptomycin 100 µl/ml. Thí nghiệm bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 lần lặp lại. Ghi nhận chỉ tiêu đường kính vòng vô khuẩn (ĐKVVK) ở 48 và 72 giờ.



Hình 1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

a: 5 mg cao chiết/ml DMSO
b: 10 mg cao chiết/ml DMSO
c: 20 mg cao chiết/ml DMSO
d: DMSO 10%
e: Streptomycin 100 µg/ml

2.2.3. Đánh giá hiệu quả trừ bệnh cháy bìa lá hại lúa của hai loại cao chiết có triển vọng trong điều kiện nhà lưới

Đất tầng mặt ruộng lúa (0 - 30 cm), 7 kg/chậu. Gieo 10 cây lúa/chậu. Bón phân theo Nguyễn Ngọc Đệ (2008). Vi khuẩn *Xoo* với mật số 10^8 cfu/ml.

Tiến hành lây bệnh nhân tạo ở 45 ngày sau khi gieo và tạo vết thương theo Kauffman *et al.* (1973): cắt 3 - 5 chóp lá hoàn chỉnh (khoảng 2 - 3 cm) ở 5 cây lúa/chậu, trước mỗi lần cắt nhúng dụng cụ cắt vào huyền phù vi khuẩn (10^8 cfu/ml). Cho vào phòng ủ bệnh 24 giờ và chuyển ra nhà lưới.

Sau khi chủng bệnh 48 giờ tiến hành phun hai loại cao chiết (lá Trầu không và Bạch đàn) với nồng độ 20 mg/ml nước, Streptomycin (100 µg/ml) (Nasir, 2019) và DMSO (2%), phun đều hai mặt lá với lượng vừa đủ (40 ml/chậu). Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 5 lặp lại.

Ghi nhận chiều dài vết bệnh 6, 10 và 15 ngày sau khi chủng bệnh (NSKCB) và tính hiệu quả giảm bệnh (HQGB) theo công thức:

$$\text{HQGB (\%)} = \frac{\text{DC - DT}}{\text{CD}} \times 100$$

Trong đó:

HQGB: hiệu quả giảm bệnh.

DC: chiều dài vết bệnh của đối chứng phun DMSO (2%).

DT: chiều dài vết bệnh nghiệm thức phun cao chiết.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm thống kê IBM SPSS 22.0 qua phép thử Duncan để so sánh sự khác biệt.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn Xoo của một số loại cao chiết thực vật

Kết quả ở thời điểm 48 giờ sau thí nghiệm (GSTN), với 3 nồng độ 5 - 20 mg/l thì cao chiết lá trầu không cho ĐKVVK lớn nhất từ 19,5 - 26,6 mm và lá

bạch đàn 14,0 - 20,5 mm (Bảng 2). Đặc biệt, ở ngay nồng độ thấp nhất (5 mg/l), cao chiết lá trầu không và lá bạch đàn có ĐKVVK: 19,5 và 14,0 mm. Ở nồng độ (20 mg/l) cao chiết lá trầu không có ĐKVVK lớn hơn, khác biệt có ý nghĩa 1% so Streptomycin và kéo dài đến 72 GSTN. Cao chiết lá bạch đàn có ĐKVVK tương đương với Streptomycin và kéo dài đến thời điểm 72 GSTN. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Amrulloh (2008) cho rằng dịch chiết lá Trầu không có tác dụng ức chế vi khuẩn *Xoo* ở nồng độ 2,5% với vùng ức chế trung bình là 3,128 mm.

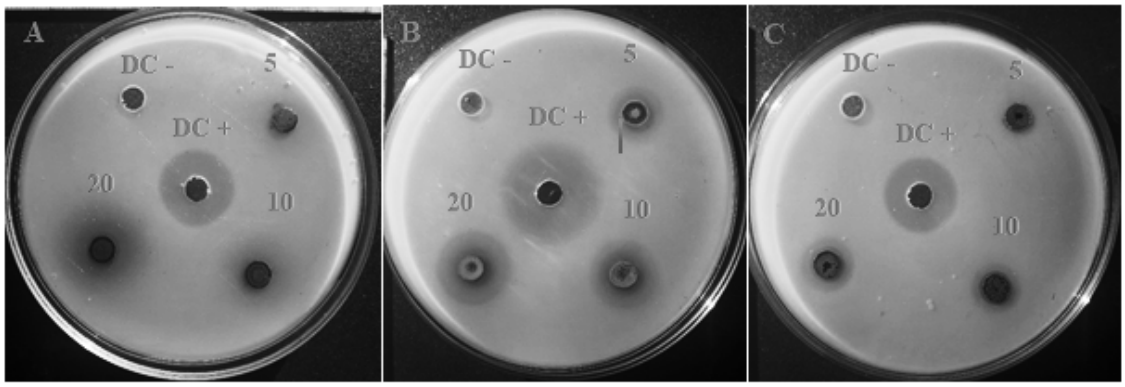
Đến thời điểm 72 GSTN thì ĐKVVK của cao chiết lá Trầu không chỉ giảm nhẹ (từ 14,7 - 23,0 mm). Cao chiết lá Bạch đàn thì hầu như không giảm (14,0 - 20,5 mm). Tương tự cao chiết lá Quế hồi có ĐKVVK ở mức trung bình nhưng không giảm so với 48 giờ 11,7 mm (10 mg/l) và 14,5 mm (20 mg/l). Cao chiết Cỏ cứt heo thì không còn vòng vô khuẩn. Như vậy, cao chiết lá Trầu không và Bạch đàn ở nồng độ 20 mg/ml thể hiện khả năng ức chế vi khuẩn cao nhất và kéo dài đến 72 GSTN được tiếp tục nghiên cứu trong điều kiên nhà lưới.

Bảng 2. Đường kính vòng vô khuẩn của 10 loại cao chiết đối với vi khuẩn Xoo

Cao chiết	Nồng độ (mg/ml)	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)	
		48 giờ	72 giờ
Cỏ hôi	5	5,0 ^{l}	5,0 ^{h}
	10	5,0 ^{l}	5,0 ^{h}
	20	5,0 ^{l}	5,0 ^{h}
Cỏ cứt heo	5	6,0 ^{k}	5,0 ^{h}
	10	8,2 ^{j}	5,0 ^{h}
	20	11,2 ^{i}	6,2 ^{h}
Bạch đàn	5	14,0 ^{g}	14,0 ^{e}
	10	17,5 ^{e}	17,2 ^{c}
	20	20,5 ^{c}	20,5 ^{b}
Cỏ cứt heo răng cưa	5	5,0 ^{l}	5,0 ^{h}
	10	5,0 ^{l}	5,0 ^{h}
	20	5,0 ^{l}	5,0 ^{h}
Mù u	5	5,0 ^{l}	5,0 ^{h}
	10	5,0 ^{l}	5,0 ^{h}
	20	5,0 ^{l}	5,0 ^{h}
Chó đẻ	5	5,0 ^{l}	5,0 ^{h}
	10	5,0 ^{l}	5,0 ^{h}
	20	5,0 ^{l}	5,0 ^{h}

Cao chiết	Nồng độ (mg/ml)	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)	
		48 giờ	72 giờ
Quế hồi	5	6,0 ^{k}	5,0 ^{h}
	10	12,2 ^{h}	11,7 ^{f}
	20	14,7 ^{f}	14,5 ^{de}
Trầu không	5	19,5 ^{d}	14,7 ^{d}
	10	23,5 ^{b}	17,7 ^{c}
	20	26,5 ^{a}	23,0 ^{a}
Rau má	5	5,0 ^{l}	5,0 ^{h}
	10	5,0 ^{l}	5,0 ^{h}
	20	5,0 ^{l}	5,0 ^{h}
Xuân hoa đỏ	5	5,0 ^{l}	5,0 ^{h}
	10	5,0 ^{l}	5,0 ^{h}
	20	5,0 ^{l}	5,0 ^{h}
Đối chứng (+)	0,5	20,7 ^{c}	20,7 ^{b}
Đối chứng âm (-)	-	5,0 ^{l}	5,0 ^{l}
Mức ý nghĩa		**	**
CV (%)		*4,8 %*	*4,6%*

Ghi chú: **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1% trong phép thử Duncan. Các giá trị ở cùng một cột cột theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt nhau trong phép thử Duncan.



Hình 2. Vòng vô khuẩn thời điểm 72 giờ trên môi trường Wakimoto cải tiến
A: Trầu không; B: Bạch đàn; C: Quế hồi

3.2. Hiệu quả trừ bệnh cháy bìa lá hại lúa của hai loại cao chiết thực vật trong điều kiện nhà lưới

Ở 6 NSKCB cho thấy cả 2 loại cao chiết cho hiệu quả giảm bệnh (HQGB) khá cao (> 50%), trong đó cao chiết lá Bạch đàn (62,1%) cho hiệu quả cao hơn kháng sinh Streptomycin. Cao chiết lá Trầu không (51,7%) tương đương so với đối chứng (Bảng 4).

Đến thời điểm 10 NSKCB có hiệu quả giảm xuống so với 6 NSKCB nhưng vẫn cho

HQGB tương đương so với kháng sinh Streptomycin: cao chiết lá Bạch đàn (52,3%), lá Trầu không (40,5%) và đối chứng sinh Streptomycin (46,6%).

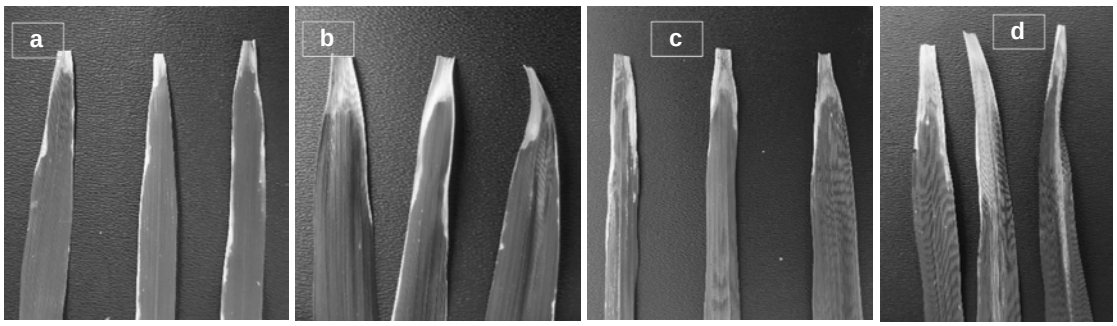
Cho đến thời điểm 15 NSKCB thì cao chiết lá Bạch đàn vẫn còn HQGB khá cao (40,4%) và không khác biệt ý nghĩa thống kê so với Streptomycin (43,3%).

Như vậy cao chiết lá Bạch đàn cho hiệu quả giảm bệnh tương đương hoặc cao hơn Streptomycin qua các thời điểm khảo sát.

Bảng 3. Hiệu quả giảm bệnh của hai loại cao chiết ở 3 thời điểm

Nghiệm thức	Hiệu quả giảm bệnh (%)		
	6 ngày	10 ngày	15 ngày
Bạch đàn	62,1^{a}	52,3^{a}	40,4^{a}
Trầu không	51,7^{b}	40,5^{b}	20,6^{b}
Đối chứng dương (+)	53,4^{b}	46,6^{ab}	43,4^{a}
Đối chứng âm (-)	00,0^{c}	00,0^{c}	00,0^{c}
Mức ý nghĩa	**	**	**
CV (%)	*7,6*	*11,7*	*8,6*

Ghi chú: **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1% trong phép thử Duncan. Các giá trị ở cùng một cột cột theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt nhau trong phép thử Duncan.



Hình 3. Khả năng hạn chế vết bệnh của 2 loại cao chiết ở thời điểm 6 NSKCB
a: Bạch đàn, b: Trầu không, c: Đối chứng (+), d: Đối chứng (-)

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Trong điều kiện phòng thí nghiệm cao chiết lá Trầu không và Bạch đàn cho ĐKVVK lớn nhất đối với vi khuẩn *Xoo* sau 48 giờ ở ngay cả nồng độ thấp nhất (5 mg/l) tương ứng: 19,5 và 14,0 mm, ở nồng độ cao (20 mg/l): 20,5 và 26,5 mm so với Streptomycin (100 µg/ml) là 20,7 mm và kéo dài hiệu quả đến 72 GSTN.

Ở điều kiện nhà lưới cả 2 loại cao chiết lá Bạch đàn và Trầu không vẫn cho hiệu quả giảm bệnh cháy bìa lá tốt: 61,5% và 50,1% ở 6 NSKCB. Trong đó, cao chiết lá Bạch đàn có thể kéo dài đến 15 NSKCB và hiệu quả tương đương với Streptomycin.

4.2. Đề nghị

Tiếp tục xác định cụ thể hợp chất nào có hiệu quả để ứng dụng chúng như là một hợp chất tự nhiên.

Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn tới Trường Đại học Cần Thơ đã cung cấp kinh phí nghiên cứu từ nguồn vốn vay ODA của Chính phủ Nhật Bản tài trợ trong khuôn khổ Dự án "Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ"

TÀI LIỆU KHAM KHẢO

1. Amrulloh, I. (2008). Uji potensi ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) sebagai antimikroba terhadap bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dan jamur *Fusarium oxysporum*. Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
2. Kauffman, H. E., Reddy, A. P. K., Hsieh, S. P. Y and Merca, S. D. (1973). An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. Plant Dis Rep 57(6), 537 - 541.
3. Khoa, N.Đ, Xạ, T.V., and Hào, L. T. (2017). Diseasereducing effects of aqueous leaf extract of Kalanchoe pinnata on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* involve induced resistance. Physiological and Molecular Plant Pathology, 100, 57 - 66.
4. Nasir, M., Iqbal, B., Hussain, M., Mustafa, A., & Ayub, M. (2019). Chemical management of bacterial leaf blight disease in rice. Journal of Agricultural Research, 57(2): 93 - 98.
5. Nguyễn Ngọc Đệ (2008). Giáo trình cây lúa. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, 338 trang.
6. Ou (1985). Rice disease. 2nd Edition. Conmmomwealth Mycology Institute. Surey, England, 201 - 221.
7. Phạm Văn Kim (2016). Các bệnh hại lúa quan trọng ở Đồng bằng sông Cửu Long (tái bản lần thứ 2). Nhà xuất bản Nông nghiệp, 126 trang.
8. Shafiei S. S. N., K. Ahmad, N. F. M. Ikhsan, S. I. Ismail and K. Sijam (2017). Antibacterial Activity of Acacia spp. Leaves Extracts against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and Screening for Active Phytochemical Contents. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science, 49 - 60.
9. Son, T.M. (1993). Breeding rice cultivars resistant to bacterial leaf blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) in Vietnam. In: Jacobs, T., and Parlevliet, J.E. (Eds.). Durability of Disease Resistance, Springer, Netherlands, 351 - 351.
10. Trần Thị Thu Thủy và Hans Jorgen Lyng Jorgensen (2015). Quản lý bệnh hại lúa bằng dịch trích thực vật. Kỷ yếu Hội nghị Khoa học BVTV toàn quốc, 111 - 119.

PHƯƠNG THỨC CANH TÁC MÔI TRƯỜNG LỢI KHUẨN CHO NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM PHÁT TRIỂN BỀN VỮNG

Cách nâng cao hoạt động hiệu quả của vi sinh vật có ích trong đất làm đất đai phì nhiêu màu mỡ và sản xuất ra thực phẩm an toàn

Saburo Matsui

Tiến sĩ, Giáo sư danh dự Đại học Kyoto
Hội viên xuất sắc của Hiệp hội Nước Thế giới

TÓM TẮT

Canh tác hữu cơ đã trở thành một vấn đề rất quan trọng cho nền nông nghiệp phát triển bền vững bằng cách cải thiện điều kiện đất đai, sử dụng các loại phân bón hữu cơ chất lượng cao. Nguồn nguyên liệu cho loại phân bón hữu cơ này có nhiều nguồn gốc khác nhau từ phân súc vật, dư thừa thực vật sau khi chế biến, rác thải, dư thừa thực vật sau mùa vụ thu hoạch và bùn chất thải sinh hoạt... Quá trình sản xuất phân hữu cơ với nhiệt độ cao có thể sản xuất ra những loại phân hữu cơ có chất lượng cao, có chứa nhiều chất dinh dưỡng thay thế được các loại phân hóa học và có chứa các loại vi sinh vật có ích có tác dụng thay thế thuốc trừ sâu. Những vi khuẩn có ích được tìm thấy như Bacillus spp. của Firmicutes, Actinomycetaceae spp. của Actinobacteria, Proteobacteria spp. và Bacteroidetes spp. là những thành viên chính của nhóm vi khuẩn vùng rễ cây. Những loại vi khuẩn có ích đơn độc như Streptomycests spp., Bacillus subtilis, Lactobacillus spp. có khả năng sản xuất số lượng lớn và thương mại hóa như loại thuốc trừ sâu sinh học. Phương thức canh tác môi trường lợi khuẩn cho nền nông nghiệp Việt Nam vừa được phát động, nhưng nó có một khả năng phát triển vô cùng rộng lớn trong tương lai.

Những từ chú giải: *Phương thức canh tác hữu cơ, phương thức canh tác môi trường lợi khuẩn, phương pháp sản xuất phân hữu cơ nhiệt độ cao, Streptomycests spp., Bacillus spp., Lactobacillus spp.*

Người dịch: KS. Phan Đình Cương.
Người phản biện: GS.TS. Nguyễn Thơ.

I. GIỚI THIỆU

Phương thức canh tác hữu cơ đã được khuyến khích trên nhiều quốc gia như: Châu Âu, Mỹ, Nhật Bản và Việt Nam. Ủy ban Châu Âu phát động phương thức canh tác hữu cơ thật sinh động như sau: Đó là một phương pháp sản xuất nông nghiệp khuyến khích việc sử dụng những chất bằng phương pháp chế biến tự nhiên để sản xuất thực phẩm nhằm hạn chế sự tác động đến môi trường: Có trách nhiệm hơn trong việc sử dụng năng lượng và nguồn tài nguyên thiên nhiên; duy trì sự đa dạng hóa sinh học; bảo vệ sự cân bằng sinh học tại địa phương; làm gia tăng độ màu mỡ phì nhiêu của đất đai. Phương thức này nhất thiết yêu cầu phải bao gồm tất cả những kỹ thuật và công nghệ nông nghiệp mới và cũ để giúp các biện pháp canh tác này được hiệu quả. Thực hiện các biện pháp canh tác hữu cơ tốt cũng có những khó khăn lớn như việc phòng trừ sâu hại mà không cần dùng hóa chất, cung cấp chất dinh dưỡng cho cây trồng mà không cần dùng phân bón hóa học, kiểm soát được hạt giống cây trồng mà không cần việc lai tạo chọn lọc giống. Tuy vậy, những khó khăn này, chúng ta phải tìm kiếm những giải pháp cho nền nông nghiệp phát triển bền vững của Việt Nam và Nhật Bản. Thật là vinh dự cho tôi trong việc soạn thảo tập tài liệu này với sự giúp đỡ của GS.TS. Nguyễn Thơ về áp dụng phương thức nông nghiệp môi trường lợi khuẩn cho canh tác nông nghiệp hữu cơ tại Việt Nam. Vì khoa học và công nghệ của phương thức canh tác hữu cơ này là kỹ thuật còn non trẻ cho nền nông nghiệp bền vững, do vậy chúng ta cần phải tiến hành nhiều thực nghiệm lập đi lập lại nhiều lần, có nhiều thành công cả những thất bại để tìm ra những biện pháp canh tác hiệu quả nhất. Cá nhân tôi đã trải qua nhiều kinh nghiệm trong nền nông nghiệp môi trường lợi khuẩn đã làm gia tăng năng suất cây trồng và đã sử dụng những loại phân hữu cơ chất lượng cao được chế biến bằng phương pháp ủ phân mới từ nhiều loại chất thải hữu cơ khác nhau. Phân bón hữu cơ chất lượng cao phải chứa nhiều chất dinh dưỡng để thay thế phân bón hóa học, và có nhiều vi sinh vật có ích để thay thế thuốc trừ sâu. Nền nông nghiệp môi trường lợi khuẩn cũng đẩy mạnh việc sử dụng các vi khuẩn có ích của nhiều loài đơn độc nó có khả năng kích thích sự sinh trưởng của cây trồng và kiềm hãm những loại vi khuẩn, nấm mốc, tuyến trùng và các loại côn trùng độc hại. Ở Nhật Bản đã áp dụng công nghệ chế biến phân hữu cơ ở nhiệt độ cao trong chế biến bùn thải sinh hoạt và rác thải để sản xuất tập đoàn vi khuẩn có lợi được gọi là vi khuẩn có ích. Vi khuẩn có ích tích lũy trong trong phân bón hữu cơ, khi được bón vào đất trồng, chúng bảo vệ cây trồng như: rau, cây ăn quả khỏi sự tấn công của nấm, vi khuẩn, tuyến trùng và côn trùng độc hại tấn công. So sánh việc sử dụng tập đoàn vi khuẩn có ích trên đồng ruộng để cải thiện độ màu mỡ của đất mà không cần phân bón hóa học với một cách sử dụng khác là áp dụng lợi khuẩn của một loại vi khuẩn có ích đơn độc như *Lactobacillus species hay Bacillus species* trên rau và cây ăn quả bằng phương pháp phun trên lá hay phun vào gốc và rễ cây. Cách sản xuất qui mô

thương mại tập thể những loài vi khuẩn có ích là công nghệ quan trọng. Ngay cả việc sản xuất thương mại các loại vi khuẩn có ích đơn lẻ cũng là công nghệ quan trọng khác.

Bài viết này cung cấp những quan điểm và vai trò của vi khuẩn, nấm, tuyến trùng và côn trùng có hại có liên quan trong môi trường sản xuất nông nghiệp và nhóm vi khuẩn nào là vi khuẩn có lợi cho việc quản lý sử dụng tốt đất canh tác để sản xuất những loại thực phẩm an toàn, và chống lại những loại vi khuẩn, nấm mốc, tuyến trùng, côn trùng có hại.

II. VI KHUẨN TRONG TỰ NHIÊN VÀ NHỮNG LỢI KHUẨN CHO SỨC KHỎE CON NGƯỜI

2.1. Vi khuẩn trong tự nhiên

Có rất nhiều loại vi sinh vật được tìm thấy trên mặt đất. Vi sinh vật bao gồm: vi khuẩn, sinh vật đơn bào, nấm mốc, tuyến trùng và virus. Trong bài viết này, chúng tôi chỉ quan tâm chủ yếu về những loại vi sinh vật có liên quan đến sức khỏe con người và sản xuất nông nghiệp. Những loài đã biết đến của vi khuẩn và vi sinh vật đơn bào cùng sống trong hệ thống tiêu hóa của con người, nhưng hầu hết các loại nấm, tuyến trùng, virus là tác nhân gây bệnh cho con người cũng như cho cây trồng.

Bảng 1 cho biết những thông tin về phân loại ngành và số lượng chủng loại vi khuẩn trong tự nhiên (1). Đặc tính vi sinh vật trong đất tạo nên một hệ thống sinh thái rất phức tạp tùy thuộc vào điều kiện phi sinh vật và sự hiện diện của chất hữu cơ trong đất. Chúng luôn luôn cạnh tranh nhau với nhau và phát triển theo xu hướng ổn định. Tuy nhiên, những hoạt động trong sản xuất nông nghiệp luôn tạo ra một hệ sinh thái mới trong đất trồng nơi đang xảy ra sự cạnh mới giữa các loài sinh vật với nhau. Trong những loại sinh vật này, sự kiểm soát của vi khuẩn dễ thực hiện hơn việc kiểm soát các loại nấm, tuyến trùng và sâu hại. Phương thức canh tác hữu cơ luôn luôn đặt nặng biện pháp luân canh, tránh việc trồng liên tục một loại hoa màu nhằm để tránh việc tích lũy những sinh vật có hại trong đất canh tác.

Bảng 1. Ngành vi khuẩn và nhiều loài vi khuẩn được xác định trong tự nhiên

	Số loài được xác định
1 Acidobacteria	4
2 Actinobacteria	*2000*
3 Aquificae	22
4 Armatimonadetes	3
5 Bacteroidetes	*500*
6 Caldiserica	1
7 Chlamydiae	17
8 Chlorobi	17
9 Chloroflexi	45

	Số loài được xác định
10 Chrysiogenetes	4
11 Coprothermobacterota	45
12 Cyanobacteria	*2654*
13 Deferribacteres	14
14 Deinococcus-Thermus	45
15 Dictyoglomi	2
16 Elusimicrobia	1
17 Fibrobacteres	2
18 Firmicutes	*2000*
19 Fusobacteria	37
20 Gemmatimonadetes	1
21 Lentisphaerae	4
22 Nitrospirae	11
23 Planctomycetes	12
24 Proteobacteria	*3000*
25 Spirochaetes	94
26 Synergistetes	23
27 Tenericutes	8
28 Thermodesulfobacteria	8
29 Thermotogae	30
30 Verrucomicrobia	41
	Tổng cộng: 10558

Theo những khám phá mới của loài vi khuẩn và những tài liệu xuất bản mới về loài vi khuẩn bằng cách xác định bộ gen, thì số lượng ngành và loài của vi khuẩn đang gia tăng. Những vi khuẩn này được tìm thấy ở trong môi trường đất và nước trong tự nhiên. Trong số chúng có 2 loài vi khuẩn *Actinobacteria, 5 loài Bacteroidetes, 12 loài Cyanobacteria, 18 loài Firmicutes và 24 loài Proteobacteria* là những nhóm vi khuẩn chủ yếu tập hợp nhiều loài đang hoạt động cho các chu kỳ môi trường các phân tử trên mặt đất.

Khi chúng tôi tập trung nghiên cứu loại vi khuẩn trong hệ thống đường ruột của con người, mặt dầu hầu hết loại vi khuẩn cùng chung sống với con người, số lượng ngành vi khuẩn và các loài giảm một cách đáng kể được mô tả trong Bảng số 2. Những nhóm vi khuẩn chủ yếu có trong đường ruột là 2 loài *Actinobacteria,* 5 loài *Bacteroidetes,* 18 loài *Firmicutes,* và 24 loài *Proteobacteria.* Những vi khuẩn này giữ vai trò quan trong cùng chung sống trong ruột của con người (2).

2.2. Vi khuẩn trong ruột con người

Điều kiện trong ruột của con người thường là yếm khí và không bắt buộc, nơi này có một sự canh tranh đặc biệt giữa các loài vi khuẩn để sống sót. Cuối cùng những vi khuẩn này đi qua ruột và trở lại môi trường đất và nước. Ruột của con người là nơi cư trú tạm thời của vi khuẩn trong chu kỳ sinh sống trong tự nhiên và ở đây chỉ những loài vi khuẩn được chọn lọc đã có sự tăng gia số lượng đáng kể.

Bảng 2. Ngành, giống và những loài vi khuẩn có trong ruột con người

Phylum	Genus	Species
2 Actinobacteria	12	28
5 Bacteroidetes	9	53
14 Deinococcus-Ther	1	1
18 Firmicutes	47	168
19 Fusobacteria	2	8
20 Lentisphaerae	1	1
24 Proteobacteria	47	111
25 Spirochaetes	1	1
26 Synergistetes	2	2
27 Tenericutes	2	2
30 Verrucomicrobia	1	1
	Total 125	Total 376

Những vi khuẩn sống trong ruột con người cố gắng tìm kiếm chất dinh dưỡng, cạnh tranh với nhau nhưng lại sống hài hòa với nhau giữa các loài vi khuẩn và với ký chủ là con người.

Một khi có một hoặc một vài loài vi khuẩn sinh trưởng phát triển nhanh làm đảo lộn sự hài hòa của tập thể vi khuẩn trong đường ruột ký chủ, thì ký chủ bị bệnh. Để giữ điều kiện sống khỏe mạnh cho tập thể những vi khuẩn trong đường ruột, những loại thực phẩm lên men truyền thống được sử dụng ở nhiều quốc gia trên thế giới. Nhiều người cũng đã biết loại thực phẩm gì tốt cho sức khỏe. Họ đã phát triển nhiều loại thực phẩm lên men truyền thống. Trong những thực phẩm lên men truyền thống này, phổ biến nhất là yogurt, dưa món của Đức và dưa muối chua. Người Việt Nam đã phát triển một loại thự phẩm lên men bằng cá độc đáo như nước mắm, mắm tôm, mắm cá... những loại thực phẩm này được sản xuất bằng một loại lợi khuẩn được dùng trong lên men acid lactic. Lên men acid lactic được tiến hành bởi những loài vi khuẩn nhất định được mô tả trong Bảng 3, 4 và 5. Cả hai loài *Lactobacillaceae* và *Streptococcaceae* thuộc ngành *Firmicutes,* trong khi đó loài *Bifidobacteriaceae* thuộc ngành *Actinobacteria.*

Bảng 3. Loài Lactobacillus được xác định trong đường ruột con người: Loài Lactobacillus thuộc họ Lactobacillaceae, bộ Lactobacillales, lớp Bacilli, ngành Firmicutes

Họ Lactobacillaceae			
Chi *Lactobacillus*	*L. acidophilus*	*L. amylolyticus*	*L. amylovorus*
	L. antri	*L. brevis*	*L. buchneri*
	L. casei	*L. coleohominis*	*L. coryniformis subsp. coryniformis*
	L. crispatus	*L. delbrueckii subsp. bulgaricus*	*L. delbrueckii subsp. lactis*
	L. farciminis	*L. fermentum*	*L. fructivorans*
	L. gasseri	*L. helveticus*	*L. hilgardii*
	L. iners	*L. jensenii*	*L. johnsonii*
	L. kefiranofaciens subsp. kefiranofaciens	*L. oris*	*L. paracasei*
	L. plantarum	*L. reuteri*	*L. rhamnosus*
	L. ruminis	*L. salivarius*	*L. ultunensis*
	L. vaginalis		

Bảng 4. Vi khuẩn lên men acid Lactic trong ruột con người: Loài Carnobacteriaceae, Enterococcaceae và Leuconostocaceae thuộc họ Streptococcaceae, bộ Lactobacillales, lớp Bacilli, ngành Firmicutes

Họ Streptococcaceae			
Giống *Lactococcus*	*L. lactis subsp. cremoris*	*L. lactis subsp. lactis*	
Giống *Streptococcus*	*S. agalactiae*	*S. anginosus subsp. anginosus*	*S. anginosus subsp. whileyi*
	S. australis	*S. bovis*	*S. constellatus subsp. constellatus*
	S. constellatus subsp. pharyngis	*S. cristatus*	*S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae*
	S. dysgalactiae subsp. equisimilis	*S. equinus*	*S. gallolyticus subsp. gallolyticus*
	S. gallolyticus subsp. macedonicus	*S. gordonii*	*S. ictaluri*
	S. infantarius subsp. infantarius	*S. infantis*	*S. macacae*
	S. mitis	*S. mutans*	*S. oralis*
	S. parasanguinis	*S. parauberis*	*S. pasteurianus*
	S. peroris	*S. pneumoniae*	*S. porcinus*
	S. pseudopneumoniae	*S. pseudoporcinus*	*S. pyogenes*
	S. salivarius subsp. salivarius	*S. salivarius subsp. thermophilus*	*S. sanguinis*
	S. suis	*S. uberis*	*S. urinalis*
	S. vestibularis		

Bảng 5. Vi khuẩn lên men acid Latic trong ruột con người thuộc giống Bifidobacterium, họ Bifidobacteriaceae, bộ Bifidobacteriales, lớp Actinobacteria, ngành Actinobacteria

Bộ Bifidobacteriales			
Họ Bifidobacteriaceae			
Giống *Bifidobacterium*	*B. adolescentis*	*B. angulatum*	*B. animalis subsp. lactis*
	B. bifidum	*B. breve*	*B. catenulatum*
	B. dentium	*B. gallicum*	*B. longum subsp. infantis*
	B. longum subsp. longum	*B. pseudocatenulatum*	
Giống *Gardnerella*	*G. vaginalis*		

2.3. Cung cấp vi khuẩn lợi khuẩn cho con người

Thay vì con người dùng thực phẩm lên men acid Latic, người ta ăn hằng ngày những dòng đơn của vi khuẩn acid Lactic là cách phổ biến thường dùng rộng rãi ở nhiều quốc gia trong đó có Nhật Bản, các nước Châu Âu và Mỹ. Liều lượng sử dụng hàng ngày của những vi khuẩn tốt này được gọi là cung cấp vi khuẩn lợi khuẩn nó giúp ổn định tập đoàn vi khuẩn sống trong đường ruột cung cấp những điều kiện tiêu hóa tốt cho chính người đó. Sự tương tác giữa vi khuẩn trong đường ruột và chính người đó ngày nay được gọi là chiến lược khoa học về dược phẩm với danh từ chuyên môn gọi là hệ thống miễn nhiễm và hệ thống tiêu hóa khỏe mạnh. Sự phát triển sản xuất số lượng lớn loại vi khuẩn này rất nhanh với tên gọi là những loại thực phẩm kiểu mới với công nghệ lên men Acid Lactic trên nhiều quốc gia, tên loại thực phẩm mới này cũng được gọi là thực phẩm chức năng có những chức năng mới như miễn dịch (miễn nhiễm), tiêu hóa và còn có nhiều đặc tính tốt khác nữa.

III. VI KHUẨN TRONG NƯỚC THẢI, BÙN THẢI LÀM TIÊU HÓA VÀ HOẠT HÓA CHẤT MÙN THẢI

3.1. Vi khuẩn trong nước thải

Sau khi tiêu hóa thức ăn, con người thải ra phân và nước tiểu trong nước thải, trong nước thải này có hầu hết những nhóm vi khuẩn đường ruột sinh sống và được tìm thấy như: 2 loài *Actinobacteria,* 5 loài *Bacteroidetes,* 18 loài *Firmicutes,* và 24 loài *Proteobacteria.*

Có sự thay đổi đáng kể môi trường trong các hệ thống nước thải có chứa vi khuẩn đường ruột. Có sự giảm số lượng ngành vi khuẩn đường ruột, chứng tỏ môi trường của nước thải này không phù hợp với với số nhóm vi khuẩn trong đường ruột. Một điều thật thú vị khi thấy những nhóm vi khuẩn mới không tìm thấy trong đường ruột nhưng lại xuất hiện trong nước thải này như 1 Loài *Acidobacteria,* 9 Loài *Chloroflexi,* 12 Loài *Cyanobacteria* và 22 loài *Nitrospirae* được chỉ ra rõ trong Bảng 6 (3).

Bảng 6. Những ngành vi khuẩn chủ yếu được tìm thấy trong nước thải

Ngành	Số lượng loài được nhận diện
1 Acidobacteria	4
2 Actinobacteria	*2000*
5 Bacteroidetes	500
9 Chloroflexi	45
12 Cyanobacteria	*2654*
18 Firmicutes	*2500*
19 Fusobacteria	37
22 Nitrospirae	11
24 Proteobacteria	*3000*
Tổng cộng	**10 251**

3.2. Quá trình lên men metan

Trong các nhà máy xử lý nước thải, quá trình lên men metan, quá trình làm tiêu hóa chất bùn thải được diễn ra, ở đây một vài nhóm vi khuẩn và vi sinh đơn bào đóng vai trò rất quan trọng được mô tả trong Bảng 7 (4).

Quá trình làm tiêu hóa chất mùn thải diễn ra trong điều kiện yếm khí nghiêm ngặt để sản xuất ra chất metan và làm phân hủy chất hữu cơ. Vai trò của vi sinh vật rất đặc biệt để thích ứng với môi trường yếm khí bắt buộc này. Những loại vi sinh vật này được tìm thấy trong Bảng 7 và có sự giống nhau với những vi khuẩn trong đường ruột của con người mà nó ít chịu điều kiện yếm khí nghiêm khắc.

Bảng 7. Vi khuẩn metan và những vi sinh vật đơn bào có trong quá trình làm tiêu hóa chất mùn thải

1 Acidobacteria		
5 Bacteroidetes		
9 Chloroflexi		
18 Firmicutes		
23 Planctomycetes		Anaerolineaceae
24 Proteobacteria		Clostridiales
25 Spirochaetes		
26 Synergistetes		
Lãnh giới (vực):	Archaea	
Giới:	Euryarchaeota	
Ngành:	Euryarchaeota	
Bộ:	Methanomicrobia	
Lớp	Methanosarcinales	
Giống	Methanothrix	

3.3. Phân hữu cơ chất lượng cao

Đây là yếu tố chủ chốt trong phương thức canh tác nông nghiệp hữu cơ với phân bón hữu cơ chất lượng cao phải chứa đủ các dinh dưỡng cân đối, 3 chất dinh dưỡng đa lượng chủ yếu là đạm, lân và kali và sau đó là các chất dinh dưỡng trung lượng là Ca, Mg và Sulfur. Tùy thuộc vào nguồn nguyên liệu chất thải hữu cơ để chế biến phân bón này mà còn có các chất dinh dưỡng vi lượng khác có số lượng tốt hơn như Cl, Si, Fe, Zn. Cu, B, Mn, Ni và Mo. Những sản phẩm của nông nghiệp hữu cơ hấp dẫn người tiêu dùng bởi vì chúng có vị ngon hơn do sự đóng góp các chất dinh dưỡng cân đối của chất dinh dưỡng đa lượng và vi lượng có được trong phân hữu cơ được sử dụng. Nhờ sự hỗ trợ của phân hữu cơ chất lượng cao, phương thức canh tác nông nghiệp hữu cơ bền vững có thể thực hiện được. Phân bón hữu cơ chất lượng cao phải chứa thêm các chất dinh dưỡng vô cơ, những chất hữu cơ chính như chất mùn, chất có mùn và acid fulvic. Khi phương pháp ủ phân này chưa kỹ (chưa hoai), phân hữu cơ này còn chứa một số chất hữu cơ quan trọng khác. Cuối cùng, phân bón hữu cơ chất lượng cao còn phải chứa những vi khuẩn tốt có lợi cho sự sinh trưởng của cây trồng, bảo vệ cây trồng khỏi bị tấn công của các loại vi sinh vật xấu có hại khác. Thật thú vị khi chúng tôi lên men chất thải hữu cơ như rác thải, bùn thải, phân súc vật và những dư thừa thục vật, có nhiều loại vi khuẩn hiếu khí, và loại vi khuẩn tùy ứng (vừa yếm khí và hiếu khí) hoạt động cho sự lên men. Sau khi lên men, thành phẩm cuối cùng có chứa một lượng lớn các vi khuẩn còn sống và các bào tử của vi khuẩn hiếu khí và vi khuẩn tùy ứng này mà nó là thành phần của vi khuẩn tốt.

3.4. Hoạt hóa chất bùn thải - AS

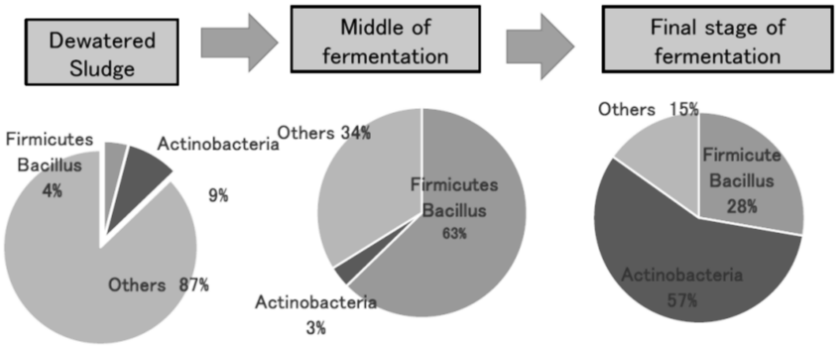
Nước thải được xử lý trong các nhà máy xử lý nước thải, ở đó người ta sử dụng phương pháp truyền thống để hoạt hóa bùn thải (AS). Phương pháp hoạt hóa bùn thải (AS) đã được sử dụng hàng trăm năm nay trên thế giới, đây là hạ tầng cơ sở về vấn đề vệ sinh chủ yếu cho con người. Phương pháp hoạt hóa bùn thải (AS) bao gồm vi sinh hiếu khí và yếm khí như vi khuẩn, vi sinh vật đơn bào, nấm và sinh vật nguyên sinh. Phương pháp hoạt hóa bùn thải (AS) hằng ngày nhận một lượng lớn vi khuẩn thải ra từ khu dân sinh được mô tả trong Bảng 6. Nó có khả năng phân hủy chất hữu cơ của phân người và nước tiểu, và nhiều loại hợp chất hữu cơ khác, bao gồm cả các chất carbohydrat, dầu ăn từ chế biến thực phẩm, chất protein, và các hóa chất dầu khí... Thành phần vi sinh của phương pháp hoạt hóa bùn thải (AS) thay đổi theo thành phần của nước thải và tùy thuộc vào các loại nước thải thải ra từ các thành phố. Khi có các loại nước thải công nghiệp thải ra thì chất lượng nước thải có thể thay đổi tùy theo thành phần của nước thải công nghiệp này. Sự thay đổ theo mùa của những dòng nước thải có thể xảy ra do lũ lụt. Vị trí các thành phố khác nhau cũng có sự thay đổi khác nhau, điều này có thể làm thay đổi thành phần nước thải do các loại thực phẩm tiêu thụ khác nhau. Tuy nhiên, những sự thay đổi và khác nhau này, thật thú vị khi thấy thành phần vi sinh của phương pháp hoạt hóa bùn thải (AS) nó vẫn giữ tập thể vi sinh vật chung và chủ yếu được mô tả như trong Bảng 8 (5).

Bảng 8. Cộng đồng vi khuẩn chính của sự hoạt hóa mùn thải trong nhà máy xử lý nước thải với những thành phần nước thải khác nhau

1	Acidobacteria
2	Actinobacteria
5	Bacteroidetes
9	Chloroflexi
16	Elusimicrobia
18	Firmicutes
20	Gemmatimonadetes
22	Nitrospirae
23	Planctomycetes
24	Proteobacteria
30	Verrucomicrobia

IV. VI KHUẨN TRONG PHÂN HỮU CƠ CHẾ BIẾN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHIỆT ĐỘ CAO

Khi chúng ta tiến hành quá trình lên men hiếu khí bùn thải bao gồm bùn thải lấy từ các bồn lắng lọc và bùn thải đã hoạt hóa đầy đủ, chúng ta có thể thấy một chuỗi sinh học của các loài vi khuẩn trong suốt quá trình lên men được mô tả trong Sơ đồ 1 (6) (7). Bùn thải đã làm khô nước có 2 loài *Actinobacteria* và 18 loài *Firmicutes* có số lượng tương đối nhỏ. Có nhiều kiểu loại vi khuẩn khác trong bùn nước thải. Giữa quá trình lên men khi nhiệt độ tăng lên trên 90^{o}C, 18 loài *Firmicutes*, giống *Bacillus* trở nên những loài chính với những vi khuẩn khác như loài chịu nhiệt cao như 14 loài *Deinococcus-Thermus,* và 29 loài *Thermotogae*. Sau giai đoạn nhiệt độ cao, nhiệt độ của quá trình ủ phân bắt đầu giảm thấp từ từ xuống nhiệt độ không khí bên ngoài, khi 2 loài *Actinobacteria* phân hủy những chất hữu cơ còn lại bao gồm những tế bào của cây trồng. Trong giai đoạn cuối cùng của quá trình ủ phân 2 loài *Actinobacteria* trở nên vi khuẩn chiếm đa số.



Ghi chú: - Dewatered Sludge: Bùn thải đã khử nước.
- Middle of Fermantation: giai đoạn giữa quá trình lên men (trong ủ phân).
- Final stage of fermentation: Giai đoạn cuối quá trình lên men.

Biểu đồ 1. Chuỗi sinh học của vi khuẩn tham gia quá trình lên men nhiệt độ cao của bùn nước thải

Phương pháp lên men này được gọi là phương pháp ủ phân nhiệt độ cao trong đó vi khuẩn hiếu khí tham gia hoạt động từ giai đoạn đầu đến giai đoạn cuối, sự phân

hủy tích cực dễ dàng phân hủy những chất như carbonhydrate, lipid và protein, tạo ra sức nóng nhiệt độ lên tới trên 90^{o}C tại trung tâm của ụ phân và thải ra hơi nước nóng ngoài không trung. Khi sư vận hành phương pháp này được kiểm soát tốt, nhiệt độ trong phần trung tâm ụ phân có lúc lên tới trên 100^{o}C, như vậy phương pháp này được gọi là quá trình ủ phân nhiệt độ cao (6) (7).

Những điều kiện sống của vi khuẩn thay đổi mạnh mẽ trong điều kiện ủ phân. Những loài vi khuẩn dị dưỡng đối mặt với những điều kiện sống khắc khe khốc liệt hơn. Trong khi những loài vi khuẩn hiếu khí này không thích hợp sống dưới điều kiện nhiệt cao và thiếu nước này.

Trong Bảng 9, 14 loài *Deinococcus-Thermus,* 27 loài *Tenericutes* và 29 loài *Thermotogae* thuộc ngành chứng tỏ rằng chúng là loại vi khuẩn chịu nhiệt cao và chịu nhiệt trung bình sống sót được trong những điều kiện ử phân nhiệt độ cao. Mặc đầu nhiệt độ cao và điều kiện hơi nước nóng tỏa ra nhưng không khí vẫn được cung cấp liên tục, thật ngạc nhiên có một vài vi khuẩn yếm khí vẫn được tìm thấy, điều này cho thấy rằng quá trình yếm khí cũng đang xảy ra, có lẽ trong môi trường vi mô của đống phân. Những sản phẩm cuối cùng của nhà máy ủ phân bón hữu cơ nhiệt độ cao đã phổ biến rỗng rãi ở Nhật Bản, đã nhận được uy tín cao từ những người nông dân đã áp dụng phương thức canh tác nông nghiệp hữu cơ. Những nguồn nguyên liệu chất thải hữu cơ là bùn nước thải, rác thải thành phố, rác thải từ các chợ bán thực phẩm và bùn thải từ các nhà máy chế biến thực phẩm công nghiệp....

Bảng 9. Những loại vi khuẩn chính trong phân hữu cơ chế biến từ bùn thải

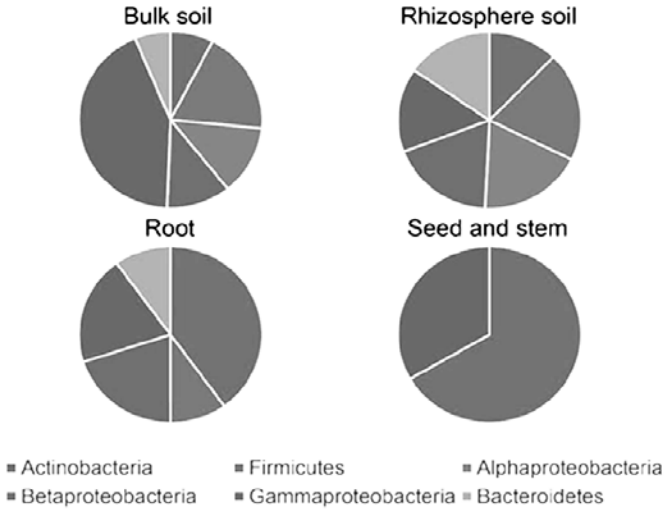
2 Actinobacteria	
5 Bacteroidetes	
9 Chloroflexi	
12 Cyanobacteria	
13 Deferribacteres	
14 Deinococcus-Thermus	
18 Firmicutes	Thermus thermophilus
22 Nitrospirae	
24 Proteobacteria	
25 Spirochaetes	
27 Tenericutes	
29 Thermotogae	
30 Verrucomicrobia	

V. VÙNG RỄ CÂY VÀ VI KHUẨN CỘNG SINH VỚI RỄ CÂY GIÚP KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG CÂY TRỒNG VÀ BẢO VỆ CÂY TRỒNG KHỎI TẤN CÔNG CỦA VI KHUẨN CÓ HẠI, NẤM MỐC VÀ TUYẾN TRÙNG

* Sinh trưởng cây trồng - vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng cây trồng (PGPR)

Vùng rễ cây (vùng đất chung quanh vùng rễ cây trồng) là một môi trường phức tạp nó hỗ trợ quần thể vi khuẩn rất phong phú cộng sinh trong rễ và sống chung quanh vùng rễ này, nó có một vai trò rất quan trọng trong chu trình sinh hóa của chất dinh dưỡng hữu cơ và chất khoáng. Cây trồng sinh trưởng nhờ quá trình quang tổng hợp cung cấp các chất carbohydrate, acid amino và những acid khác cho rễ cây qua các bô phận hút cuả lá cây, trong khi rễ cây tiết ra những chất hữu cơ cung cấp cho các vi khuẩn cộng

sinh với rễ cây và vi khuẩn sống vùng rễ cây. Những chất acid hữu cơ này được sử dụng để hòa tan những khoáng chất trong đất vùng chung quanh rễ cây. Chất khoáng và nước được di chuyển từ rễ cây lên lá cây qua các mạch. Kiến thức về sinh thái và vai trò của những vi khuẩn này sống ở vùng rễ cây vẫn còn thiếu, đặc biệt chú ý cách mà những vi khuẩn tại chỗ có thể giao tiếp, làm quen và cư trú được tại môi trường của rễ cây, và cạnh tranh cùng với những vi sinh vật tại chỗ. Lorena M. *et al.* quan sát kỹ vi khuẩn ở vùng rễ cây và đã khám phá một vai trò rất quan trọng trong chu kỳ biến đổi chất hữu cơ và chất hóa sinh của dinh dưỡng cây trồng (8). Một số lượng đáng kể các loài vi khuẩn có thể tương tác với cây trồng ký chủ và có thể có tác dụng có lợi cho sinh trưởng cây trồng, cung cấp chất chất dinh dưỡng và làm giảm áp lực sâu bệnh của cây trồng. Như vậy, nó cho ta biết những vi khuẩn này là loại vi khuẩn vùng rễ cây kích thích sự sinh trưởng cây trồng (PGPR). Trong số những chức năng chính của vi khuẩn vùng rễ là kích thích sinh trưởng cây trồng (PGPR) như: Sự cố định đạm sinh học, biện pháp phòng trừ sinh học ngăn ngừa các tác nhân gây bệnh cho cây trồng, cố định phosphate, tác nhân hòa tan các chất khoáng trong đất, sản xuất các hoạt chất sinh học cây trồng và các loại enzyme. Ngày nay, vi khuẩn vùng rễ cây kích thích sự sinh trưởng cây trồng (PGPR) còn đại diện cho những biện pháp thay thế cho phân bón hóa học như là các loại phân bón sinh học, các chất kích thích sinh học, chất cải tạo vùng rễ cây và cũng là tác nhân phòng trừ sinh học các loại bệnh hại trên cây trồng (9).



Ghi chú: - Bulk soil: Đất nằm ngoài vùng rễ cây.
- Rhizophere soil: Đất nằm trong vùng rễ cây.
- Root: bộ phận rễ cây.
- Seed and Stem: Bộ phận hạt và thân cây.
- *Actinobacteria, Firmicute, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Bacterioidetes:* Tên và tỉ lệ từng loài vi khuẩn được tìm thấy.

Biểu đồ 2. Theo tài liệu GenBank tiến hành phân loại mối quan hệ của 157 dòng vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng cây trồng (PGPR) có mối quan hệ đến điều kiện đất trồng (đất bên ngoài và đất vùng rễ cây) với các loại mô thực vật (rễ, hạt và thân cây) (9)

Thật là thú vị để tìm hiểu mối quan hệ giữa vi khuẩn và môi trường tại Biểu đồ 2, trong đó vi khuẩn vùng rễ kích thích sự sinh trưởng cây trồng (PGPR), vi khuẩn trong vùng đất bên ngoài vùng rễ cây và vi khuẩn trong mô tế bào cây trồng (rễ cây, hạt giống và thân cây) được tiến hành so sánh. Vai trò chính của vi khuẩn trong vùng đất bên ngoài phạm vi rễ cây trồng và trong vùng rễ cây giống nhau của các 2 loài *Actinobacteria,* 5 loài *Bacteroidetes*, 18 loài *Firmicutes* và 24 loài *Proteobacteria (Alpha - Beta - Gamma -).* Tuy nhiên, thành phần của chúng khác nhau. Vi khuẩn cộng sinh, ký sinh hay gây bệnh hại có liên quan vùng rễ cây trồng được tóm tắt trong Bảng 1 cho biết rằng 4 ngành vi khuẩn: 2 loài *Actinobacteria,* 5 loài *Bacteroidetes,*18 loài *Firmicutes,* and 24 loài P*roteobacteria* (Beta- và Gamma-). Ở hạt và thân cây có 2 ngành: 2 loài *Actinobacteria* và 24 loài P*roteobacteria* (Gamma-) cho đến ngày nay đã được tìm thấy.

Bảng 10. Sự cộng sinh, ký sinh hoặc là nguồn gây bệnh của vi khuẩn vùng rễ cây qua sự sản xuất ra chất kích thích sinh trưởng cây trồng và những chức năng của chúng

Ngành	Bộ/Giống		Chất kích sinh trưởng cây trồng	Chức năng
2 Actinobacteria	*Actinomycetaceae*		AA, GB, CK,	Trừ nấm
5 Bacteroidetes	*Flabobacterium*		IAA	Nguồn gây bệnh hại cây
18 Firmicutes	*Bacillus*	*B.thuringiensis*		Trừ sâu hại
		B.subtilis	CK, GB, ABA	Trừ sâu hại
24 Proteobacteria	*Agrobacterim*		IAA	Ký sinh
alpha-	*Bradyrhizobium*		IAA	Cố định đạm ở đậu nành
	Rhizobium		IAA	Cố định đạm
	Azospirillum		IAA, GB, GK	Cố định đạm
24 Proteobacteria	*Alcaligines*		IAA	Khử nitơ
beta-	*Xanthomonas*			Gây bệnh hại cây trồng
24 Proteobacteria	*Azotobactor*		IAA	Cố định đạm
gamma-	*Enterobactor*		IAA	Gây bệnh cho người
	Erwinia		IAA	Gây bệnh cho người
	Hafnia			Gây bệnh cho người
	Klebsiella		IAA	Gây bệnh cho người
	Pseudomonas	*P. fluorescens*	IAA, GB, CK	Gây bệnh cho cây trồng, Cơ hội cho con người
	Serratia		IAA	Gây bệnh cho người

VI. CHẤT KÍCH THÍCH TĂNG TRƯỞNG CHO CÂY VÀ NHỮNG CHỨC NĂNG CỦA VI KHUẨN VÙNG RỄ CÂY

6.1. Chất kích thích thực vật

Cây trồng chịu nhiều tác động bất lợi từ các yếu tố phi sinh vật như: khô hạn, nhiệt độ quá cao, bị nhiễm mặn, bị ngộ độc những kim loại nặng. Những tác động bất lợi từ các yếu tố phi sinh vật có những tác hại về sinh lý và hình thái cây trồng thông qua tác động làm sai lệnh những cấu trúc di truyền của các chuỗi phản ứng hóa học của tế bào. Cây trồng sử dụng nhiều cơ chế chống chịu và dùng chuỗi phản ứng hóa học để ngăn chặn những tác động của điều kiện bất lợi làm tác động khi có bất cứ sự thay đổi nào làm tác động ảnh hưởng sự trao đổi chất của cây trồng. Những chất kích thích thực vật là những chất điều tiết sinh trưởng quan trọng nhất; chúng được biết đến có tác động nổi trội lên qúa trình biến dưỡng của cây trồng, và hơn nữa, chúng đóng một vai trò quan trọng trong việc kích thích cơ chế phản ứng bảo vệ những tác động khắc nghiệt của môi trường (10). Sự bổ sung những chất kích thích thực vật ngoại sinh đã được công nhận là chất cải thiện sinh trưởng và quá trình biến dưỡng của cây trồng trong điều kiện có tác động căng thẳng khắc nghiệt của những điều kiện môi trường chung quanh. Chất kích thích tăng trưởng là những chất kích thích thực vật quan trọng, và chất kích thích thực vật indole-3-acetic acid (IAA) đã được chứng minh thúc đẩy nhiều giai đoạn sinh trưởng và phát triển của cây trồng như sự phân chia tế bào, sự kéo dài và sự phân hóa của tế bào. Chất Cytokinins (CK) là một nhóm quan trọng của các chất kích thích thực vật đóng vai trò trong việc duy trì gìn giữ sinh trưởng và quan phân hóa của tế bào và ngăn cản sự già nua, do vậy nó có tác dụng làm chậm quá trình gìa của lá cây. Chất Abscisic Acid (ABA) được biết đến nó giữ một vai trò quan trọng trong việc cải thiện và chịu đựng của cây trồng đối với các tác động khắc nghiệt căng thẳng của môi trường chung quanh. Sự xuất hiện tự nhiên chất sesquiterpenoid là nhóm chất kích thích thực vật quan trọng tham gia vào quá trình điều tiết sinh trưởng. Chất gibberellin (GB) có một vai trò rất quan trọng trong giai đoạn hạt giống ngủ để kích thích hình thành cơ quan của hoa, kích thích sinh trưởng những những chòi mọc ngang. Chất salicylic acid cũng là một chất kích thích thực vật quan trọng khác với nhân phenolic thiên nhiên nó giữ chức năng quan trọng làm cây trồng có khả năng chống chịu nhũng điều kiện khắc nghiệt qua sự điều biến hoạt động của enzym antioxidative.

6.2. Vi khuẩn sản xuất ra những chất kích thích thực vật

Vi khuẩn tổng hợp một lượng nhỏ những chất kích thích thực vật này và cung cấp cho cây trồng để cải thiện nâng cao tính chống chịu và sinh trưởng của cây trồng để chịu đựng với những điều kiện khắc nghiệt của môi trường chung quanh như nhiễm mặn, nhiệt độ cao, khô hạn và nhiễm độc những kim loại nặng. Có nhiều vi khuẩn vùng rễ cây trồng chúng có khả năng cung cấp những chất kích thích thực vật được mô tả trong Bảng 10. Vi khuẩn vùng rễ cây trồng nói chung thường là cộng sinh hay hội sinh với cây trồng, nó cung cấp chất đạm hoặc các chất kích thích sinh trưởng thực vật cho cây trồng và giúp chống lại sự tấn công nấm bệnh và tuyến trùng. Trong khi đó mốt số vi khuẩn này là nguồn bệnh cho

con người hoặc cơ hội bị nhiễm bệnh, loài vi khuẩn là lợi khuẩn cho con người như *Lactobacillus* spp. có chức năng chống lại những vi khuẩn vùng rễ cây trồng này. Do vậy, rau tươi đóng vai trò quan trọng trong cuộc sống khỏe của con người nhưng phải được đun nấu kỹ trước khi dùng để đảm bảo vệ sinh và sức khỏe.

VII. NẤM LÀ NHỮNG VI SINH VẬT SỐNG RẤT KHỎE TRONG MÔI TRƯỜNG; MỘT SỐ LOẠI NẤM CÓ LỢI NHƯNG MỘT SỐ LOẠI NẤM LẠI GÂY ĐỘC HẠI CHO CON NGƯỜI VÀ CÂY TRỒNG

7.1. Loại nấm có lợi và loại nấm độc hại

Nấm là loại vi sinh vật rất mạnh như các loại vi khuẩn, nó cạnh tranh với nhau trong nhiều hệ sinh thái trên mặt đất. Đôi khi chúng hợp tác hoạt động cùng nhau trong quá trình lên men để sản xuất rượu, tương Miso (Nhật)... Nhưng hầu hết các trường hợp nó chiến đấu với nhau, việc này cho ta biết những kiến thức hữu ích để phòng trừ các loại nấm bằng loại vi khuẩn có ích. Các loài nấm là thành viên của nhóm sinh vật có nhân, nó bao gồm những sinh vật như men, mốc, cũng như những loại nấm phổ biến (11). Những sinh vật này được cùng xếp vào Giới, và nó được tách ra khỏi Giới động thực vật có nhân khác. Nấm là sinh vật dị dưỡng; nó lấy thức ăn bằng cách hấp thu các phân tử hòa tan điển hình nhất là phương pháp chúng tiết ra những men tiêu hóa vào môi trường của chúng. Nấm thực hiện vai trò quan trọng trong phân hủy chất hữu cơ và có vai trò cơ bản trong chu trình dinh dưỡng và trao đổi với môi trường bên ngoài. Chúng được dùng làm nguồn thực phẩm cho con người trong thời gian dài, dưới dạng sản phẩm thương mại là nấm rơm và nấm cục, men làm bột nở cho bánh mì; và trong quá trình lên men rượu của nhiều loại thực phẩm khác nhau như: rượu vang, bia, nước tương. Chúng có được phân loại xếp vào 9 giới phụ và 14 ngành bao gồm nấm được mô tả trong Bảng 11. Trong khi đó một số ngành của nấm là cộng sinh với những cây thân gỗ, một số khác là loại ký sinh với cây trồng gây nên những thiệt hại đáng kể trong ngành nông nghiệp.

Bảng 11. Nấm, những giới phụ và ngành quan trọng cho nông nghiệp

Những giới phụ	Ngành
1 *Rozellomyceta*	
	1 *Rozellomycota*
	2 *Microsporidia*
2 *Aphelidiomyceta*	
	3 *Aphelidiomycota*
3 *Chytridiomyceta*	
	4 *Neocallimastigomycota*
4 *Chytridiomycota*	
5 *Blastocladiomyceta*	
	5 *Blastocladiomycota*
6 *Zoopagomyceta*	
	6 *Basidiobolomycota*
	7 *Entomophthoromycota*
	8 *Kickxellomycota*
7 *Mortierellomycota*	
8 *Mucoromyceta*	
	9 *Calcarisporiellomycota*
	10 *Mucoromycota*
9 *Symbiomycota*	
	11 *Glomeromycota*
	12 *Entorrhizomycota*
	13 *Basidiomycota*
	14 *Ascomycota*

7.2. Sự cộng sinh

Sự cộng sinh là sự cộng tác cộng sinh cùng có lợi giữa nấm và các loại cây trồng

thân gỗ (12). Thuật ngữ cộng sinh nói về vai trò của nấm trong vùng rễ của cây trồng, hay hệ thống rễ cây trồng. Sự cộng sinh đóng một vai trò quan trọng trong dinh dưỡng cây trồng, sinh học đất đai và hóa học đất đai. Sự hợp tác đôi khi là sự phụ thuộc lẫn nhau. Một số loài đặc biệt hoặc một số trường hợp cộng sinh cụ thể nào đó có thể có sự hợp tác ký sinh với cây ký chủ. Cây cộng sinh thường có tính chống chịu cao hơn với sâu bệnh hại, như một số trường hợp gây bệnh từ nguồn vi sinh gây bệnh có nguồn gốc trong đất trồng. Những sự cộng sinh này đã được phát hiện giúp cây trồng có tính phòng ngự bảo vệ những bộ phận trên không và dưới mặt đất. Sự cộng sinh trong cây trồng đã được phát hiện, nó tiết ra các chất enzym có độc tính đối với vi sinh vật gây bệnh hại có nguồn gốc từ trong đất trồng như tuyến trùng. Có ít nhất 1060 loài nấm tham gia cộng sinh được biết đến như nhóm Zygomycota, thuộc ngành 8 loài *Kickxellomycota,* 9 loài *Calcarisporiellomycota,* 10 loài *Mucoromycota,* 13 loài *Basidiomycota,* 14 loài *Ascomycota,...*

Hầu hết các loài nấm là loại hoại sinh và không là nguồn gây bệnh cho cây trồng, động vật và con người (13). Tuy nhiên, nhiều loài nấm là nguồn bệnh thực vật cũng như gây bệnh cho con người (ví dụ: làm nhiễm trùng, gây dị ứng..). Chúng sản xuất ra chất độc làm ảnh hưởng đến cây trồng, động vật và con người. Trong đó có các loài nấm như *Aspergillus, Fusarium* và giống *Alternaria* của 14 loài *Ascomycota* và mucor của 10 loài *Mucoromycota* trở thành nhóm gây nguồn bệnh cho con người. Những loại nấm xuất hiện là mối đe dọa chung cho cả sản xuất nông nghiệp và sức khỏe con người. Nói chung, có một số ít loài nấm này có thể gây thiệt hại kinh tế đáng kể cho nông nghiệp, làm tổn hao một lượng thực phẩm tiêu dùng đáng kể của con người và trường hợp trầm trọng hơn gây nên những dịch bệnh chết người và gia súc.

7.3. Bệnh phấn trắng, bệnh mốc sương và bệnh héo rũ

Bệnh phấn trắng là bệnh do nấm gây hại trên hơn 7.600 loại cây trồng trên toàn cầu (14)(15). Bệnh phấn trắng do nhiều loài nấm gây ra. Trong đó, loài gây hại phổ biến nhất cho bệnh phấn trắng này thuộc họ Erysiphaceae. loài *Erysiphaceae* này là loại ký sinh bắt buộc. Trong họ này, loài *Podosphaera fuliginea, P. xanthii* được tìm thấy phổ biến nhất, nó thuộc giống *Podosphaera*, họ Podosphaera, bộ Erysiphales, lớp Leotiomycetes, ngành 14 loài Ascomycota.

Bệnh phấn trắng là bệnh trên cây trồng dễ phát hiện hơn, vì triệu chứng của chúng rất rõ ràng. Cây bị nhiễm bệnh biểu hiện có nhiều bột trắng trên lá và trên thân. Những lá nằm bên dưới thường bị ảnh hưởng năng nhất, nhưng bệnh phấn trắng có thể xuất hiện trên bất cứ phần nào của cây trên mặt đất. Bệnh phấn trắng phát triển nhanh ở trong môi trường có độ ẩm cao và nhiệt độ trung bình. Trong nhà kính có điều kiện ẩm độ và nhiệt độ lý tưởng cho việc lây lan của bệnh. Việc này làm thiệt hại đến biện pháp canh tác nông nghiệp và nghề làm vườn nơi mà bệnh phấn trắng phát triển mạnh trong điều kiện của nhà kính. Trong điều kiện canh tác nông nghiệp và làm vườn, bệnh hại có thể được kiểm soát bằng những phương pháp hóa học, hữu cơ sinh học và dùng những gene kháng. Cùng với bệnh phấn trắng, còn có nhiều loại bệnh nấm điển hình

khác như bệnh héo rũ *Furasium*, bệnh gỉ sét trên lá cây, bệnh rụi cây, thối rễ cây, chết rụi, bệnh héo rũ.... Bảng 12: Ngành *Ascomycota* có nhiều lớp và giống, loài nấm gây hại cho sản xuất nông nghiệp và gây bệnh cho con người.

Bàng 12. Ngành Ascomycota có nhiều lớp và giống, loài nấm nó gây hại cho cây trồng nông nghiệp và gây bệnh cho con người có triệu chứng như héo rũ, chết rụi, phấn trắng, thối rễ và héo rũ

Dothideomycetes		
	Cladosporium spp.	*Fusarium* spp. (Fusarium wilt disease)
Sordariomycetes		
	Magnaporthe spp.	*Thielaviopsis* spp. (canker rot, black root rot, Thielaviopsis root rot)
Leotiomycetes		
	Botrytis spp.	*Magnaporthe grisea* (rice blast)
	Verticillium spp.	*Sclerotinia sclerotiorum* (cottony rot)
Basidiomycota		
	Pucciniomycetes	
	Puccinia spp.	severe rusts of cereals and grasses rusts

Phylum	Class	Genus	Disease
Ascomycota			
	Dothideomycetes	Cladosporium spp.	Fusarium spp. (Fusarium wilt and damping-off disease)
		Alternaria spp.	Plant diseade, Early blight, Damping-off
			Human disease(allergens AIDS opportunistic)
	Sordariomycetes	Magnaporthe spp.	Rice rotten neck, rice seedling blight, blast, and Johnson spot,
			blast of rice, oval leaf spot of
			graminea, pitting disease, ryegrass
		Thielaviopsis spp.	
			Many vegetables and cotton, canker rot, black root rot,
			Thielaviopsis root rot
		Cryphonectria	
		parasitica	
		Glomerella cingulata	Anthracnose(Canker). fruit rotting diseases
			strawberry
	Incertae sedis	Verticillium spp.	Chesnut blight
			verticillium wilt disease
			300 different cultivated plants infected,
			potato,maples, elms, aspen, ash, beech, catalpa, oak,
	Leotiomycetes	Botrytis spp.	
		Sclerotinia	Wine grapes and other plants infected,Damping-off
		sclerotiorum	408 plant species infected
		Podosphaera fuliginea	producing an abundance of mycelium and sclerotia
		P. xanthii	
		Erysiphaceae	Powdery mildew
		Pucciniomycetes	
		Puccinia spp.	
		Phakospora pachyrhiz	Powdery mildew
	Basidiomycota	Ceratobasidiaceae	Severe rusts of cereals and grasses
		Rhizoctonia solani	Soybean rust
			brown patch (a turfgrass disease)
			damping off (e.g. in soybean seedlings)
			black scurf of potatoes,
			bare patch of cereals,
			root rot of sugar beet,
			belly rot of cucumber
			sheath blight of rice

Trong thời gian qua những loại vi sinh vật khác được tìm thấy thuộc giới Nấm, nhưng ngày nay chúng được xếp loại thuộc giới Chromista. Loài Oomycota thuộc giới này cũng gây nên thiệt hại đáng kể trên cây trồng nông nghiệp, được chỉ rõ trong Bảng 13.

Bảng 13. Vi sinh vật Oomycota gây hại nặng trên cây trồng nông nghiệp, có những triệu chứng như bệnh héo rũ, bệnh héo rụi cây và bệnh phấn trắng

Kingdom:	Chromista	
Phylum:	Oomycota	
Order:	Peronosporales	
Family:	Peronosporaceae	
Genus:	Phytophthora	
Species	Phytophthora	
	Phytopthora infestans	The plant-destroyer (water molds),
		Damping-off,Late blight,Downy mildew
		avocado and pineapple,
Family:	Peronosporaceae	
Genus:	Plasmopara	
Species:	P. viticola	Downy mildew,grapevines
Family:	Pythiaceae	
Genus:	Pythium	
	P.spp.	Damping-off

VIII. SỰ CẠNH TRANH GIỮA VI KHUẨN, NẤM, SÂU HẠI VÀ TUYẾN TRÙNG TRÊN CÂY TRỒNG XÂY DỰNG NÊN MỐI QUAN HỆ PHỤ THUỘC LẪN NHAU

Trong những nội dung trước, chúng tôi đã thảo luận về vi khuẩn tốt, nó có thể xây dựng nên những mối quan hệ phụ thuộc lẫn nhau với cây ký chủ và những vi khuẩn gây hại nó tấn công gây hại cây ký chủ, và nhiều vi khuẩn cơ hội nó có nhiều chức năng có ý nghĩa với cây ký chủ. Câu chuyện tương tự này có thể áp dụng trên nấm, nấm có lợi, nấm có hại và loại cơ hội. Tuy nhiên, loại nấm có lợi thì số lượng còn ít để giúp việc canh tác cây rau màu và cây ăn quả.

Ngay cả khi ta biết loại nấm này có lợi, nhưng nó khó được đưa vào áp dụng rộng rãi trong thị trường. Để làm cho đất đai thêm màu mỡ phì nhiêu, phương thức canh tác môi trường lợi khuẩn phải có chiến lược kiểm soát được vi sinh vật. Chiến lược của chúng tôi là vi khuẩn có lợi phải chiếm đa số vi khuẩn có hại bằng cách chọn lọc vi khuẩn có lợi và cung cấp nó cho cây trồng qua biện pháp áp dụng phun trên lá hay phun vào rễ cây trồng.

Có một kết quả so sánh rất thú vị giữa việc bón phân hóa học và hữu cơ có chứa vi sinh vật vào đất trồng kết quả ở Bảng 14 (16).

Chúng tôi kiểm tra sự thay đổi vi sinh với hai công thức bón phân hóa học và

phân hữu cơ trong thời gian hơn 4 năm. Chúng tôi chuẩn bị 2 lô đất trống nghèo dinh dưỡng để làm thử nghiệm. Chúng tôi bón mỗi đợt 270 kg phân hữu cơ khô trên diện tích 10 ha trong 2 năm liên tục. Chúng tôi thấy rằng có sự gia tăng đáng kể số lượng 2 loài *Actinobacteria* trong đất có bón phân hữu cơ, trong khi số lượng loài nấm dạng khuẩn ty xuất hiện hầu như giống nhau trong đất có bón cả phân hóa học và phân hữu. Tổng số lượng vi khuẩn hiếu khí và yếm khí bằng nhau, trong khi sự phân hủy chất xơ gia tăng do sự gia tăng của vi khuẩn *Actinobacteria* spp. Do vậy, việc sử dụng phân hữu cơ có ý nghĩa rất quan trọng nó đã làm gia tăng loại vi khuẩn *Actinobacteria* spp. trong đất.

Bảng 14. So sánh chỉ tiêu lượng vi sinh trong đất giữa biện pháp sử dụng phân bón hóa học và phân hữu cơ

Fertilizer		1954	1955	1955	1956
		Oct.22	May. 23	Aug. 4	May. 17
	No. /g dry soil				
Chemical fertilizer	Aerobic bacteria (x10^6)	42.4	12.5	12.2	10.6
application	Annaerobic bacteria (x10^6)	1.07	1.45	1.42	1.56
	Actinobacteria (x10^6)	2.8	1.3	2.01	0.46
	Fungi (x10^4)	18.5	9.3	8	4.3
	Cellulose decomposer(x1)	394	160	9,060	26
	Denitrifying bacteria(x1)	–	479	20,000	3,576
	Nitrite oxidizing bacteria(x1)	–	160	4,700	
Compost application	Aerobic bacteria (x10^6)	41.4	16.1	14	11
	Annaerobic bacteria (x10^6)	1.13	1.66	1.22	1.03
	Actinobacteria (x10^6)	4.4	2.5	3.25	2.28
	Fungi (x10^4)	26.2	15	7.4	5.3
	Cellulose decomposer(x1)	1,270	12,690	3,700	4,762
	Denitrifying bacteria(x1)	–	2,345	29,000	5,442
	Nitrite oxidizing bacteria(x1)	–	12,690	21,200	
	Started from bare land				
	Twice applied compost each with 270kgdry/10a, May 10,1954, and May 23.1955				

Loại *Actinobacteria:*

Actinobacteria trở thành cộng sinh với cây ký chủ nó đã tạo nên vật cản trở chống lại sự xâm chiếm của nấm bệnh vào cây trồng. Loài *Actinobacteria* spp. được biết đến như một tác nhân sản suất ra nhiều loại chất kháng sinh. Những chất kháng sinh này chống lại nấm bệnh và tuyến trùng nhờ enzym chitinases (17) (18). Enzym chitinases của vi khuẩn *Actinobacteria* spp. làm tan vỡ vách tế bào của nấm và tuyến trùng chứng minh qua việc tấn công trực tiếp vi khuẩn và bất cứ nấm bệnh nào hay bất cứ loại tuyến trùng gây nốt sần rễ cây (19)(20).

Loại vi khuẩn *Streptomycests* spp. của 2 loài *Actinobacteria* có thể trừ nấm bệnh *Altenaria brassiscicola* của hệ *Ascomycota* và cả tuyến trùng gây nốt sần trên rễ cây.

Tuyến trùng gây nốt sần trên rễ cây là vật ký sinh trên cây trồng và thuộc giống *Meloidogyne,* họ Meloidogynidae, bộ Tylenchida, lớp Secernentea, ngành Nematoda.

Giới *Animalia*

Được nhận dạng là loài *Meloidogyne hapla, Meloidogyne incognita, Meloidogyne enterolobii syn. M. mayaguensis.* Chúng thường sinh trưởng và phát triển trong đất ở những vùng khí hậu nóng và có mùa đông ngắn. Trên toàn thế giới có khoảng 2000 loại cây trồng bị mẫn cảm với sự gây bệnh từ tuyến trùng gây nốt sần rễ này và nó gây ra sự thiệt hại khoảng 5% sản lượng hoa màu trên thế giới (21). Sâu non của tuyến trùng gây bệnh nốt sần tấn công vào rễ cây, kích thich sự phát triển của nốt sần nó hút hết những sản phẩm của quá trình quang hợp và chất dinh dưỡng của cây trồng.

Sự phát triển của thuốc trừ sâu sinh học vi sinh mang lại rất nhiều triển vọng như: loài *Bacillus* nó có khả năng phòng trừ được sâu bệnh và một số loài nấm bệnh như: *Glomerella cingulata* của *Ascomycota* trên cây quít. *Bacillus thuringiensis* được biết đến nhiều là loại phòng trừ sâu bệnh hiệu quả và được kinh doanh rộng rãi trên thị trường. Tuy nhiên chúng ta nên biết rằng *Bacillus anthracis* nó chỉ là nguồn bệnh hại trong giống *Bacillus* và giết hại động vật và con người như là một vũ khí sinh học.

Bacillus subtilis sản xuất ra những chất có khả năng khuếch tán để ngăn càn những nguồn bệnh do nấm gây ra. Đó là những chất kháng nấm được tìm thấy và xác định bởi M. Shoda đó là chất iturin và surfactin (22).

Bacillus subtilis có thể phòng trừ được bệnh thối đọt và thối rễ cây cà chua do nấm *Fusarium oxysporum,* loài *F. radicis-lycopersici. Bacillus subtilis* có thể phòng trừ bệnh héo rũ cà chua do nấm *Pseudomonas solanacearum* gây ra.

Psuedomonas fluorescens của *Gamma Proteobacteria* không những chỉ có khả năng của một vi khuẩn vùng rễ cây kích thích sinh trưởng cây trồng (PGPR), mà còn là một loại thuốc trừ nấm hiệu quả cao trên loài nấm *Pythium aphanidermatum* thuộc ngành *Oomycota* và giới *Chromsita* mà nó gây hại trên cây bắp cải xanh, bắp cải Brussels, cải bắp, cây súp lơ...

Loài *Pectobacterium carotovorum* thuộc bộ Enterobacterales của Gammaproteobacteria, 24 loài *Proteobacteria* là nguồn gây bệnh thối nhũn, nó tiết ra những enzym ngoại bào, enzym pectinase làm hòa tan chất pectine của tế bào cây trồng (23). Nó gây hại rất lớn đối với một số loại rau như: rau diếp, cải thảo, cải bắp, súp lơ, rau diếp cá, gừng, cần tây, ngò tây, hành xứ Wales, hành, cà rốt, khoai tây, cà chua, ớt chuông, ớt ngọt, ớt xanh, các loại ớt, ớt cựa gà, cây mù tạt Nhật Bản, Komatsuna, tỏi tây, tỏi, củ cải trắng...

Một thông tin rất thú vị từ Nhật Bản cho biết vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* có khả năng làm giảm bệnh thối nhũn do vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum* gây ra (24).

Nhóm chúng tôi đã đang sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* để ngăn ngừa và phòng trừ sự xâm nhập gây hại của các loại nấm và vi khuẩn như *Pectobacterium carotovorum* trên các loại cây trồng như lúa, dưa hấu, bắp cải Trung Quốc, cà rốt, cà chua, khoai lang, đậu nành, đậu saya, táo, lê, cam quít, quả thanh long. Chúng tôi đã có nhiều kinh nghiệm về sự thành công trong việc áp dụng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum,*

và chúng tôi thấy rằng một chất rất quan trọng do vi khuẩn *L. fermentum* tiết ra giống như là một chất kích thích sinh trưởng cây trồng giống như chất auxin và cytokinin nó có tác dụng kích thích sự sinh trưởng cây trồng (25). Chúng tôi đã quan sát thấy sự ra hoa và chín sớm của các loài quả cây ăn quả.

Để so sánh các loại *Bacillus* và *Pseudomonas,* chúng là những loại vi khuẩn *Lactobacillus* hiếu khí. Các loại vi khuẩn *Lactobacillus* là loại yếm khí tùy ứng, chúng có những biểu hiện chúng có thể hoạt động ở vùng đất sâu hơn nới có ít oxy. Một vài loại *Lactobacillus* có thể sống cộng sinh trong các khí khổng của lá cây, nơi mà nhiều loại vi khuẩn và nấm đã cố gắng xâm nhập vào để tranh giành chất dinh dưỡng và các dưỡng chất do quá trình quang tổng hợp tạo nên.

Các loại vi khuẩn *Lactobacillus* có thể bảo vệ cây ký chủ khỏi sự tấn công của sâu bệnh hại.

Sử dụng những loại vi khuẩn có ích này của các loài đơn độc rất có triển vọng trong việc phát triển những biện pháp kỹ thuật cho canh tác hữu cơ và nền nông nghiệp bền vững.

IX. KẾT LUẬN

Canh tác hữu cơ trong nông nghiệp đã được khuyến khích ở nhiều quốc gia trên thế giới như các nước Châu Âu (EU), Mỹ, Nhật Bản và Việt Nam. Trong việc thực hiện tốt biện pháp canh tác hữu cơ cũng có những khó khăn rất lớn như việc phòng trừ sâu hại mà không sử dụng hóa chất, cung cấp chất dinh dưỡng cho cây trồng mà không dùng phân bón hóa học, quản lý giống cây trồng mà không lai tạo chọn giống.

Nông nghiệp môi trường lợi khuẩn nó đẩy mạnh sản xuất và sử dụng phân hữu cơ chất lượng cao được chế biến từ nhiều loại chất thải hữu cơ bằng công nghệ ủ phân mới. Phân hữu cơ chất lượng cao không những có chứa đầy đủ chất dinh dưỡng cho cây trồng thay thế được phân bón hóa học mà nó còn có chứa nhiều loại vi sinh vật có ích có tác dụng phòng trừ sâu bệnh hại có thể thay thế được thuốc trừ sâu hóa học.

Nông nghiệp môi trường lợi khuẩn khuyến khích việc sử dụng các vi khuẩn có ích của nhiều loài vi sinh khác nhau, chúng có khả năng kích thích sinh trưởng cây trồng và làm giảm những loại vi khuẩn, nấm, tuyến trùng và sâu hại tấn công phá hại cây trồng.

Loại phân bón hữu chất lượng cao có thể sản suất bằng phương pháp ủ phân nhiệt độ cao, với phương pháp này đã làm tích lũy nhiều loại vi khuẩn tốt trong sản phẩm phân bón. Những loại vi khuẩn có ích thuộc loài *Bacillus của Firmicutes,* loài *Actinomycetaceae* của *Actinobacteria,* loài *Proteobacteria Streptomycests* spp. của *Actinobacteria, Bacillus subtilis* của *Firmicutes, Lactobacillus species* của *Firmicutess* và loài *Bacteroidetes,* chúng là những thành phần chính của vi khuẩn vùng rễ cây. Những loài đơn lẻ của những vi khuẩn có lợi như loài *Streptomycests* spp. của *Actinobacteria,* loài *Bacillus subtilis* của *Firmicutes,* loài *Lactobacillus* của *Firmicutes* là những sản phẩm thương mại đang sử dụng rộng rãi như là loại thuốc trừ sâu hại sinh học. Phương thức canh tác môi trường lợi khuẩn cần cho sự

phát triển nông nghiệp bền vững ở Việt Nam vừa mới bắt đầu và nó có nhiều triển vọng tiềm năng phát triển rộng lớn trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phân loại, https://en.wikipedia.org/wiki/Bacterial_taxonomy
2. Kazuhiro Hirayama, Phân loại vi khuẩn đường ruột con người, 30:5 - 152016, Tạp chí Vi sinh vật đường ruột, Nhật Bản.
3. Daniela Numberger, Những đặc tính của cộng đồng vi sinh vật có trong nước thải bằng phương pháp phân giải phân loại cách sắp xếp theo chuỗi của chiều dài gene 16S rRNA, Báo cáo khoa học quyển 9, Mã số bài báo cáo: 9673 (2019).
4. Qiuting Zhang, *et al.*, Sự biến dạng cao của vi sinh tổng hợp chất methan trong ruột do tác động quá trình tiêu hóa yếm khí hoàn toàn, Quyển 126, Tháng 5/2019, Trang 543 - 551 Môi trường thế giới.
5. Nataliya M. Shchegolkova, *et al.*, Cấu trúc của cộng đồng vi sinh vật trong bùn thải đã hoạt hóa trong các nhà máy xử lý nước thải với các thành phần nước thải khác nhau. Phần vi sinh vật 7:90. 10.3389. Ấn bản online 18/2/2016.
6. Tairo Oshima và Toshiyuki Moriya, Phân tích sơ khởi về vi sinh vật và những đặc điểm về sinh hóa của vi sinh vật trong phân hữu cơ chế biến bằng phương pháp ủ nhiệt độ cao, Báo cáo hàng năm của Viện khoa học New York, Mỹ, 1125: 338 - 344 (2008).
7. Takahiro Yoshii *et al.*, Phân tích hệ vi khuẩn chiếm đa số trong phân hữu cơ chế biến bằng phương pháp ủ nhiệt độ cao phân hủy từ nội tạng của sò “, Extremophiles 2016, 9/2016
8. Lorena M. Lagos, *et al.*, Những tổng kết hiện nay về nghiên cứu vi khuẩn vùng rễ cây bằng những kỷ thuật phân tử hiện đại: Tổng kết, J. KHoa học đất đai. Dinh dưỡng cây trồng [online]. 2015, quyển15, số.2, trang 504 - 523. Ấn hành 30/4/2015. ISSN 0718 - 9516.
9. Lugtenberg, B., and Kamilova, F., Những vi khuẩn sống vùng rễ cây kích thích sinh trưởng cây trồng. Báo cáo hàng năm về vi sinh vật. 63, 541 - 556. 2009.
10. Dilfuza Egamberdieva, *et al.*, Chất kích thích thực vật và những vi sinh vật có lợi: Những thành phần chủ yếu để cây trồng sinh trưởng cân đối trong những môi trường bất lợi, Vi sinh vật 31/10/2017, https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02104
11. Nấm Wikipedia, Bách khoa toàn thư, en.wikipedia.org/wiki/Fungus
12. Sự cộng sinh Wikipedia, Bách khoa toàn thư, en.wikipedia.org/wiki/Mycorrhiza
13. Anthony J De Lucca, Những loại nấm hại trong sản xuất nông nghiệp và sản xuất thuốc y học, Rev Iberoam Micol, 2007 Mar;24(1):3-13.
14. Bệnh phấn trắng Wikipedia, Bách khoa toàn thư, org/wiki/Powdery_mildew
15. Archana Jain, *et al.*, Tổng kết bệnh nấm trên lá cây và sự phát triển hình thành các loài mới của nấm do điều kiện môi trường, Tạp chí Kỹ thuật sinh học quyển 10, năm 2019 - Vấn đề 1.
16. 吉田・坂井 [新・土の微生物（１）]—耕地・草地・林地の微生物。土壌微生物研究会編 trang 42, 博文社、1997年、Yoshida・Sakai「shin tsuchino biseibutsu(1)」—koochi・soochi・rinchi no biseibutsu-Dojobiseibutsu kenkyukai hen, trang 42, năm 1997.
17. Tomokazu Kawase, *et al.*, Phân tích sự phân bố và phát sinh nhiều nguồn của Họ 19 Loài Chitinases của *Actinobacteria,* Ứng dụng và di truyền sinh học môi trường và kỷ thuật phân tử, DOI: 10.1128/AEM.70.2.1135-1144.2004.
18. Marie-Ève Lacombe-Harvey, *et al.*, Chức năng của chất kitin trong kháng vi khuẩn: sinh thái, enzyme và sự tiến hóa. Kỷ thuật sinh học vi sinh ứng dụng năm 2018; 102(17): 7219 - 7230.
19. Xuất bản online ngày 21 tháng 6 năm 2018. doi: 10.1007/s00253-018-9149-4.
20. J.J.Skujins,*et al.*, Sự hòa tan vách tế bào nấm bằng enzyme chitinase của vi khuẩn streptomycete và enzyme β-(1→3) glucanase,

Tài liệu lưu trữ của Hóa sinh và Lý sinh tháng 8/1965, Trang 358 - 364.

21. Kazuyoshi Chubachi, er al., Phòng trừ tuyến trùng gây nốt sần ở rễ cây trồng do Streptomyces gây ra: Sàn lọc tuyến trùng gây nốt sần trên rễ cây, phòng trừ vi khuẩn *Actinomycetes* và đánh giá sự ích lợi của chúng trong các thực nghiệm cây trồng trong chậu, Quyển 29. Số 2 năm 1999 Tạp chí của Nhật Bản về tuyến trùng.
22. Sasser JN and Carter CC: Tổng quan về dự án tuyến trùng *Meloidogyne quốc tế* năm 1975 - 1984. Chuyên luận tiến bộ về *Meloidogyne*. Tác giả: Sasser JN, Carter CC. Raleigh: Trường đại học Bang North Carolina; năm 1985: trang 19 - 24.
23. Bệnh cây sinh học do vi khuẩn *Bacillus subtilis* gây ra - Áp dụng cơ sở và thực tế bởi Makoto Shoda CRC Press, Tayler & Francis Group, 2020.
24. Pectobacterium carotovorum Wikipedia, thefreeencyclopedia, en.wikipedia.org/wiki/ Pectobacterium carotovorum
25. Báo cáo của Trung tâm Nghiên cứu về nguồn vi sinh của tỉnh Kyoto. Tháng 25/5/2015.
26. Saburo Matsui *et al.*, Phương pháp phân tích các chất kích thích sinh trưởng Auxin và Cytokinin do vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* sinh ra- 403 - Nguyên tắc nông nghiệp môi trường lợi khuẩn,
27. Tổ chức về xử lý nước bằng sinh học của Nhật Bản, Quyển. 48, No.3, 117-123, 20l2.

Bản báo cáo trên được viết ngày 05/9/2020

PROBIOTIC ENVIRONMENTAL FARMING FOR SUSTAINABLE VIETNAMESE AGRICULTURE

How to enhance good microbial activity for healthy soil and healthy food

Saburo Matsui

Ph.D,Emeritus Professor, Kyoto University
IWA Distinguished Fellow

Abstract ; Organic farming becomes important for sustainable agriculture by improving soil conditions introducing high quality compost. The sources of compost are various such as animal dungs, food process left, garbage, harvest residues and sewage sludge, etc. A hyper-thermophilic composting can produce a high quality compost which must contain nutrients that replace chemical fertilizer, and 'the good' microorganisms that replace pesticides. The good bacteria are understood as at least *Bacillus* spp. *of Firmicutes, Actinomycetaceae spp. of Actinobacteria, Proteobacteria spp. and Bacteroidetes spp.*, which are major members of rhizosphere bacteria. Single species of 'the good' bacteria, such as *Streptomycests spp.* ,*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus spp.* are commercially available as bio-pesticides. The probiotic environmental farming for sustainable Vietnamese agriculture has just started, which has an enormous possibility in the future.

Key words; organic farming, probiotic environmental farming, hyper-thermophilic composting, *Streptomycests spp., Bacillus spp., Lactobacillus spp.*

[1] Introduction

Organic farming has been encouraged in many countries such as EU, USA, Japan and Vietnam. EU commission actively promotes organic farming, indicating as follows; it is an agricultural method that aims to produce food using natural substances and processes, which tends to have a limited environmental impact as it encourages: the responsible use of energy and natural resources; the maintenance of biodiversity; preservation of regional ecological balances; enhancement of soil fertility. This approach necessarily requires comprehensive new and old agricultural technologies for effective practices. Practicing good organic farming has significant difficulties such as pest control without agrochemicals, nutrient supply without chemical fertilizer, seeds control without improvement of species and selective breeding. Nevertheless of those difficulties, we have to find solutions for sustainable agriculture for Vietnam as well as Japan. It is my great honor to write this paper with help of Prof. Nguyen Tho on my

approach of the *probiotic environmental agriculture* for Vietnam organic farming. Since the science and technology of organic farming is a young art for sustainable agriculture, we may need many repeats of trial and error to find effective practices. I have experienced by myself the *probiotic environmental agriculture* that promotes production and use of high quality compost from variety of organic wastes by a new composting technology. High quality compost must contain nutrients that replace chemical fertilizer, and beneficial microorganisms that replace pesticides. The *probiotic environmental agriculture* also promotes uses of beneficial bacteria of many single species, that can promote growth of plants and suppress harmful bacteria, fungi, nematodes and insects. In Japan there is available a new technology of hyper-thermophilic composting, that has been applied for sewage sludge and raw garbage, to produce beneficial consortiums of so called 'the good' bacteria. The good bacteria accumulated in the compost, can protect when it is applied to soils, for the cultivation vegetable and fruits from attacks of harmful fungi, bacteria, nematodes and insects. Comparing to the application of beneficial consortium bacteria to agricultural fields in order to improve soils without agrochemicals, another approach is the application of beneficial bacteria of single species such as *Lactobacillus species* as well as *Bacillus species* to vegetables and fruits by foliage and/or root spray methods. How to economically produce *'the good'* bacteria consortiums is a key technology. How to economically produce the good bacteria of single species is also another key technology. This paper provides an outlook of bacteria, fungi, nematodes and insects involved in the agricultural environment, and what groups of bacteria are 'the good' bacteria for soil management and healthy food production , against 'the bad' bacteria, fungi, nematodes and insects.

[2] Bacteria in nature and probiotic bacteria for human health

[Bacteria in nature]

There were many microorganisms found on the earth. Microorganism includes bacteria, archaea, fungi, nematodes and viruses. We are primarily concerned with the microorganism for human and agricultural health in this paper. Certain species of bacteria and archaea coexist in human intestine, but most of fungi, nematode and viruses are sick inducers for human as well as cultivation plants. **Table 1** shows a recent information on the taxonomy of bacterial phyla and the number of species in nature **(1)**. Microorganisms habit in soil making a complex ecosystem depending conditions of abiotic and availability of organic substances. They are always competing and evolving toward a stabilized state. However, agriculture activity is always making

a new ecosystem in soils where a new competition starts among microorganisms. Among microorganisms, control of bacteria is more practical than control of fungi, nematodes and insects. Organic farming always emphasizes on a rotation cropping, avoiding continuous cropping in order to stop the accumulation of 'the bad' microorganisms in soils.

Table 1 Bacterial phyla and the number of species identified in nature

	No. of Species Identified
1 Acidobacteria	4
2 Actinobacteria	***2000***
3 Aquificae	22
4 Armatimonadetes	3
5 Bacteroidetes	***500***
6 Caldiserica	1
7 Chlamydiae	17
8 Chlorobi	17
9 Chloroflexi	45
10 Chrysiogenetes	4
11 Coprothermobacterota	45
12 Cyanobacteria	***2654***
13 Deferribacteres	14
14 Deinococcus-Thermus	45
15 Dictyoglomi	2
16 Elusimicrobia	1
17 Fibrobacteres	2
18 Firmicutes	***2000***
19 Fusobacteria	37
20 Gemmatimonadetes	1
21 Lentisphaerae	4
22 Nitrospirae	11
23 Planctomycetes	12

24 Proteobacteria	*3000*
25 Spirochaetes	94
26 Synergistetes	23
27 Tenericutes	8
28 Thermodesulfobacteria	8
29 Thermotogae	30
30 Verrucomicrobia	41
Total	10,558

The numbers of bacterial phyla and species are increasing, according to new findings of bacteria species and editing bacteria species by new genomic identifications. Those bacteria are found in soil and water in nature. Among them *2 Actinobacteria, 5 Bacteroidetes, 12 Cyanobacteria, 18 Firmicutes and 24 Proteobacteria* are major bacteria groups that hold many species working for environmental cycles of elements on the earth.

When we focus on the bacteria in human intestine, although the most of the bacteria coexist with human, the numbers of bacterial phyla and species are dramatically decreased, shown in **Table 2.** The major bacterial groups in human intestine are 2 *Actinobacteria, 5 Bacteroidetes, 18 Firmicutes, and 24 Proteobacteria.* Those bacteria have a strategy for coexistence with human intestine **(2)**.

[Bacteria in human intestine]

Human intestinal condition is anaerobic and facultative, in which there are unique competitions among the bacteria to survive. In the ends they are going through the intestine and back to the environment of water or soils. Human intestine is a tentative habitat for them in the natural cycle, where only selected bacteria increase in number.

Table 2 Bacterial phyla, genera, and possible species in human intestine

Phylum	Genus	Species
2 Actinobacteria	12	28
5 Bacteroidetes	9	53
14 Deinococcus-Ther	1	1
18 Firmicutes	47	168
19 Fusobacteria	2	8
20 Lentisphaerae	1	1
24 Proteobacteria	47	111
25 Spirochaetes	1	1
26 Synergistetes	2	2
27 Tenericutes	2	2
30 Verrucomicrobia	1	1
	Total 125	Total 376

Phylum	Genus	Species
2 Actinobacteria	12	28
5 Bacteroidetes	9	53
14 Deinococcus-Thermus	1	1
18 Firmicutes	47	168
19 Fusobacteria	2	8
20 Lentisphaerae	1	1
24 Proteobacteria	47	111
25 Spirochaetes	1	1
26 Synergistetes	2	2
27 Tenericutes	2	2
30 Verrucomicrobia	1	1
	Total 125	Total 376

They survive in human intestine striving for nutrient, competing each other but harmonizing generally with others and the host human.

When one or some of species grow more and disturbing the harmony of intestinal consortium of the host bacteria, the host develops illness. In order to keep the healthy conditions of intestinal consortium, traditional fermentation foods have been utilized in many countries. Many peoples know what foods are good for health. They developed traditional fermentation foods. Among fermentation foods, most popular ones are yogurt, sauerkraut, and pickled. Vietnam developed unique fish fermentation foods such as Nước mắm, Mắm tôm and Mắm cá etc., which are produced by beneficial bacteria specially utilizing lactic acid fermentation. Lactic acid fermentation is

conducted by certain bacteria shown in **Tables 3, 4, and 5.** Both *Lactobacillaceae* and *Streptococcaceae* belong to phylum *Firmicutes, while Bifidobacteriaceae belongs to* pylum *Actinobacteria.*

Table 3 *Lctobacillus* species identified in human intestine.
They belong to Family *Lactobacillaceae*, Order *Lactobacillales*, Class *Bacilli,* Phyla *Firmicutes*

Family *Lactobacillaceae*			
Genus			
Lactobacillus	*L. acidophilus*	*L. amylolyticus*	*L. amylovorus*
	L. antri	*L. brevis*	*L. buchneri*
	L. casei	*L. coleohominis*	*L. coryniformis subsp. coryniformis*
	L. crispatus	*L. delbrueckii subsp. bulgaricus*	*L. delbrueckii subsp. lactis*
	L. farciminis	*L. fermentum*	*L. fructivorans*
	L. gasseri	*L. helveticus*	*L. hilgardii*
	L. iners	*L. jensenii*	*L. johnsonii*
	L. kefiranofaciens subsp. kefiranofaciens	*L. oris*	*L. paracasei*
	L. plantarum	*L. reuteri*	*L. rhamnosus*
	L. ruminis	*L. salivarius*	*L. ultunensis*
	L. vaginalis		

Table 4 Lactic acid fermentation bacteria of *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae* and *Leuconostocaceae* of Family *Streptococcaceae* Order *Lactobacillales,* Class *Bacilli*, Phylum *Firmicutes* in human intestine

Family *Streptococcaceae*		
Genus *Lactococcus*	*L. lactis subsp. cremoris*	*L. lactis subsp. lactis*

Genus *Streptococcus*	*S. agalactiae*	*S. anginosus subsp. anginosus*	*S. anginosus subsp. whileyi*
	S. australis	*S. bovis*	*S. constellatus subsp. constellatus*
	S. constellatus subsp. pharyngis	*S. cristatus*	*S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae*
	S. dysgalactiae subsp. equisimilis	*S. equinus*	*S. gallolyticus subsp. gallolyticus*
	S. gallolyticus subsp. macedonicus	*S. gordonii*	*S. ictaluri*
	S. infantarius subsp. infantarius	*S. infantis*	*S. macacae*
	S. mitis	*S. mutans*	*S. oralis*
	S. parasanguinis	*S. parauberis*	*S. pasteurianus*
	S. peroris	*S. pneumoniae*	*S. porcinus*
	S. pseudopneumoniae	*S. pseudoporcinus*	*S. pyogenes*
	S. salivarius subsp. salivarius	*S. salivarius subsp. thermophilus*	*S. sanguinis*
	S. suis	*S. uberis*	*S. urinalis*
	S. vestibularis		

Table 5 Lactic acid fermentation bacteria, Genus *Bifidobacterium*, Family *Bifidobacteriaceae*, Order *Bifidobacteriales*, Class *Actinobacteria*, Pylum *Actinobacteria* in human intestine.

Order *Bifidobacteriales*			
Family *Bifidobacteriaceae*			
Genus *Bifidobacterium*	*B. adolescentis*	*B. angulatum*	*B. animalis subsp. lactis*
	B. bifidum	*B. breve*	*B. catenulatum*

B. dentium *B. gallicum* *B. longum subsp. infantis*

B. longum subsp. longum *B. pseudocatenulatum*

Genus Gardnerella G. vaginalis

[Probiotic bacterial supplyment for human]

Instead of taking lactic acid fermentation foods, feeding daily those lactic acid bacteria of single species, is commercially popular in many countries including Japan, EU and USA. The daily dose of those so called 'the good' bacteria is called a probiotic supplyment that supports a stability of the intestinal consortium lending healthy digestional conditions for host human. The interaction between intestinal bacteria and the host human, is now a big medical science target in terms of the immune system and the healthy digestion system. Commercial development is very rapid with new types of foods with lactic acid fermentation in many countries, calling the new foods as supplymental foods with new functions of immune, digestion and possibly others.

[3] Bacteria in sewage, sewage sludge digestion and activated sludge

[Bacteria in sewage]

After digestion of foods, human discharges feces and urine in sewage where most of intestinal bacteria groups survive and are found such as *2 Actinobacteria, 5 Bacteroidetes, 18 Firmicutes, and 24 Proteobacteria.* There is a dramatic environmental change in sewer pipes for flowing intestinal bacteria. There is a decrease in number of the intestinal phyla, indicating the environment of sewerage is not favorable to some groups of intestinal bacteria. It is interesting to see new groups of bacteria that are not often found in the intestine, emerging in sewage such as *1 Acidobacteria, 9 Chloroflexi, 12 Cyanobacteria,* and 22 *Nitrospirae* , show in **Table 6** (3).

Table 6 Major bacteria phyla found in sewage

Phylum	No. of Species Identified
1 Acidobacteria	4
2 Actinobacteria	*2000*
5 Bacteroidetes	500
9 Chloroflexi	45
12 Cyanobacteria	*2654*

18 Firmicutes	*2500*
19 Fusobacteria	37
22 Nitrospirae	11
24 Proteobacteria	*3000*
Total	*10,251*

[Methane fermentation]

In sewage treatment plants, the methane fermentation of sewage sludge digestion is conducted, where some groups of bacteria and archaea play key roles shown in **Table 7** (4). Sewage sludge digestion is operated in strict anaerobic conditions to produce methane and decompose organic substances. Playing microorganisms are very special to adapt the obligate anaerobic environment. Those microorganisms found in Table 7 show some similarity with those in human intestine that is not strict anaerobic.

Table 7 Methane bacteria and archaea in sewage sludge digestion

1 Acidobacteria	
5 Bacteroidetes	
9 Chloroflexi	
18 Firmicutes	
23 Planctomycetes	*Anaerolineaceae*
24 Proteobacteria	*Clostridiales*
25 Spirochaetes	
26 Synergistetes	

Domain:	*Archaea*
Kingdom:	*Euryarchaeota*
Phylum:	*Euryarchaeota*
Order:	*Methanomicrobia*
Class	*Methanosarcinales*
Genus	*Methanothrix*

[High quality compost]

It is a key to conduct organic farming with high quality composts that must contain, in good balance, three major nutrients such as nitrogen, phosphate, and potassium, followed by the next major nutrients such as Ca, Mg and Sulfur. Depending on

the composting sources that have various organic waste sources, some high quality composts contain in good amount, essential micronutrients such as Cl, Si, Fe, Zn, Cu, B, Mn, Ni and Mo. The products of organic farming attract consumers because of their good taste, which could be attributed to the good balance of major and micro nutrients in composts. In the support of high quality composts, sustainable organic farming can be practiced. High quality composts must contain in addition to those inorganic nutrients, essential organic substances that are humus, humic substance and fulvic acid. When composting methods are immature, the finished compost may not contain those essential organic substances. At the last, the high quality compost should contain 'the good' bacteria that are beneficial to plant growth and protect from attacks of the bad microorganisms. It is very interesting that when we aerobically ferment organic wastes of raw garbage, sewage sludge, animal dung, and plant residue, many aerobic and facultative bacteria work for the fermentation. After fermenting, the end product contains large amounts of survived bacteria and spores of aerobic and facultative bacteria that are components of 'the good' bacteria.

[Activated sludge AS]

Sewage is treated in waste water treatment where they use traditionally the activated sludge (AS) method. The AS method has been utilized in the world for one century, which is a key sanitation infrastructure for humankind. AS is composed of aerobic and anaerobic microorganisms such as bacteria, archaea, fungi, and protists. AS accepts daily huge amounts of bacteria discharged from citizens, shown in Table 6. It is capable of degrading organic substances of human feces and urine, and many types of organic compounds, including carbohydrates, food oils, proteins and petroleum chemicals, etc. The microbial component of AS changes according composites of sewage that depending on types of waste water dischargers in sewage service cities. When different types of industrial waste waters are discharged, the water quality of sewage may change according to the proportion of the industrial waste water. Seasonal changes of inflow sewage may occur due to change of food types. Location of cities are various according to climate difference, which may also change water quality due to different types of food consumption.Nevertheless of those changes and differences, it is very interesting to see the microbial component of AS, which keeps a common and core consortium shown in **Table 8** (5).

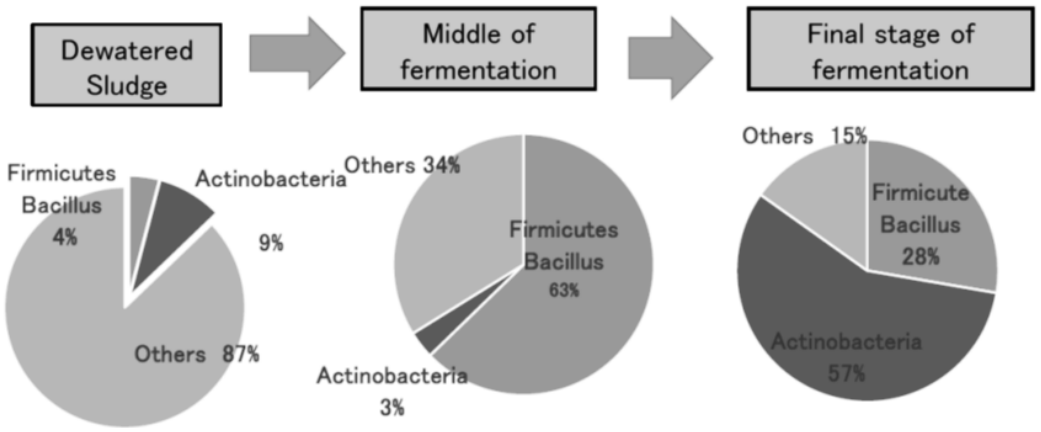
Table 8 Bacterial core community of Activated Sludge in treatment plants with different wastewater compositions

1 *Acidobacteria*
2 *Actinobacteria*
5 *Bacteroidetes*
9 *Chloroflexi*
16 *Elusimicrobia*
18 *Firmicutes*
20 *Gemmatimonadetes*
22 *Nitrospirae*
23 *Planctomycetes*
24 *Proteobacteria*
30 *Verrucomicrobia*

[4] Bacteria in the hyper-thermophilic compost

When we conduct aerobic fermentation for sewage sludge that consists of sludge from sedimentation tanks and surplus activated sludge, we can see an ecological succession of bacteria species during fermentation shown in **Fig. 1** (6)(7). Dewatered sludge shows *2 Actinobacteria and 18 Firmicutes* are relatively small in number. There are many other types of bacteria in sewage sludge. In the middle of fermentation when temperature increases more than 90oC, *18 Firmicutes, genus Bacillus s*pecies become major species with other bacteria including thermophilic species such as *14 Deinococcus-Thermus,* and *29 Thermotogae*. After a high temperature period, the composting temperature slowly drops down till air temperature, when *2 Actinobacteria* degrade remained organic substances including cell walls of plant. In the final stage, *2 Actinobacteria* become dominant bacteria.

Fig 1 Ecological succession of bacteria involved in the hyper-thermophilic fermentation of sewage sludge.



This fermentation method is called a high temperature composting or a hyper-thermophilic composting, in which aerobic bacteria work from start to end, actively decomposing easily degradable substances such as carbohydrates, lipids and protein, generating heat with high temperature above 90 oC in the center part of composting mound, and discharging vapor in air. When the operation method is well controlled, temperature in the center part can exceed even more than 100 oC, thus I call it the hyper-thermophilic composting (6)(7).

The survival conditions of Bactria drastically change in the composting conditions. Heterotrophic bacteria face very severe survival conditions. Those of many anaerobic bacteria are not favorable to survive under high temperature and water limit conditions. In **Table 9,** the phyla, *14 Deinococcus-Thermus, 27 Tenericutes and 29 Thermotogae* indicate that they are thermophilic and meso-thermophilic bacteria surviving in the hyper-thermophilic composting conditions. Although high-temperature and vapor releasing conditions are involved by a continuous air supply, interestingly some anaerobic bacteria were still found, suggesting that anaerobic processes also take place, probably in micro-environments of the composting piles. The end products of hyper-thermophilic composting plants are commercially available in Japan, which obtain a high reputation among farmers who practice organic farming. The organic waste sources are sewage sludge, city garbage, food market garbage and sludge of food processing factories, etc.

Table 9 Major bacteria in the hyper-thermophilic compost of sewage sludge

2 Actinobacteria

5 Bacteroidetes
9 Chloroflexi
12 Cyanobacteria
13 Deferribacteres
14 Deinococcus-Thermus
18 Firmicutes *Thermus thermophilus*
22 Nitrospirae
24 Proteobacteria
25 Spirochaetes
27 Tenericutes
29 Thermotogae
30 Verrucomicrobia

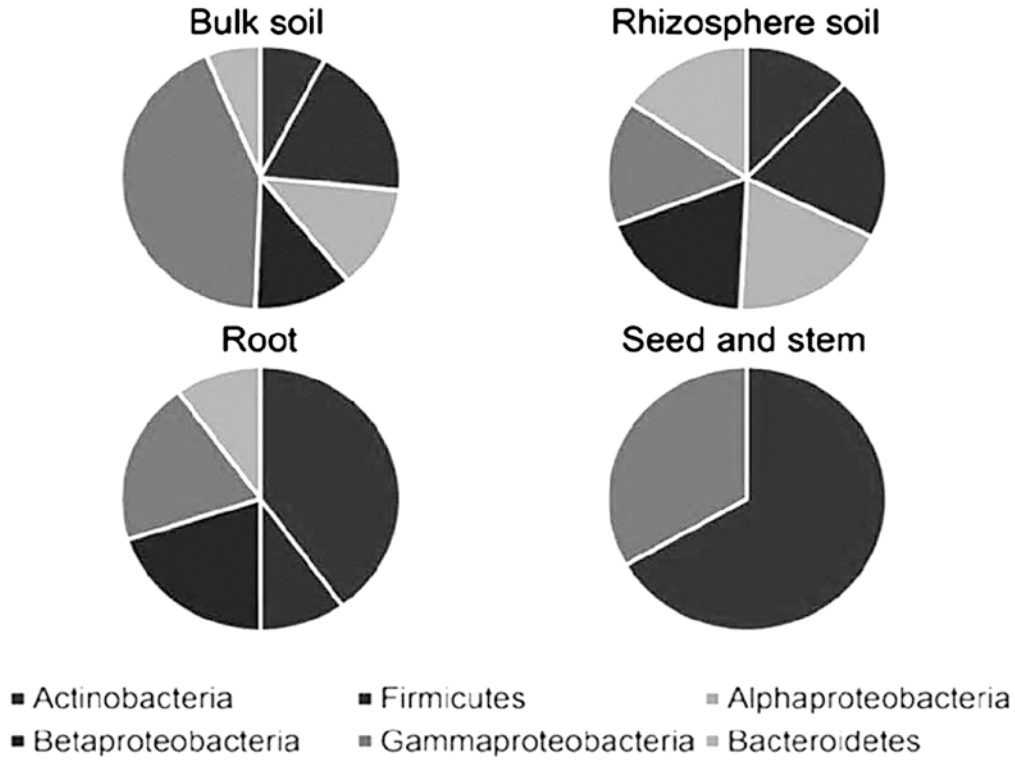
[5] Rhizosphere and root-associated bacteria, promoting plant growth, and protecting plants from attacks of bacteria, fungi and nematodes

[Plant growth–promoting rhizobacteria (PGPR)]

The rhizosphere (soil zone influenced by roots) is a complex environment that supports diverse bacterial populations, which have an important role in biogeochemical cycling of organic matter and mineral nutrients. Plants grow on photosynthesis which provides the product such as carbohydrates, amino acids and other acids to roots through sieve tubes from leaves, while the roots exudates those organic substances to root associated bacteria and rhizosphere bacteria. Those organic acids are utilized to solubilize minerals in soils around roots. Minerals and water are transported from roots to leaves through vessels. The knowledge of the ecology and role of these bacteria in the rhizosphere is limited, particularly regarding how indigenous bacteria are able to communicate, colonize root environments, and compete along the rhizosphere microsites. Lorena M. et.all overviewed bacteria in the rhizosphere, and found an important role in the organic matter transformations and biogeochemical cycles of plant nutrients (8). A substantial number of bacterial species can interact with their host plants and may exert beneficial effects on plant growth, plant nutrition and disease suppression. Thus, they indicate those bacteria as plant growth–promoting rhizobacteria (PGPR). Among the main functions attributed to PGPR are: biological N2 fixation,

phytopathogen biocontrol, phosphate fixation, solubilization, production of phytohormones and enzymes. Nowadays, PGPR represent an attractive alternative for chemical fertilizers as biofertilizers, phytostimulators, rhizoremediators and phytopathogen biocontrol agents (9).

Fig 2 Taxonomic affiliation of 157 entries of plant growth−promoting rhizobacteria (PGPR) in GenBank database in relation to soils (bulk and rhizosphere) and plant tissues (root, seed and stem)(9).



It is very interesting to understand a bacterial ecology in **Fig 2,** in which plant growth−promoting rhizosphere bacteria (PGPR), bacteria in bulk soil, and bacteria in plant tissues (root, seed and stem) are compared. Major playing bacteria in bulk soil and rhizosphere soil are the same as *2 Actinobacteria, 5 Bacteroidetes,18 Firmicutes, and 24 Proteobacteria (Alpha- Beta- Gamma-).* However their proportions are different. The symbiotic or parasitic or pathogenic bacteria of root-associated are summarized in **Table 10**, indicating four phyla such as 2 *Actinobacteria,* 5

*Bacteroidetes,*18 *Firmicutes,* and 24 P*roteobacteria* (Beta- and Gamma-). In seeds and stems, two phyla 2 *Actinobacteria,* and 24 P*roteobacteria (* Gamma-) are so far mainly found.

Table 10 Symbiotic or parasitic or pathogenic of root-associated bacteria, indicating production of plant hormones, and their functions

Pylum	Order/Genus		Plant hormone	Function
2 *Actinobacteria*	*Actinomycetaceae*		AA, GB, CK,	fungi killer
5 *Bacteroidetes*	*Flabobacterium*		IAA	plant pathogenic
18 *Firmicutes*	*Bacillus*	*B.thuringiensis*		insect killer
		B.subtilis	CK, GB, ABA	insect killer
24 *Proteobacteria*	*Agrobacterim*		IAA	parasitic
alpha-	*Bradyrhizobium*		IAA	Soy beans nitrogen fixing
	Rhizobium		IAA	nitrogen fixing
	Azospirillum		IAA, GB, GK	nitrogen fixing
24 *Proteobacteria*	*Alcaligines*		IAA	denitrification
beta-	*Xanthomonas*			plant pathogenic
24 *Proteobacteria*	*Azotobactor*		IAA	nitrogen fixing
gamma-	*Enterobactor*		IAA	human pathogenic
	Erwinia		IAA	human pathogenic
	Hafnia			human pathogenic
	Klebsiella		IAA	human pathogenic
	Pseudomonas	*P. fluorescens*	IAA, GB, CK	plant pathogenic, human
	Serratia		IAA	human pathogenic

[6] Plant hormones and functions of root-associated bacteria

[Phytohormones]

Plants are subjected to various abiotic stresses, such as drought, extreme temperature, salinity, and heavy metals. Abiotic stresses have negative impact on the physiology and morphology of plants through defects in the genetic regulation of cellular pathways. Plants employ several tolerance mechanisms and pathways to avert the effects of stresses that are triggered whenever alterations in metabolism are encountered. Phytohormones are among the most important growth regulators; they are known for having a prominent impact on plant metabolism, and additionally, they play a vital role in the stimulation of plant defense response mechanisms against stresses **(10)**.

Exogenous phytohormone supplementation has been adopted to improve growth and metabolism under stress conditions. Auxins are important phytohormones, and the auxin indole-3-acetic acid (IAA) was shown to promote several growth and developmental events, such as cell division, elongation, and differentiation. Cytokinins (CK), an important group of plant hormones are involved in the maintaining of cellular proliferation and differentiation and the prevention of senescence, therefore leading to the inhibition of premature leaf senescence

Abscisic Acid(ABA) is known to have an important role in plants by improving stress responses and adaptation. It is a naturally occurring sesquiterpenoid, which are a group of key phytohormones involved in the regulation of growth. Gibberellin(GB) has a vital role in seed dormancy formation of floral organs, and lateral shoot growth. Salicylic acid is another important phytohormone with a phenolic nature, and it has an important function in plant stress tolerance through modulation of antioxidative enzyme activities.

[Bacteria make phytohormones]

Bacteria synthesize low amounts of those phytohormones and give to plants improving stress tolerance and plant growth under various stress conditions, including salinity, heat, drought and metal toxicity. There are many root-associated bacteria that can provide phytohormones shown in Table 10. The root-associated bacteria are basically symbiotic or commensal to plants, providing nitrogen or plant hormones, and fighting against fungi and nematodes invasions. While some of them are human pathogenic or opportunistic, human probiotic bacteria such as *Lactobacillus spp.* are

functioning against those root-associated bacteria. Fresh vegetables are important to be carefully cooked before eating for human health points of view.

[7] Fungi are powerful microorganisms in the environment ; some beneficial but others are trouble makers to human and plant

[Beneficial fungi and trouble fungi]

Fungi are very powerful microorganisms as much as bacteria, in which they are competing each other in many ecosystems on the earth. Some time they work together for alcohol and Miso fermentation, etc. But most of occasions they fight against, which tells us a useful knowledge of controlling fungi by 'the good' bacteria. Fungus is any member of the group of eukaryotic organisms that includes microorganisms such as yeasts and molds, as well as the more familiar mushrooms (11). These organisms are classified as a kingdom, which is separate from the other eukaryotic life kingdoms of plants and animals. Fungi are heterotrophs; they acquire their food by absorbing dissolved molecules, typically by secreting digestive enzymes into their environment. Fungi perform an essential role in the decomposition of organic matter and have fundamental roles in nutrient cycling and exchange in the environment. They have long been used as a direct source of human food, in the form of mushrooms and truffles; as a leavening agent for bread; and in the aochol fermentation of various food products, such as wine, beer, and soy sauce. There are 9 subkingodms and 14 phyla included in Fungi shown in **Table 11**. While some phyla of fungi are symbiotic with woody plants, the others are parasitic to plants causing significant agricultural damages.

Table 11 Fungi, subkingdoms and important phyla for agricuture

Subkingdoms	Phyla
1 *Rozellomyceta*	
	1 *Rozellomycota*
	2 *Microsporidia*
2 *Aphelidiomyceta*	
	3 *Aphelidiomycota*
3 *Chytridiomyceta*	
	4 *Neocallimastigomycota*
4 *Chytridiomycota*	

5 *Blastocladiomyceta*

5 *Blastocladiomycota*

6 *Zoopagomyceta*

6 *Basidiobolomycota*

7 *Entomophthoromycota*

8 *Kickxellomycota*

7 *Mortierellomycota*

8 *Mucoromyceta*

9 *Calcarisporiellomycota*

10 *Mucoromycota*

9 *Symbiomycota*

11 *Glomeromycota*

12 *Entorrhizomycota*

13 *Basidiomycota*

14 *Ascomycota*

[Mycorrhiza]

A mycorrhiza is a mutual symbiotic association between a fungus and mostly woody plants (12). The term mycorrhiza refers to the role of the fungus in the plant's rhizosphere, its root system. Mycorrhizae play important roles in plant nutrition, soil biology and soil chemistry. The association is sometimes mutualistic. In particular species or in particular circumstances mycorrhizae may have a parasitic association with host plants. Mycorrhizal plants are often more resistant to diseases, such as those caused by microbial soil-borne pathogens. These associations have been found to assist in plant defense both above and belowground. Mycorrhizas have been found to excrete enzymes that are toxic to soil borne organisms such as nematodes. There are at least 1060 species of fungi involved in mycorrhiza known as the group of Zygomycota, which are belonging to phyla, 8 *Kickxellomycota,* 9 *Calcarisporiellomycota,* 10 *Mucoromycota*,13 *Basidiomycota,* 14 *Ascomycota,* etc.

Most fungi are saprophytic and not pathogenic to plants, animals and humans(13). However, many fungal species are phyto-pathogenic as well as human sick causing (e.g., infections, allergies). They produce toxins that affect plants, animals and humans. Among such fungi some members of *Aspergillus, Fusarium* and *Alternaria* genera of 14 *Ascomycota*, and Mucor of 10 *Mucoromycota* are emerging pathogen groups in humans. These fungi present a common threat to both agricultural production and

human health. Taken together, these relative few fungi can cause huge economic losses to agriculture, loss of food for consumption, and serious, often fatal diseases in humans and animals.

[Powdery mildew, wilt and damping-off]

Powdery mildew is a fungal disease that affects more the 7,600 species of plants worldwide (14)(15). Powdery mildew diseases are caused by many different species of fungi. Among them, most species belonging Family *Erysiphaceae* cause powdery mildew. *Erysiphales* are obligate parasites. In the Family, species *Podosphaera fuliginea, P. xanthii* are well known, which belong to Genus *Podosphaera* Family *Erysiphaceae* Order *Erysiphales* , Class *Leotiomycetes* of Phyla 14 *Ascomycota.*

Powdery mildew is one of the easier plant diseases to identify, as its symptoms are quite distinctive. Infected plants display white powdery spots on the leaves and stems. The lower leaves are the most affected, but the mildew can appear on any above-ground part of the plant. Powdery mildew grows well in environments with high humidity and moderate temperatures. Greenhouses provide an ideal moist, temperate environment for the spread of the disease. This causes harm to agricultural and horticultural practices where powdery mildew may thrive in a greenhouse setting. In an agricultural or horticultural setting, the pathogen can be controlled using chemical methods, bio organic methods, and genetic resistance. In addition to powdery mildew, there are many other typical fungal diseases listed such as fusarium wilt, leaf rust, late blight, root rot, wilt, damping-off, etc, in **Table 12.** The phylum *Ascomycota* gives many classes and genera spices of fungi which cause agricultural damages as well as human diseases.

In the past other microorganisms were understood as belonging to the Kingdom Fungus, which are now clarified as belong to a new Kingdom Chromista. Species of Oomycota of this Kingdom also give a strong damages to agricultural plants, shown in Table 13.

Table 12 Phylum Ascomycota gives many classes and genera, species of fungi which cause agricultural damages as well as human diseases such as symptoms of damping-off, late blight, downy mildew, root rot, and wilt.

Phyla	Class	Species	
Ascomycota			
	Dothideomycetes	Cladosporium spp.	Fusarium spp. (Fusarium wilt disease)
	Sordariomycetes	Magnaporthe spp.	Thielaviopsis spp. (canker rot, black root rot, Thielavi
	Leotiomycetes	Botrytis spp.	Verticillium spp.

Magnaporthe grisea (rice bl

Sclerotinia sclerotiorum (c

Basidiomycota

Pucciniomycetes Puccinia spp. (severe rusts of cereals and grasses) n

Phylum	Class	Genus	Disease
Ascomycota			
	Dothideomycetes	Cladosporium spp.	Fusarium spp. (Fusarium wilt and damping-off disease)
		Alternaria spp.	Plant diseade, Early blight, Damping-off
			Human disease(allergens AIDS opportunistic)
	Sordariomycetes	Magnaporthe spp.	Rice rotten neck, rice seedling blight, blast, and Johnson spot,
			blast of rice, oval leaf spot of
			graminea, pitting disease, ryegrass
		Thielaviopsis spp.	
			Many vegetables and cotton, canker rot, black root rot,
			Thielaviopsis root rot
		Cryphonectria parasitica	
		Glomerella cingulata	Anthracnose(Canker). fruit rotting diseases
			strawberry
	Incertae sedis	Verticillium spp.	Chesnut blight
			verticillium wilt disease
			300 different cultivated plants infected,
			potato,maples, elms, aspen, ash, beech, catalpa, oak,
	Leotiomycetes	Botrytis spp.	
		Sclerotinia	Wine grapes and other plants infected,Damping-off
		sclerotiorum	408 plant species infected
		Podosphaera fuliginea	producing an abundance of mycelium and sclerotia
		P. xanthii	
		Erysiphaceae	Powdery mildew
		Pucciniomycetes	
		Puccinia spp.	
		Phakospora pachyrhiz	Powdery mildew
	Basidiomycota	Ceratobasidiaceae	Severe rusts of cereals and grasses
		Rhizoctonia solani	Soybean rust
			brown patch (a turfgrass disease)
			damping off (e.g. in soybean seedlings)
			black scurf of potatoes,
			bare patch of cereals,
			root rot of sugar beet,
			belly rot of cucumber
			sheath blight of rice

Table 13 Oomycota microorganisms give strong damages to agricultural plants, showing symptoms of damping-off, late blight and downy mildew.

Kingdom:	Chromista	
Phylum:	Oomycota	
Order:	Peronosporales	
Family:	Peronosporaceae	
Genus:	Phytophthora	
Species	Phytophthora	
	Phytopthora infestans	The plant-destroyer (water molds), Damping-off,Late blight,Downy mildew avocado and pineapple,
Family:	Peronosporaceae	
Genus:	Plasmopara	
Species:	P. viticola	Downy mildew,grapevines
Family:	Pythiaceae	
Genus:	Pythium	
	P.spp.	Damping-off

[8] Bacteria compete fungi, nematodes and insects over plants to build mutualistic relationships

In the preceding chapters, we discussed 'the good' bacteria that can build mutualistic relations with host plants, and 'the bad' bacteria that attack host plants, and many opportunistic bacteria that have some meaningful function with host plants. The same story could be applied to fungi, that 'the good', 'the bad' and the opportunistic ones. However, 'the good' fungi are very limited to support cultivation of vegetables and fruits. Even we know species of 'the good' fungi, it is still difficult to introduce them into commercial markets. In order to make healthy soils, our probiotic environmental agriculture must have a strategy of controlling microorganisms. Our strategy is that 'the good' bacteria overcome 'the bad' fungi, by selecting 'the good' bacteria and providing them to cultivation plants in the ways of root and foliage.

There is an interesting result of comparison between chemical fertilizer application and compost application in terms of microorganisms in the soils, shown in **Table 14** (16). They tested microbial changes in soils with applications of compost and chemical fertilizer over four years. They prepared two bare lands for the test. They applied each time an amount of compost 270kg (dry)/10 ha in succeeding two years. They found a significant increase in the number 2 *Actinobacteria* species in the test soil of the compost

application, while the number of filamentous fungi were the same both in chemical fertilizer and compost soils. The total numbers of aerobic and anaerobic bacteria were the same, while cellulose decomposers increased due to the increase of *Actinobacteria spp.* The compost application has a very important meaning in which the number of *Actinobacteria spp.* increased in soils.

Table 14 Comparison between chemical fertilizer application and compost application in terms of microorganisms in the soils

Fertilizer		1954 Oct.22	1955 May. 23	1955 Aug. 4	1956 May. 17
	No. /g dry soil				
Chemical fertilizer application	Aerobic bacteria (x10⁶)	42.4	12.5	12.2	10.6
	Annaerobic bacteria (x10⁶)	1.07	1.45	1.42	1.56
	Actinobacteria (x10⁶)	2.8	1.3	2.01	0.46
	Fungi (x10⁴)	18.5	9.3	8	4.3
	Cellulose decomposer(x1)	394	160	9,060	26
	Denitrifying bacteria(x1)	–	479	20,000	3,576
	Nitrite oxidizing bacteria(x1)	–	160	4,700	
Compost application	Aerobic bacteria (x10⁶)	41.4	16.1	14	11
	Annaerobic bacteria (x10⁶)	1.13	1.66	1.22	1.03
	Actinobacteria (x10⁶)	4.4	2.5	3.25	2.28
	Fungi (x10⁴)	26.2	15	7.4	5.3
	Cellulose decomposer(x1)	1,270	12,690	3,700	4,762
	Denitrifying bacteria(x1)	–	2,345	29,000	5,442
	Nitrite oxidizing bacteria(x1)	–	12,690	21,200	
	Started from bare land				
	Twice applied compost each with 270kgdry/10a, May 10,1954, and May 23.1955				

Actinobacteria species become endophytic to host plants, in which they make a barrier against the invasion of fungi to plants. *Actinobacteria spp.* are well known as producers of many types of antibiotic substances. Those substances work against fungi and nematodes as chitinases (17)(18). Chitinases of *Actinobacteria spp.* solubilize cell walls of fungi and nematodes, indicating direct attacks of the bacteria to any fungus and any root-not nematodes (19)(20). Streptomycests spp. of 2 *Actinobacteria* can control a fungus *Altenaria brassiscicola of Ascomycota, also root-knot nematodes.*

The root-knot nematodes are parasitic to plants and belong to Genus *Meloidogyne.* Family *Meloidogynidae,* Order *Tylenchida,* Class *Secernentea,* Phylum *Nematoda* , Kingdom *Animalia.* Identified *Species are Meloidogyne hapla, Meloidogyne incognita, Meloidogyne enterolobii syn. M. mayaguensis.* They exist in soil in areas with hot climates or short winters. About 2000 plants worldwide are susceptible to infection by

root-knot nematodes and they cause approximately 5% of global crop loss(21). Root-knot nematode larvae infect plant roots, causing the development of root-knot galls that drain the plant's photosynthates and nutrients.

Development of microbiological pesticides are very promising including *Bacillus* species that have a control capacity against insects, and also against some fungi such as *Glomerella cingulata* of *Ascomycota* on Satsuma mandarins. *Bacillus thuringiensis is* well known as a strong insect killer and commercially available. However we should know *Bacillus anthracis* which is only obligate pathogen within the genus *Bacillus* and kills animal and human as a biological weapons.

Bacillus subtilis produces diffusable substances that inhibit fungal pathogens. . They are antifungal substances found and identified to be iturin and surfactin by M.Shoda (22) *Bacillus subtilis* can control crown and root rot of tomato caused by *Fusarium oxysporum, species F. radicis-lycopersici. Bacillus subtilis* can control potato wilt caused by *Pseudomonas solanacearum.*

Psuedomonas fluorescens of *Gamma Proteobacteria* has not only a capacity of plant growth–promoting rhizobacteria (PGPR) ,but also a fungi killer effecting on *Pythium aphanidermatum of Phylum, Oomycota, Kingdom Chromsita,* that attacks broccoli, Brussels sprouts, cabbage and cauliflower, etc.

Pectobacterium carotovorum of *Order Enterobacterales* of *Gammaproteobacteria,* 24 *Proteobacteria* is a soft rot pathogen, secreting an exoenzyme, pectinase that dissolves pectines of plant cells(23). It gives a vast damage to varieties of vegetables such as Radish, Chinese cabbage, Cabbage ,Cauliflower ,Lettuce, Ginger, Celery, Parsley, Welsh Onion, Onion, Carrot ,Potato ,Tomato, Bell Pepper, Sweet Pepper , Green Pepper , Capsicum, Paprika, Qinggengcai, Japanese Mustard Spinach / Komatsuna , Leek, and Garlic Turnip,etc.

It is a very interesting news from Japan that *Lactobacillus plantarum* has a capacity of suppressing soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* (24).
My group has been employing *Lactobacillus fermentum* to protect from attacks of fungi, and bacteria including *Pectobacterium carotovorum ,* for plant cultivation such as rice, melon, Chinese cabbage, carrot, tomato, sweet potato, soy, Saya pea, apple ,

pear ,Mandarin orange, lemon and Dragon fruit. We have many experiences of great success in the application of *Lactobacillus fermentum*, and we found a very important substances excreted by *L. fermentum* as plant hormones such as auxin and cytokinin that promote plant growth(25). We observed early flowering early ripen of fruits.

Comparing to *Bacillus* species and *Psuedomonas* species, that are aerobic, *Lactobacillus* species are facultative anaerobic, which indicates that the bacteria can work around in deep soils where oxygen is limited. Some *Lactobacillus species* can be endophytic in stomata of leaves, where many species of bacteria and fungi try to invade in for the nutrient products of photosynthesis. *Lactobacillus* species can protect the host plants from the attacks.

The utilization of those beneficial bacteria of single species is very promising to develop for practices of organic farming, and sustainable agriculture.

[9] Conclusion

Organic farming has been encouraged in many countries such as EU, USA, Japan and Vietnam. Practicing good organic farming has significant difficulties such as pest control without agrochemicals, nutrient supply without chemical fertilizer, seeds control without improvement of species and selective breeding. The *probiotic environmental agriculture* that promotes production and use of high quality compost from a large variety of organic wastes by a new composting technology. High quality compost contains nutrients that replace chemical fertilizer, and beneficial microorganisms that replace pesticides. The *probiotic environmental agriculture* promotes the use of beneficial bacteria of many species, that can promote growth of plants and suppress harmful bacteria, fungi, nematodes and insects. High quality compost can be produced by a hyper-thermophilic composting method that accumulates 'the good' bacteria in the product of composts. The good bacteria are belonging to *Bacillus* species *of Firmicutes, Actinomycetaceae species of Actinobacteria, Proteobacteria species, and Bacteroidetes species,* which are major members of rhizosphere bacteria. Single species of 'the good' bacteria, such as *Streptomycests spp. of Actinobacteria, Bacillus subtilis* of *Firmicutes, Lactobacillus species* of *Firmicutes,*, are commercially available as bio-pesticides. The probiotic environmental farming for sustainable Vietnamese agriculture has just started, which has an enormous possibility in the future.

Reference

(1) Taxnomy, https://en.wikipedia.org/wiki/Bacterial_taxonomy

(2) Kazuhiro Hirayama, Taxonomy of Human Intestinal Bacteria ,30:5-152016,

Journal of Intestinal Microbiology, Japan

(3) Daniela Numberger, Characterization of bacterial communities in wastewater with enhanced taxonomic resolution by full-length 16S rRNA sequencing, *Scientific Reports* volume 9, Article number: 9673 (2019)

(4) Qiuting Zhang, et al, High variations of methanogenic microorganisms drive full-scale anaerobic digestion process Volume 126, May 2019, Pages 543-551 Environment International

(5) Nataliya M. Shchegolkova, et al, Microbial community structure of activated sludge in treatment plants with different wastewater compositions. **Front. Microbiol. 7:90.** 10.3389. Published online 2016 Feb 18.

(6) Tairo Oshima and Toshiyuki Moriya, A Preliminary Analysis of Microbial and Biochemical Properties of High-Temperature Compost, Annals of the New York Academy of Sciences, 1125: 338–344 (2008).

(7) Takahiro Yoshii et al., Analysis of the predominant microflora in high temperature compost degrading middle gut gland of scallop", Extremophiles 2016, Sep.2016

(8) Lorena M. Lagos, et al., Current overview on the study of bacteria in the rhizosphere by modern molecular techniques: A mini-review, J. Soil Sci. Plant Nutr. [online]. 2015, vol.15, n.2, pp.504-523. Epub Apr 30, 2015. ISSN 0718-9516 .

(9) Lugtenberg, B., and Kamilova, F. ,Plant-growth- promoting rhizobacteria. Annu. Rev. Microbiol. 63, 541–556. 2009.

(10) Dilfuza Egamberdieva, **et al., Phytohormones and Beneficial Microbes: Essential Components for Plants to Balance Stress and Fitness**, Front. Microbiol., 31 October 2017 ,https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02104

(11) Fungus Wikipedia, the free encyclopedia, en.wikipedia.org/wiki/**Fungus**

(12) Mycorrhiza Wikipedia, the free encyclopedia, en.wikipedia.org/wiki/Mycorrhiza

(13) Anthony J De Lucca, Harmful fungi in both agriculture and medicine, Rev Iberoam Micol., 2007 Mar;24(1):3-13.

(14) Powdery mildew Wikipedia, the free encyclopedia, org/wiki/Powdery_mildew

(15) Archana Jain, et al.,**A review of plant leaf fungal diseases and its environment speciation,** Journal **Bioengineered** Volume 10, 2019 - Issue 1

(16) 吉田・坂井 [新・土の微生物（1）]—耕地・草地・林地の微生物。土壌微生物研究会編 pp42, 博文社、1997年、 Yoshida・Sakai「shin tsuchino biseibutsu(1)」—koochi・soochi・rinchi no biseibutsu - Dojobiseibutsu kenkyukai hen ,pp42, 1997

(17) Tomokazu Kawase, et al., Distribution and Phylogenetic Analysis of Family 19 Chitinases in *Actinobacteria, Applied and Environmental Biology -Genetics and Molecular Biology* , DOI: 10.1128/AEM.70.2.1135-1144.2004

(18) Marie-Ève Lacombe-Harvey, et al., Chitinolytic functions in actinobacteria: ecology, enzymes, and evolution, Appl Microbiol Biotechnol. 2018; 102(17): 7219–7230. Published online 2018 Jun 21. doi: 10.1007/s00253-018-9149-4

(19) J.J.Skujins,et al., Dissolution of fungal cell walls by a streptomycete chitinase and ß-(1→3) glucanase, Archives of Biochemistry and Biophysics, Volume 111, Issue 2, August 1965, Pages 358-364

(20) Kazuyoshi Chubachi,er al., Control of Root-knot Nematodes by Streptomyces: Screening of Root-knot Nematode-controlling Actinomycetes and Evaluation of Their Usefulness in a Pot Test, Vol,29.No.2 1999 Journal of The Japanese Nematological Society

(21) Sasser JN and Carter CC: Overview of the International *Meloidogyne* Project 1975–1984. In An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Edited by: Sasser JN, Carter CC. Raleigh: North Carolina State University Graphics; 1985:19-24.

(22) Biological Plant Diseases by Bacillus subtilis- basic and practical Applications by Makoto Shoda CRC Press,Tayler & Francis Group, 2020

(23) Pectobacterium carotovorum Wikipedia,thefreeencyclopedia, en.wikipedia.org/wiki/Pectobacterium carotovorum

(24) A Report of Research Center for Bioresoures of Kyoto Pref. May 25, **2015**

(25) Saburo Matsui, et al.,An Analytical Method of Auxin and Cytokinin Produced by Lactobacillus fermentum 403 -a Principle of Probiotic Environmental Agriculture, Japanese Society of Water Treatment Biology, Vol. 48, No.3, 117-123 , 2012

Written Sept.5, 2020

KHẢO SÁT HÀM LƯỢNG POLYPHENOL, FLAVONOID, TANNIN, ALKALOID VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA, KHÁNG VI KHUẨN GÂY BỆNH THỰC VẬT CỦA CAO CHIẾT NĂM LOÀI CÂY VÙNG ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Vũ Phan Thiên Nga, Lý Ngọc Phụng, Vũ Thị Hồng Nhung, Đào Thị Trúc Đào và Nguyễn Đức Độ

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

ABSTRACT

Biochemical characteristics and inhibitory effects against two phytopathogenic bacteria of crude extracts and their fractions from *Annona glabra, Passiflora foetida, Elaeocarpus hygrophilus Kurz., Phyllanthus amarus and Melastomas* sp.

This study is to evaluate some biochemical characteristics and inhibitory effects against two phytopathogenic bacteria (Klebsiella variicola and Erwinia sp.*) of methanolic and ethanolic crude extracts and their silica gel/liquid-liquid fractions from five indigenous plants (Annona glabra, Passiflora foetida, Elaeocarpus hygrophilus Kurz., Phyllanthus amarus and Melastomas* sp.*) under in vitro conditions. High concentrations of total phenolic, flavonoid, tannin and alkaloid contents were found in all extracts. These extracts exhibited strong antioxidant activities through reducing power, H_2O_2 scavenging and DPPH scavenging assays. Using the agar well diffusion assay, all extracts showed the antibacterial activites against two tested bacteria. Amongst those, fraction from Annona glabra showed the highest activity against Klebsiella variicola and Erwinia* sp. *at the concentration of 150 mg/mL and 100 mg/mL respectively.*

Keywords: *Antioxidant, antibacterial, fractions, phytopathogenic bacteria.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự đa dạng phong phú của vi khuẩn gây hại cho cây trồng đã và đang được nghiên cứu, cho đến nay ước tính có khoảng 150 loài được công bố. Bệnh cây do vi khuẩn gây ra nghiêm trọng nhất và thường xuyên nhất ở những vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, có điều kiện ấm và ẩm ướt lý tưởng cho sự phát triển của vi khuẩn (Kannan *et al.*, 2005). Từ những

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Đắc Khoa.

năm 80 của thế kỷ trước, các nhà khoa học trên thế giới ngày càng quan tâm đến việc tìm kiếm các chất kháng khuẩn có nguồn gốc thực vật, cũng như trong việc phân lập và xác định các thành phần có hoạt tính có thể sử dụng trong các chương trình quản lý dịch hại và bảo vệ cây trồng. Điều này chủ yếu là do các thuốc phòng trừ bệnh hại tổng hợp được biết là góp phần gây ra sự mất cân bằng sinh thái và ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Các hợp chất có nguồn gốc thực vật an toàn hơn với môi trường so với các hợp chất tổng hợp, vì chúng có thể phân hủy sinh học và không để lại dư lượng có hại. Các hợp chất được phân lập từ thực vật có thể được sử dụng trực tiếp làm hóa chất nông nghiệp tự nhiên hoặc chúng có thể trở thành nguyên liệu ban đầu hữu ích để tổng hợp các chất tương tự với các đặc tính sinh học và vật lý được cải thiện (Pretorius *et al.*, 2003). Cao thô vỏ cây *Annona glabra* trong hexane; cao thô lá *Phyllanthus amarus* trong methanol; cao phân đoạn lá và quả cây *Passiflora foetida*, cao thô lá cây *Elaeocarpus tuberculatus* (cây cùng họ với *Elaeocarpus hygrophilus* Kurz.), cao thô lá *Melastomas malabathricum* L. trong các dung môi khác nhau đều cho khả năng kháng dòng vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* (Padmaja *et al.* (1995), Mazumder *et al.* (2006), Patil và Paikrao (2012), Jayashree *et al.* (2018), Maji *et al.* (2010)). Các công bố ở Việt Nam về khả năng kháng dòng vi khuẩn *Erwinia* sp. của các loài cây được khảo sát trong bài còn hạn chế. Do đó, trong nghiên cứu này, hàm lượng các hợp chất thực vật có trong cao chiết năm loài thực vật bản địa vùng Đồng bằng sông Cửu Long và khả năng kháng oxy hóa, kháng khuẩn sẽ được tìm hiểu.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Các dòng vi khuẩn: Klebsiella variicola, Erwinia sp. được cung cấp bởi Phòng Thí nghiệm Protein và Sản phẩm tự nhiên, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

Hóa chất: Dung môi DMSO dùng để pha loãng cao chiết; kháng sinh Ampicillin làm đối chứng dương; Trypticase peptone, $K_2HPO_4.3H_2O$ (Trung Quốc), Yeast extract (Ấn Độ); Sodium chloride, Agar (Việt Nam).

Các nghiệm thức cao chiết được chiết xuất bằng các dung môi khác nhau như sau: cao thô lá cà na (*Elaeocarpus hygrophilus* Kurz.) trong ethanol; cao phân đoạn lỏng - lỏng dây nhãn lồng (*Passiflora foetida*) trong dichloromethane; cao phân đoạn sắc ký cột của lá bình bát (*Annona glabra*), thân lá cây diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus*) và lá mua (*Melastomas* sp.) trong methanol (Duy, 2020).

2.2. Định lượng các hợp chất thực vật có trong cao chiết

Định lượng polyphenol tổng được thực hiện theo mô tả của Huỳnh Thanh Duy *et al.* (2020). Định lượng flavonoid tổng được thực hiện theo mô tả của Chang *et al.* (2002) có hiệu chỉnh (0,25 mL dung dịch mẫu hoặc chất chuẩn (quercetin); 0,75 mL methanol; 0,05 mL $AlCl_3$ 10%; 0,05 mL CH_3COOK 1M và 1,4 mL nước khử ion, đo ở bước sóng 415 nm). Định

lượng tannin tổng được thực hiện theo mô tả của Laitonjam *et al.* (2013) có hiệu chỉnh (0,25 mL dung dịch cao chiết hoặc chất chuẩn (acid tannic); 0,25 ml nước khử và 0,25 mL dung dịch Folin- Ciocalteu 20%, đo ở bước sóng 700 nm). Định lượng alkaloid tổng được thực hiện theo mô tả của Shamsa *et al.* (2008) có hiệu chỉnh (1 mL dung dịch mẫu hoặc chất chuẩn (atropine); 1 mL HCl 2N; 3,5 mL Bromocresol Green (BCG); 5 mL dung dịch đệm phosphate (pH 4,7); 8 mL dung dịch chloroform, đo ở bước sóng 470 nm).

2.3. Khảo sát khả năng kháng oxy hóa của cao chiết

Thí nghiệm khử gốc peroxide H_2O_2, khử ion Fe^3, khử gốc tự do DPPH được thực hiện theo mô tả của Huỳnh Thanh Duy *et al.* (2020).

2.4. Khảo sát khả năng kháng khuẩn trên môi trường đĩa thạch

Thí nghiệm được thực hiện theo mô tả của Balouiri *et al.* (2016) có hiệu chỉnh. Chuẩn bị cao chiết nồng độ 100 mg/mL đối với *Erwinia* sp. và 300 mg/mL đối với *Klebsiella variicola* (riêng cao Bình bát ở nồng độ 150 mg/mL), đối chứng âm là DMSO 100%, đối chứng dương Ampicillin 4 mg/mL (*Klebsiella variicola*) hoặc 10 mg/mL (*Erwinia* sp.).

2.5. Xử lý số liệu

Kết quả thí nghiệm được xử lý bằng Microsoft 2013 và thống kê bằng phần mềm Minitab 16.0 với phân tích ANOVA, các giá trị trung bình được so sánh bằng kiểm định Tukey.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Định lượng polyphenol tổng, flavonoid tổng, tannin tổng và alkaloid tổng trong cao chiết

Dựa vào phương trình đường chuẩn của mỗi phương pháp, hàm lượng polyphenol tổng, flavonoid tổng, tannin tổng và alkaloid tổng được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Hàm lượng polyphenol tổng, flavonoid tổng, tannin tổng và alkaloid tổng có trong cao chiết

Cao chiết	Hàm lượng polyphenol tổng (mg GAE/g chiết xuất) (*)	Hàm lượng flavonoid tổng (mg QE/g chiết xuất) (*)	Hàm lượng tannin tổng (mg TAE/g chiết xuất) (*)	Hàm lượng alkaloid tổng (mg AE/g chiết xuất) (*)
Bình bát	85,63 ± 1,86^{d}	43,79 ± 2,59^{b}	83,97 ± 4,66^{d}	4,05 ± 0,43^{c}
Nhãn lồng	36,58 ± 5,39^{e}	197,4 ± 10,64^{a}	53,58 ± 0,82^{e}	51,63 ± 2,30^{a}
Cà na	217,63 ± 8,40^{b}	18,76 ± 2,03^{c}	283,33 ± 4,27^{b}	51,16 ± 0,43^{a}
Diệp hạ châu	294,24 ± 18,81^{a}	29,79 ± 1,07^{c}	421,33 ± 2,24^{a}	6,44 ± 3,33^{c}
Mua	144,95 ± 13,53^{c}	29,9 ± 1,36^{c}	187,74 ± 3,98^{c}	12,74 ± 1,70^{b}

Ghi chú: Các giá trị trong bảng này được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn của acid gallic: y = 0,0031x - 0,0094, R^2 = 0,9996; đường chuẩn của quercetin: y = 0,0059x + 0,024, R^2 = 0,9964; đường chuẩn của acid tannic: y = 0,0093x + 0,026, R^2 = 0,9992 và đường chuẩn atropine: y = 0,0009x + 0,0572, R^2 = 0,99. Hàm lượng polyphenol tổng, flavonoid tổng, tannin tổng và alkaloid tổng là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Trong cùng một cột, các số có ít nhất một chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% (*) qua kiểm định Tukey.

Hàm lượng polyphenol tổng và tannin tổng cao nhất ở lá diệp hạ châu đắng (294,24 mg GAE/g chiết xuất và 421,33 mg TAE/g chiết xuất). Ngược lại, hàm lượng của polyphenol tổng và tannin tổng trong dây nhãn lồng là thấp nhất (36,58 mg GAE/g chiết xuất và 53,58 mg TAE/g chiết xuất). Hàm lượng flavonoid tổng cao nhất ở dây nhãn lồng (197,4 mg QE/g chiết xuất) và thấp nhất ở lá cà na (18,76 mg QE/g chiết xuất). Hàm lượng alkaloid tổng cao nhất ở lá nhãn lồng và lá cà na (51,63 và 51,16 mg AE/g chiết xuất) trong khi đó thấp nhất ở lá bình bát nước (4,05 mg AE/g chiết xuất). Hàm lượng polyphenol tổng trong cao phân đoạn nhãn lồng (dung môi dichloromethane) thấp hơn so với các loại cao chiết còn lại (dung môi methanol và ethanol) có thể được giải thích bởi độ hòa tan thấp của polyphenol trong dung môi dichloromethane do sự tăng cường các liên kết hydro giữa polyphenol và protein trong dung môi. Hàm lượng flavonoid tổng của cao chiết nhãn lồng (dichloromethane) cao hơn các cao chiết còn lại cho thấy các loại cao chiết khảo sát có thể chứa nhiều flavonoid có cấu trúc aglycone hơn flavonoid glycoside (Felhi *et al.*, 2017). Bên cạnh đó, sự khác biệt về hàm lượng tannin tổng của các nghiệm thức, có thể là do độ hòa tan của tannin tương quan với mức độ trùng hợp với các dung môi là khác nhau (Naima *et al.*, 2015). Kết quả hàm lượng các chất này của 5 loại cao chiết khá cao khi so với những loài cây phổ biến như polyphenol, flavonoid và tannin trong trà xanh (Lassed *et al.*, 2017; Bizuayehu *et al.*, 2016) và alkaloid trong loài pogang gan (Phan Van Tan, 2018).

3.2. Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết

Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng oxy hóa thông qua khả năng khử H_2O_2, ion Fe^{3+} và gốc tự do DPPH được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Giá trị IC_{50} của cao chiết và vitamin C trong thí nghiệm kháng oxy hóa bằng phương pháp H_2O_2, khử ion Fe^{3+} và phương pháp DPPH

Cao chiết	Giá trị IC_{50} (µg/mL)		
	H_2O_2 (*)	Fe^{3+}(*)	DPPH (*)
Bình bát	106,72 ± 0,09^{b}	14,09 ± 1,78^{c}	17,13 ± 0,65^{b}
Nhãn lồng	76,70 ± 0,77^{d}	96,26 ± 9,70^{a}	768,81 ± 118.24^{a}
Cà na	45,73 ± 0,60^{e}	10,34 ± 0,47^{c}	7,93 ± 0,74^{b}
Diệp hạ châu	44,20 ± 0,13^{f}	9,13 ± 0,44^{c}	3,59 ± 0,05^{b}
Mua	91,58 ± 0,51^{c}	29,16 ± 0,42^{b}	8,32 ± 0,90^{b}
Vitamin C	116,12 ± 0,08^{a}	3,33 ± 0,36^{c}	1,53 ± 0,01^{b}

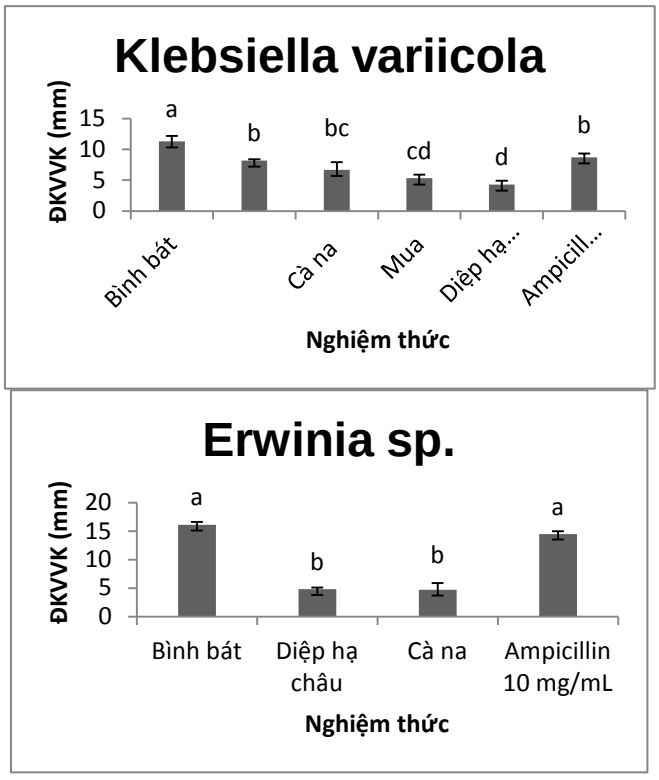
Ghi chú: Giá trị IC_{50} là giá trị của ba lần lặp lại, được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn của vitamin C: y = 0,2800x + 17,4893, R^2 = 0,9840 (thử nghiệm H_2O_2); y = 17,6815x - 8,8407, R^2 = 0,9922 (thử nghiệm Fe^{3+}); y = 33,193x - 0,7797, R^2 = 0,9948 (thử nghiệm DPPH). Trong cùng một cột, các số có ít nhất một chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% (*) qua kiểm định Tukey.

Khả năng khử gốc tự do H_2O_2 của các nghiệm thức cao chiết đều mạnh hơn vitamin C, mạnh nhất là nghiệm thức cây diệp hạ châu đắng (IC_{50} = 44,2 µg/mL), yếu nhất là cao bình bát (IC_{50} = 106,72 µg/mL). Tương tự, khả năng khử ion Fe^{3+} và gốc tự do DPPH mạnh nhất vẫn là cây diệp hạ châu đắng (giá trị IC_{50} là 9,13 và 3,59 µg/mL) và yếu nhất là dây nhãn lồng (giá trị IC_{50} là 96,26 và 768,81 µg/mL). Qua kết quả trên có thể thấy khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp khử ion Fe^{3+} và gốc tự do DPPH tương quan với hàm lượng polyphenol và tannin tổng trong cao chiết. Với trường hợp của dây nhãn lồng, tuy khả năng khử ion Fe^{3+} và gốc tự do DPPH là yếu nhất nhưng khả năng khử H_2O_2 lại khá mạnh có thể là do bên cạnh polyphenol và tannin, còn có các hợp chất khác có trong cao chiết này có đóng góp lớn trong khả năng khử H_2O_2. Điều này phù hợp với kết quả định lượng flavonoid và alkaloid tổng khi nghiệm thức cao chiết nhãn lồng cho hàm lượng hai hợp chất này cao nhất so với các nghiệm thức còn lại. Flavonoid đã được chứng minh là chất khử hiệu quả cao các phân tử oxy hóa nhất, bao gồm oxy đơn và các gốc tự do khác nhau (Nithya *et al.*, 2016). Gan *et al.* (2017) và Tiong *et al.* (2013) đã chứng minh mối tương quan giữa hợp chất alkaloid và khả năng kháng oxy hóa của cao phân đoạn từ trụ dưới lá mầm (hypocotyl) của củ Maca (*Lepidium meyenii*) và khả năng kháng oxy hóa của các hợp chất alkaloid từ lá dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don).

3.3. Khả năng kháng khuẩn của các loại cao chiết

Cả năm nghiệm thức cao chiết đều cho khả năng kháng *K. variicola* với ĐKVVK dao động từ 4,3 - 11,3 mm. Đối với vi khuẩn *Erwinia* sp., cả ba nghiệm thức khảo sát đều cho khả năng ức chế ở thời điểm 24 giờ với ĐKVVK dao động từ 4,7 - 16,1 mm. Cao phân đoạn từ lá bình bát nước cho khả năng ức chế cao nhất hai dòng vi khuẩn Gram âm thử nghiệm. Các nghiệm thức cao chiết cho thấy khả năng kháng hai dòng vi khuẩn khảo sát không tương quan với các thí nghiệm định lượng và kháng oxy hóa đã nêu. Nguyên nhân có thể là do trong các cao chiết này ngoài các chất nêu trên còn có các hợp chất khác có tính kháng khuẩn. Đặng Phúc Vinh (2019) đã định tính cao phân đoạn lá bình bát trong dung môi methanol còn có chứa các hợp chất như steroid, triterpenoid, quinone, carotenoid và saponin bên cạnh các hợp chất được định lượng đã nêu. Theo Cowan (1999), các hợp chất steroid, triterpenoid, quinone, carotenoid và saponin đều có khả năng kháng khuẩn theo các cơ chế khác nhau như tác động lên màng tế bào hay protein, phá vỡ DNA của vi khuẩn. Từ kết quả thí nghiệm trên cho thấy không thể hoàn toàn dựa vào định lượng một hoặc hai hợp chất tự nhiên có trong cao chiết hoặc khả năng kháng oxy hóa của chúng để đánh giá khả năng kháng vi sinh vật của cao chiết thực vật bởi các loài thực vật bao gồm nhiều loại hợp chất tự nhiên khác nhau. Khả năng kháng khuẩn của các loài thực vật có thể

là do tác động cộng gộp của nhiều yếu tố khác nhau. Hoạt tính sinh học của cao chiết thực vật phụ thuộc vào sự tổng hợp phức tạp của các đặc tính riêng lẻ bao gồm thành phần hóa học, cấu trúc các hợp chất có trong cao chiết, ái lực với vị trí mục tiêu, khả năng tồn tại trong hệ thống sinh học, đặc tính vận chuyển và trạng thái của sinh vật mục tiêu (Araújo *et al.*, 2012). Bên cạnh đó, các phân tích thành phần hóa học trong thực vật đã chỉ ra rằng các protein hoặc peptide nhỏ đóng một vai trò quan trọng như một hệ thống phòng thủ chống lại vi khuẩn ở thực vật. Hệ thống phòng thủ của thực vật giúp bảo vệ chúng khỏi sự xâm lược của các vi sinh vật tiềm ẩn. Các loài thực vật này tiết ra một số protein hoặc peptide và carbohydrate có cơ chế bảo vệ cụ thể chống lại vi khuẩn gây bệnh bằng cách kìm hãm sự phát triển của chúng. Cơ chế hoạt động của chúng có thể là sự hình thành các kênh ion trong màng tế bào vi sinh vật hoặc ức chế cạnh tranh sự bám dính của các protein vi sinh vật vào các thụ thể polysaccharide của vật chủ. Ngoài ra, khi cây trồng đối mặt với mầm bệnh, chúng tiết ra các chất chuyển hóa thứ cấp có trọng lượng phân tử thấp có khả năng kháng khuẩn đã biết như phytoalexin hoặc tổng hợp của nhiều protein liên quan đến phòng vệ giả định (Naqvi *et al.*, 2011).



Hình 1. Giá trị đường kính vòng vô khuẩn của các nghiệm thức cao chiết đối với *Klebsiella variicola* và *Erwinia* sp. ở thời điểm 24 giờ

Ghi chú: ĐKVVK là đường kính vòng vô khuẩn

IV. KẾT LUẬN

Khảo sát định lượng cho thấy tất cả cao chiết năm loài thực vật đều có hàm lượng các hợp chất tự nhiên như polyphenol, flavonoid, tannin và alkaloid khá cao và hoạt tính kháng oxy hóa ở cả 3 phương pháp khử ion Fe^{3+}, gốc tự do DPPH và H_2O_2 đều khá mạnh. Các loại cao chiết đều có khả năng ức chế hai dòng vi khuẩn khảo sát là *Klebsiella variicola* và *Erwinia* sp.. Qua đó có thể thấy rằng, các hợp chất tự nhiên có trong các loại cao chiết cho khả năng ức chế hai dòng vi khuẩn gây bệnh trên cây trồng trong điều kiện *in vitro*. Đây là tiền đề để dùng cho các nghiên cứu sâu hơn cũng như ứng dụng vào nền nông nghiệp bền vững trong khía cạnh quản lý bệnh hại cây trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Avijit Mazumder, Arun Mahato, Rupa Mazumder (2006). Antimicrobial potentiality of *Phyllanthus amarus* against drug resistant pathogens. Natural Product Research, Vol. 20, No. 4, April 2006, 323 - 326.
2. Chia-Chi Chang, Ming-Hua Yang, Hwei-Mei Wen và Jiing-Chuan Chern (2002). Estimation of total flavonoid content in Propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 10, No. 3, 2002, Pages 178 - 182.
3. Dereje Bizuayehu, Minaleshewa Atlabachew, Mirtachew Tihar Ali (2016). Determination of some selected secondary metabolites and their invitro antioxidant activity in commercially available Ethiopian tea (*Camellia sinensis*).
4. Fazel Shamsa, Hamidreza Monsef, Rouhollah Ghamooshi, Mohammadreza Verdian-rizi. (2008). Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. Thai J. Pharm. Sci. 32 (2008) 17 - 20.
5. Huynh Thanh Duy, Nguyen Van Thanh, Le Nhu Thuy, Nguyen Trieu Nhat Uyen, Nguyen Duc Do (2020). Determination of total polyphenol, saponin contents, antioxidant and antibacterial activities of *Melastoma malabathricum* leaves by liquid-liquid extraction. Can Tho University Journal of Science.
6. Indhiramuthu Jayashree, Geetha DH, Rajeswari M. (2018). In vitro anti-microbial activity of *Elaeocarpus tuberculatus* Roxb. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 49(1), March - April 2018; Article No. 08, Pages: 50 - 54.
7. JC Pretorius, S Magama, PC Zietsman (2003). Growth inhibition of plant pathogenic bacteria and fungi by extracts from selected South African plant species. South African Journal of Botany 2003, 69(2): 186 - 192.
8. Jin Gan, Ying Feng, Zhao He, Xian Li, Hong Zhang (2017). Correlations between Antioxidant Activity and Alkaloids and Phenols of Maca (*Lepidium meyenii*). Journal of Food Quality, Volume 2017, https://doi.org/10.1155/2017/3185945.
9. Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo, Felipe Hilário, Wagner Vilegas, Lourdes Campaner dos Santos, Iguatemy Lourenço Brunetti, Claudia Elena Sotomayor, Tais Maria Bauab. (2012). Correlation among Antioxidant, antimicrobial, hemolytic, and antiproliferative properties of *Leiothrix spiralis* leaves extract. Int. J. Mol. Sci. 2012, 13, 9260-9277; doi:10.3390/ijms13079260.
10. Marjorie Murphy Cowan (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Rev. 1999 Oct; 12(4): 564 - 582.
11. Mounyr Balouiri, Moulay Sadiki, Saad Koraichi Ibnsouda (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, Volume 6, Issue 2, Pages 71 - 79.
12. Nithya TG, Jayanthi J, Ragunathan MG (2016). Antioxidant activity, total phenol, flavonoid, alkaloid, tannin, and saponin contents of leaf extracts of *Salvinia molesta* D. S. Mitchell (1972). Asian J Pharm Clin Res, Vol 9, Issue 1, 2016, 200 - 203.

13. Patil A.S. và Paikrao H.M. (2012). Bioassay guided phytometabolites extraction for screening of potent antimicrobials in *Passiflora foetida* L. Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 2 (9), pp. 137 - 142.
14. Phan Van Tan (2018). The determination of total alkaloid, polyphenol, flavonoid and saponin contents of Pogang gan (*Curcuma* sp.). International Journal of Biology; Vol. 10, No. 4; 2018.
15. Rhazi Naimaa, M. Oumama, H. Hannachea, A. Sesboue, B. Charrier, A. Pizzi, F. Charrier - El Bouhtoury (2015). Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan *Acacia mollissima* barks. Industrial Crops and Products, Volume 70, August 2015, Pages 245 - 252.
16. Samir Felhi, Amal Daoud, Hafedh Hajlaoui, Kais Mnafgui, Néji Gharsallah, Adel Kadri (2017). Solvent extraction effects on phytochemical constituents profiles, antioxidant and antimicrobial activities and functional group analysis of *Ecballium elaterium* seeds and peels fruits. Food Science and Technology.
17. S. Habib Naqvi, M. Umar Dahot, M. Rafiq, M. Yakoub Khan, Imran Ibrahim, Khalid H. Lashari, Asghar Ali, A. L. Korai (2011). Anti-microbial efficacy and biochemical analysis from different parts of *Acacia nilotica* L. and *Ricinus communis* L. extracts. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(27), pp. 6299 - 6308.
18. Somia Lassed, Cláudia M. Deus, Radja Djebbari, Djamila Zama, Paulo J. Oliveira, Albert A. Rizvanov, Abderrezak Dahdouh, Fadila Benayache, Samir Benayache (2017). Protective effect of green tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) against prostate cancer: from in vitro data to Algerian patient. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.
19. Soon Huat Tiong, Chung Yeng Looi, Hazrina Hazni, Aditya Arya, Mohammadjavad Paydar, Won Fen Wong, Shiau-Chuen Cheah, Mohd Rais Mustafa, Khalijah Awang (2013). Antidiabetic and antioxidant properties of alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Molecules 2013, 18, 9770-9784; doi:10.3390/molecules18089770.
20. S. Maji, P. Dandapat, D. Ojha, C. Maity, S.K. Halder, P.K. Das Mohapatra, T.K. Pathak, B.R. Pati, A. Samanta, K.C. Mondal (2010). In vitro antimicrobial potentialities of different solvent extracts of ethnomedicinal plants against clinically isolated human pathogens. Journal of Phytology 2010, 2(4): 57-64.
21. Velu Rajesh Kannan, Kubilay Kurtulus Bastas, Robert Antony (2005). Plant pathogenic bacteria: An overview. Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria, pp.1 - 16.
22. V. Padmaja, V. Thankamany, N. Hara, Y. Fujimoto, A. Hisham (1995). Biological activities of *Annona glabra*. Journal of Ethnopharmacology 48 (1995) 21 - 24.
23. Warjeet Laitonjam, Satyavama D Asem, R. Yumnam, Satyavama D Asem, Wangkheirakpam Sujata (2013). Evaluative and comparative study of biochemical, trace elements and antioxidant activity of *Phlogacanthus pubinervius* T. Anderson and *Phlogacanthus jenkinsii* C. B. Clarke leaves. Indian Journal of Natural Products and Resources 4(1):67 - 72.

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM *Pyricularia oryzae* GÂY BỆNH ĐẠO ÔN TRÊN CÂY LÚA CỦA CÁC CAO DỊCH CHIẾT THẢO MỘC TRONG ĐIỀU KIỆN invitro

Nguyễn Thị Thu Thủy[1], Nguyễn Thanh Hải[2], Nguyễn Tiến Long[3], Nguyễn Thị Ái Nhung[2]

[1] Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế
[2] Khoa Hóa, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế
[3] Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế
E-mail: nguyenthithuthuy@huaf.edu.vn

ABSTRACT

Effects of the methanolic leaves extract against rice blast disease in *in vitro*

Rice blast disease, caused by Pyricularia oryzae, is one of the most serious biotic threats to rice (Oryza sativa L.) production worldwide. The disease causes severe yield losses in Vietnam especially in epidemic years. The effect of the methanolic leaves extract from betle and Cleistocalyx operculatus leaves against rice blast fungus was demostrated in invitro. Five concentrations of four types of methanolic leaves extract exhibited a significant inhibition of P. oryzae hyphal growth. While The betle leave extract was strong inhibition on the mycelium growth of P. oryzae at 100, 150, 200, 250 and 300mg/100ml, Cleistocalyx operculatus leave extract was highly efficient at 150, 200, 250 and 300 mg/100ml. The current study indicated a new orientation in the use of Piper betle and Cleistocalyx operculatus extract for control rice blast in the future.

Keywords: *Piper betle extract, Cleistocalyx operculatus extract, Rice, Pyricularia oryzae.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Pyricularia oryzae thuộc lớp Nấm túi (*Ascomycetes*), là tác nhân gây bệnh đạo ôn và là một trong những nguyên nhân gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng nhất trên toàn thế giới (Ou, 1980). Khi cây lúa bị nhiễm bệnh, tất cả các mô lá có thể bị nấm tấn công, đặc biệt là khi bệnh gây hại trên bông có thể dẫn đến mất hoàn toàn năng suất của lúa gạo. Thiệt hại trung bình của bệnh khoảng 20 - 60%, ở những vùng bị nhiễm nặng, có thể mất năng suất hoàn toàn (Zeigler *và cs.*, 1994). Thuốc trừ nấm là biện pháp chủ yếu thường được sử dụng

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Vĩnh Trường.

để kiểm soát bệnh đạo ôn, tuy nhiên, sử dụng thuốc trừ nấm thường gây ra hiện tượng kháng thuốc, đồng thời dư lượng của thuốc còn ảnh hưởng đến sức khỏe con người và gây ô nhiễm môi trường (Minh Tường Le *và cs.*, 2010). Thực vật đang ngày càng chứng minh được vai trò quan trọng của chúng trong nền công nghiệp dược phẩm như là một giải pháp thay thế cho các thuốc hóa học tổng hợp. Trong những năm gần đây, các nguồn dược liệu từ thực vật và các chế phẩm thực vật, ngày càng được các nhà nghiên cứu trong và ngoài nước quan tâm nhằm tìm kiếm các dược tính và công dụng của chúng. Sự kháng thuốc của dịch hại ngày càng trở nên nghiêm trọng trong việc quản lý dịch hại cây trồng trên toàn thế giới. Thực vật được xem như là một trong những nguồn thay thế lý tưởng vì mức độ an toàn, không hoặc ít phản ứng phụ, và có nhiều cơ chế tác động khác nhau lên tế bào vi khuẩn nên ít có nguy cơ gây ra sự kháng thuốc (Raskin *và cs.*, 2002; Ahn *và cs.*, 1994).

Trong xu hướng sản xuất nông nghiệp sạch ngày nay thì biện pháp sinh học rất được quan tâm, có nhiều nghiên cứu gần đây đã ghi nhận các hoạt chất được chiết xuất từ thảo mộc có thể hạn chế sự phát triển của nấm gây hại cây trồng như: hoạt chất curcumin có trong nghệ có tác dụng ức chế sự phát triển của nấm bệnh *Colletotrichum capsici* (Jung Young *et al.*, 2006), hoạt chất saponin và polyphenol trong lá cỏ tranh lá mua và diệp hạ châu đắng có thể ức chế các nấm sợi gây bệnh cây như *Rhizoctonia*,sp., *Sclerotium* sp., *Colletotrichum* sp., *Rhizopus* sp (Nguyễn Đực Độ *và cs.*, 2019). Do đó việc tiến hành sàng lọc các loại thảo dược có tiềm năng để ứng dụng trong phòng trừ bệnh cho cây trồng là một trong những hướng đi mới. Trong phạm vi nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá khả năng ức chế của 4 loại thảo dược truyền thống của Việt Nam đối với nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Nghiên cứu được thực hiện trên năm loại thảo dược ở Thừa Thiên Huế bao gồm: sống đời (*Kalanchoe pinnata*), rau tần (*Plectrabthus amboinicus*), trầu không (*Piper betle*), vối (*Cleistocalyx operculatus).*

- Nguồn *Pyricularia oryzae* được phân lập, làm thuần từ cây lúa bị bệnh đạo ôn tại Thừa Thiên Huế và được bảo quản ở phòng nghiên cứu bệnh cây, Bộ môn Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp bố trí thí nghiệm:

Mỗi dịch chiết là một thí nghiệm khác nhau, với 5 nồng độ. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, gồm 6 công thức, trong đó 5 công thức là 5 nồng độ khác nhau, công thức 6 không có chế phẩm làm đối chứng. Mỗi công thức được nhắc lại 3 lần, mỗi lần nhắc lại gồm 5 đĩa petri.

Bảng 1. Công thức thí nghiệm

TT	Công thức thí nghiệm	Nồng độ (mg cao/100 ml nước)
1	CT 1 (ĐC)	0
2	CT 2	100
3	CT 3	150
4	CT 4	200
5	CT 5	250
6	CT 6	300

- Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của các chế phẩm thảo mộc khác nhau đến sự sinh trưởng của nấm Pyricularia oryzae:

100 ml môi trường PDA có bổ sung các nồng độ của các chế phẩm thảo mộc: Trầu không, vối, cỏ hôi, sống đời, rau tần. Các khoanh nấm đạo ôn được nuôi cấy ở 7 ngày tuổi có đường kính 5 mm được cấy vào trung tâm đĩa pêtri (Ø = 9 mm) chứa môi trường và thảo dược và để trong điều kiện nhiệt độ 28^{o}C. Theo dõi đường kính tản nấm *P. oryzea* sau 3 - 5 ngày nuôi cấy (Elamawi và El-Shafey, 2013). Khả năng kháng nấm của chế phẩm thảo mộc được xác định như sau:

$$HLUC\ (\%) = ((D-d)/D) \times 100$$

Trong đó: D (mm) là đường kính khuẩn lạc nấm trên môi trường PDA không bổ sung chế phẩm thảo mộc (đối chứng);

d là đường kính khuẩn lạc nấm trên môi trường PDA có bổ sung các loại chế phẩm thảo mộc khác nhau.

- Phương pháp xử lí số liệu:

Các số liệu thu thập được phân tích phương sai một nhân tố và sai khác giữa các nghiệm thức được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2007 và phần mềm Stastitix 10.0.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

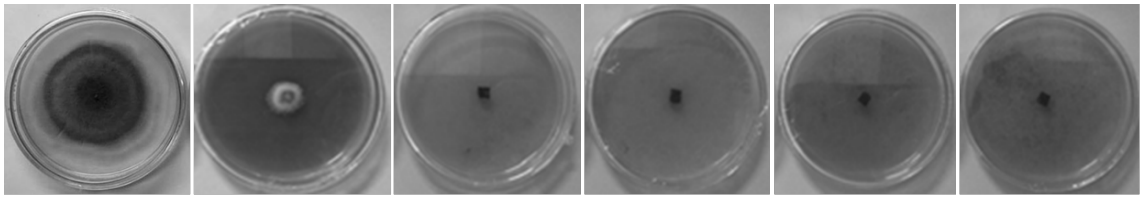
3.1. Ảnh hưởng của cao dịch chiết trầu không đến sự phát triển của nấm *Pyricularia oryzae*

Ảnh hưởng của nồng độ cao dịch chiết trầu không đến đường kính tản nấm trong thí nghiệm được trình bày ở Bảng 1 và Hình 1. Kết quả cho thấy nồng độ cao dịch chiết trầu càng tăng, môi trường nuôi cấy nấm trong đĩa petri càng đậm màu, đồng thời cũng cho thấy ở các nồng độ cao dịch chiết khác nhau, khả năng ức chế sự phát triển của tản nấm là khác nhau. Đường kính tản nấm giảm dần theo chiều tăng nồng độ cao dịch chiết trầu (Hình 1).

Bảng 1. Hiệu lực ức chế của nồng độ cao dịch chiết trầu không đến phát triển của nấm P. oryzae

Nồng độ (mg cao/100 ml nước)	Đường kính tản nấm (mm)			Hiệu lực ức chế (%)		
	3 NSC	5 NSC	7 NSC	3 NSC	5 NSC	7 NSC
0	38,5^{a}	67,0^{a}	78,5^{a}	-	-	-
100	15,1^{b}	19,0^{b}	23,2^{b}	60,7	71,6	70,4
150	0,0^{c}	0,0^{c}	0,0^{c}	100	100	100
200	0,0^{c}	0,0^{c}	0,0^{c}	100	100	100
250	0,0^{c}	0,0^{c}	0,0^{c}	100	100	100
300	0,0^{c}	0,0^{c}	0,0^{c}	100	100	100

Ghi chú: NSC: ngày sau cấy; *: các giá trị trung bình đường kính tản nấm theo cột có các chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P \leq 0,05$.



Hình 1. Hiệu lực ức chế của nồng độ cao dịch chiết trầu không đối với nấm *Pyricularia oryzae*

Đường kính hệ sợi nấm ở 7 ngày sau cấy giao động từ 0,0 đến 78,5 mm, các công thức có sự khác nhau ở mức có ý nghĩa thống kê. Trong đó công thức đối chứng có đường kính tản nấm cao nhất và các công thức nồng độ 150, 200, 250, 300 mg có đường kính tản nấm bằng nhau và đều bằng 0. Hiệu lực ức chế đến sinh trưởng của nấm *P. oryzae* ở nồng độ 100 mg là 70,4%, hiệu lực ức chế của các nồng độ từ 150 mg trở lên đạt 100%. Điều này cho thấy, cao dịch chiết trầu có khả năng ức chế sự phát triển đường kính tản nấm *P. oryzae*, khả năng ức chế này tốt nhất ở môi trường PDA có bổ sung 150 mg cao dịch chiết trầu trở lên. (Hình 2). Nhiều nghiên cứu cho thấy trong lá trầu không chứa các hoạt chất hydroxychavicol, hydroxychavicol acetate, allypyrocatechol, chavibetol, piperbetol, methylpiperbetol, piperol A và piperol B có tác dụng kháng nấm và vi khuẩn rất mạnh (Kumar *và cs.*, 2010; Singburaudom, 2015). Theo Singburaudom (2015), dịch chiết thô từ lá trầu không có khả năng ức chế tốt sự nảy mầm của bào tử và sự phát triển sợi nấm của một số loại nấm hại cây trồng như *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *C. capsici* và *P. oryzae*. Khi sử dụng dịch chiết lá trầu không ở nồng độ pha loãng 1% đã ức chế 100% sự phát triển sợi nấm của 4 loại nấm trên trong điều kiện invitro.

3.2. Ảnh hưởng của cao dịch chiết vối không đến sự phát triển của nấm *Pyricularia oryzae*

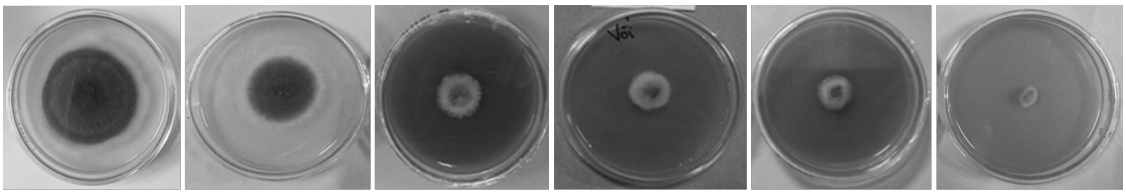
Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của các nồng độ cao dịch chiết vối đến sự phát triển của nấm *P. oryzae* được trình bày ở Bảng 2 và Hình 2.

Bảng 2. Hiệu lực ức chế của nồng độ cao dịch chiết vối đến phát triển của nấm P. oryzae

Nồng độ (mg cao/100 ml nước)	Đường kính tản nấm (mm)			Hiệu lực ức chế (%)		
	3 NSC	5 NSC	7 NSC	3 NSC	5 NSC	7 NSC
0	38,5^{a}	67,0	78,4	-	-	-
100	23,4^{b}	38,6	39,5	39,2	42,3	49,6
150	18,4^{bc}	28,4	29,7	52,2	57,6	62,1
200	10,8^{c}	21,4	27,6	71,9	68,0	64,8
250	7,4	15,2	19,9	80,7	77,3	74,6
300	0,0	4,4	7,2	100,0	93,4	90,8

Ghi chú: Các giá trị trung bình số lượng bào tử nấm theo cột có các chữ cái in thường khác nhau sai khác ở $P \leq 0,05$.

Ở thời gian 7 ngày sau cấy, đường kính tản nấm ở các công thức thí nghiệm dao động từ 7,2 - 78,4 mm, trong đó đường kính lớn nhất là ở công thức đối chứng và đường kính thấp nhất là ở công thức 300 mg cao dịch chiết vối. Hiệu lực ức chế sự phát triển của nấm *P. oryzae* ở nồng độ khác nhau là khác nhau, hiệu lực ức chế tăng dần theo chiều tăng của nồng độ cao dịch chiết vối. Hiệu lực ức chế đạt cao ở nồng độ 250 mg là 74,6% và đạt cao nhất ở nồng độ 300 mg (90,8%).



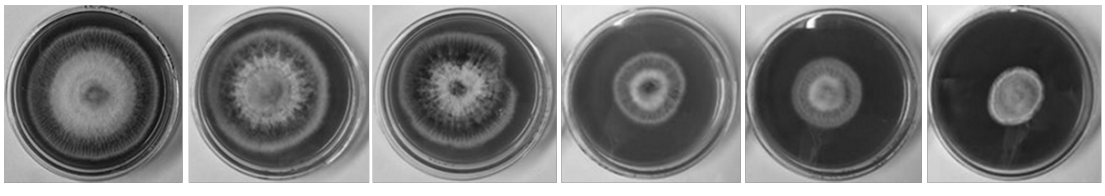
Hình 2. Hiệu lực ức chế của nồng độ cao dịch chiết vối đối với nấm *Pyricularia oryzae*

3.3. Ảnh hưởng của cao dịch chiết sống đời đến sự phát triển của nấm *Pyricularia oryzae*

Ảnh hưởng của nồng độ cao dịch chiết sống đời đến đường kính tản nấm trong thí nghiệm được trình bày ở Bảng 3. Kết quả cho thấy kích thước tản nấm giảm dần theo chiều tăng nồng độ của cao dịch chiết sống đời (Hình 3).

Bảng 3. Hiệu lực ức chế của nồng độ cao dịch chiết sống đời đến phát triển của nấm P. oryzae

Nồng độ (mg cao/100 ml nước)	Đường kính tản nấm (mm)			Hiệu lực ức chế (%)		
	3 NSC	5 NSC	7 NSC	3 NSC	5 NSC	7 NSC
0	38,5^{a}	67,0^{a}	80,1^{a}	-	-	-
100	35,1^{a}	60,0^{a}	74,5^{a}	8,8	10,4	6,9
150	32,9^{a}	57,4^{a}	69,3^{a}	15,5	14,3	13,4
200	30,5^{a}	51,8^{a}	65,8^{a}	20,7	22,6	17,8
250	29,2^{a}	51,2^{a}	63,2^{a}	24,1	23,5	21,1
300	22,6^{b}	45,2^{c}	56,1^{b}	41,3	32,5	29,9



Hình 3. Hiệu lực ức chế của nồng độ cao dịch chiết sống đời đối với nấm *Pyricularia oryzae*

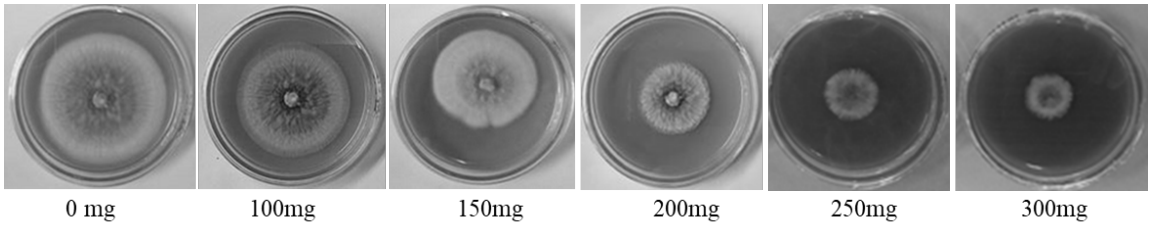
Ở thời gian 7 ngày sau cấy, đường kính tản nấm ở các công thức thí nghiệm dao động từ 56,1 - 80,1 mm, trong đó đường kính lớn nhất là ở công thức đối chứng và đường kính thấp nhất ở nồng độ 300 mg/100 ml. Hiệu lực ức chế của các nồng độ cao dịch chiết sống đời không cao, thấp hơn nhiều so với cao dịch chiết vối và trầu không. Nồng độ giao động từ 6,9 - 29,9%, ở nồng độ 300 mg/100 ml chỉ đạt 29,9%. Điều này cho thấy cao dịch chiết sống đời không có khả năng ức chế sự phát triển của nấm gây bệnh đạo ôn trong điều kiện invitro.

3.4. Ảnh hưởng của cao dịch chiết rau tần đến sự phát triển của nấm *Pyricularia oryzae*

Ảnh hưởng nồng độ cao dịch chiết rau tần đến đường kính tản nấm trong thí nghiệm được trình bày ở Bảng 4 và Hình 4. Ở thời gian 7 ngày sau cấy, đường kính tản nấm ở các công thức thí nghiệm dao động từ 50,0 - 78,8 mm, trong đó đường kính lớn nhất là ở công thức đối chứng, và đường kính nhỏ nhất ở nồng độ 300 mg/100 ml. Hiệu lực ức chế khác nhau ở nồng độ khác nhau. Hiệu lực giao động từ 7,3 - 35,4%, hiệu lực ức chế đạt cao nhất ở nồng độ 300 mg/100 ml. So sánh với các cáo dịch chiết khác trong thí nghiệm cho thấy, cao dịch chiết rau tần có hiệu lực ức chế nấm gây bệnh đạo ôn cao hơn cao dịch chiết sống đời, nhưng thấp hơn nhiều so với cao dịch chiết trầu không và vối.

Bảng 4. Hiệu lực ức chế của nồng độ cao dịch chiết rau tần đến phát triển của nấm P. oryzae

Nồng độ (mg cao/100 ml nước)	Đường kính tản nấm (mm)			Hiệu lực ức chế (%)		
	3 NSC	5 NSC	7 NSC	3 NSC	5 NSC	7 NSC
0	38,7	67,6	78,8	-	-	-
100	36,6	61,8	73,0	5,4	8,5	7,3
150	32,6	53,7	66,8	15,7	20,5	15,2
200	29,4	50,2	61,2	24,0	25,7	22,3
250	27,2	47,6	57,8	29,7	29,5	26,6
300	25,8	44,6	50,9	33,3	34,0	35,4



Hình 4. Hiệu lực ức chế của nồng độ cao dịch chiết rau tần đối với nấm *Pyricularia oryzae*

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Trong 4 loại cao dịch chiết thử nghiệm cho thấy, cao dịch chiết trầu không có hiệu lực ức chế nấm gây bệnh đạo ôn cao nhất, tiếp đến là cao dịch chiết lá vối, 2 cao dịch chiết sống đời và rau tần có hiệu lực ức chế thấp. Cao dịch chiết trầu không ở nồng độ 150 mg/100 ml trở lên có hiệu lực ức chế nấm *P. oryzae* cao nhất là 100%, cao dịch chiết vối có hiệu lực ức chế sự phát triển nấm gây bệnh đạo ôn ở nồng độ 250 mg và 300 mg/100 ml lần lượt là 74,6 và 90,6%.

4.2. Đề nghị

Tiếp tục đánh giá ảnh hưởng cao dịch chiết trầu không và lá vối đến sự phát sinh gây bệnh của nấm *Pyricularia oryzea* ở điều kiện ngoài đồng ruộng để có thể sử dụng phòng trừ bệnh đạo ôn trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ahn, Y.J., J.H. Kwon, S.H. Chae, J.H. Park, J.Y. Yoo. (1994). Growth-inhibitory responses of human intestinal bacteria to extracts of oriental medicinal plants, Microbial Ecology in Health Disease, vol. 7, no. 5, pp. 257 - 26, 1994.
2. Kumar, N., Misra, P., Dube, A., Bhattacharya, S., Dikshit, M. and Ranade, S. (2010). Piper betel Linn. A maligned Pan-Asiatic plant with an array of pharmacological activities and prospects for drug discovery. Current Sciences, 99: 922 - 932.
3. Minh Tuong Le, Tsutomu Arie, Tohru Teraoka. (2010). Population dynamics and pathogenic races of rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* in the Mekong Delta in Vietnam. Journal of General Plant Pathology, 76:177 - 182.
4. Ou, S.H. (1980). Pathogen variability and host resistance in rice blast disease. Annual Review of Pathology, 18, 167 - 187.
5. Raskin, I, D.M. Ribnicky, S. Komarnytsky, N. Ilic, A. Poulev, N. Borisjuk, A. Brinker, D. A. Moreno, C. Ripoll, N. Yakoby, J.M. O'Neal, T. Cornwell, I. Pastor, B. Fridlender. (2002). Plants and human health in the twenty-first century, Trends Biotechnology, vol. 20, no. 12, pp. 522 - 531, 2002.
6. Singburaudom, N. (2015). Hydroxychavicol from Piper betel leave is an antifungal activity against plant pathogenic fungi. Journal of Bio-pesticides, 8(2), 82 - 92.
7. Zeigler RS, Couc XL, Scott RP. (1995). The relationship between lineage and virulence in *P. grisea* in Philippines. Phytopathology 85:443 - 451.

KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM CHIẾT XUẤT TỪ CÂY SẢ CHANH (*Cymbopogon citratus)* PHÒNG TRỪ TUYẾN TRÙNG *Meloidogyne incognita* GÂY HẠI CÀ PHÊ TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

Trần Thị Thường, Nguyễn Xuân Hòa

Bộ môn Hệ thống Nông nghiệp,
Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên

ABSTRACT

Results of lemon grass (*Cymbopogon citratus*) extract to control *Meloidogyne incognita* that attacks coffee in the laboratory

Plant extracts are, nowadays, extensively used as environment friendly approaches for biological control of parasitic pests, including the root-knot nematodes, instead of using chemical pesticides. Study results of WASI in 2019 showed that lemon grass extract (Cymbopogon citratus) used 80% ethanol solvent had higher effect of killing nematodes than distilled water solvent. The effect of extract of lemon grass of 80% ethanol for nematode killing increased with the increase of extraction concentrations. However, maximum nematode mortality percentage was observed in Cymbopogon citratus extract at 1.000 ppm after 24 hours of exposure time in the laboratory. The results show that lemon grass extract is potential for developing biological products to control Meloidogyne incognita.

Keywords: *Lemon grass extract, Cymbopogon citratus, control, Meloidogyne incognita.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tuyến trùng ký sinh thực vật nói chung và *Meloidogyne* spp. nói riêng là đối tượng gây hại chính và nguy hiểm hiện nay đối cây cà phê nói riêng và nhiều loại cây trồng nói chung. Đối với cây cà phê tuyến trùng gây bệnh vàng lá thối rễ là bệnh hại phổ biến và quan trọng hiện nay. Có nhiều biện pháp phòng trừ khác nhau, trong đó biện pháp hóa học vẫn là biện pháp chính. Tuy nhiên việc lạm dụng thuốc hóa học đã để lại nhiều hệ lụy như: làm ô nhiễm môi trường, có thể gây nên sự bùng phát dịch hại và tính kháng thuốc. Trong xu hướng phát triển nền nông nghiệp bền vững, việc nghiên cứu, ứng dụng các biện pháp sinh học vào sản xuất đã và đang được chú trọng nghiên cứu và đưa vào sử dụng. Đặc biệt, trong những năm gần đây sử dụng chiết xuất từ thực vật là một trong các biện pháp đánh giá có hiệu quả và có triển vọng lớn trong phòng

Người phản biện: ThS. Đào Thị Lan Hoa.

trừ tuyến trùng. Kết quả tổng hợp các nghiên cứu trên thế giới cũng như ở Việt Nam cho thấy một số loại thực vật như cây dã quỳ, quế, giẻ gỗ (cây bạch đàn)... chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học có tiềm năng phòng trừ tuyến trùng *Meloidogyne* spp. cao.

Theo Patidar *và ctv.*, 2016 cho thấy chiết xuất từ các loài sả (*Cymbopogon citratus*) và (*Cymbopogon martini*) có hiệu quả kiểm soát trứng nở trên 50%; diệt trên 80% tuyến trùng *Meloidogyne incognita* gây hại cà chua ở nồng độ 500 ppm. Chiết xuất từ lá và rễ của cây sả (*Cymbopogon citratus)* cũng kiểm soát được tuyến trùng *Meloidogyne* trong đất và rễ của rau chi sâm mùng tơi *(Talinum triangulare)* cao hơn so với carbofuran (Nwauzoma & Adeleke, 2017). Do đó chúng tôi nghiên cứu thử nghiệm chiết xuất sả phòng trừ tuyến trùng *Meloidogyne* spp. gây hại cây cà phê trong phòng thí nghiệm.

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Đối tượng

Cây sả chanh (*Cymbopogon citratus)* và tuyến trùng *Meloidogyne incognita.*

2.2. Nội dung

Đánh giá hiệu quả phòng trừ tuyến trùng *Meloidogyne incognita* gây hại cà phê của chiết xuất sả chanh trong phòng thí nghiệm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

**** Địa điểm và thời gian thực hiện***

Thực hiện tại phòng thí nghiệm Bộ môn Bảo vệ thực vật, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên trong năm 2019.

**** Phương pháp chiết xuất sử dụng một số loại dung môi khác nhau:***

- Sử dụng cây sả chanh (*Cymbopogon citratus*). Phần thân, cành và lá sả chanh được rửa sạch bằng nước. Cắt nhỏ độ dài từ 3 - 5 cm. Phơi khô, sau đó dùng cối xay nhỏ thành bột.

- Dung môi: ethanol, nước cất.

- Chất thô được chiết xuất bằng ethanol tỷ lệ 100 g bột cây sả chanh: 400 ml ethanol 80% (1:4; g:ml). Hỗn hợp được đặt lên máy khuấy từ trong khoảng 15 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó hỗn hợp được lọc qua giấy lọc Whatmann® filter paper No. 1 để thu được dung dịch chất thô. Dung dịch chất thô được cô đặc sử dụng máy cô quay chân không tại nhiệt độ 65^{o}C để thu được chất thô. Chất thô được hòa lại với ethanol 80% để đạt nồng độ 10% và lưu giữ trong tủ lạnh 5 - 10^{o}C dùng cho các thí nghiệm kiểm tra hoạt tính kháng tuyến trùng.

- Làm tương tự đối với dung môi là nước cất với tỷ lệ 100 g bột cây sả chanh: 800 ml nước cất (1:8; g:ml) và hỗn hợp được đun sôi 10 phút, để nguội rồi đặt lên máy khuấy từ trong khoảng 15 giờ ở nhiệt độ phòng. Cô đặc dịch chiết sả chanh với máy cô quay chân không tại nhiệt độ 70^{o}C để thu được chất thô, sau đó hòa lại với nước cất để đạt nồng độ 10% và lưu giữ trong tủ lạnh 5 - 10^{o}C dùng cho các thí nghiệm kiểm tra hoạt tính kháng tuyến trùng.

**** Thí nghiệm 1:*** *Đánh giá hiệu quả diệt tuyến trùng Meloidogyne incognita của chất chiết xuất sả chanh với các dung môi khác nhau*

Các công thức thí nghiệm:

Công thức 1: Sử dụng nước cất (đối chứng 1).

Công thức 2: Sử dụng ethanol 80% (đối chứng 2).

Công thức 3: Chất chiết xuất thô sử dụng dung môi nước cất 500 ppm.

Công thức 4: Chất chiết xuất thô sử dụng dung môi ethanol 500 ppm.

**** Thí nghiệm 2:*** *Đánh giá hiệu quả diệt tuyến trùng Meloidogyne incognita của chiết xuất sả chanh ở các nồng độ khác nhau (Sử dụng chiết xuất của dung môi chọn ở thí nghiệm 1)*

Các công thức thí nghiệm:

Công thức 1; 2; 3; 4: Chất chiết xuất sả chanh với nồng độ tương ứng 300; 500; 800 và 1.000 ppm.

Công thức 5: Đối chứng ethanol 80%.

Cả 2 thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), 3 lần lặp lại. Sử dụng khay nhỏ 12 giếng (mỗi giếng có dung tích 4 ml) để làm thí nghiệm.

Hình 1. Chuẩn bị nguồn tuyến trùng (rễ cà chua)

(Nguồn: Trần Thị Thường (WASI, 2019))

- Chuẩn bị nguồn tuyến trùng:

Khử trùng đất (điều kiện 121^{o}C, 1 atm, 30 phút), cho vào các chậu hoặc ô thí nghiệm có diện tích 1 m^2/ô trong nhà lưới. Sau đó gieo cà chua và lây nhiễm tuyến trùng *Meloidogyne incognita* đã khử trùng vào và nhân nuôi. Trứng của tuyến trùng *Meloidogyne incognita* được ly trích từ những nốt sần rễ của cây cà chua sử dụng dung dịch 1% sodium hypochlorite và rửa qua nước cất sử dụng rây 25 µm để thu trứng. Trứng được ủ từ 3 - 5 ngày sử dụng phương pháp phễu Baermann (Southey, 1986) để đạt được ấu trùng tuổi 2. Trứng và ấu trùng tuổi 2 được khử trùng bề mặt bằng cách ngâm qua dung dịch streptomycin sulphate 0,01% trong vòng 1 giờ trước khi sử dụng cho các thí nghiệm.

- Chỉ tiêu và thời điểm theo dõi: Theo dõi số tuyến trùng còn sống, chết sau 12, 24 và 48 giờ;

Tỷ lệ chết của tuyến trùng; Hiệu lực diệt tuyến trùng của chiết xuất sả chanh (E).

Hiệu lực diệt tuyến trùng được tính theo công thức của Schneider - Orelli:

$$E\ (\%) = [(b - K)/(100 - K)] \times 100$$

E: Hiệu lực diệt tuyến trùng của chiết xuất sả chanh.

B: Tỷ lệ chết của tuyến trùng ở công thức thí nghiệm.

K: Tỷ lệ chết của tuyến trùng ở công thức đối chứng.

*** Phương pháp xử lý số liệu:**

Các số liệu được tổng hợp và xử lý bằng phần mềm Excel và SAS.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

**** Thí nghiệm 1:*** *Đánh giá hiệu quả diệt tuyến trùng Meloidogyne incognita của chất chiết xuất sả chanh với các dung môi khác nhau*

Tiến hành bố trí thí nghiệm, xử lý chiết xuất sả chanh với các dung môi khác nhau, theo dõi tỷ lệ tuyến trùng chết và kết quả thể hiện Bảng 1 và 2.

Bảng 1. Tỷ lệ chết (%) của tuyến trùng Meloidogyne incognita (%)

Công thức	Tỷ lệ chết (%) sau thời gian xử lý		
	12 giờ	24 giờ	48 giờ
Đối chứng 1 (nước cất)	3,02 ^{c}	5,82 ^{c}	6,09 ^{c}
Đối chứng 2 (ethanol 80%)	6,76 ^{c}	12,41 ^{c}	13,03 ^{c}
Chiết xuất sả chanh dung môi nước cất 500 ppm	20,24 ^{b}	26,21 ^{b}	28,23 ^{b}
Chiết xuất sả chanh dung môi ethanol 500 ppm	39,56 ^{a}	63,92 ^{a}	66,82 ^{a}
CV (%)	*11,42*	*10,87*	*12,34*

Bảng 2. Hiệu lực diệt tuyến trùng Meloidogyne incognita (%)

Công thức	Hiệu lực (%)		
	12 giờ	24 giờ	48 giờ
Chiết xuất sả chanh dung môi nước cất 500 ppm	17,76	21,65	23,58
Chiết xuất sả chanh dung môi ethanol 500 ppm	37,68	61,69	64,67

Qua Bảng 1 và 2 cho thấy: Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của dung môi sử dụng trong chiết xuất sả chanh giữa nước cất và ethanol đến tỷ lệ tuyến trùng chết theo thời gian. Dịch chiết dung môi ethanol 500 ppm có khả năng diệt tuyến trùng *Meloidogyne incognita* cao hơn hẳn so với dịch chiết dung môi nước cất 500 ppm ở cả 3 thời điểm theo dõi. Sau 24 đến 48 giờ xử lý, công thức sử dụng dịch chiết xuất bằng dung môi ethanol có tỷ lệ gây chết khá cao (> 60%), trong khi đó, dịch chiết xuất sử dụng dung môi nước cất chỉ gây chết khoảng 25%. Tính toán, so sánh hiệu lực diệt tuyến trùng của dịch chiết hai dung môi cũng cho thấy dịch chiết dung môi ethanol 500 ppm có hiệu lực diệt tuyến trùng (64,27%) cao hơn hẳn so với dịch chiết dung môi nước cất (23,58%).

**** Thí nghiệm 2:*** *Đánh giá hiệu quả diệt tuyến trùng Meloidogyne incognita của chiết xuất sả chanh sử dụng dung môi ethanol ở các nồng độ khác nhau*

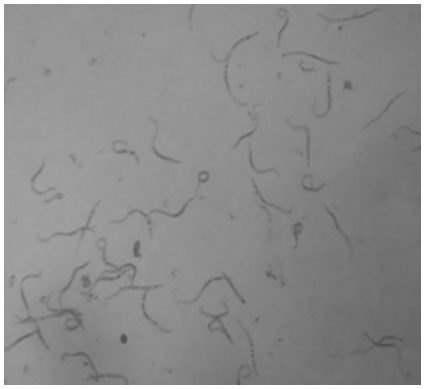
Sau khi thực hiện thí nghiệm 1, chúng tôi chọn chiết xuất sả chanh bằng dung môi ethanol để tiếp tục nghiên cứu đánh giá hiệu lực diệt tuyến trùng *Meloidogyne incognita* ở các nồng độ khác nhau, kết quả ghi nhận ở Bảng 3.

Bảng 3. Tỷ lệ chết và hiệu lực diệt tuyến trùng Meloidogyne incognita sau 24 giờ xử lý (%)

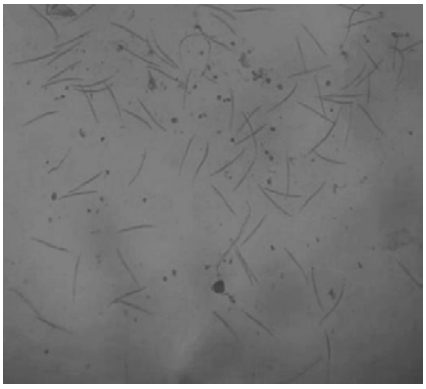
TT	Công thức	Tỷ lệ chết (%)	Hiệu lực (%)
1	Chiết xuất sả chanh 300 ppm	41,34 [d]	32,01
2	Chiết xuất sả chanh 500 ppm	68,01 [c]	62,92
3	Chiết xuất sả chanh 800 ppm	85,16 [b]	82,81
4	Chiết xuất sả chanh 1.000 ppm	100,00 [a]	100,00
5	Đối chứng ethanol 80%	13,72 [e]	
	CV (%)	*6,56*	

Tỷ lệ chết của tuyến trùng *Meloidogyne incognita* tăng dần theo nồng độ của dịch chiết. Sau 24 giờ dịch chiết dung môi ethanol 500 ppm đã gây chết tuyến trùng 68,01%. Tỷ lệ chết của tuyến trùng tăng lên 85,16% ở nồng độ 800 ppm và gây chết 100% ở nồng độ 1.000 ppm.

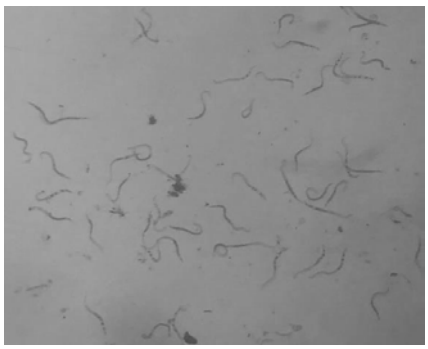
Tính toán hiệu lực diệt tuyến trùng *Meloidogyne incognita* cho thấy hiệu lực của dịch chiết xuất sả chanh sử dụng dung môi ethanol tăng dần theo nồng độ sử dụng và đạt 100% ở nồng độ 1.000 ppm. Kết quả này tương tự nghiên cứu của Patidar *và ctv.*, 2016.



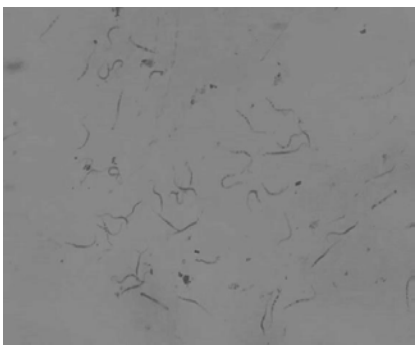
CT4 (1.000 ppm) trước xử lý



CT4 (1.000 ppm) sau 24 giờ xử lý



CT5 (đối chứng) trước xử lý



CT5 (đối chứng) sau 24 giờ xử lý

Hình 2. Hình ảnh thử nghiệm chiết xuất sả chanh phòng trừ tuyến trùng *Meloidogyne incognita (Trần Thị Thường, WASI, 2019)*

IV. KẾT LUẬN

Sử dụng dung môi ethanol 80% để chiết xuất sả chanh cho chất chiết xuất có hiệu lực phòng trừ tuyến trùng *Meloidogyne incognita* gây hại cà phê cao hơn so với sử dụng dung môi nước cất. Hiệu lực diệt tuyến trùng trong phòng thí nghiệm tăng theo nồng độ chiết xuất và đạt 100% ở nồng độ dịch chiết xuất sả chanh 1.000 ppm sau 24 giờ xử lý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nwauzoma, A.B.; Adeleke, M. T.V. (2017). Effect of some plant extracts on the nematode population and yield parameters of waterleaf (*Talinum triangulare* L.) (Jacq.) Willd. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, ISSN 2224-3208 (Paper).

2. Patidar, R.K.; Debashish Sen, Pathak1 M.; Shakywar R.C. and Rajesh Patidar (2016). Effect of essential oils on mortality, hatching and multiplication of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* and its impact on plant growth parameters. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*.

3. Southey, J.F (ed) (1986). *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Reference book, 402.

HIỆU QUẢ CỦA DỊCH TRÍCH CỎ HÔI, CỎ CỨT HEO, CỎ CÚ ĐỐI VỚI NẤM *Curvularia* sp. VÀ *Fusarium* sp. PHÂN LẬP TỪ HẠT LÚA

Lê Thanh Toàn[1], Nguyễn Thúy Vy[1] và Lê Thị Huỳnh Vy[1]

[1]Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

ABSTRACT

Efficacy of extracts from *Eupatorium* leaf, *Cyperus* rhizome and *Ageratum* leaf on *Curvularia* sp. and *Fusarium* sp. isolated from diseased rice grains

Discoloration of rice grains is one of the most important diseases at all rice-growing areas of Viet Nam. Curvularia sp. and Fusarium sp. are popular fungal pathogens on rice grains. The research on efficacy of extracts from Eupatorium leaf, Cyperus rhizome and Ageratum leaf at concentrations of 2, 4 and 8% on mycelial growth of Fusarium sp. VL05 and Curvularia sp. VL17 showed that treatments of both Cyperus rhizome and Ageratum leaf at a concentration of 8% had high inhibitory effect on mycelial growth of Fusarium sp. at 9.81-12.53% at 72 hours after putting fungal slices (HAPFS). Besides, the inhibitory efficacy of Cyperus and Ageratum extracts at 8% were approximately 11.84-23.86% at 72 HAFPS.

Keywords: *Curvularia sp., plant extract, Fusarium sp.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sản xuất lúa gạo nước ta đang bước vào thời kỳ có nhiều thử thách mới về chất lượng, năng suất, dịch bệnh, xâm nhập mặn. Lem lép hạt là bệnh đang phổ biến ở các vùng trồng lúa ở nước ta, mùa vụ nào, chân ruộng nào cũng có bệnh và chưa có giống lúa nào chống chịu được bệnh lem lép hạt. Nhiều loại tác nhân khác nhau có thể gây lem lép như nhện gié, vi khuẩn và nấm nhưng chủ yếu là các loại nấm bệnh. Kết quả khảo sát thành phần nấm trên các giống lúa tại bốn tỉnh ở miền Nam Nigeria trong năm 2008 đã ghi nhận sự hiện diện của 9 loài nấm là *Trichoconis padwickii* (khoảng 37%), *Helminthosporium oryzae* (khoảng 17%), *Fusarium moniliforme* (khoảng 14%), *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Curvularia lunata*, *Penicillium* sp., *Alternaria oryzae*, *Pyricularia oryzae* (Utopo *et al.*, 2011). Tại Pakistan, trên các mẫu lúa trữ trong kho, chỉ có bốn loài nấm được ghi nhận là *F. moniliforme*, *Alternaria* sp., *Helminthosporium* sp. và *Curvularia* sp. (Butt *et al.*, 2011). Tại Cần Thơ, trong số các loài nấm hiện diện trên 6000 hạt lúa đã được thu thập, *Fusarium* spp. và

Người phản biện: TS. Châu Nguyễn Quốc Khánh.

Curvularia sp. hiện diện trên tất cả các mẫu lúa với tần số xuất hiện là 100% (Võ Thị Yến Nhi, 2012). Nghiên cứu đã được thực hiện để khảo sát hiệu quả của một số loại dịch trích thực vật đối với hai loại nấm *Fusarium* sp. và *Curvularia* sp. trên hạt lúa.

II. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Phương tiện

Một số loại dịch trích thực vật đã được nhóm nghiên cứu khảo sát sơ bộ, từ đó chọn ra các loại dịch trích thực vật sử dụng trong thí nghiệm là lá cỏ hôi (*Eupatorium odoratum*), lá cỏ cứt heo (*Ageratum conyzoides*) và củ cỏ cú (*Cyperus rotundus* L.) với các nồng độ là 2, 4 và 8%.

Nguồn nấm *Fusarium* sp. VL05 và *Curvularia* sp. VL17 được cung cấp từ Bộ môn Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Cần Thơ. Nấm được nuôi cấy trong đĩa petri khoảng 10 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm. Khuẩn ty nấm sẽ được đục thành các khoanh có đường kính 5 mm khi thực hiện thí nghiệm.

2.2. Khảo sát hiệu quả của các loại dịch trích thực vật đối với nấm *Fusarium* sp. gây lem lép hạt lúa

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 10 nghiệm thức (nghiệm thức sử dụng dịch trích cỏ hôi, cỏ cứt heo, cỏ cú ở 2, 4 và 8% và 1 đối chứng), 5 lần lặp lại. Trong nghiệm thức đối chứng, dịch trích thực vật được thay bằng nước cất thanh trùng.

Các loại thực vật sau khi thu về sẽ được rửa sạch đất cát, sau đó được trích với nước cất thanh trùng bằng cách tính nồng độ theo trọng lượng lá tươi/thể tích, kế tiếp cho vào máy xay sinh tố xay nhuyễn, lược bỏ phần xác bã thực vật, thu phần dịch trích. Sau cùng rót phần dịch trích thu được qua giấy lọc Whatman (có đường kính lỗ lọc 0,2 µm) vào 1 cốc thủy tinh đã thanh trùng khô, thao tác được tiến hành trong tủ cấy. Nấu tan môi trường PDA. Khi chai môi trường đạt nhiệt độ khoảng 55 - 60^{o}C, cho dịch trích thực vật đã chuẩn bị sẵn vào chai môi trường, lắc chai môi trường để dịch trích hòa tan đều vào môi trường. Sau đó, môi trường trong chai sẽ được bơm vào các đĩa petri bằng dispenser, tương ứng 10 ml môi trường/đĩa petri. Sau khi môi trường đặc lại, các khoanh khuẩn ty nấm đã chuẩn bị được đặt vào chính giữa đĩa petri. Đường kính khuẩn lạc (ĐKKL) của nấm được ghi nhận vào các thời điểm 24, 48 và 72 giờ sau đặt khoanh khuẩn ty (GSĐKT). Hiệu quả của thuốc (HQT) được tính theo công thức HQT (%) = ($ĐKKL_{đc}$ - $ĐKKL_i$)/$ĐKKL_{đc}$ * 100%, trong đó $ĐKKL_{đc}$ là đường kính khuẩn lạc của nghiệm thức đối chứng, $ĐKKL_i$ là đường kính khuẩn lạc của nghiệm thức dịch trích thực vật. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.3. Khảo sát hiệu quả của các loại dịch trích thực vật đối với nấm *Curvularia* sp. gây lem lép hạt lúa

Thí nghiệm được thực hiện tương tự thí nghiệm 2.2. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.4. Phương pháp phân tích số liệu

Số liệu được xử lý với Microsoft Excel, phân tích thống kê bằng phần mềm thống kê SPSS 20.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hiệu quả của các loại dịch trích thực vật đối với nấm *Fusarium* sp.

Hiệu quả ức chế sự phát triển khuẩn ty nấm *Fusarium* sp. của các loại dịch trích thực vật trong điều kiện *in vitro* được trình bày trong Bảng 2. Ở thời điểm 24 GSĐKT, nghiệm thức lá cỏ cứt heo 2% có hiệu quả ức chế cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so nghiệm thức đối chứng. Tuy nhiên, nghiệm thức này không duy trì được hiệu quả ở hai thời điểm sau đó là 48 và 72 GSĐKT. Tại thời điểm 48 GSĐKT, nghiệm thức xử lý với dịch trích cỏ cứt heo nồng độ 8% bắt đầu thể hiện hiệu quả, khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng. Và nghiệm thức này tiếp tục thể hiện hiệu quả cao đến 72 GSĐKT. Bốn nghiệm thức xử lý với cỏ cứt heo 4%, cỏ cú 2, 4 và 8% thể hiện hiệu quả chỉ ở thời điểm 72 GSĐKT. Các nghiệm thức xử lý dịch trích còn lại không thể hiện hiệu quả trong các thời điểm khảo sát (Bảng 1).

Bảng 1. Hiệu quả ức chế (%) sự phát triển khuẩn ty nấm Fusarium sp. của các loại dịch trích thực vật trong điều kiện in vitro

Nghiệm thức	Thời điểm quan sát (giờ sau đặt khuẩn ty)		
	24 GSĐKT	48 GSĐKT	72 GSĐKT
Lá cỏ hôi 2%	4,00 ab	1,33 ab	0,00 b
Lá cỏ hôi 4%	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Lá cỏ hôi 8%	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Lá cỏ cứt heo 2%	13,71 a	7,18 ab	5,44 ab
Lá cỏ cứt heo 4%	11,05 ab	12,29 ab	9,27 a
Lá cỏ cứt heo 8%	11,14 ab	17,70 a	12,53 a
Lá cỏ cú 2%	8,19 ab	10,20 ab	7,63 a
Lá cỏ cú 4%	8,10 ab	11,69 ab	7,62 a
Lá cỏ cú 8%	11,05 ab	14,63 ab	9,81 a
Đối chứng xử lý nước cất	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Mức ý nghĩa	*	*	*
CV (%)	*12,46*	*12,33*	*15,56*

Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có cùng chữ số theo sau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức 5%.

3.2. Hiệu quả của các loại dịch trích thực vật đối với nấm *Curvularia* sp.

Hiệu quả ức chế sự phát triển khuẩn ty nấm *Curvularia* sp. của các loại dịch trích thực vật được trình bày ở Bảng 4. Ở ba thời điểm 24, 48 và 72 GSĐKT, các nghiệm thức xử lý với dịch trích cỏ hôi không thể hiện hiệu quả ức chế sự phát triển khuẩn ty nấm. Các nghiệm thức còn lại đều cho hiệu quả ức chế phát triển khuẩn ty nấm, thể hiện qua trung bình hiệu quả ức chế khuẩn ty nấm 16 - 24%, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng không xử lý (Bảng 2).

Bảng 2. Hiệu quả ức chế (%) sự phát triển khuẩn ty nấm Curvularia sp. của các loại dịch trích thực vật trong điều kiện in vitro

Nghiệm thức	Thời điểm quan sát (giờ sau đặt khuẩn ty)		
	24 GSĐKT	48 GSĐKT	72 GSĐKT
Lá cỏ hôi 2%	0,00 [b]	0,00 [c]	0,00 [d]
Lá cỏ hôi 4%	0,00 [b]	0,00 [c]	0,00 [d]
Lá cỏ hôi 8%	0,00 [b]	0,00 [c]	0,00 [d]
Lá cỏ cứt heo 2%	16,92 [a]	14,00 [abc]	11,70 [b]
Lá cỏ cứt heo 4%	17,69 [a]	8,54 [bc]	5,62 [c]
Lá cỏ cứt heo 8%	16,92 [a]	8,56 [bc]	11,84 [b]
Lá cỏ cú 2%	18,46 [a]	18,26 [ab]	18,25 [ab]
Lá cỏ cú 4%	19,23 [a]	18,26 [ab]	14,74 [ab]
Lá cỏ cú 8%	20,00 [a]	20,72 [a]	23,86 [a]
Đối chứng xử lý nước cất	0,00 [b]	0,00 [c]	0,00 [d]
Mức ý nghĩa	*	*	*
CV (%)	*13,14*	*9,12*	*8,26*

Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có cùng chữ số theo sau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức 5%.

Như vậy trong các loại dịch trích thực vật được sử dụng, các nghiệm thức xử lý với cỏ cứt heo và cỏ cú cho hiệu quả ức chế khá tốt đối với sự phát triển khuẩn ty nấm *Fusarium* sp. và *Curvularia* sp. Dịch trích từ hai loại thực vật này đã được ghi nhận có hiệu quả ức chế sự sinh trưởng của một số loại mầm bệnh trên cây trồng. Dịch trích từ nước của cỏ cứt heo đã được ghi nhận có khả năng ức chế sự sinh trưởng của nấm *Penicillium italicum* trên quýt (Dixit *et al.*, 1995), *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* trên cà chua (Mishra *et al.*, 2014). Ilondu *et al.* (2014) đã khảo sát thành phần dịch trích trong cỏ cứt heo. Kết quả cho thấy các chất 2,4,6-tri-tertbutyl phenol ($C_{18}H_{30}O$, 12,14%), 7-t-butyl-3,3-dimetyl-1-indanone ($C_{15}H_{20}O$, 9,88%), 1(2H)-naphthalenone-(1,1-dimethylethyl)-3,4-dihydro ($C_{14}H_{18}O$, 9,19%) và demethoxyageratochromene ($C_{12}H_{14}O_2$, 8,60%) là những chất hiện diện với tỉ lệ lớn. Nghiên cứu về hiệu quả của từng đơn chất trong thành phần dịch trích cỏ cứt heo đối với mầm bệnh trên cây trồng vẫn chưa được thực hiện. Nghiên cứu về dịch trích từ củ cỏ cú đối với nấm gây bệnh cây trồng vẫn chưa được thực hiện nhiều. Dịch trích củ cỏ cú ức chế sự nảy mầm của bào tử nấm *Fusarium udum* (Singh *et al.*, 2011). Một nghiên cứu khác đã khảo sát về ức chế nảy mầm bào tử của các loài nấm bằng dịch trích từ thân rễ cây cỏ cú được thực hiện bởi Singh *et al.* (2011), bào tử của nấm *C. lunata* gây bệnh trên lúa bị ức chế hoàn toàn sự nảy mầm ở nồng độ 1000 - 3000 mg/ml. Các tác giả này đề nghị sử dụng dịch trích thực vật

như là một biện pháp thân thiện để kiểm soát dịch bệnh trên cây trồng. Thành phần và cơ chế tác dụng của dịch trích cỏ cú đối với nấm gây hại cây trồng chưa được báo cáo.

IV. KẾT LUẬN

Trong điều kiện phòng thí nghiệm, nghiệm thức xử lý với dịch trích cỏ cứt heo và cỏ cú ở nồng độ 8% thể hiện khả năng ức chế khoảng 9,81 - 23,86% sự phát triển khuẩn ty nấm *Fusarium* sp. và *Curvularia* sp. Các nghiên cứu về phối trộn dịch trích cỏ cứt heo và cỏ cú với các chất khác để tăng hiệu quả ức chế nấm *Fusarium* sp. và *Curvularia* sp. đang được nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Utopo, E.B., Ogbodo, E. N. and Nwogbaga, A.C. (2011). Seedborne mycoflora associated with rice and their influence on growth at Abakaliki, Southeast Agro-Ecology, Nigeria. Libyan Agriculture Research Center Journal Internation 2(2): 79 - 84.
2. Butt, A.R., Yaseen, S.I. and Javaid, A. (2011). Seed-borne mycoflora of stored rice grains and its chemical control. The Journal of Animal & Plant Science 21(2): 193 - 196.
3. Võ Thị Yến Nhi (2012). Xác định thành phần nấm gây hại trên hạt lúa tại Cần Thơ trong vụ Đông Xuân 2011 - 2012. Luận văn Tốt nghiệp Kỹ sư. Trường Đại học Cần Thơ.
4. Dixit, S. N., Chandra, H., Tiwari, R. and Dixit, V. (1995). Development of a botanical fungicide against blue mould of mandarin. J. Stored Prod. Res. 31: 165 - 172.
5. Mishra, P., Singh, P. and Tripathi, N. N. (2014). Evaluation of plant extracts against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* - wilt pathogen of tomato. International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences 4(2): 163 - 167.
6. Ilondu, E.M., Ojeifo, I.M. and Emosairue, S.O. (2014). Evaluation of antifungal properties of *Ageratum conyzoides*, *Spilanthes filicaulis* and *Tithonia diversifolia* leaf extracts and search for their compounds using gas chromatography-mass spectrum. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science 9(11): 375 - 384.
7. Singh, A., Maurya, S. and Singh, R.P. (2011). Antifungal efficacy of some ethyl acetate extract fractions of *Cyperus rotundus* rhizomes against spore germination of some fungi. Archives of Phytopathology and Plant Protection 44(20): 2004 - 2011.

ĐẶC ĐIỂM SINH HÓA VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM GÂY BỆNH CÂY TRỒNG CỦA CAO CHIẾT PHÂN ĐOẠN LÁ BÌNH BÁT NƯỚC, MÙ U VÀ DIỆP HẠ CHÂU ĐẮNG

Nguyễn Phạm Thanh Trúc, Nguyễn Minh Dương, Đặng Phúc Vinh, Trần Thị Nhựt An và Nguyễn Đức Độ

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

ABSTRACT

Biochemical characteristics and antifungal activities against plant pathogens of the fractions of *Annona glabra*, *Calophyllum inophyllum* and *Phyllanthus amarus*

This study aims at determining some biochemical characteristics and antifungal activities against 2 fungal plant pathogens, namely Phytophthora sp. *and Rhizoctonia* sp. *from fractions of Annona glabra, Calophyllum inophyllum and Phyllanthus amarus. All extracts displayed high level of polyphenol, flavonoid and tannin compounds, while alkaloid compounds were lower among fractions. They indicated strong antioxidant activities through reducing power (Fe^{3+}), DPPH radical scavenging and hydrogen peroxide (H_2O_2) assays. Antifungal abilities were carried out by agar well diffusion method at the concentration of 200 mg/mL with the inhibition zone ranged from 3.5 ± 0.5 mm to 6.3 ± 0.6 mm. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentraion (MFC) of Annona glabra extract sample 2 on Phytophthora* sp. *were 5 and 50 mg/mL while that of Calophyllum inophyllum extract sample 1 were 5 and* 20 *mg/mL. MIC and MFC values of Calophyllum inophyllum extract sample 2 on Rhizoctonia* sp. *were 5 and 25 mg/mL.*

Keywords: *Antifungal activities, biochemical characteristics, fungal plant pathogens.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

An ninh lương thực Việt Nam và thế giới đang phải đối mặt với nhiều mối đe dọa, đặc biệt là các loại nấm bệnh có thể lây lan nhanh, mức độ nguy hiểm cao và có khả năng kháng thuốc, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất cây trồng. Trong đó, *Phytophthora* sp. và *Rhizoctonia* sp. là những đối tượng phổ biến. Theo Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam, *Phytophthora* sp. là tác nhân

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Đắc Khoa.

gây thối gốc hồ tiêu, ớt, các loại cây trồng lâu năm, thối ở nõn cây dứa và mốc sương trên cà chua. Nguyễn Phước Tuyên (2008) cho rằng *Phytophthora* sp. gây bệnh thối thân, cháy lá trên cây sen. Trong khi *Rhizoctonia* sp. gây bệnh đốm vằn trên lúa ở nhiều quốc gia trên thế giới và hiện tại vẫn chưa tìm được giống kháng bệnh (Kotamraju, 2010). Việc kháng thuốc đặc trị của các loại nấm bệnh đặt ra yêu cầu cho các nhà khoa học để tìm ra các biện pháp phòng trừ sinh học hiệu quả hơn. Trong đó, nghiên cứu dịch trích từ các loài cây hoang dại có khả năng kháng nấm được xem là biện pháp mới để hướng tới nền nông nghiệp hiện đại, an toàn và bền vững. Ba loại cây bình bát, mù u và diệp hạ châu là những loài thực vật hoang dại tại Đồng bằng sông Cửu Long đã được khảo sát về giá trị y học và sinh học nhất định, nhưng hiệu quả ức chế nấm bệnh hại cây trồng vẫn còn nhiều thông tin cần phải khảo sát về hàm lượng các chất thứ cấp và hoạt tính sinh học liên quan.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Nấm *Phytophthora* sp. và *Rhizoctonia* sp. được cung cấp bởi Phòng Thí nghiệm Protein và Sản phẩm tự nhiên, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Cao chiết phân đoạn bình bát nước (*Annona glabra*), mù u (*Calophyllum inophyllum*) và diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus*) được ly trích theo mô tả của Huỳnh Thanh Duy *et al.* (2020), trong đó, cao bình bát 1 trích trong dichloromethane:methanol, bình bát 2 (methanol), mù u 1 (dichloromethane: ethylacetate), mù u 2 (dichloromethane: ethylacetate: acetone) và diệp hạ châu (hexane:ethylacetate:dichloromethane).

2.2. Khảo sát hàm lượng polyphenol, flavonoid, tannin và alkaloid tổng của các loại cao chiết

Thí nghiệm khảo sát hàm lượng polyphenol tổng được thực hiện theo mô tả của Huỳnh Thanh Duy *et al.* (2020). Thí nghiệm khảo sát hàm lượng flavonoid tổng được thực hiện theo mô tả của Chang *et al.* (2002) có hiệu chỉnh (0,25 mL cao chiết; 0,75 mL methanol; 0,05 mL $AlCl_3$; 0,005 mL CH_3COOK 1M và 1,4 mL nước khử ion). Thí nghiệm khảo sát hàm lượng tannin tổng được thực hiện theo mô tả của Laitonjam *et al.* (2013) có hiệu chỉnh (0,25 mL cao chiết; 0,25 mL nước khử ion; 0,25 mL dung dịch Folin-Ciocalteu 20% và 1 mL Na_2CO_3). Thí nghiệm khảo sát hàm lượng alkaloid tổng được thực hiện theo mô tả của Shamsa *et al.* (2008) có hiệu chỉnh (1 mL cao chiết; 1 mL HCl; 3,5 mL BCG; 5 mL đệm phosphate (pH 4,7) và 8 mL dung dịch chloroform).

2.3. Khảo sát khả năng kháng oxy hóa của cao chiết

Thí nghiệm khảo sát khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp khử ion Fe^{3+}, phương pháp khử gốc tự do DPPH và phương pháp khử hydrogen peroxide (H_2O_2) được thực hiện theo mô tả của Huỳnh Thanh Duy *et al.* (2020).

2.4. Khảo sát khả năng kháng nấm của cao chiết

Thí nghiệm kháng nấm bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch được tiến hành dựa trên mô tả của Nguyễn Đức Độ *et al.* (2019), bố trí hoàn toàn ngẫu

nhiên với 3 lần lặp lại trên môi trường PDA, đối chứng âm là DMSO 100%, đối chứng dương là Nystatin, nồng độ cao chiết là 200 mg/mL. Bán kính vòng ức chế nấm được đo khi tơ nấm chạm thành giếng chứa đối chứng âm.

Thí nghiệm khảo sát nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) được thực hiện dựa trên mô tả của Nguyễn Đức Độ *et al.* (2020), bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại theo dãy nồng độ được khảo sát.

2.5. Xử lý số liệu

Tất cả số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010, thống kê bằng phần mềm Minitab 16.0 và so sánh trung bình bằng kiểm định Tukey.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả định lượng các hợp chất thực vật có trong cao chiết

Cao chiết mù u 1 chứa hàm lượng polyphenol, flavonoid và alkaloid cao nhất, lần lượt là 332,08 ± 2,24 mg GAE/g chiết xuất, 197,63 ± 8,83 mg QE/g chiết xuất và 101,58 ± 14,89 mg AE/g chiết xuất trong khi cao chiết mù u 2 chứa hàm lượng tannin tổng cao nhất (214,48 ± 4,44 mg TAE/g chiết xuất). Nhìn chung, hàm lượng hợp chất thực vật trong cao chiết diệp hạ châu đắng là thấp nhất.

Bảng 1. Hàm lượng polyphenol tổng, flavonoid tổng, tannin tổng và alkaloid tổng có trong cao chiết

Cao chiết	Polyphenol (mg GAE/g cx) (*)	Flavonoid (mg QE/g cx) (*)	Tannin (mg TAE/g cx) (*)	Alkaloid (mg AE/g cx) (*)
Bình bát 1	74,52 ± 7,27^{d}	154,24 ± 2,99^{b}	92,15 ± 0,56^{d}	28,64 ± 2,14^{b}
Bình bát 2	85,70 ± 1,86^{d}	43,79 ± 2,59^{e}	83,97 ± 4,66^{de}	4,05 ± 0,43^{d}
Mù u 1	332,08 ± 2,24^{b}	197,63 ± 8,83^{a}	166,31 ± 2,00^{c}	101,58 ± 14,89^{a}
Mù u 2	230,29 ± 5,52^{c}	85,54 ± 2,59^{c}	214,48 ± 4,44^{b}	10,87 ± 2,36^{cd}
Diệp hạ châu	39,62 ± 3,63^{e}	35,97 ± 3,39^{e}	65,05 ± 0,39^{e}	26,82 ± 2,31^{bc}

Ghi chú: Các giá trị trong bảng này được xác định dựa vào các phương trình đường chuẩn: acid gallic y = 0,0031x - 0,0095, R^2=0,999; quercetin y = 0,0059x + 0,024, R^2=0,9964; acid tanic y = 0,0093x + 0,026, R^2 = 0,999; atropine y = 0,0009x + 0,0572, R^2 = 0,99. Giá trị trong bảng là giá trị của trung bình ba lần lặp lại, trong cùng một cột các giá trị có ít nhất một chữ cái theo sau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%, (*): qua kiểm định Tukey.

Theo Galanakis *et al.* (2013), Hagerman và Robbins (1987), những hợp chất polyphenol hay tannnin có xu hướng hòa tan trong các dung môi có độ phân cực trung bình như acetone do có thể ức chế khả năng tạo phức không tan giữa những hợp chất này với protein có sẵn trong thực vật trong quá trình ly trích. Zhao *et al.* (2019) và Bizuayehu *et al.* (2016) cũng cho thấy hàm lượng polyphenol và tannin trong các loại trà đều thấp hơn so với cao chiết mù u 1 và

mù u 2. Do đó, việc sử dụng acetone để ly trích lượng lớn polyphenol và tannin từ các loài cây hoang dại như mù u như một nguồn nguyên liệu dễ tìm là hoàn toàn khả thi. Andersen và Markham (2005) cho rằng có hai loại flavonoid bao gồm flavonoid ít phân cực và flavonoid phân cực, trong đó, flavonoid ít phân cực chiếm đa số. Cao chiết mù u 1 và bình bát 1 được ly trích trong dung môi có độ phân cực trung bình yếu nên chứa hàm lượng flavonoid ít phân cực cao hơn so với các cao chiết khác. Sự đa dạng về hợp chất và hàm lượng các hợp chất thực vật có trong cao chiết tạo nên mối tương quan với khả năng kháng oxy hóa và khả năng kháng nấm ở các thí nghiệm sau.

3.2. Kết quả khả năng kháng oxy hóa của các loại cao chiết

Khả năng khử ion Fe^{3+} và gốc tự do DPPH của cao chiết đều yếu hơn so với vitamin C và mạnh hơn khi khử gốc tự do H_2O_2. Trong đó, cao chiết mù u 1 cho thấy hiệu quả kháng oxy hóa mạnh nhất đối với cả ba phương pháp. Cao chiết bình bát 1 khử ion Fe^{3+} và gốc tự do DPPH yếu nhất trong khi bình bát 2 là cao chiết khử gốc tự do H_2O_2 yếu nhất.

Bảng 2. Giá trị IC_{50} của vitamin C và cao chiết qua thí nghiệm khử ion Fe^{3+}, khử gốc tự do DPPH và H_2O_2

Cao chiết	Khử ion Fe^{3+} (*)	DPPH (*)	H_2O_2 (*)
Bình bát 1	93,07 ± 9,00^{a}	29,52± 0,17^{a}	69,40± 0,05^{d}
Bình bát 2	25,98 ± 2,39^{b}	17,13 ± 0,65^{b}	106,72 ± 0,09^{b}
Mù u 1	11,15 ± 0,06^{c}	6,29 ± 0,19^{d}	27,50 ± 0,12^{f}
Mù u 2	26,53 ± 0,22^{b}	7,29 ± 0,18^{c}	43,67 ± 0,19^{e}
Diệp hạ châu	34,99 ± 2,96^{b}	17,82 ± 0,29^{b}	77,86 ± 0,31^{c}
vitamin C	2,53 ± 0,23^{c}	1,88 ± 0,04^{e}	120,10 ± 0,55^{a}

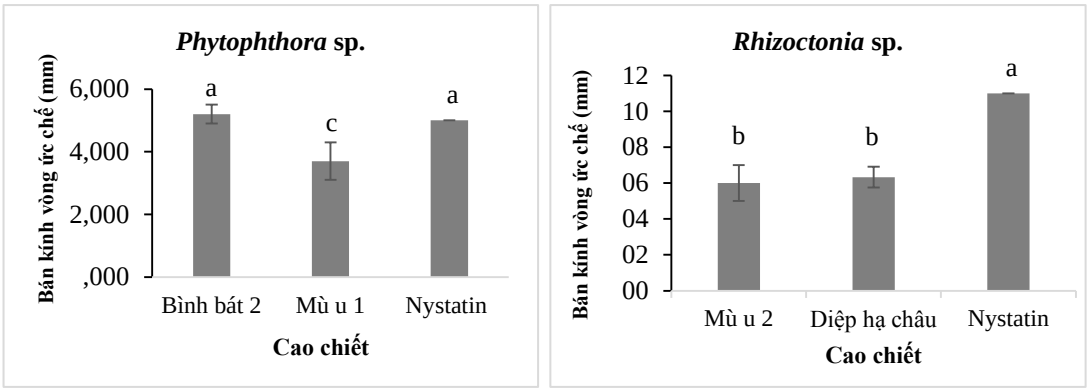
Ghi chú: Các giá trị IC_{50} được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn của vitamin C y = 22,61x - 7,341, R^2 = 0,987 (thí nghiệm khử Fe^{3+}), y = 30,35x - 7,018, R^2 = 0,997 (thí nghiệm khử gốc DPPH) và y = 0,4313x - 1,7956, R^2 = 0,977 (thí nghiệm khử gốc H_2O_2. Giá trị trong bảng là giá trị của trung bình ba lần lặp lại. Trong cùng một cột, các giá trị có ít nhất một chữ cái theo sau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%. (*): qua kiểm định Tukey.

Theo Handique và Gogoi (2016), hàm lượng polyphenol có liên quan mật thiết với khả năng kháng oxy hóa của cao chiết. Bên cạnh đó, theo Yokozawa *et al.* (1998), tannin cô đặc và thủy phân có trọng lượng phân tử lớn có khả năng kháng oxy hóa cao gấp nhiều lần so với các hợp chất polyphenol đơn giản. Do đó có thể kết luận rằng các cao chiết mù u 1 chứa hàm lượng polyphenol và tannin cao nên có khả năng kháng oxy hóa mạnh hơn các cao chiết còn lại.

3.3. Khả năng kháng nấm của cao chiết

Các loại cao chiết sử dụng trong mỗi thí nghiệm đều có khả năng ức chế lại các loại nấm được khảo sát. Cao chiết bình bát 2 cho khả năng ức chế nấm *Phytophthora*

sp. khác biệt không có ý nghĩa thống kê (mức ý nghĩa 5%) so với đối chứng dương, với giá trị bán kính vùng ức chế lần lượt là 5,2 ± 0,3 mm và 5,0 ± 0,0 mm. Các thí nghiệm còn lại các cao chiết đều cho khả năng ức chế nấm yếu hơn đối chứng dương. Nấm *Rhizoctonia* sp. bị ức chế mạnh nhất với bán kính vùng ức chế từ 6,0 ± 1,0 đến 11,0 ± 0,0 mm, trong đó khả năng kháng nấm của cao chiết mù u 1 khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với diệp hạ châu.



Hình 1. Khả năng ức chế nấm của cao chiết và kháng sinh Nystatin

Theo Pohl *et al.* (2011), linoleic acid (có trong lá mù u) có khả năng kháng lại một số loại nấm sợi, trong đó có *Rhizoctonia solani*. Dhandapani *et al.* (2015) đã chứng minh cao chiết *Phyllanthus embilica* (cùng chi với diệp hạ châu đắng), ly trích trong dung môi ethyl acetate có hiệu quả ức chế *Rhizoctonia solani* lên đến 80%. Theo Zhu *et al.* (2019), tannin có cơ chế kháng nấm đa dạng như ức chế sự hình thành sợi nấm và bào tử, biến đổi ống mầm, phá vỡ thành tế bào và màng tế bào, làm giảm hoạt động enzyme. Ngoài ra, tannin còn gây kết tủa elicitin - protein được tạo ra bởi chi *Phytophthora* giúp ergosterol của nấm bám vào, góp phần quan trọng vào quá trình trao đổi chất của màng phospholipid. Acetone thích hợp để ly trích các hợp chất thuộc nhóm tannin, điều này giải thích cho khả năng ức chế nấm tốt của cao chiết mù u 2. Ngoài ra, các hợp chất thực vật khác như polyphenol, flavonoid, alkaloid,... đều có khả năng ức chế sự phát triển của vi sinh vật. Các chất này có khả năng ức chế hoạt động sản xuất enzyme như catalase, cellulolytic thông qua các phản ứng oxy hóa khử. Trong đó, catalase là enzyme cần thiết để chống lại stress oxy hóa, giúp vi sinh vật duy trì hoạt động sống. Khả năng khử sắt cũng là một yếu tố quan trọng cho khả năng ức chế của cao chiết do sắt là yếu tố vi lượng cần thiết cho các hoạt động sống của tế bào, bao gồm hô hấp, chuyển hóa amino acid, sinh tổng hợp DNA, sterol và hoạt động hấp thu sắt ngoại bào của các phân tử siderophore (Hubertus Haas, 2014).

Thí nghiệm kháng nấm trong môi trường lỏng đã xác định được giá trị MIC và giá trị MFC của cao chiết bình bát 2 và mù u 1 trên *Phytophthora* sp., cao chiết mù u 2 trên *Rhizoctonia* sp..

Bảng 3. Giá trị MIC và MFC của cao chiết bình bát 2 và mù u 1 trên nấm Phytophthora sp.

Cao chiết	Bình bát 2			Mù u 1		
	5 mg/mL	30 mg/mL	50 mg/mL	5 mg/mL	15 mg/mL	20 mg/mL
Đường kính khuẩn ty (mm)	20,3 ± 1,2	10,2 ± 0,3	0,0 ± 0,0	9,8 ± 1,8	1,3 ± 0,4	0,0 ± 0,0
Phần trăm ức chế (%)	20,83 (MIC)	58,33 (MIC)	100 (MFC)	35,95 (MIC)	94,77 (MIC)	100 (MFC)

Ghi chú: Đối chứng âm cho đường kính khuẩn ty bằng 23,7 ± 0,6 mm, đối chứng dương Nystatin 1 mg/mL cho đường kính khuẩn ty bằng 0.

***Bảng 4. Giá trị MIC và MFC của cao chiết mù u 2 trên nấm Rhizoctonia* sp**.

Cao chiết	Mù u 2		
	5 mg/mL	15 mg/mL	25 mg/mL
Đường kính khuẩn ty (mm)	28 ± 4,2	20 ± 1,4	0,0 ± 0,0
Phần trăm ức chế (%)	16,42 (MIC)	40,3 (MIC)	100 (MFC)

Ghi chú: Đối chứng âm cho đường kính khuẩn ty bằng 33,5 ± 2,3 mm, đối chứng dương Nystatin 0,3 mg/mL cho đường kính khuẩn ty bằng 0.

Theo De la Cruz-Chacón *et al.* (2011), cao chiết từ loài *Annona diversifolia* (cùng chi với bình bát nước) có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Phytophthora infestan* từ 97% đến 100%. Celastrol là một hợp chất pentacyclic triterpenoid được tìm thấy trong cây mù u. Theo một thí nghiệm của Luo *et al.* (2005), Celastrol phân lập từ rễ của *Celastrus hypoleucus* thể hiện tác dụng ức chế sự tăng trưởng sợi nấm của *Rhizoctonia solani* với phần trăm ức chế là 83,6% tại 10 µg/mL. Ragasa *et al.* (2015) khi thực hiện sắc ký cột silicagel cao chiết dichloromethane cành và lá cây mù u cho thấy sự hiện diện của friedelin, squalene, canophyllic acid, canophyllalic acid, canophyllol và taraxasterol. Trong đó, canophyllol có hoạt tính kháng nấm chống lại *Rhizoctonia solani* với phần trăm ức chế là 25,93%. Có thể thấy rằng các loại cao chiết thực vật đều có khả năng ức chế thậm chí giết chết nấm với nồng độ sử dụng rất nhỏ.

IV. KẾT LUẬN

Các loại cao chiết đều chứa nhiều loại hợp chất thực vật với hàm lượng cao, đặc biệt là polyphenol, tannin và flavonoid, tương ứng với khả năng kháng oxy hóa mạnh ở cả ba phương pháp khử ion Fe^{3+}, khử gốc tự do DPPH và khử gốc tự do H_2O_2. Đặc tính sinh hóa nổi bật của cao chiết đã giải thích cho khả năng kháng nấm hiệu quả trong điều kiện in-vitro, là cơ sở khoa học cho các nghiên cứu chuyên sâu và ứng dụng thực tế trong việc phòng trị bệnh cây trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Andersen, O. M., and Markham, K. R. (Eds.). (2005). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC press.
2. Burgess L, W,, Knight T, E,, Tesoriero L, và Phan H, T. (2009). Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam. Chuyên khảo ACIAR số 129a, 210pp, ACIAR: Canberra.
3. Bizuayehu, D., Atlabachew, M., and Ali, M. T. (2016). Determination of some selected secondary metabolites and their invitro antioxidant activity in commercially available Ethiopian tea (*Camellia sinensis*). *SpringerPlus*, *5*(1), 412.
4. Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M and Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, *10*(3).
5. Nguyễn Đức Độ, Phạm Ngọc Cẩm, Đặng Anh Quốc và Phan Thị Trúc Quyên (2019). Đặc điểm sinh hóa và hoạt tính kháng nấm gây bệnh cây của cao chiết lá cỏ tranh, lá mua và diệp hạ châu đắng. Hội thảo Quốc gia Bệnh hại Thực vật Việt Nam lần thứ 18, 241 - 248.
6. De la Cruz-Chacón, I., González-Esquinca, A. R., Fefer, P. G., and Garcia, L. F. J. (2011). Liriodenine, early antimicrobial defence in *Annona diversifolia*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *66*(7-8), 377 - 384.
7. Dhandapani, R., Lakshmi, D., Balakrishnan, V., and Jayakumar, S. (2007). Preliminary phytochemical investigation and antibacterial activity of *Phyllanthus amarus* Schum & Thorn. *Ancient science of life*, *27*(1), 1.
8. Duy, H. T., Thanh, N. V., Thuy, L. N., and Do, D. N. (2020). Determination of total polyphenol, saponin contents and antibacterial activities of *Melastoma malabathricum* leaves by liquid-liquid extraction. *Can Tho University Journal of Science*. 12(1): 8 - 15.
9. Galanakis, C. M., Goulas, V., Tsakona, S., Manganaris, G. A., and Gekas, V. (2013). A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *International Journal of Food Properties*, *16*(2), 382 - 396.
10. Haas, H. (2014). Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*. *Natural product reports*, *31*(10), 1266 - 1276.
11. Hagerman, A. E., and Robbins, C. T. (1987). Implications of soluble tannin-protein complexes for tannin analysis and plant defense mechanisms. *Journal of Chemical Ecology*, *13*(5), 1243 - 1259.
12. Handique, J. G., and Gogoi, D. (2016). Antioxidant activities of the medicinal plants used for preparation of fermentation cakes of “haanj”, the rice based alcoholic beverage of ahom community people of Assam, India. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, *8*(2), 217-222.
13. Laitonjam, W. S., Yumnam, R., Asem, S. D., and Wangkheirakpam, S. D. (2013). Evaluative and comparative study of biochemical, trace elements and antioxidant activity of *Phlogacanthus pubinervius* T, Anderson and *Phlogacanthus jenkinsii* CB Clarke leaves.
14. Luo, D. Q., Wang, H., Tian, X., Shao, H. J., Liu, J. K. (2005). Antifungal properties of pristimerin and celastrol isolated from *Celastrus hypoleucus*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 61(1), 85 - 90.
15. Kotamraju, V. K. K. (2010). Management of Sheath Blight and Enhancement of Growth and Yield of Rice with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Auburn University, Electronic Theses and Dissertations, Abstract*. http://etd. Auburn.edu/handle/10415/2381
16. Pohl, C. H., Kock, J. L., and Thibane, V. S. (2011). Antifungal free fatty acids: a

review. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, *3*, 61 - 71.

17. Ragasa, C. Y., Ebajo Jr, V., De Los Reyes, M. M., Mandia, E. H., Brkljača, R., Urban, S. (2015). Triterpenes from *Calophyllum inophyllum* Linn. *Int J Pharmacogn Phytochem Res*, 7, 718 - 22.
18. Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R., and Verdian-rizi, M. (2008). Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai J Pharm Sci*, *32*, 17 - 20.
19. Nguyễn Phước Tuyên (2008). Kỹ thuật trồng sen. NXB Nông nghiệp thành phố Hồ Chí Minh.
20. Yokozawa, T., Chen, C. P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G. I and Nishioka, I. (1998). Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical pharmacology*, *56*(2), 213 - 222.
21. Zhao, C. N., Tang, G. Y., Cao, S. Y., Xu, X. Y., Gan, R. Y., Liu, Q.,... and Li, H. B. (2019). Phenolic profiles and antioxidant activities of 30 tea infusions from green, black, oolong, white, yellow and dark teas. *Antioxidants*, *8*(7), 215.
22. Zhu, C., Lei, M., Andargie, M., Zeng, J., Li, J. (2019). Antifungal activity and mechanism of action of tannic acid against *Penicillium digitatum*. Physiological and Molecular Plant Pathology.doi:10.1016/j.pmpp.2019.04.009.

KHẢO SÁT HIỆU QUẢ PHÒNG TRỊ BỆNH BẠC LÁ TRÊN RUỘNG LÚA CỦA VI KHUẨN *Serratia nematodiphila* CT-78 SAU 6 THÁNG TỒN TRỮ

Nguyễn Thanh Tùng, Cao Đình An Giang, Nguyễn Đắc Khoa*

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học,
Trường Đại học Cần Thơ.
Tác giả liên hệ: ndkhoa@ctu.edu.vn

ABSTRACT

Disease-reducing effects of the 6-month formulations of *Serratia nematodiphila* CT-78 against rice bacterial leaf blight under field conditions

This study aimed at testing for the disease-reducing effects of the 6-month formulations of the antagonistic Serratia nematodiphila CT-78 against rice bacterial leaf blight (Xanthomonas oryzae pv. oryzae) under field conditions. Experiments were carried out during the wet and dry seasons of 2019-2020 where three formulations composed of rice bran, rice husk and talc powder were tested. Rice seeds were treated with the formulations and pathogen inoculation was done at 45 days after sowing. The effects were shown and maintained until 15 days after pathogen inoculation by all formulations.

Keywords: *Bacterial leaf blight, formulation, rice, Serratia nematodiphila, Xanthomonas oryzae pv. oryzae.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bạc lá (cháy bìa lá) do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzea* (*Xoo*) là một trong những bệnh gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất lúa. Để phòng trị bệnh, nông dân đã và đang lạm dụng sử dụng thuốc bảo vệ thực vật bên cạnh việc sử dụng các giống lúa kháng bệnh. Tuy nhiên, sử dụng thuốc bảo vệ thực vật làm tăng tính kháng của mầm bệnh; gây ô nhiễm môi trường, giảm giá trị thương phẩm do lượng hóa chất tồn dư trên nông sản. Biện pháp sử dụng giống kháng lại tiêu tốn thời gian, kinh phí trong việc tuyển chọn và lai tạo, đồng thời có thể làm thay đổi đặc tính của mầm bệnh gây kháng lại các giống kháng (Kiyosawa, 1989; de Weger *et al.*, 1995; Gerhardson, 2002). Sử dụng các biện pháp sinh học để xử lý bệnh hại trên cây trồng ngày càng được quan tâm do thân thiện với môi trường và có khả năng làm tăng năng suất cây trồng (Postma *et al.*, 2003; Welbaum *et al.*, 2004).

Người phản biện: TS. Lê Phước Thạnh.

Vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78, được phân lập từ đất trồng lúa tại Cần Thơ, có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Xoo* trên đĩa thạch và hiệu quả làm giảm bệnh bạc lá lúa trong điều kiện nhà lưới và ngoài đồng (Nguyễn Đặng Ngọc Giàu, 2014; Phạm Trút My, 2015). Sau đó, chủng vi khuẩn này được tồn trữ trong các chế phẩm cám, trấu ở độ ẩm 50%, và chế phẩm bột talc ở độ ẩm 50 - 20% cho hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa tốt trong điều kiện nhà lưới khi xử lý ngâm hạt với huyền phù vi khuẩn có mật số là 10^5 CFU/mL (Nguyễn Huỳnh Nhã Uyên, 2018). Từ những lý do trên, đề tài được thực hiện nhằm khảo sát được hiệu quả làm giảm bệnh bạc lá lúa của vi khuẩn *S. nematodiphila* CT-78 sau 6 tháng tồn trữ trong các chất mang. Đây là tiền đề để tạo chế phẩm sinh học giúp nông dân phòng trừ bệnh bạc lá an toàn và hiệu quả.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Tạo chế phẩm dạng bột

Từng loại chất mang gồm bột talc thương mại, vỏ trấu và cám được trộn với $CaCO_3$ và CMC theo công thức của Vidhyasekaran và Muthamilan (1995). Sau đó, các loại chất mang này được phân phối vào các túi nylon với khối lượng 25 g/túi trước khi khử trùng nhiệt ướt 2 lần liên tục (mỗi lần cách nhau 24 giờ).

Thí nghiệm được chia thành 2 nhóm nghiệm thức là *(1)* nhóm 50% độ ẩm cho các chất mang cám và trấu và *(2)* nhóm 50%-20% độ ẩm cho bột talc. Các túi chất mang ở nhóm *(1)* được chủng 2 x 10^6 CFU/mL vi khuẩn, điều chỉnh độ ẩm đạt khoảng 50%, tiến hành ủ cho đến khi mật số đạt đến 10^9 CFU/g thì tiến hành tồn trữ trong điều kiện phòng thí nghiệm (25 ± 2^{o}C). Các túi chất mang ở nhóm *(2)* được được thực hiện tương tự như trên, nhưng độ ẩm được điều chỉnh xuống dưới 20% (bằng cách cách sấy ở 38^{o}C) sau khi vi khuẩn đối kháng đạt mật số 10^9 CFU/g và tiến hành tồn trữ trong điều kiện phòng thí nghiệm (25 ± 2^{o}C).

2.2. Khảo sát hiệu quả làm giảm bệnh của vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78 trong điều kiện ngoài đồng sau 6 tháng tồn trữ

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức khối hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 5 nghiệm thức cám, trấu, bột talc, đối chứng dương (Starner 20WP) và đối chứng âm (nước cất). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và phân thành 15 lô (20 m^2/lô) trên ruộng lúa. Vi khuẩn trong các túi chất mang cám, trấu và bột talc được pha loãng đến mật số 10^5 CFU/mL. Sau đó, huyền phù được sử dụng để ngâm hạt lúa giống (giống lúa IR50404 trong vụ Hè Thu và giống lúa Đài Thơm trong vụ Đông Xuân) 2 giờ trước khi sạ. Lúa được canh tác theo tập quán của nông dân địa phương, trừ việc kiểm soát bệnh bạc lá.

Đối với phương pháp chủng bệnh, huyền phù vi khuẩn *Xoo* với mật số 10^9 CFU/mL được phun tại thời điểm 45 ngày sau sạ. Chỉ tiêu được ghi nhận sau 5, 10 và 15 ngày sau chủng bệnh (NSCB) tại 9 điểm/lô, mỗi điểm được đặt khung kim loại có kích thước 400 cm^2. Những chỉ tiêu được ghi nhận bao gồm tổng số chồi,

tổng số lá, tổng số chồi bệnh, số lá bệnh, phần trăm diện tích lá nhiễm bệnh để xác định mức độ bệnh theo thang đánh giá IRRI (1996), trọng lượng hạt trong mỗi ô, tổng số hạt, số hạt chắc, số hạt chắc bị lem và số hạt lép.

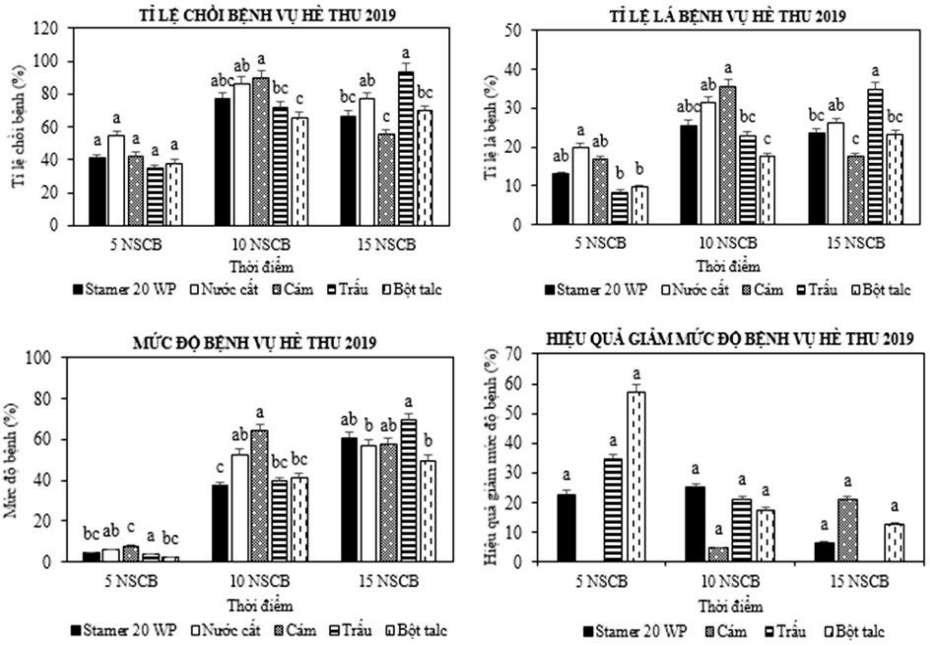
2.3. Phân tích số liệu

Số liệu được xử lý sơ bộ bằng phần mềm Microsoft Excel 2013. Sau đó, các số liệu này được phân tích phương sai một chiều (One-way ANOVA) bằng phần mềm R (vesion 3.5.3), kiểm định Duncan với $\alpha = 5\%$.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hiệu quả làm giảm làm bệnh bạc lá trên ruộng lúa của vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78 sau 6 tháng tồn trữ trong vụ Hè Thu năm 2019 và vụ Đông Xuân 2019 - 2020

Thí nghiệm được thực hiện để khảo sát hiệu quả phòng trị bệnh bạc lá trên ruộng lúa của chủng vi khuẩn đối kháng *S. nematodiphila* CT-78 tồn trữ 6 tháng trong các chất mang cám, trấu và bột talc. Các chỉ tiêu ghi nhận trong vụ Hè Thu 2019 được trình bày trong Hình 1.



Hình 1. Tỷ lệ chồi bệnh, tỷ lệ lá bệnh, mức độ bệnh và hiệu quả giảm mức độ bệnh của lúa trong vụ Hè Thu 2019 khi đượ`c xử lý với vi khuẩn trong các chất mang sau 6 tháng tồn trữ

Ghi chú: Trong cùng một thời điểm khảo sát, các cột có một hay nhiều chữ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%. NSCB: ngày sau chủng bệnh.

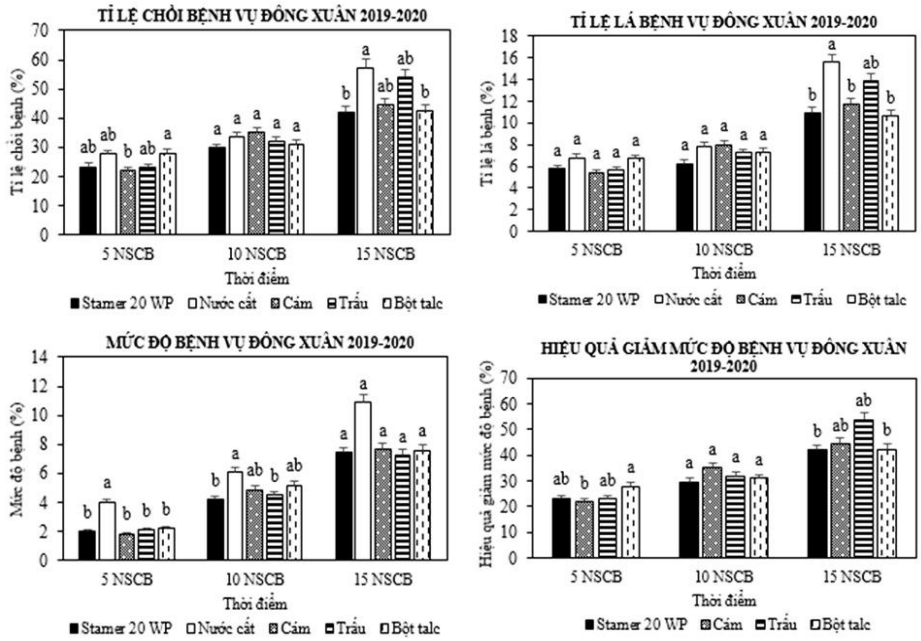
Tại thời điểm 5 NSCB chỉ có nghiệm thức cám không cho thấy hiệu quả giảm bệnh, nghiệm thức trấu và talc cho thấy hiệu quả giảm bệnh tương đương đối chứng dương. Trong đó, vi khuẩn đối kháng trong nghiệm thức bột talc cho hiệu quả làm giảm bệnh cao nhất (56,9%). Các chỉ tiêu tỷ lệ chồi bệnh, tỷ lệ lá bệnh và

mức độ bệnh của các nghiệm thức đều thấp hơn đối chứng âm ở thời điểm này. Tỷ lệ lá bệnh của lúa trong các nghiệm thức trấu và bột talc, mức độ bệnh của lúa trong nghiệm thức bột talc đều thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với đối chứng âm. Riêng mức độ bệnh của lúa trong nghiệm thức cám ở thời điểm này và các thời điểm 10 NSCB và 15 NSCB đều cao hơn đối chứng âm, nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Ở thời điểm 10 NSCB, vi khuẩn tồn trữ trong các nghiệm thức cám, trấu và bột talc đều có hiệu quả giảm bệnh giảm tương đương đối chứng dương. Tỷ lệ chồi bệnh, tỷ lệ lá bệnh và mức độ bệnh của lúa trong các nghiệm thức thấp hơn nghiệm thức đối chứng âm, trừ chỉ tiêu mức độ bệnh của lúa trong nghiệm thức cám. Trong đó, tỷ lệ chồi bệnh và tỷ lệ lá bệnh của lúa trong nghiệm thức bột talc thấp hơn đối chứng âm và khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Thời điểm 15 NSCB, vi khuẩn tồn trữ trong nghiệm thức trấu không còn duy trì được hiệu quả giảm bệnh. Nghiệm thức cám và bột talc duy trì hiệu quả giảm bệnh tương đương đối chứng dương. Mặc dù, mức độ bệnh của lúa ở nghiệm thức cám cao hơn đối chứng âm, nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Qua kết quả trên cho thấy vi khuẩn đối kháng trong nghiệm thức bột talc duy trì hiệu quả giảm bệnh tốt hơn trong nghiệm thức cám và trấu ở vụ Hè Thu 2019; duy trì hiệu quả giảm bệnh tương đương thuốc hóa học đến 15 NSCB. Tiếp theo, các chỉ tiêu ghi nhận trong vụ Đông Xuân 2019 - 2020 được trình bày trong Hình 2.



Hình 2. Tỷ lệ chồi bệnh, tỷ lệ lá bệnh, mức độ bệnh và hiệu quả giảm mức độ bệnh của lúa trong vụ Đông Xuân 2019 - 2020 khi được xử lý với vi khuẩn trong các chất mang sau 6 tháng tồn trữ

Ghi chú: Trong cùng một thời điểm khảo sát, các cột có một hay nhiều chữ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%. NSCB: ngày sau chủng bệnh.

Thời điểm 5 NSCB, vi khuẩn trong các nghiệm thức cám, trấu và bột talc có hiệu quả giảm bệnh tương đương đối chứng dương. Trong đó, nghiệm thức bột talc có hiệu quả giảm bệnh cao nhất (28%). Tỷ lệ chồi bệnh và tỷ lệ lá bệnh của lúa ở các nghiệm thức đều thấp hơn đối chứng âm, nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Mức độ bệnh của lúa các nghiệm thức thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng âm.

Hiệu quả giảm bệnh ở thời điểm 10 NSCB của vi khuẩn đối kháng trong các nghiệm thức cám, trấu và bột talc đều tăng và tương đương với đối chứng dương. Vi khuẩn trong nghiệm thức cám có hiệu quả giảm bệnh cao nhất (35%). Tỷ lệ chồi bệnh, tỷ lệ lá bệnh và mức độ bệnh của lúa ở các nghiệm thức thấp hơn đối chứng âm. Mức độ bệnh của lúa ở nghiệm thức trấu thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng âm. Riêng lúa ở nghiệm thức cám có tỷ lệ chồi bệnh và tỷ lệ lá bệnh cao hơn đối chứng âm, nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Tại thời điểm 15 NSCB, hiệu quả giảm bệnh trong các nghiệm thức cám, trấu và bột talc tiếp tục tăng và tương đương đối chứng dương. Vi khuẩn trong nghiệm thức trấu cho thấy hiệu quả làm giảm bệnh cao nhất (53,9%). Tỷ lệ chồi bệnh, tỷ lệ lá bệnh và mức độ bệnh của lúa ở các nghiệm thức đều thấp hơn đối chứng âm.

Tóm lại, kết quả thí nghiệm trong vụ Đông Xuân cho thấy cả vi khuẩn đối kháng trong cả ba nghiệm thức cám, trấu và bột talc đều tăng dần hiệu quả làm giảm bệnh và duy trì hiệu quả giảm bệnh tương đương thuốc hóa học đến 15 NSCB.

3.2. Năng suất lúa vụ Hè Thu năm 2019 và vụ Đông Xuân 2019 - 2020

Kết quả ghi nhận về năng suất lúa và tỷ lệ hạt chắc, hạt lem và hạt lép vụ Hè Thu cho thấy tất cả các nghiệm thức có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi so sánh (Bảng 1). Nghiệm thức bột talc cho năng suất cao hơn đối chứng dương. Nghiệm thức cám có tỷ lệ hạt chắc cao nhất, tỷ lệ hạt lem và lép thấp nhất so với các nghiệm thức còn lại.

Bảng 1. Năng suất và tỷ lệ hạt chắc, hạt lem và hạt lép của các nghiệm thức tại thành phố Cần Thơ trong vụ Hè Thu 2019

Chỉ tiêu	Nghiệm thức				
	Đối chứng dương	Đối chứng âm	Cám	Trấu	Bột talc
Năng suất (tấn/ha)	4,17^{a}	4,10^{a}	4,13^{a}	4,02^{a}	4,43^{a}
Tỷ lệ hạt chắc	53,67^{ab}	52,33^{ab}	62,00^{a}	47,33^{b}	61,33^{a}
Tỷ lệ hạt lem	10,33^{b}	11,33^{ab}	9,67^{b}	14,00^{a}	10,33^{b}
Tỷ lệ hạt lép	36,00^{a}	36,67^{a}	28,33^{a}	39,67^{a}	28,67^{a}

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biết không có ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Duncan.

Năng suất lúa, tỷ lệ hạt chắc, hạt lem và hạt lép vụ Đông Xuân cho thấy tất cả các nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa thống kê (Bảng 2). Nghiệm thức bột talc có năng suất cao hơn so với nghiệm thức cám và trấu.

Bảng 2. Năng suất và tỷ lệ hạt chắc, hạt lem và hạt lép của các nghiệm thức tại thành phố Cần Thơ trong vụ Đông Xuân 2019 - 2020

Chỉ tiêu	Nghiệm thức				
	Đối chứng dương	Đối chứng âm	Cám	Trấu	Bột talc
Năng suất (tấn/ha)	7,90[a]	7,86[a]	7,32[a]	7,53[a]	7,64[a]
Tỷ lệ hạt chắc	75,00[a]	78,67[a]	78,33[a]	73,33[a]	75,00[a]
Tỷ lệ hạt lem	4,67[a]	2,33[a]	3,33[a]	3,00[a]	7,00[a]
Tỷ lệ hạt lép	20,67[a]	19,00[a]	18,33[a]	23,67[a]	18,00[a]

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biết không có ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Duncan.

Nhìn chung, vi khuẩn đối kháng trong các nghiệm thức cám, trấu và bột talc vụ Đông Xuân 2019 - 2020 duy trì hiệu quả giảm bệnh và đạt năng suất tốt hơn vụ Hè Thu 2019. Kết quả sai khác này có thể do yếu tố giống lúa, điều kiện thời tiết, dịch bệnh và thuốc hóa học sử dụng khác nhau giữa hai vụ. Thời tiết mưa, bão ở vụ Hè Thu cũng tạo điều kiện cho cho bệnh bạc lá phát triển và tấn công mạnh lên cây lúa được xem là nguyên nhân chính gây sự khác biệt kết quả khảo sát hai vụ. Tuy nhiên, các nghiệm thức cám, trấu và bột talc ở vụ Hè Thu và Đông Xuân đều cho thấy hiệu quả giảm bệnh tương đương với nghiệm thức đối chứng dương. Năng suất và chất lượng hạt của đối chứng âm khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ở cả 2 vụ Hè Thu và Đông Xuân. Nghiệm thức bột talc có thể duy trì hiệu quả giảm bệnh ở cả hai vụ Hè Thu và Đông Xuân. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả khảo sát trong điều kiện nhà lưới của Nguyễn Huỳnh Nhã Uyên (2018) khi nhận thấy vi khuẩn trong nghiệm thức bột talc (50 - 20%) sau 6 tháng tồn trữ cho hiệu quả giảm bệnh tốt hơn nghiệm thức cám (50%) và trấu (50%) tại 3 thời điểm 5, 10 và 15 NSCB.

IV. KẾT LUẬN

Vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78 sau 6 tháng tồn trữ trong các chất mang cám, trấu và bột talc vẫn còn hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa trong điều kiện ngoài đồng. Hiệu quả phòng trị bệnh bạc lá của vi khuẩn trong các chất mang cám, trấu và bột talc trong vụ Đông Xuân tốt hơn vụ Hè Thu. Vi khuẩn trong chế phẩm sinh học có hiệu quả phòng trị tương đương thuốc hóa học, do đó có tiềm năng ứng dụng vào thực tiễn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gerhardson, B. (2002). Biological substitutes for pesticides. Trends Biotechnology, 20: 338 - 343.
2. IRRI (1996). Standard evaluation and utilization system for rice in Manila. International Rice Research Institute. Phillippines.

3. Kiyosawa, S. (1989). Breakdown of blast resistance in rice in relation to general strategies of resistance gene deployment to prolong effectiveness of disease resistance in plants. In K.J. Leonard and W.E Fry (Eds.), Plant Disease Epidemiology, Vol. 2, McGraw-Hill, New York. 251 - 283.
4. Nguyễn Đặng Ngọc Giàu (2014). Phân lập, định danh và khảo sát khả năng phòng trừ bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn trong đất ở thành phố Cần Thơ và tỉnh Hậu Giang. Luận văn tốt nghiệp Cao học. Ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ.
5. Nguyễn Huỳnh Nhã Uyên (2018). So sánh hiệu quả giảm bệnh của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. và *Serratia* sp. đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh cháy bìa lá lúa và tuyển chọn chất mang tồn trữ vi khuẩn. Luận văn tốt nghiệp cao học. Ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ.
6. Phạm Trút My (2015). Khảo sát hiệu quả phòng trừ bệnh cháy bìa lá của vi khuẩn *Serratia nematodiphila* trên ruộng lúa. Luận văn tốt nghiệp cao học. Ngành Sinh thái học. Khoa Khoa học Tự nhiên. Trường Đại học Cần Thơ.
7. Postma, J., Montanari, M. and van den Boogert, P.H.J.F. (2003). Microbial enrichment to enhance the disease suppressive activity of compost. European Journal of Soil Biology, 39: 157 - 163.
8. de Weger, L. A., van der Bij, A.J., Dekkers, L.C., Simons, M., Wijffelman, C. A. and Lugtenberg, B.J.J. (1995). Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial pseudomonads. FEMS Microbiology Ecology, 17: 221 - 228.
9. Welbaum, G., Sturz, A.V., Dong, Z. and Nowak, J. (2004). Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. Critical Reviews in Plant Sciences, 23: 175 - 193.
10. Vidhyasekaran, P. and Muthamilan, M. (1995). Development of formulation of Pseudomonas fluorescens for control of chickpea wilt. Plant Disease, 79: 782 - 786.

HIỆU LỰC DIỆT CỎ TRANH (*Imperata cylindrica*) TRÊN VƯỜN CÂY CAO SU (*Hevea brasiliensis*) CỦA THUỐC Glufosinate ammonium

Nguyễn Phương Vinh, Nguyễn Anh Nghĩa, Trần Ánh Pha và Nguyễn Thị Thanh Trang

Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam

ABSTRACT

Efficacy of Glufosinate ammonium on cogongrass (*Imperata cylindrica*) control in rubber (*Hevea brasiliensis*) plantation

A study has been carried out with the aim of appraising the potential of Glufosinate ammonium in substitution of Glyphosate, which will be banned in july 2021, to control cogongrass (Imperata cylindrica) in rubber (Hevea brasiliensis) plantation. The experiment includes five treatments, in which four treatments was sprayed herbicides (Glufosinate ammonium at three doses 0,6 kg a.i/ha, 0,75 kg a.i./ha, and 0,9 kg a.i./ha; Glyphosate at 1,92 kg a.i./ha) and one control treatment spraying water. The spraying volume was 500 l/ha for all treatment. All herbicide treatments were effective in control of cogongrass in rubber plantation. Based on the efficacy and the cost, two Glufosinate ammonium doses 0,6 kg a.i./ha (Fasfix 150SL 4 l/ha) and 0,75 kg a.i./ha (Fasfix 150SL 5 l/ha) can recommend to substitute Glyphosate in control of cogongrass in rubber plantation.

Keywords: *Glufosinate ammonium, Glyphosate, Imperata cylindrica, Hevea brasiliensis.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cỏ tranh (*Imperata cylindrica* (L.) P. Beauv) là một trong những loài cỏ nguy hại nhất trên vườn cây cao su (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). Cỏ cạnh tranh với cây cao su về không gian sống, nước và chất dinh dưỡng, đặc biệt là một trong những nguyên nhân làm phát sinh phát triển bệnh loét sọc miệng cạo gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất mủ cao su. Trên những vườn cao su có nhiều cỏ tranh, thời gian kiến thiết cơ bản có thể phải kéo dài thêm từ 2 - 3 năm. Trong giai đoạn mùa khô, cỏ tranh còn là nguyên nhân gây cháy lô, làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến chất lượng vườn cây (Nguyễn Hải Đường *và cs.*, 1990; Phan Thành Dũng *và cs.*, 2014; Chee và Chung, 2014).

Người phản biện: TS. Võ Thị Thu Oanh.

Để quản lý cỏ tranh trên vườn cao su, biện pháp hóa học đang được xem là phù hợp nhất. Thuốc trừ cỏ đang được khuyến cáo sử dụng là Glyphosate (Tập đoàn Công nghiệp Cao su Việt Nam, 2012), đây là loại thuốc có nhiều tính năng ưu việt, hiệu quả trừ cỏ đã được khẳng định trong thực tiễn sản xuất. Tuy nhiên, một số kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy, Glyphosate có ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người, Cơ quan Nghiên cứu Ung thư Quốc tế (International Agency for Research on Cancer) thuộc Tổ chức Y tế thế giới (World Health Organization) đã xếp Glyphosate vào nhóm chất có thể gây ung thư ở người (IARC, 2019). Chất này cũng được đánh giá là tác nhân quan trọng gây bệnh ung thư hạch không Hodgkin của một nông dân ở Mỹ (U.S. News, 2019). Trước những tác hại của Glyphosate đối với sức khỏe con người, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã quyết định loại Glyphosate ra khỏi Danh mục các loại thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng tại Việt Nam từ tháng 7 năm 2021 (Quyết định số 1186/QĐ-BNN-BVTV ngày 10/4/2019 và Thông tư số 06/2020/TT/-BNNPTNT ngày 24 tháng 4 năm 2020).

Trong Danh mục thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng tại Việt Nam, Glufosinate ammonium là loại thuốc có nhiều đặc tính kỹ thuật tương đối phù hợp để thay thế Glyphosate. Ưu điểm của loại thuốc này là phát huy hiệu quả trừ cỏ nhanh, trừ được nhiều loài cỏ hòa bản, năn lác và lá rộng. Thuốc xâm nhập vào cây qua lá và những bộ phận có vỏ màu xanh, không xâm nhập qua các mô đã hóa gỗ, phù hợp áp dụng quản lý cỏ dại trên các vườn cây lâu năm (Nguyễn Mạnh Chinh *và cs.*, 2010). Về độc tính, thuốc này thuộc nhóm độc III, sau khi xử lý thuốc nhanh chóng bị phân hủy bởi các vi sinh vật đất nên ít ảnh hưởng đến môi trường. Bài viết này trình bày kết quả đánh giá hiệu lực diệt trừ cỏ tranh trên vườn cao su của thuốc Glufosinate ammonium.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 6 - 8/2020, tại Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam, xã Lai Hưng, huyện Bàu Bàng, tỉnh Bình Dương.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

Vườn cao su trồng năm 2017, địa hình bằng phẳng, canh tác theo phương thức trồng thuần, có thảm cỏ tranh đang trong thời kỳ sinh trưởng mạnh.

Thuốc trừ cỏ chứa hoạt chất Glufosinate ammonium (Fasfix 150SL) và Glyphosate (Vifosat 480SC).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí giữa hai hàng cây cao su. Bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên 1 yếu tố, 5 nghiệm thức (NT), 3 lần lặp lại, mỗi ô cơ sở có diện tích 25 m^2.

Bảng 1. Nội dung các nghiệm thức

NT	Hoạt chất (Thuốc)	Liều lượng thuốc/1 ha	
		Hoạt chất (kg)	Thương phẩm (lít)
1	Glufosinate ammonium (Fasfix 150SL)	0,60	4
2	Glufosinate ammonium (Fasfix 150SL)	0,75	5
3	Glufosinate ammonium (Fasfix 150SL)	0,90	6
4	Glyphosate (Vifosat 480SC)	1,92	4
5	Phun nước		

Thực hiện: Xử lý thuốc 1 lần vào thời điểm cỏ đang sinh trưởng mạnh, chiều cao trung bình thảm cỏ khoảng 60 cm. Lượng thuốc đã pha sử dụng: 500 lít/ha (1,25 lít/ô cơ sở 25 m^2). Các ô cở sở được ngăn cách bằng tấm nilong để tránh thuốc bay từ ô này sang ô khác.

Phương pháp và chỉ tiêu theo dõi: Quan trắc tại 4 điểm trên 2 đường chéo góc của ô cơ sở, mỗi điểm quan trắc có diện tích 0,25 m^2 (0,5 m x 0,5 m). Trọng lượng cỏ tươi được cân 1 lần tại thời điểm trước khi xử lý thuốc và 2 lần tại các thời điểm 21 và 40 ngày sau xử lý thuốc. Số lượng cỏ tươi được đếm 1 lần trước khi xử lý thuốc và 4 lần tiếp theo tại các thời điểm 7, 14, 21 và 40 ngày sau xử lý thuốc. Đếm cỏ theo phương pháp đếm trong tài liệu tập huấn của Trung tâm Kiểm định và Khảo nghiệm thuốc Bảo vệ thực vật phía Nam (2014).

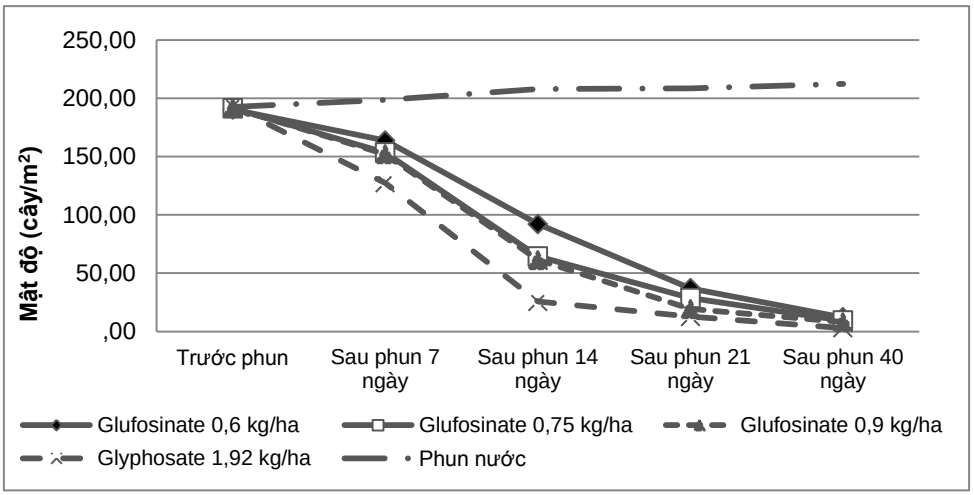
Hiệu lực trừ cỏ: Tính hiệu lực trừ cỏ của các nghiệm thức theo công thức Abbott.

$$\text{Hiệu lực (\%)} = \frac{\text{Trọng lượng cỏ ô đối chứng} - \text{Trọng lượng cỏ ô xử lý thuốc}}{\text{Trọng lượng cỏ ô đối chứng}} \times 100$$

Xử lý số liệu: Số liệu được tổng hợp bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê bằng phần mềm SAS.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Thí nghiệm được thực hiện trên vườn cây cao su có thảm cỏ tranh đang trong giai đoạn sinh trưởng mạnh. Trước xử lý, thảm cỏ có chiều cao trung bình khoảng 60 cm, mật độ cỏ tranh biến động từ 190,3 - 192,7 cây/m^2, không có sự khác biệt thống kê về trọng lượng cỏ tươi giữa các nghiệm thức.



Hình 1. Diễn biến mật độ cỏ tranh tại các nghiệm thức

Bảng 2. Hiệu lực trừ cỏ của các nghiệm thức

Nghiệm thức	Hiệu lực trừ cỏ (%)	
	Sau phun 21 ngày	Sau phun 40 ngày
Glufosinate 0,6 kg/ha	89,5	92,4
Glufosinate 0,75 kg/ha	91,9	95,5
Glufosinate 0,9 kg/ha	96,6	96,9
Glyphosate 1,92 kg/ha	97,3	98,4
F tính	*2,75*	*2,15*
Mức ý nghĩa	*ns*	*ns*
CV%	*2,12*	*1,62*

Ghi chú: Nghiệm thức đối chứng (phun nước) được sử dụng để tính hiệu lực trừ cỏ của các nghiệm thức xử lý thuốc, không đưa vào xử lý thống kê.

Triệu chứng cỏ tranh bị nhiễm độc Glufosinate ammonium diễn ra khá nhanh, sau phun 1 ngày phần lá cỏ đã chuyển dần từ màu xanh sang màu vàng nhạt, những ngày tiếp theo cỏ bị chết dần theo hướng từ ngọn xuống gốc và thân ngầm. Tại thời điểm 7 ngày sau phun, mật độ cỏ tại các NT xử lý thuốc giảm còn 127,3 - 163,7 cây/m^2. Đến 21 ngày sau phun, mật độ cỏ tại các NT xử lý thuốc là 12,7 - 37,1 cây/m^2, hiệu lực trừ cỏ đạt 89,5 - 97,3%, không có sự khác biệt thống kê về hiệu lực trừ cỏ giữa các NT xử lý thuốc.

Sau phun 40 ngày, các NT xử lý thuốc đều đạt hiệu lực trừ cỏ ở mức cao, hầu hết cỏ tranh đã chết và không tái sinh trở lại, các loại cỏ khác bắt đầu nảy mầm và thiết lập thảm cỏ mới. Mật độ cỏ tranh tại các NT sử dụng Glufosinate ammonium là 8,0 - 12,0 cây/m^2, hiệu lực trừ cỏ đạt 92,4 - 96,9%. Tại NT sử dụng Glyphosate, mật độ cỏ tranh là 3,0 cây/m^2, hiệu lực trừ cỏ đạt 98,4%. Không có sự khác biệt thống kê về hiệu lực trừ cỏ giữa các NT xử lý thuốc.

Glufosinate 0,6 kg/ha - trước phun

Glufosinate 0,6 kg/ha - sau phun 7 ngày

Glufosinate 0,6 kg/ha - sau phun 40 ngày

Glufosinate 0,75 kg/ha - trước phun

Glufosinate 0,75 kg/ha - sau phun 7 ngày

Glufosinate 0,75 kg/ha - sau phun 40 ngày

Glufosinate 0,9 kg/ha - trước phun

Glufosinate 0,9 kg/ha - sau phun 7 ngày

Glufosinate 0,9 kg/ha - sau phun 40 ngày

Glyphosate 1,92 kg/ha - trước phun

Glyphosate 1,92 kg/ha - sau phun 7 ngày

Glyphosate 1,92 kg/ha - sau phun 40 ngày

Đối chứng - trước phun

Đối chứng - sau phun 7 ngày

Đối chứng - sau phun 40 ngày

Hình 2. Hiện trạng thảm cỏ các nghiệm thức tại thời điểm trước xử lý thuốc, sau xử lý thuốc 7 ngày và sau xử lý thuốc 40 ngày

Để khuyến cáo một loại thuốc sử dụng trừ cỏ trên vườn cao su cần xem xét cả hai phương diện hiệu quả kỹ thuật và chi phí đầu tư. Xét về hiệu quả kỹ thuật, không có sự khác biệt thống kê về hiệu lực trừ cỏ giữa các công thức thuốc thí nghiệm. Tuy nhiên, về chi phí tiền thuốc thì có sự chênh lệch. Trong đó, công thức Glufosinate ammonium 0,6 kg/ha (Fasfix 150SL 4 lít/ha) có chi phí tiền thuốc thấp nhất, thấp hơn 40.000 đồng/ha so với sử dụng Glyphosate. Đây là công thức thuốc có triển vọng để áp dụng quản lý cỏ tranh trên vườn cao su.

Glufosinate ammonium là thuốc trừ cỏ tiếp xúc, thuốc chỉ phát huy hiệu quả cao nhất nếu được phun ướt đều các bộ phận có màu xanh của cây cỏ, khi cỏ đang trong giai đoạn sinh trưởng mạnh. Vì vậy, việc sử dụng Glufosinate ammonium trên những vườn cao su có thảm cỏ tranh quá dày (mật độ > 300 cây/m^2 và chiều cao thảm cỏ > 80 cm), cần điều chỉnh lại lượng thuốc đã pha phù hợp với thực trạng thảm cỏ, có thể tăng lượng thuốc đã pha lên 600 lít/ha với lượng Glufosinate ammonium sử dụng là 0,75 kg/ha (Fasfix 150SL 5 lít/ha).

Bảng 3. Khái toán chi phí thuốc trừ cỏ của các nghiệm thức

Nghiệm thức	Đơn giá/1 lít (đồng)	Tiền thuốc/ha (đồng)	Hiệu lực sau phun 40 ngày (%)
Glufosinate 0,6 kg/ha (Fasfi × 4 lít/ha)	130.000	520.000	92,4
Glufosinate 0,75 kg/ha (Fasfi ×5 lít/ha)	130.000	650.000	95,5
Glufosinate 0,9 kg/ha (Fasfi × 6 lít/ha)	130.000	780.000	96,9
Glyphosate 1,92 kg/ha (Vifosate 4 lít/ha)	140.000	560.000	98,4

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Trong điều kiện thí nghiệm, thuốc Glufosinate ammonium ở các mức liều lượng 0,6 kg/ha, 0,75 kg/ha và 0,9 kg/ha đảm bảo hiệu lực diệt cỏ tranh trên vườn cao su, thuốc không ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây cao su.

4.2. Đề nghị

Sử dụng thuốc Glufosinate ammonium ở liều lượng từ 0,6 - 0,75 kg/ha (Fasfix 150SL 4 - 5 lít/ha) với lượng thuốc đã pha từ 500 - 600 lít/ha để diệt trừ cỏ tranh trên vườn cao su.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chee Y. K., and Chung G. F.. (2014). Efficient weed management to enhance rubber production. Acadamy of Sciences Malaysia, and International Rubber Research and Development Board.
2. Nguyễn Mạnh Chinh, Phạm văn Biên, Bùi Cách Tuyến, Nguyễn Mạnh Hùng và Mai Thành Phụng (2010). Cẩm nang thuốc bảo vệ thực vật. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
3. Phan Thành Dũng, Nguyễn Anh Nghĩa, Trần Ánh Pha và Nguyễn Đôn Hiệu (2014). Tài liệu tập huấn kỹ thuật bảo vệ thực vật cây cao su. Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam.
4. Nguyễn Hải Đường, Thân Thị Minh Tâm, Phan Thành Dũng, Lê Thị Thanh Phượng và Hồ Ngọc Thành (1990). Phòng trừ bệnh hại và

cỏ dại cho cây cao su. Báo cáo Tổng kết đề tài cấp Tổng Công ty Cao su Việt Nam.

5. Tập đoàn Công nghiệp Cao su Việt Nam (2012). Quy trình Kỹ thuật cây cao su.
6. Trung tâm Kiểm định và Khảo nghiệm thuốc Bảo vệ thực vật phía Nam (2014). Tài liệu tập huấn khảo nghiệm thuốc bảo vệ thực vật.
7. IARC (2019). Glyphosate cancer determination challenged by world consensus. Retrieved October 07, 2020, <https://geneticliteracyproject.org/glp-facts/iarc-international-agency-research-cancer-glyphosate-determination-world-consensus/>.
8. U.S. News (2019). Man who blamed Monsanto's Roundup weed killer for his cancer gets $80 million award. Retrieved October 07, 2020, <https://www.nbcnews.com/news/us-news/man-who-blamed-monsanto-s-roundup-weed-killer-his-cancer-n988226>.
9. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2019). Quyết định số 1186/QĐ-BNN-BVTV ngày 10/04/2019 về việc loại bỏ thuốc bảo vệ thực vật chứa hoạt chất Glyphosate ra khỏi Danh mục thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng tại Việt Nam.
10. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2020). Thông tư số 06/2020/TT-BNNPTNT sửa đổi, bổ sung Điều 2 của Thông tư số 10/2019/TT-BNNPTNT ngày 20/9/2019 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn về việc ban hành Danh mục thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng, cấm sử dụng tại Việt Nam.

TUYỂN CHỌN DỊCH TRÍCH THỰC VẬT CÓ KHẢ NĂNG GIÚP GIẢM BỆNH BẠC LÁ LÚA (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)

Trương Văn Xạ[1] và Nguyễn Đắc Khoa[2]*

[1] Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long
[2] Trường Đại học Cần Thơ
** Tác giả liên hệ: ndkhoa@ctu.edu.vn*

ABSTRACT

Disease-reducing effects of aqueous plant extracts against rice bacterial leaf blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) under greenhouse conditions

Bacterial leaf blight (Xanthomonas oryzae pv. oryzae) is one of the most serious diseases of rice. Alternative strategies have been developed to control the disease where the use of plant extracts has increasingly been focused. Aqueous extracts of the ten commonly found plants in the Mekong Delta of Vietnam were selected to screen for those having disease-reducing effects under greenhouse conditions. The effects were observed when rice seeds were treated with the nine extracts including Chromolaena odorata (cỏ hôi), Lantaca camara (trâm ổi), Kalanchoe pinnata (sống đời), Ageratum conyzoides (cỏ cứt heo), Ocimum sanctum (húng quế), Eclipta prostrate (cỏ mực), Allium sativum (tỏi), Azadirachta indica (neem) and Datura metel (cà độc dược). These extracts did not show any adverse effects on the germination and development of rice seeds. Similar effects compared to that of the chemical control were recorded from the treatments using 1% and 2% (w/v) extracts of Ageratum conyzoides and Kalanchoe pinnata. The effects were maintained until 21 days after pathogen inoculation.

Keywords: *Ageratum conyzoides, bacterial leaf blight, Kalanchoe pinnata, plant extract, rice, Xanthomonas oryzae pv. oryzae*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bạc lá (cháy bìa lá) lúa do vi khuẩn Gram âm *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) gây ra (Khush, 2005). Vi khuẩn *Xoo* xâm nhiễm và phát triển trong mạch dẫn; kết quả làm nghẽn mạch dẫn, làm cho cây mạ chết héo hoặc bạc lá ở giai đoạn lúa đẻ nhánh (Lutz, 2010). Bệnh có thể làm giảm năng suất từ 20 - 50% (Zhang *et al.*, 2004). Các biện pháp phòng trừ bệnh bạc lá lúa như sử dụng các loại thuốc hoá học (Chithrashree *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2012); sử dụng giống mang gen kháng (Shah *et al.*, 2009; Bhasin *et al.* 2012; Natraj Kumar *et al.*, 2012; Verdier *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015); sử dụng vi sinh vật đối kháng (Vasudevan *et al.*, 2002;

Người phản biện: TS. Nguyễn Đức Độ.

Suryadi *et al.*, 2013; Van Hop *et al.*, 2014). Một chiến lược khác để phòng trừ bệnh bạc lá là kích thích tính kháng bệnh lưu dẫn (kích kháng). Kích kháng là phương pháp giúp cho cây bị nhiễm bệnh có khả năng kháng được bệnh sau khi được xử lý bằng tác nhân kích kháng (Kloepper *et al.*, 1992) và là phương pháp quản lý bệnh hại trên cây trồng một cách bền vững và thân thiện với môi trường (Pieterse *et al.*, 2014; Nguyễn Đắc Khoa, 2018). Tác nhân kích kháng không tác động trực tiếp lên mầm bệnh mà chúng tạo ra các tín hiệu giúp kích thích cơ chế tự vệ có sẵn trong cây, trong đó có sự tăng tích luỹ các hợp chất phenol, phytoalexin và protein liên quan đến quá trình phát sinh bệnh (Pathogenesis Related proteins-PR-protein) (van Loon *et al.*, 1998; van Loon, 1999). Các tác nhân kích kháng mầm bệnh bạc lá lúa đã được báo cáo như acilbenzolar-S-methyl, Salicylic acid (SA) (Mohan Babu *et al.*, 2003a; 2003b) và vitamin B_1 (Ahn *et al.*, 2005); vi khuẩn *Bacillus* spp. (Chithrashree *et al.*, 2011), *Pseudomonas fluorescens* (Lingaiah và Umesha, 2013); hoặc dịch trích cà độc dược (*Datura metel*) (Kagale *et al.*, 2004), cang mai (*Adhatoda vasica*) (Govindappa *et al.*, 2011), cây cỏ hôi (*Chromolaena odorata*) (Khoa, 2010; Khoa *et al.*, 2011; Rodríguez-Algaba *et al.*, 2015), ngũ trảo (*Vitex negundo*) (Nisha *et al.*, 2012). Quản lý bệnh bạc lá lúa bằng việc sử dụng tác nhân kích kháng có nguồn gốc tự nhiên như dịch trích thực vật sẽ lợi thế hơn sử dụng hóa chất hay vi sinh vật như dễ phân hủy, không độc hại cho người và môi trường, dễ sử dụng và có thể tận dụng nguồn nguyên liệu tại chỗ nên giúp giảm chi phí sản xuất (Nguyễn Đắc Khoa, 2018).

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Vi khuẩn *Xoo* từ bộ sưu tập mầm bệnh của Nhóm Nghiên cứu Bệnh cây, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường Wakimoto cải tiến (Karganilla *et al.*, 1973).

Giống lúa Jasmine 85 được xử lý bằng nước ấm (45 ± 1^{o}C), sau đó ngâm hạt trong dịch trích sống đời trong 24 giờ (đối chứng âm ngâm nước), ủ ấm trong 48 giờ trước khi sạ. Sạ 10 hạt/chậu (30 × 45 cm - chứa 7 kg đất phù sa đã được xử lý với vôi trước đó). Đối chứng âm là ngâm hạt trong nước 24 giờ. Đối chứng dương sử dụng thuốc hóa học Starner 20WP theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tuyển chọn các loại dịch trích thực vật

Các loại dịch trích thực vật được tuyển chọn cho nghiên cứu phải đáp ứng ba tiêu chí gồm (1) cây cỏ phổ biến, dễ tìm và thường dùng làm thuốc dân gian; (2) loại thực vật được sử dụng làm vật liệu cho các nghiên cứu kích kháng trên cây thuốc lá, cà chua hoặc cây lúa chống lại các mầm bệnh vi khuẩn hoặc nấm hại và (3) dịch trích thực vật có chứa một số hoạt chất biến dưỡng thứ cấp có khả năng kích thích tính kháng của cây trồng như mô tả bởi Kuć (2006) (Bảng 1).

Bảng 1. Một số hợp chất biến dưỡng thứ cấp có khả năng kích thích tính kháng bệnh trong cây trong trồng (Kuć, 2006)

Nhóm chất	Chất biến dưỡng thứ cấp
Acid amin	Glycine, glutamic, *α*-aminobutyric, *β*-aminobutyric, *γ*-aminobutyric, *α*-aminoisobutyric, *D*-phenylalanine, *D*-alanine và *D*-*L*-tryptophan.
Acid hữu cơ	Salicylic, *m*-hydroxybenzoic, *p*-hydroxybenzoic, phloroglucinol, gallic, isovanillic, vanillic, protocatecheic, syringinc và 1,3,5-benzene tricarboxylic và một số hợp chất khác.
Acid béo	Oleic, linoleic, linolenic, arachidonic và eicosapentaenoic.
Muối hữu cơ	Paraquat, acifluorfen, sodium chlorate, nitric oxyde, reactive oxygen species, *D*-galacturonic, *D*-glucuroinic, glycollate, oxalic, polyacrylic và một số hợp chất kim loại.
Hormone thực vật	2,6-dichloroisonictonic, phenolic, jasmonic, methyl jasmonate, benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acids-methyl ester, ethylene, ethylene diamine tetraacetic acid, riboflavin, probenazole, 2,2-dichcloro-3,3-di-methylcyclopropane carboxylic, dodecyl *D*-*L*-alanine và dodecyl-*L*-valine.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của các loại dịch trích thực vật lên khả năng nảy mầm và phát triển của hạt lúa

Thí nghiệm được thực hiện dựa trên phương pháp đặt hạt trên giấy Whatman ẩm của Singh và Rao (1977). Bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại gồm 2 nhân tố là (1) nồng độ dịch trích (0,5%, 1% và 2%) và (2) cách xử lý (ngâm hạt trong dịch trích 24 giờ và áo hạt bằng dịch trích 1 giờ). Các nghiệm thức được giữ ở điều kiện nhiệt độ phòng (25 ± 2°C). Nước được tưới để giữ ẩm cho các nghiệm thức mỗi ngày một lần.

Các chỉ tiêu được ghi nhận gồm (1) tỷ lệ nảy mầm (7 ngày sau đặt hạt); (2) chiều dài rễ và chiều dài chồi mầm ở ba thời điểm 3, 5 và 7 ngày sau đặt hạt; và (3) chỉ số nảy mầm (7 ngày sau đặt hạt) được thực hiện như mô tả của Arumugam *et al.* (2008) và Doni *et al.* (2014).

2.2.3. Khảo sát khả năng làm giảm bệnh của các loại dịch trích thực vật trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lặp lại gồm 2 nhân tố là 9 loại dịch trích thực vật (cỏ hôi, trâm ổi, sống đời, cỏ cứt heo, húng quế, cỏ mực, tỏi, neem và cà độc dược) và 3 nồng độ dịch trích (0,5%, 1% và 2%). Nghiệm thức đối chứng âm không xử lý dịch trích. Nghiệm thức đối chứng dương sử dụng thuốc hóa học Starner 20WP đặc trị bệnh bạc lá.

Chủng bệnh nhân tạo được thực hiện nhý mô tả của Khoa *et al. (*2017). Chỉ tiêu ghi nhận là chiều dài vết bệnh được ghi nhận 7, 14 và 21 ngày sau chủng bệnh (Khoa *et al.*, 2017); hiệu quả giảm bệnh được tính như mô tả của Nisha *et al.* (2012) và Khoa *et al. (*2017).

2.3. Phân tích số liệu

Số liệu tỷ lệ nảy mầm, chiều dài chồi mầm, chiều dài rễ và chiều dài vết bệnh bạc lá được tính trung bình của các lần lặp lại, phân tích phương sai và so sánh bằng phép thử Duncan với mức ý nghĩa 5% theo từng thời điểm khảo sát bằng phần mềm thống kê SAS® 9.1 (SAS Institure Inc., Cary, USA).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Các loại dịch trích thực vật được tuyển chọn để nghiên cứu kích kháng bệnh bạc lá lúa

Kết quả tuyển chọn dịch trích thực vật được trình bày trong Bảng 2. Trong đó, các loại thực vật được tuyển chọn đều đạt được các tiêu chí đã đặt ra, trong đó tiêu chí là cây cỏ phổ biến và tiêu chí chứa hợp chất biến dưỡng thứ cấp có khả năng kích kháng luôn được chú trọng trong quá trình tuyển chọn. Các loại thực vật đã được tuyển chọn đều có chứa các hợp chất phenolic và flavonoid. Hợp chất có vai trò quan trọng trong quá trình kích thích tính kháng bệnh của cây trồng (Manandhar *et al.*, 2000; Ku, 2006). Bên cạnh đó, các loại dịch trích thực vật này đã được sử dụng làm vật liệu trong các nghiên cứu chống lại bệnh đốm vằn (*Rhizoctonia solani*) trên cây lúa (Kagale *et al.*, 2004; Khoa *et al.*, 2011; Pal *et al.*, 2011).

Bảng 2. Mười loại cây cỏ được sử dụng trong các nghiên cứu kích kháng bệnh trên lúa

Tên thực vật	Hoạt chất	Đặc điểm	Nghiên cứu liên quan
Cỏ hôi (*Chromolaena odorata*)	Ancaloid, tannin, flavanoid, saponin, steroid, anisic acid, phenolic	Mọc hoang dại khắp nơi	Khoa *et al.* (2011) Trần Văn Dương (2012) Rodríguez-Algaba *et al.* (2015)
Cỏ cứt heo (*Ageratum conyzoides*)	Cadinen, caryphyllen, geratocromen, phenolic	Mọc hoang dại khắp nơi	Khoa *et al.* (2011) Võ Văn Chi (2012)
Sống đời (*Kalanchoe pinnata*)	Glycozit acid flavionoid, phenolic	Trồng làm thuốc và làm cảnh	Khoa *et al.* (2011) Võ Văn Chi (2012)
Cây Neem (*Azadirachta indica*)	Salannin, oleic acid, linoleic acid, palmitic acid, stearic acid, linolenic	Trồng làm thuốc và trị bệnh.	Khoa *et al.* (2011) Nisha *et al.* (2012)
Trâm ổi (*Lantaca camara*)	Terpen bicyclic, *L*-α-phelandren, lantanin	Mọc hoang hoặc trồng làm cảnh	Govindappa *et al.* (2011) Võ Văn Chi (2012)
Cà độc dược (*Datura metel*)	Saponin, flavonoid, tannin	Mọc hoang và trồng làm thuốc	Kagale *et al.* (2004) Khoa *et al.* (2011)
Cỏ mực (*Eclipta Prostrate*)	Alkaloid ecliptin, nicotine, tanin	Mọc hoang dại khắp nơi	Khoa *et al.* (2011) Võ Văn Chi (2012)
Tỏi (*Allium sativum*)	Allicin, diallyl và một số hợp chất chứa lưu huỳnh	Phổ biến khắp nơi, làm gia vị	Govindappa *et al.* (2011) Khoa *et al.* (2011) Võ Văn Chi (2012)
Húng quế (*Ocimum sanctum*)	Linalol, cineol, estragol methyl-chavicol	Trồng làm thuốc và rau xanh	Pal *et al.* (2011) Võ Văn Chi (2012)
Sả (*Cymbopogan citrus*)	Geraniol, citronellol	Trồng làm thuốc và gia vị.	Pal *et al.* (2011) Võ Văn Chi (2012)

3.2. Ảnh hưởng của các loại dịch trích thực vật lên khả năng nảy mầm và phát triển của hạt lúa

Nghiên cứu được thực hiện với 10 loại dịch trích thực vật với hai biện pháp xử lý là áo hạt và ngâm hạt ở các nồng độ khác nhau. Kết quả khảo sát các loại dịch trích cỏ hôi, trâm ổi, sống đời, cỏ cứt heo, húng quế, cỏ mực, tỏi, cây neem, cà độc dược đều không ức chế khả năng nảy mầm và phát triển của hạt lúa (ngoại trừ dịch trích sả). Dịch trích sả ảnh hưởng đến khả năng nảy mầm và phát triển của của hạt lúa được trình bày ở Bảng 3. Chiều chồi mầm và chiều dài rễ mầm của hạt lúa ở nghiệm thức xử lý dịch trích sả thời điểm 3 ngày sau khi đặt hạt đều ngắn khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng. Thời điểm 7 ngày sau đặt hạt, chồi mầm và rễ mầm các nghiệm thức xử lý dịch trích khác biệt không ý nghĩa so với đối chứng (ngoại trừ nghiệm thức áo hạt 0,5% và ngâm hạt 2%). Trong khi đó, tỷ lệ nảy mầm khác biệt ý nghĩa so với đối chứng trong cùng thời điểm. Như vậy, dịch trích sả ảnh hưởng đến khả năng nảy mầm và phát triển của hạt lúa.

Bảng 3. Ảnh hưởng của dịch trích sả đến khả năng nảy mầm và phát triển của hạt lúa

Biện pháp xử lý		Chiều dài (mm)*					
		Chồi mầm			Rễ mầm		
		3 NSĐH	5 NSĐH	7 NSĐH	3 NSĐH	5 NSĐH	7 NSĐH
Áo hạt	0,5%	3,28 ^{yz}	23,05 $^{c-k}$	37,40 ^{k}	6,77 ^{o}	36,38 ^{qr}	53,82 ^{o}
	1%	3,30 ^{yz}	28,08 $^{a-g}$	46,55 $^{b-k}$	9,77 $^{l-o}$	55,82 $^{c-p}$	80,18 $^{f-n}$
	2%	3,33 ^{yz}	28,43 $^{a-f}$	47,07 $^{b-k}$	10,15 $^{k-o}$	59,40 $^{a-m}$	83,40 $^{e-n}$
Ngâm hạt	0,5%	8,97 $^{e-l}$	25,38 $^{a-k}$	52,33 $^{a-j}$	12,77 $^{g-o}$	49,42 $^{h-r}$	95,77 $^{a-j}$
	1%	9,33 $^{d-k}$	29,50 $^{a-d}$	57,70 $^{a-d}$	20,40 $^{a-i}$	59,77 $^{a-m}$	98,03 $^{a-h}$
	2%	6,27 $^{n-u}$	21,25 $^{f-k}$	41,92 $^{h-k}$	15,50 $^{b-n}$	39,87 $^{o-r}$	69,07 $^{l-o}$
Đối chứng		*13,67* ^{a}	*30,08* ^{abc}	*53,45* $^{a-j}$	*19,10* $^{a-j}$	*51,97* $^{f-q}$	*84,32* $^{d-n}$

Ghi chú: NSĐH: ngày sau đặt hạt; ***** Trung bình chiều dài chồi mầm và rễ mầm được tính dựa vào 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại có 100 hạt lúa Jasmine 85.

Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức 5% bằng phép thử Duncan.

Chỉ số nảy mầm là một tiêu chí tổng hợp để đánh ảnh hưởng của các loại dịch trích thực vật lên khả năng nảy mầm và phát triển của hạt lúa. Chỉ số nảy mầm được khảo sát ở thời điểm 7 ngày sau khi đặt hạt được trình bày trong Bảng 4. Kết quả các nghiệm thức áo hạt và ngâm hạt bằng các loại dịch trích thực vật nồng độ 0,5%, 1% và 2% có chỉ số nảy mầm khác biệt không ý nghĩa so với đối chứng. Ngoại trừ nghiệm thức xử lý với dịch trích Sả (áo hạt 0,5% và ngâm hạt 2%) có chỉ số nảy mầm thấp khác biệt ý nghĩa so với đối chứng.

Bảng 4. Chỉ số nảy mầm của hạt lúa giống Jasmine 85 khi được xử lý áo hạt và ngâm hạt bằng các loại dịch trích thực vật

Loại dịch trích	Biện pháp xử lý					
	Áo hạt			Ngâm hạt		
	0,5%	1%	2%	0,5%	1%	2%
Cỏ hôi	13812,9 ^{abcd}	11836,7 $^{a-i}$	12101,3 $^{a-h}$	13903,4 ^{abcd}	9969,6 $^{c-i}$	11997,5 $^{a-i}$
Trâm ổi	11851,5 $^{a-i}$	13940,3 ^{abcd}	15651,3 ^{a}	12406,2 $^{a-h}$	10298,1 $^{c-i}$	10992,5 $^{b-i}$
Sống đời	12498,5 $^{a-h}$	13094,3 $^{a-f}$	12723,5 $^{a-h}$	10839,1 $^{b-i}$	13694,1 $^{a-e}$	12554,6 $^{a-h}$
Cỏ cứt heo	13051,2 $^{a-g}$	10071,1 $^{c-i}$	12190,5 $^{a-h}$	15137,3 ^{ab}	14600,2 ^{abc}	11116,3 $^{a-i}$
Húng quế	12969,6 $^{a-h}$	11399,8 $^{a-i}$	12713,0 $^{a-h}$	14401,5 ^{abcd}	14364,8 ^{abcd}	14425,8 ^{abcd}
Cỏ mực	11121,4 $^{a-i}$	13925,9 ^{abcd}	10566,5 $^{b-i}$	15033,0 ^{ab}	12341,8 $^{a-h}$	14187,6 ^{abcd}
Tỏi	12992,9 $^{a-h}$	13119,5 $^{a-f}$	10804,7 $^{b-i}$	12786,7 $^{a-h}$	9891,5 $^{d-i}$	14149,5 ^{abcd}
Cây neem	11346,6 $^{a-i}$	11317,8 $^{a-i}$	13220,2 $^{a-f}$	13122,4 $^{a-f}$	11024,0 $^{a-i}$	10187,5 $^{c-i}$
Cà độc dược	9182,5 $^{e-i}$	11593,7 $^{a-i}$	8446,9 ^{ghj}	11702,4 $^{a-j}$	8429,3 ^{hi}	11689,9 $^{a-i}$
Sả	7476,7 ^{i}	11234,3 $^{a-i}$	11619,5 $^{a-i}$	12322,5 $^{a-h}$	13966,3 ^{abcd}	8712,6 ^{fghi}
Đối chứng	12446,9 $^{a-h}$					

Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức 5% bằng phép thử Duncan.

Tóm lại, kết quả khảo sát khả năng nảy mầm, chiều dài chồi mầm và rễ mầm, chỉ số nảy mầm của hạt lúa Jasmine 85 khi xử lý bằng 10 loại dịch trích thực vật. Nghiên cứu đã tuyển chọn được 9 loại dịch trích không ức chế khả năng nảy mầm và phát triển của hạt lúa là cỏ hôi, trâm ổi, sống đời, cỏ cứt heo, húng quế, cỏ mực, tỏi, cây neem và cà độc dược.

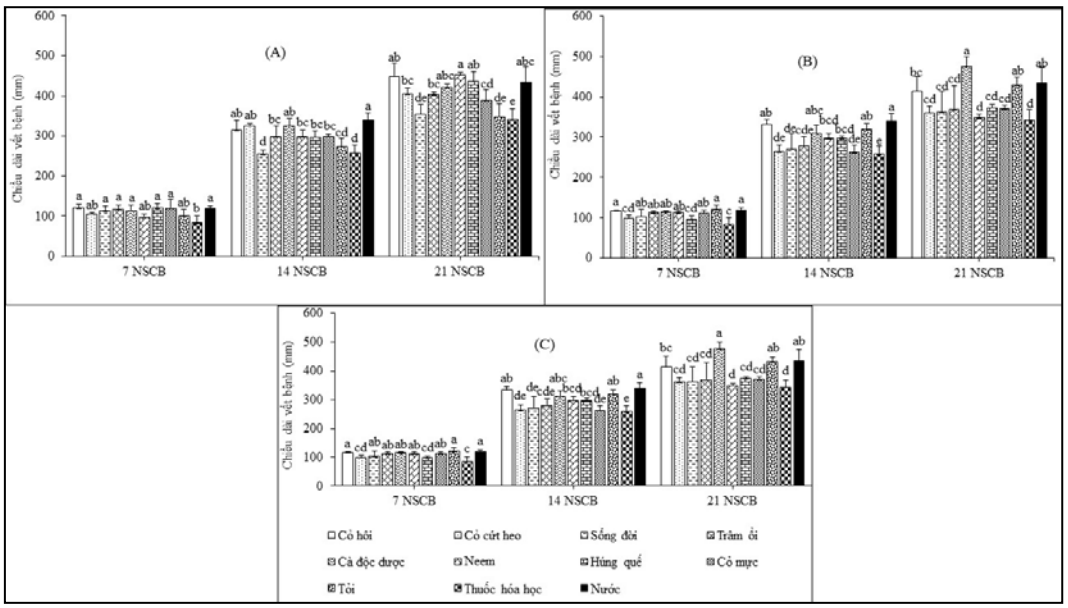
3.3. Khả năng giảm bệnh bạc lá lúa của dịch trích thực vật trong điều kiện nhà lưới

Kết quả khảo sát chiều dài vết bệnh bạc lá lúa khi được ngâm hạt bằng các loại dịch trích thực vật nồng độ 0,5% ở các thời điểm khảo sát là 7, 14 và 21 ngày sau chủng bệnh đã tuyển chọn được 2 loại dịch trích là sống đời và tỏi có khả năng giảm chiều dài vết bệnh khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức ngâm hạt trong nước. Đồng thời, khả năng giảm bệnh tương đương với nghiệm thức sử dụng thuốc hóa học ở thời điểm 14 ngày và 21 ngày sau chủng bệnh (Hình 1A).

Khả năng giảm chiều dài vết bệnh bạc lá lúa của dịch trích cỏ cứt heo và húng quế ở nồng độ 1% khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức ngâm hạt trong nước ở cả ba thời điểm 7, 14 và 21 ngày sau chủng bệnh. Ngoài ra, ba loại dịch trích thực vật khác là sống đời, trâm ổi và cỏ mực nồng độ 1% có hiệu quả giảm chiều dài vết bệnh tương đương nghiệm thức sử dụng thuốc hóa học ở thời điểm 14 và 21 ngày sau chủng bệnh (Hình 1B).

Khảo sát khả năng giảm chiều dài vết bệnh bạc lá lúa của dịch trích thực vật

nồng độ 2% đã xác định được các loại dịch trích có hiệu quả giảm bệnh tương đương nghiệm thức thuốc hóa học tương ứng là cỏ cứt heo, húng quế (thời điểm 7 ngày sau chủng bệnh); cỏ cứt heo, sống đời, trâm ổi, cỏ mực (thời điểm 14 ngày sau chủng bệnh); cỏ cứt heo, sống đời, trâm ổi, neem, húng quế, cỏ mực (thời điểm 21 ngày sau chủng bệnh) (Hình 1C). Trong đó, hai loại dịch trích cỏ cứt heo và sống đời nồng độ 2% có hiệu quả giảm bệnh cao nhất, lần lượt là 29,5% và 32% (21 ngày sau chủng bệnh).



Hình 1. Trung bình chiều dài vết bệnh bạc lá (mm) tại thời điểm 7, 14, 21 ngày sau chủng bệnh khi ngâm hạt bằng dịch trích thực vật trong điều kiện nhà lưới.

Ghi chú: Chủng bệnh giai đoạn 45 ngày sau khi gieo. NSCB: Ngày sau chủng bệnh; (A): dịch trích thực vật nồng độ 0,5% (w/v); (B): dịch trích thực vật nồng độ 1% (w/v); (C): dịch trích 2% (w/v). Các cột trong cùng một thời điểm theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức 5% bằng phép thử Duncan.

Tóm lại, khả năng làm giảm chiều dài vết bệnh bạc lá lúa khác biệt ý nghĩa so với đối nghiệm thức ngâm hạt trong nước của dịch trích Cỏ cứt heo nồng độ 1% và 2% được duy trì ổn định cả ba thời điểm khảo sát là 7, 14 và 21 ngày sau chủng bệnh; dịch trích Sống đời nồng độ 0,5% và 1% ở thời điểm 14 và 21 ngày sau chủng bệnh. Trong khi đó, dịch trích Sống đời nồng độ 2% có hiệu quả giảm bệnh ở thời điểm 21 ngày sau chủng bệnh là 32% và tương đương nghiệm thức thuốc hóa học.

IV. THẢO LUẬN

Ở Việt Nam, nông dân có thói quen phun thuốc hóa học để ngừa bệnh bạc lá ở giai đoạn lúa đẻ nhánh, và thường sử dụng thuốc với liều cao hơn khuyến cáo để phòng trị bệnh. Điều đó làm cho mầm bệnh bị biến đổi kháng thuốc nhanh hơn, dễ ô nhiễm môi trường, và ảnh hưởng đến sức khỏe con người (Sigee, 2005; Kado, 2009). Trong khi đó, ngâm hạt bằng dịch trích thực vật phát huy hiệu quả giảm

bệnh tương đương sử dụng thuốc hóa học trong điều kiện nhà lưới. Do đó, các loại dịch trích thực vật đã tuyển chọn trở thành đối tượng thay thế tiềm năng để kiểm soát bệnh ngoài đồng. Bên cạnh đó, các loại dịch trích này là loài cây dược liệu khá phổ biến, nông dân dễ dàng thu thập và chuẩn bị dịch trích chỉ bằng những dụng cụ thô sơ như chày và cối. Cách làm này đơn giản, nguyên liệu dễ tìm, giúp nông dân tiết kiệm chi phí và giảm sự lệ thuộc vào thuốc hóa học. Biện pháp ngâm hạt bằng dịch trích thực vật so với các biện pháp khác như phun qua lá, phun vào đất hay ngâm hạt có nhiều ưu điểm như dễ thực hiện, ít nguyên liệu, ít tốn công, ít phụ thuộc vào điều kiện môi trường (Mew và Gonzales, 2002; Khoa, 2010; Nguyễn Thị Thu Hương *và cộng sự*, 2018). Ngoài ra, có thể một số hợp chất kháng khuẩn có trong thành phần dịch trích có thể tiêu diệt được mầm bệnh ngay từ đầu, nhất là các mầm bệnh lây lan qua hạt; bảo vệ lúa ngay từ giai đoạn nảy mầm, vốn là giai đoạn mẫn cảm của cây (Chaliganjewar *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2013; Trần Thị Thu Thủy *et al.*, 2015). Theo kết quả khảo sát kích kháng bệnh bạc lá và các bệnh khác trên cây lúa trong điều kiện nhà lưới của Khoa (2010) và Khoa *et al.* (2011), khi ngâm hạt bằng dịch trích cỏ hôi ở nồng độ thấp hơn giúp giảm bệnh trên lúa tốt hơn so với phun qua lá dù ở nồng độ cao hơn. Điều này có thể do phun qua lá dễ chịu ảnh hưởng của điều kiện môi trường như nắng, gió và mưa sau khi phun. Biện pháp ngâm hạt phát huy hiệu quả khi bệnh không nghiêm trọng và do đó giúp nông dân giảm chi phí trong việc sử dụng thuốc hóa học để phòng bệnh (Walters *et al.*, 2013). Tuy nhiên, dưới áp lực bệnh nặng cần có sự phối hợp giữa ngâm hạt bằng dịch trích với các biện pháp phòng trừ dịch hại tổng hợp IPM mới đạt được hiệu quả.

Việc ngâm hạt bằng dịch trích được tiến hành cách khá xa thời điểm chủng bệnh nhân tạo, nhưng vẫn giúp giảm chiều dài vết bệnh, vì thế rất có thể khả năng làm giảm bệnh của dịch trích có liên quan nhiều đến cơ chế kích kháng. Theo nguyên tắc kích kháng khi cây được xử lý bằng tác nhân kích kháng, cây sẻ được tăng một số biểu hiện phòng vệ vật lý, tăng nồng độ sản phẩm trao đổi chất thứ cấp, tăng biểu hiện các PR-protein, tăng tích tụ phenols và phản ứng siêu nhạy cảm (van Loon và van Strien, 1999). Trong đó, PR-protein là kết quả của quá trình phản ứng tự vệ của cây, chúng giúp hạn chế sự xâm nhiễm và lây lan của mầm bệnh (Conrath *et al.*, 2002), đồng thời chúng cũng là một trong những cơ sở để xác định khả năng tự vệ của cây (Sticher *et al.*, 1997). Ở khía cạnh sinh hóa, sự tăng hoạt tính các enzyme là một trong những biểu hiện rõ nhất chứng tỏ tính kháng bệnh trên cây trồng đã được kích hoạt (Garcion *et al.*, 2014). Tuy nhiên, trong tự nhiên quá trình trình kích hoạt phản ứng tự vệ của cây thường không đủ mạnh hoặc quá chậm so với sự tấn công của mầm bệnh (Khoa, 2010; Nguyễn Đắc Khoa, 2018). Vì vậy, cần phải có một tác nhân kích thích cây kích hoạt quá trình đó được nhanh và mạnh hơn để ngăn chặn xâm nhiễm và lây lan của mầm bệnh hiệu quả hơn. Trong nghiên cứu này, giả thuyết được đặt ra là khi ngâm hạt bằng dịch trích thực vật giúp kích kháng cây lúa

chống lại bệnh bạc lá, trên cơ sở nhiều nghiên cứu kích kháng bệnh bạc lá lúa bằng dịch trích thực vật đã thực hiện trước đó như cà độc dược (*Datura metel*) (Kagale *et al.*, 2004), cang mai (*Adhatoda vasica*) (Govindappa *et al.*, 2011), ngũ trảo (*Vitex negundo*) (Nisha *et al.*, 2012), sống đời (*Kalanchoe pinnata*) (Khoa *et al.*, 2017) đều ghi nhận được sự tăng hoạt enzyme PO, PPO và PAL ở những nghiệm thức xử lý dịch trích và có mặt mầm bệnh. Tương tự như vậy, nguyên cứu của Pal *et al.* (2011) cũng chỉ ra rằng các enzyme PAL, CAT, PO, PPO tăng từ 2 - 4 lần khi được xử lý dịch trích Sả (*Cymbopogan citrus*) và tăng từ 2 - 3 lần khi xử lý dịch trích húng quế (*Ocimum sanctum*) giúp hạn chế nấm *Rhizoctonia solani*; và nghiên cứu của Punja (2001) cho thấy sự tăng biểu hiện gene CAT có liên quan đến giảm kích thước vết bệnh do nấm *Phytophthora infestans* gây ra trên thuốc lá.

Tuy kích kháng giúp bảo vệ cây trước sự tấn công mầm bệnh, nhưng lại là một quá trình tiêu tốn năng lượng do phải khuếch đại các tín hiệu và kích hoạt các gen kháng bệnh bình thường vốn ở trạng thái bất hoạt hoặc không được biểu hiện nhiều (Walters *et al.*, 2014). Tuy nhiên sự tiêu tốn này là cần thiết để giảm thất thu năng suất khi cây bị mầm bệnh tấn công (Khoa, 2010; Hammerschmidt, 2014). Nhưng sau khi các cơ chế kháng bệnh được kích hoạt tối đa để ngăn chặn sự tấn công và lây lan của mầm bệnh thì chúng có xu hướng giảm ở giai đoạn sau. Giả thuyết này phù hợp với nghiên cứu của Khoa *et al.* (2017) và Nguyễn Thị Thu Hương *và cộng sự* (2018) cho thấy khu xử lý với dịch trích sống đời thì các PR-protein trong cây lúa có xu hướng tăng ở giai đoạn đầu khi mầm bệnh xâm nhiễm, nhưng sau đó giảm ở các thời điểm sau đó nhằm đảm bảo năng lượng và nguyên liệu cho các quá trình chuyển hóa của cây, nhất là vào giai đoạn cuối đẻ nhánh đến trổ. Những nghiên cứu về kích kháng bệnh bạc lá lúa như: sử dụng hóa chất acibenzolar-S-methyl (ASM) và SA (Mohan Babu *et al.*, 2003a; 2003b), hoặc dịch trích Cỏ hôi (*Chromolaena odorata*) (Khoa, 2010; Khoa *et al.*, 2011); dịch trích sống đời (Khoa *et al.*, 2017; Nguyễn Thị Thu Hương *và cộng sự*, 2018) chỉ làm giảm mức độ biểu hiện chứ không khống chế hoàn toàn sự phát triển của bệnh. Tuy nhiên, với áp lực bệnh cao do chủng bệnh nhân tạo thì các kết quả này là chấp nhận được; việc giảm chiều dài vết bệnh trên lá sẽ giúp duy trì diện tích lá giúp giảm thất thu năng suất.

IV. KẾT LUẬN

Mười loại dịch trích gồm cỏ hôi, trâm ổi, sống đời, cỏ cứt heo, húng quế, cỏ mực, tỏi, neem, cà độc dược và sả đã được tuyển chọn trong nghiên cứu này. Trong đó, 9 loại dịch trích không ức chế khả năng nảy mầm và phát triển của hạt lúa (ngoại trừ sả) đã được khảo sát khả năng giúp giảm bệnh bạc lá trong điều kiện nhà lưới. Kết quả cho thấy dịch trích cỏ cứt heo và sống đời nồng độ 1% và 2% (w/v) có khả năng làm giảm chiều dài vết bệnh bạc lá lúa tương đương với sử dụng thuốc hóa học và duy trì đến thời điểm 21 ngày sau chủng bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ahmed, M., Z.U. Wazir, R. A. Khan, M.I. Khan, S. Waqas and A. Iqbal (2013). Pharmacological evaluation of crude methanolic extract of *Kalanchoe pinnata* leaves. Toxicological and Environmental Chemistry. 95(9): 1539 - 1545.
2. Ahn, I.P., S. Kim and Y.H. Lee (2005). Vitamin B_1 functions as an activator of plant disease resistance. Plant Physiology. 138: 1505 - 1515.
3. Arumugam, M., M.P. Rajanna and R. Gowda (2008). Seed dormacy and seedling vigour as influenced by planting time enviroment and date of harverst in rice (*Oryza sativa* L.). *Caspian J. Env. Sci.*, 6(1): 1 - 9.
4. Bhasin, H., D. Bhatia, S. Raghuvanshi, J.S. Lore, G.K. Sahi and B. Kaur (2012). New PCR-based sequence-tagged site marker for bacterial blight resistance gene *Xa*38 of rice. Molecular breeding. 30: 607 - 611.
5. Chaliganjewar, S.D., N. Lakpale, N. Khare and V.S. Thrimurty (2010). Effect of medicinal plant leaf extracts against sheath rot disease of rice and yield attributing characters. Annals of Plant Protection Sciences. 18(1): 265 - 266.
6. Chithrashree, U.S., A.C. Udayashankar, S. ChandraNayaka, M.S. Reddy and C. Srinivas (2011). Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Biological Control. 59: 114 - 122.
7. Conrath, U., M.C. Pieterse and B. Mauch-Mani (2002). Priming in plant-pathogen interactions. Trends Plant Science. 5: 210-216.
8. Doni, F., I. Anizan, C.M.Z. Che Radziah, A.H. Salman, M.H. Rodzihan and W.M.W. Yousoff (2014). Enhancement of Rice Seed Germination and Vigour by *Trichoderma* spp. *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology*, 7(21): 4547 - 4552.
9. Garcion, C., O. Lamotte, J. L. Cacas and J.P. Métraux (2014). Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. In: D.R. Walters, A.C. Newton and G.D. Lyon. eds, 2014. Induced Resistance for Plant Defense: A Sustainable Approach to Crop Protection. 2nd ed. Chichester: John Wiley and Sons. pages 106 - 136.
10. Govindappa, M., S. Umesha and S. Lokesh (2011). Adathoda vasica leaf extract induces resistance in rice against bacterial leaf blight disease *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Internationnal Journal of Plant Physiology and Biochemistry. 3(1): 6 - 14.
11. Hammerschmidt, R (2014). Introduction: definitions and some history. In: D.R. Walters, A.C. Newton and G.D. Lyon. eds, 2014. Induced Resistance for Plant Defense: A Sustainable Approach to Crop Protection. 2nd ed. Chichester: John Wiley and Sons. pages 1 - 10.
12. Kado, C.I. (2009). Horizontal gene transfer: sustaining pathogenicity and optimizing host-pathogen interactions. Molecular Plant Pathology. 10:143 - 150.
13. Kagale, S., T. Marimuthu, B. Thayumanavan, R. Nandakumar and R. Samiyappan (2004). Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 65: 91 - 100.
14. Karganilla, A.D., M. Paris-Natural and S.H. Ou (1973). A comparative study of culture media for *Xanthomonas oryzae*. The Philipp. Agric. 57: 141 - 152.
15. Khan, J. A., R. Siddiq, H.M. A. Arshad, H.S. Anwar, K. Saleem and F.F. Jamil (2012). Chemical control of bacterial leaf blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Pakitsan Journal of Phytopathology. 24:97 - 100.
16. Khan, M. A., M. Naeem and M. Iqbal (2014). Breeding approaches for bacterial leaf blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.), current status and future directions. European Journal of Plant Pathology. 139(1): 27 - 37.
17. Khoa N.Đ, T.V. Xa, L. T. Hào (2017). Disease-reducing effects of aqueous leaf extract of *Kalanchoe pinnata* on rice bacterial

leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* involve induced resistance. Physiological and Molecular Plant Pathology 100:57 - 66.

18. Khoa, N. D. (2010). Control of sheath blight and other rice diseases by induced resistance using an extract of the plant *Chromolaena odorata*. PhD thesis. Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Denmark. 100 pages.
19. Khoa, N.D., P. T.H. Thuy, T. T. Thuy, D.B. Collinge and H.J. L. Jørgensen (2011). Disease-reducing effect of *Chromolaena odorata* extract on sheath blight and other rice diseases. Phytopathology. 101(2): 231 - 240.
20. Khush G.S. (2005). What it will take to feed 5.0 billin rice consumers in 2030. Physiological and Molecular Plant Pathology. 59:1 - 6.
21. Kloepper, J.W, S. Tuzun and J. A. Kuć (1992). Propose definitions relates to induced disease resistance. Biocontrol Science and Technology. 2: 349 - 351.
22. Kuć, J. (2006). Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. EJPP, 107: 7 - 12.
23. Lingaiah, S. and S. Umesha (2013). *Pseudomonas fluorescens* inhibits the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen in rice. Canadian Journal of Plant Protection. 1:147 - 153.
24. Lutz W.S.KC. (2010). Dimensisons of global population projections: what do we know about future population treds and structures?. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 365: 2779 - 2791.: IRRI. 83 pages.
25. Manandhar, H.K., H.J. L. Jørgense, S.B. Mathur and V.Smedgaard-Petersen (2000). Induced resistance against rice blast. Avdance in rice blast research. *Kluwer academic pubs*, 93 - 104.
26. Mohan Babu, R., A. Sajeena, A. Vijaya Samundeeswari, A. Sreedhar, P. Vidhyasekeran and M.S. Reddy (2003a). Induction of bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) resistance in rice by treatment with acibenzolar- S- methyl. Annals of Applied Biology. 143:333 - 340.
27. Mohan Babu, R., A. Sajeena, A. Vijaya Samundeeswari, A. Sreedhar, P. Vidhyasekaran, K. Seetharaman and M.S. Reddy (2003b). Induction of systemic resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by salicylic acid in *Oryza sativa* (L.). Journal of Plant Diseases and Protection. 110:419 - 431.
28. Natraj Kumar, P., K. Sujatha, G.S. Laha, K. Srinivasa Rao, B. Mishra, B.C. Viraktamath, Y. Hari, C.S. Reddy, S.M. Balachandran, T. Ram, M. Sheshu Madhav, N. Shobha Rani, C. N. Neeraja, G. Ashok Reddy, H. Shaik and R.M. Sundaram (2012). Identification and fine-mapping of *Xa*33, a novel gene for resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Phytopathology. 102:222 - 228.
29. Nguyễn Đắc Khoa (2018). Bệnh bạc lá lúa. Sách Bệnh hại cây trồng Việt Nam. Chủ biên: Vũ Triệu Mân, Nguyễn Văn Tuất, Bùi Cách Tuyến và Phạm Văn Kim. Nhà xuất bản Học viện Nông nghiệp, Việt Nam. 643 trang (112 - 119).
30. Nguyễn Thị Thu Hương, Lâm Tấn Hào, Nguyễn Đắc Khoa (2018). Hiệu quả giảm bệnh và cơ chế kích kháng liên quan đến enzyme phenylalanine ammonia-lyase và polyphenol oxidase đối với bệnh cháy bìa lá lúa khi phun qua lá với dịch trích lá sống đời. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ 54: 13 - 21.
31. Nisha, S., K. Revathi, R. Chandrasekaran, S. A. Kirubakaran, S. Sathish-Narayanan, M.J. Stout and S. Senthil-Nathan (2012). Effect of plant compounds on induced activities of defense-related enzymes and pathogenesis related protein in bacterial blight disease susceptible rice plant. Physiological and Molecular Plant Pathology. 80:1-9.
32. Pal, T.K., S. Bhattacharya and K. Chakraborty, 2011. Induction of Systemic Resistance in Rice by Leaf Extract of *Cymbopogan citrus* and *Ocimum sanctum* against Sheath Blight Disease. Archives of Applied Science Research. 3(1):392 - 400.
33. Pieterse, C.M.J., C. Zamioudis, D. Van der Does and S.C.M. Van Wee (2014). Signalling networks involved in induced resistance. In: D.R. Walters, A.C. Newton and G.D. Lyon. eds, 2014. Induced Resistance for Plant Defense: A Sustainable Approach to Crop Protection. 2nd ed. Chichester: John Wiley and Sons, pages 58-80.
34. Punja, J.K (2001). Genetic engineering of plant to enhance resistance to fungal

pathogens-a review of progress and future prospects. Canadian Journal of Plant Parthology. 23(3):216 - 235.

35. Rodríguez-Algaba, R., J.C. Sørensen, H. Sørensen, N.Đ. Khoa, D.B. Collinge and H.J. L. Jørgensen (2015). Activity-guided separation of *Chromolaena odorata* leaf extract reveals fractions with rice disease-reducing properties. European Journal of Plant Phathology. 143:331 - 341.
36. Shah, S.M. A., H.U. Rahman, F.M. Abassi, M.M. Akhtar, A. Aafi and I. A. Khan (2009). Resistance characterization of wild relatives of rice in response to bacterial blight. Pakistan Journal of Botany. 41(2): 917 - 925.
37. Sigee, D.C. (2005). Bacterial Plant Pathology: Cell and Molecular Aspects. Cambridge: Cambridge University Press. pages 276 - 278.
38. Singh, R. A and M.H.S. Rao (1977). A simple technique for detecting *Xanthomonas oryzae* in rice seeds. Seed Science and Technology. 5:123 - 127.
39. Sticher, L., B. Mauch-Mani and J.P. Métraux (1997). Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology. 35:235 - 270.
40. Suryadi, Y., D. N. Susilowati, T.P. Priyatno, I.M. Samudra, T.S. Kadir and N.R. Mubarik (2013). Prospect of Using Bacterial Bio-formulation to Suppress Bacterial Leaf Blight of Rice: A Case Study in Cianjur, West Java. Penelitian Pertanian Tanaman Pangan. 32:83 - 90.
41. Trần Thị Thu Thủy, Nguyễn Thị Lùng và H.J. L. Jørgensen (2015). Khảo sát khả năng kích kháng bệnh cháy lá lúa do nấm *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. của dịch trích thực vật trên khía cạnh sinh học và mô học. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ. 36:57 - 62.
42. Trần Văn Dương (2012). Khảo sát khả năng hạn chế bệnh đốm vằn (*Rhizoctonia solani*) trên ruộng lúa của dịch trích cỏ hôi (*Chromolaena odorata*). Luận văn Thạc sĩ Bảo vệ Thực vật. Trường Đại học Cần Thơ. 63 trang.
43. Van Hop, D., P. T. Phuong Hoa, N.D. Quang, P.H. Ton, T.H.Ha, N. Van Hung, N. T. Van, T. Van Hai, N. T. Kim Quy, N. T. Anh Dao and V. Thi Thom (2014). Biological control of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing rice bacterial blight disease by *Streptomyces toxytricini* VN08-A-12, isolated from soil and leaf-litter samples in Vietnam. Biocontrol science. 19(3):103 - 111.
44. van Loon, L.C, P. A. Bakker and C.M. Peiterse (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology. 36: 453 - 483.
45. van Loon, L.C. and E. A. van Strien (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiolgical and Molecular Plant Pathology. 55(2): 85 - 97.
46. Vasudevan, P., S. Kavitha, V.B. Priyadarisini, L. Babujee and S. Gnanamanickam (2002). Biological control of rice diseases. In: Gnanamanickam S, ed. Biological Control of Crop Diseases. New York: Marcel Dekker. 11 - 32.
47. Verdier, V, C. Vera Cruz, J.E. Leach (2012). Controlling rice bacterial blight in Afica: Needs and prospects. Journal of Biotechnology. 159(4): 320 - 328.
48. Võ Văn Chi (2012). Từ điển cây thuốc Việt Nam (tập 1, 2). Nhà xuất bản Y học.
49. Walters, D.R. and A.E. Bennett (2014). Microbial Induction of Resistanceto Pathogens. In: D.R. Walters, A.C. Newton and G.D. Lyon. eds. 2014. Induced Resistance for Plant Defense: A Sustainable Approach to Crop Protection. 2nd ed. Chichester: John Wiley and Sons, pages 149 - 170.
50. Walters, D.R., J. Ratsep and N.D. Havis (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. Journal of Experimental Botany. 64:1263 - 1280.
51. Zhang X., T.D. Mount, R. N. Boisvert (2004). Industrialization, urbanization and land use in China, J. Chin. Econ. Bus. Stud. 2:207 - 224.
52. Zhang, F., D. L. Zhuo, F. Zhang, L.Y. Huang, W.S. Wang, J. L. Xu, C. Vera Cruz, Z.K. Li and Y. L. Zhou (2015). *Xa*39, a novel dominant gene conferring broad-spectrum resistance to *Xanthomonas oryzae* pv.*oryzae* in rice. Plant Pathology. 64:568 - 575.
53. Zhao, J., L.C. Davis and R. Verpoorte (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances. 23:283 - 333.

ẢNH HƯỞNG CỦA GLYPHOSATE ĐẾN CHỨC NĂNG HÔ HẤP VI SINH VẬT ĐẤT

Nguyễn Bình Duy (Viện Khoa Học Kỹ Thuật Nông Nghiệp Miền Nam, 121 Nguyễn Bỉnh Khiêm, Phường Đakao, Quận 1, Thành phố Ho Chi Minh),

Email: duy.nb@iasvn.org or nguyenbinhduy@yahoo.com, phone: 0938.938.129

ABSTRACT

Multiple applications of the herbicide glyphosate each year are now common in many agricultural systems worldwide. Although a body of literature exists on the impacts of single label rate or high application rates on soil functionality, a paucity of data exists on the more realistic effect of repeated application to soil. This study investigated the effects of repeated glyphosate (as RoundupCT®) application on substrate-induced respiration (SIR) in three contrasting agricultural soils. The influence of soil characteristics in observing effects was highlighted with the light-texture Tenosol showing changes to SIR following RoundupCT® treatment, while the clay Vertosol and loamy Chromosol, showed no significant effects on SIR or function. In the Tenosol, monthly exposure of the soil to label rate doses (2.93 mg kg^{-1}) of RoundupCT® significantly altered patterns of SIR compared to control soil not previously exposed to RoundupCT® by reducing mineralisation of glucose and arabinose.

Keywords: *RoundupCT®, Respiration, soil function, Microresp™*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Glyphosate là thuốc diệt cỏ được sử dụng phổ biến trên thế giới do chi phí thấp và hiệu quả cao. Việc sử dụng glyphosate đã tăng gần 15 lần kể từ khi nó được giới thiệu vào năm 1996 (Benbrook, 2016). Glyphosate ức chế 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), một loại enzyme tham gia trong chu trình shikimate tổng hợp axit amin được sử dụng bởi nhiều vi khuẩn trong đất (Helander *et al.*, 2012; MC Zabaloy *et al.*, 2008), điều này làm người ta lo ngại rằng glyphosate có thể ảnh hưởng xấu đến chức năng của vi sinh vật trong đất (Rose *et al.*, 2016).

Chức năng của vi sinh vật trong đất đóng vai trò quan trọng trong việc phân hủy chất hữu cơ, luân chuyển chất dinh dưỡng và ngăn chặn mầm bệnh, và do đó nó có vai trò thiết yếu đối với các hệ thống canh tác bền vững. Một trong các phép đo được áp dụng phổ biến về sự đa dạng chức năng của vi sinh vật trong đất là quá trình hô hấp thông qua một số các chất nền, được xem như các chỉ thị độc tính sinh thái (Nannipieri và cộng sự, 2002). Đánh giá chức năng hô hấp là theo

Người phản biện: GS. TS. Nguyễn Thơ.

dõi quá trình giải phóng CO_2 từ đất sau khi bổ sung một số chất nền cacbon, cho thấy khả năng chuyển hóa các chất hữu cơ trong đất (Konopka *et al.*, 1998). Một phân tích tổng hợp gần đây gồm 30 nghiên cứu cho thấy các liều đơn glyphosate sử dụng ở nồng độ đồng ruộng (<10 mg kg^{-1}) thường ít tác động đến hô hấp của đất (Nguyen B. D. *et al.*, 2016).

Những ảnh hưởng của việc bón glyphosaet lặp lại ít được biết đến mặc dù xu hướng sử dụng này ngày càng phổ biến (Benbrook, 2016). Hơn nữa, rất ít những nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của việc sử dụng lặp lại glyphosate trong thời gian dài đối với chức năng vi sinh vật đất.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu thí nghiệm

Nghiên cứu được thực hiện gồm 3 nhóm đất Tenosol, Chromosol và Vertosol, được thu thập trên ba vùng nông nghiệp khác nhau ở Úc, có các đặc điểm vật lý và tính chất hóa học khác nhau (Isbell, 1997). Các mẫu đất được thu thập ở tầng đất mặt (200 mm). Đất được phơi khô không khí và qua sàng (<2,0 mm) trước khi bố trí thí nghiệm.

RoundupCT® có chứa 450g L^{-1} glyphosate được cho vào đất. Dung dịch gốc RoundupCT® (1,4g glyphosate L^{-1}) pha với nước khử ion (DI) được cho vào đất đạt được tỷ lệ 2,93 mg glyphosate kg^{-1} đất cho mỗi lần cung cấp. Điều này tương đương với 2,2 kg glyphosate ha^{-1}, giả sử tỷ trọng khối đất khô là 1,5 g cm^{-3} và độ sâu trung bình của glyphosate có thể thâm nhập vào đất là 50 mm (EEC, 2007; Silva *et al.*, 2018).

2.2. Thiết kế thí nghiệm

Thí nghiệm thực hiện gồm ba loại đất được ủ với RoundupCT® (có chứa thành phần hoạt tính glyphosate) ở các mức độ khác nhau trong thời gian 9 tháng. Năm (05) công thức gồm: đối chứng (không cung cấp RoundupCT®), bổ sung RoundupCT® hàng tháng (10 lần), bổ sung RoundupCT® hàng quý (4 lần), bổ sung RoundupCT® vào ngày đầu tiên (01 lần) và bổ sung RoundupCT® vào ngày cuối cùng (01 lần), mỗi công thức gồm 4 lần lặp lại.

Đất được cho vào các lọ thủy tinh có đường kính 63 mm và cao 80 mm. Đất được lấp đầy đến 50 mm và độ ẩm đất được duy trì ở mức 40% khả năng giữ nước của đất (WHC). Sau đó, dung dịch gốc RoundupCT® hoặc nước đã khử ion được thêm vào để đưa đất đến độ ẩm 80% khả năng giữ nước của đất. Kế tiếp, đất được ủ 9 tháng trong phòng tối ở 25°C với một lịch trình cung cấp bổ sung RoundupCT® mỗi tháng và mỗi 3 tháng. Độ ẩm của đất được kiểm tra sau mỗi 14 ngày bằng cách cân các lọ thủy tinh có ủ đất để tính toán ra lượng nước cần bổ sung để duy trì độ ẩm của đất ở 80% WHC.

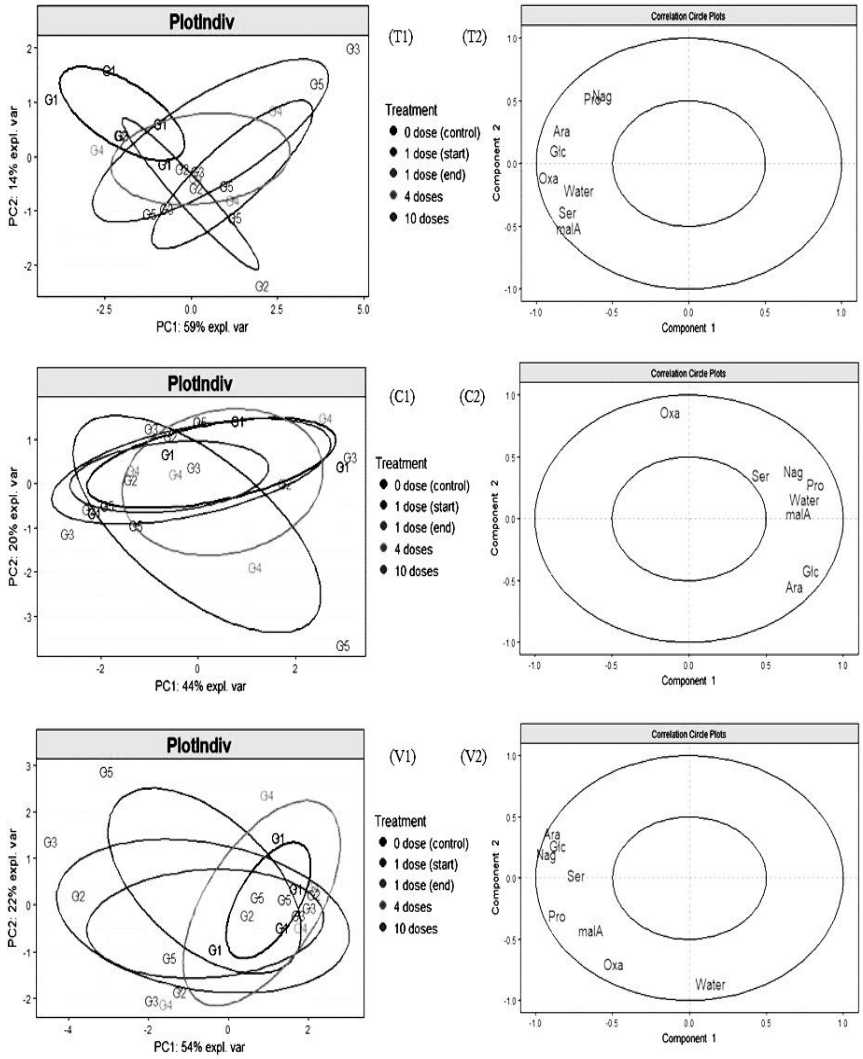
2.3. Đánh giá chức năng hô hấp cộng đồng vi sinh vật sau thời gian 9 tháng

Sau giai đoạn ủ, các mẫu đất được phân tích để đánh giá mức độ hô hấp của vi sinh vật trong đất bằng phương pháp MicroRespTM (Campbell và cộng sự, 2003). Lượng CO_2 giải phóng ra từ đất thông qua việc sử dụng các chất nền cacbon phổ biến trong môi trường đất như (arabinose, glucose, axit malic, N-acetylglucosamine, axit oxalic, proline và serine). Các bảng gel được sử dụng để hấp thu CO_2, sau đó chúng được cho vào máy đo (BMG labtech FLUOstar Omega, Ortenberg, Đức) để xác định hàm lượng CO_2 được giải phóng ra từ đất.

2.4. Phân tích dữ liệu

Tất cả dữ liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm ngôn ngữ Rv.3.1.1 (R-Development-Core-Team, 2014). Trước tiên, bộ dữ liệu được phân tích theo mô hình phản ứng đa biến với các công thức sử dụng glyphosate trên những loại đất khác nhau. Phân tích thành phần chính (Principal Components Analysis - PCA) được sử dụng như một kỹ thuật phổ biến để phân tích tập dữ liệu đa biến, trong đó một số biến định lượng phụ thuộc tương quan với nhau được trích xuất và mô tả như một tập hợp các biến trực giao mới được gọi là thành phần chính (Abdi and Williams, 2010). ANOVA và HSD cũng được sử dụng để đánh giá phản ứng chức năng hô hấp đối với các công thức xử lý glyphosate.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU



Hình 1. Ảnh hưởng của glyphosate sử dụng lặp lại đến chức năng hô hấp trên ba nhóm đất khác nhau. (T1, T2): Chức năng hô hấp trong Tenosol; (C1, C2): chức năng hô hấp trong Chromosol; (V1, V2): chức năng hô hấp trong Vertosol.

Các ký hiệu từ G1 đến G5 đại diện cho số lần lặp lại riêng lẻ ở mỗi công thức sử dụng glyphosate khác nhau. Hình elip thể hiện giới hạn mức độ tin cậy 95% của mỗi công thức sử dụng glyphosate.

Phân tích thành phần chính (PCA) cho thấy chức năng hô hấp trong đất Vertosol và Chromosol không thay đổi đáng kể khi cung cấp RoundupCT® lặp lại, và chúng được chứng minh bằng các hình elip chồng chéo nhau với độ tin cậy 95% (Hình 1V và 1C). Ngược lại, RoundupCT® bón lặp lại 10 lần, trong thời gian 9 tháng đã thay đổi đáng kể đến chức năng hô hấp vi sinh vật trong đất Tenosol. Tuy nhiên, số lần bón lặp lại ít hơn không ảnh hưởng đáng kể đến chức năng hô hấp vi sinh vật trong nhóm đất này.

Trong phân tích đơn biến cho thấy chức năng hô hấp (công thức đối chứng) trong Tenosol giảm đáng kể ($P \leq 0,05$) (Bảng 1) đối với hầu hết các công thức có sử dụng RoundupCT®. Tuy nhiên, hô hấp không bị ảnh hưởng khi chỉ sử dụng một liều RoundupCT® duy nhất trước khi ủ. Quá trình hô hấp có sử dụng chất nền cacbon (arabinose và glucose) thấp hơn đáng kể ở nghiệm thức 10 lần bón lặp lại so với công thức đối chứng ($P> 0,05$).

Bảng 1. Ảnh hưởng RoundupCT® đến chức năng hô hấp trong đất Tenosol

	Nghiệm thức (mg kg^{-1})						
C-substrates	**0 dose (control)**	**1 dose (start) (2.93 mg)**	**1 dose (end) (2.93 mg)**	**4 doses (monthly) (11.72 mg)**	**10 doses (quarterly) (29.3 mg)**	**Tukey HSD**	**P-value**
Đối chứng	0.078 [a]	0.066 [ab]	0.060 [b]	0.063 [b]	0.062 [b]	0.014	0.002
Ara	0.192 [a]	0.176 [ab]	0.166 [ab]	0.177 [ab]	0.157 [b]	0.029	0.015
Glc	0.268 [a]	0.251 [ab]	0.236 [ab]	0.239 [ab]	0.223 [b]	0.040	0.032
malA	0.073 [a]	0.074 [a]	0.069 [a]	0.068 [a]	0.067 [a]	0.013	0.451
Nag	0.161 [a]	0.142 [a]	0.157 [a]	0.145 [a]	0.132 [a]	0.032	0.090
Oxa	0.071 [a]	0.066 [a]	0.066 [a]	0.068 [a]	0.065 [a]	0.010	0.535
Pro	0.118 [a]	0.095 [a]	0.101 [a]	0.100 [a]	0.106 [a]	0.024	0.075
Ser	0.075 [a]	0.075 [a]	0.072 [a]	0.075 [a]	0.074 [a]	0.013	0.953

Dữ liệu trong bảng đại diện cho giá trị trung bình về tốc độ giải phóng CO_2 trong bốn lần lặp lại (µg CO_2-C/g/h). Các giá trị có các chữ cái đi kèm viết giống nhau trong cùng một hàng thể hiện không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P <0,05$.

Ký hiệu: Abbreviations: Ara - Arabinose; Glc - Glucose; MalA - Malic acid; Nag - N-acetylglucosamine; Oxa - Oxalic acid; Pro - Proline; Ser - Serine.

IV. THẢO LUẬN

Sử dụng RoundupCT® lặp lại không ảnh hưởng đáng kể đến chức năng hô hấp vi sinh vật trong đất Vertosol hoặc

Chromosol. Tuy nhiên, RoundupCT® có ảnh hưởng đáng kể đến chức năng hô hấp trong nhóm đất Tenosol, đặc biệt ở công thức sử dụng RoundupCT® lặp lại 10 lần (2,2 kg ha^{-1} / lần) trong thời gian 9 tháng. Các nghiệm thức khác, nhận được lượng tương đương từ 12 mg glyphosate kg^{-1} trở xuống không ảnh hưởng đến chức năng hô hấp. Kết quả này cho thấy sự tương đồng với những phát hiện trước đây, rằng nồng độ dưới 10 mg kg^{-1} nói chung không có ảnh hưởng đáng kể đến chức năng hô hấp của vi sinh vật trong đất (Nguyen *et al.*, 2016).

Phân tích đơn biến cho thấy rằng trong trường hợp không có chất nền C bổ sung vào Tenosol (tức chỉ cung cấp nước), các công thức sử dụng một liều RoundupCT® duy nhất vào cuối thí nghiệm, công thức 4 liều và 10 liều lặp lại đều dẫn đến hô hấp thấp hơn đáng kể ($P < 0,05$) so với công thức không sử dụng RoundupCT®. Sự khoáng hóa của chất nền arabinose và glucose cũng giảm xuống khi Tenosol nhận 10 liều RoundupCT® trong suốt 9 tháng, nhưng không có sự khác biệt đáng kể nào được phát hiện ở hầu hết các trường hợp khác. Một nghiên cứu trước đó cũng chỉ ra rằng chức năng hô hấp từ đất sau khi sử dụng glyphosate từ hai, ba và bốn lần đều thấp hơn đáng kể so với một lần sử dụng (Andrea và cộng sự, 2003).

Hart và Brookes (1996) phát hiện ra rằng glyphosate tích lũy hàng năm trong suốt 19 năm, không làm thay đổi quá trình khoáng hóa C so với đất đối chứng không được xử lý glyphosate. Trong thí nghiệm này, việc sử dụng glyphosate lặp lại với khung thời gian ngắn hơn (mỗi 4 tuần một lần) và Andrea *et al.*, (2003) mỗi 2 tuần một lần, so với sử dụng glyphosate hàng năm được mô tả bởi Hart và Brookes (1996), có thể tạo ra áp lực chọn lọc lớn hơn trên quần thể vi sinh vật để tạo ra sự chuyển dịch chức năng. Tuy nhiên, theo Lancaster và cộng sự (2009), việc sử dụng glyphosate lặp đi lặp lại có thể tác động nhiều đến cộng đồng vi sinh vật trong đất hơn là việc sử dụng glyphosate đơn lẻ. Có thể hình dung rằng glyphosate được bón hàng năm hoàn toàn bị phân hủy trước lần bón sau, trong khi việc sử dụng hàng tháng và thực tế cứ sau 2 tuần như báo cáo của (Andrea và cộng sự, 2003) có thể dẫn đến tích tụ dần dần các chất tồn dư, do đó làm nghiêm trọng thêm các tác động tiềm tàng đối với quần thể vi sinh vật trong đất.

V. KẾT LUẬN

Việc sử dụng RoundupCT® với 10 lần lặp lại trong thời gian 9 tháng đã tạo ra những thay đổi đáng kể về chức năng hô hấp được quan sát thấy trong nhóm đất cát Tenosol. Điều này cho thấy, đối với đất có ít chất hữu cơ và hoạt động vi sinh vật thấp thì khả năng phục hồi đất rất kém sau khi sử dụng glyphosate. Tuy nhiên, việc sử dụng RoundupCT® với 10 lần lặp lại theo tỷ lệ ghi trên nhãn trong thời gian 9 tháng, trong thực tế cũng rất hiếm khi xảy ra. Việc xử lý glyphosate lặp lại 4 liều trong 9 tháng thực tế hơn nhưng không gây ra những thay đổi đáng kể đến chức năng hô hấp trong bất kỳ loại đất nào. Điều này cho thấy rằng, theo thực tiễn nông nghiệp hiện nay, tác động của việc sử dụng glyphosate lặp lại đối với chức năng hô hấp của vi sinh vật trong đất rất ít.

REFERENCES

1. Abdi, H., Williams, L.J., 2010. Principal component analysis. *John Wiley & Sons 2*.
2. Andrea, M.M.d., Peres, T.B., Luchini, L.C., 2003. Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira 38, 1329-1335*.
3. Benbrook, C.M., 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe 28, p3.*
4. Campbell, C.D., Chapman, S.J., Cameron, C.M., Davidson, M.S., Potts, J.M., 2003. A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil. *Applied and Environmental Microbiology 69, 3593-3599*.
5. European-Economic-Community (EEC), 2007. *Council Directive of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market (91/414/EEC, OJ L 230).*
6. Hart, M.R., Brookes, P.C., 1996. Soil microbial biomass and mineralisation of soil organic matter after 19 years of cumulative field applications of pesticides. *Soil Biology and Biochemistry 28, 1641-1649*.
7. Helander, M., Saloniemi, I., Saikkonen, K., 2012. Glyphosate in northern ecosystems. *Trends in Plant Science 17, 569-574*.
8. Isbell, R.F., 1997. Concepts and rationale of the Australian soil classification / R.F. *Isbell, W.S McDonald, L.J. Ashton. Canberra: Australian Collaborative Land Evaluation Program, p152*.
9. Konopka, A., Oliver, L., Turco, J.R.F., 1998. The Use of Carbon Substrate Utilization Patterns in Environmental and Ecological Microbiology. *Microb Ecol 35, 103-115*.
10. Lancaster, S.H., Hollister, E.B., Senseman, S.A., Gentry, T.J., 2009. Effects of repeated glyphosate applications on soil microbial community composition and the mineralization of glyphosate. *Pest Management Science, 66(1):59-64. doi: 10.1002/ps.1831*.
11. M.C. Zabaloy, J.L. Garland, Gomez, M.A., 2008. An integrated approach to evaluate in the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Applied Soil Ecology 40, 1-12.*
12. Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P., 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. Enzymes in the environment. *Marcel Dekker, New York, 1-33*.
13. Nguyen, D.B., Rose, M.T., Rose, T.J., Morris, S.G., van Zwieten, L., 2016. Impact of glyphosate on soil microbial biomass and respiration: A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry 92, 50-57*.
14. Nguyen, D.B., Rose, M.T., Rose, T.J., van Zwieten, L., 2018. Effect of glyphosate and a commercial formulation on soil functionality assessed by substrate induced respiration and enzyme activity. *European Journal of Soil Biology 85, 64-72*.
15. Primost, M.A., Gil, M.N., Bigatti, G., 2017. High bioaccumulation of cadmium and other metals in Patagonian edible gastropods. *Marine Biology Research 13, 774-781*.
16. R-Development-Core-Team, 2014. A Language and Environment for Statistical Computing v.3.1.1, Vienna, Austria. *The R Foundation for Statistical Computing.*
17. Rose, M.T., Cavagnaro, T.R., Scanlan, C.A., Rose, T.J., Vancov, T., Kimber, S., Kennedy, I.R., Kookana, R.S., Van Zwieten, L., 2016. Impact of Herbicides on Soil Biology and Function, in: Donald, L.S. (Ed.), Advances in Agronomy. *Academic Press, pp. 133-220.*
18. Silva, V., Montanarella, L., Jones, A., Fernández-Ugalde, O., Mol, H. G. J., Ritsema, C. J., & Geissen, V. (2018). Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union. *Science of The Total Environment, 621, 1352-1359. doi:https:// doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.093*

MỤC LỤC

1. HOẠT ĐỘNG CỦA HỘI NGHIÊN CỨU BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM TỪ ĐẠI HỘI THÀNH LẬP 3/8/2019 3

GS.TS. Vũ Triệu Mân - Chủ tịch Hội

2. TƯỞNG NHỚ GS.TS. PHẠM VĂN BIÊN NGUYÊN PHÓ CHỦ TỊCH HỘI NGHIÊN CỨU BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM - NGƯỜI BẠN, NGƯỜI ĐỒNG CHÍ THÂN THIẾT CỦA CHÚNG TA 9

GS.TS. Vũ TriệuMân

3. CANH TÁC VÀ QUẢN LÝ DỊCH HẠI THEO HƯỚNG HỮU CƠ SINH HỌC, THAY ĐỔI TẬP QUÁN LẠM DỤNG HÓA HỌC 11

Nguyễn Thơ

4. PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN Rice yellow stunt virus GÂY BỆNH VÀNG LỤI LÚA BẰNG KHÁNG HUYẾT THANH THỎ ĐẶC HIỆU PROTEIN N 21

Hà Viết Cường, Nguyễn Quang Bằng, Lê Thị Tuyết, Trần Nguyễn Hà, Nguyễn Đức Huy, Đỗ Tấn Dũng

5. TẠO KHÁNG HUYẾT THANH ĐA DÒNG BẰNG PROTEIN VỎ TÁI TỔ HỢP CỦA Passiflora mottle virus, MỘT POTYVIRUS NHIỄM TRÊN CÂY CHANH LEO TẠI VIỆT NAM 32

Hà Viết Cường, Lê Thị Tuyết, Trần Nguyễn Hà, Nguyễn Đức Huy, Đỗ Tấn Dũng

6. XÁC ĐỊNH MỨC ĐỘ VÀ THỜI ĐIỂM XUẤT HIỆN TRIỆU CHỨNG ĐẶC TRƯNG LÙN XOẮN LÁ LÚA Ở ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI 45

Nguyễn Phú Dũng và Trần Văn Thơ

7. KHẢO SÁT KHẢ NĂNG TẠO CHẤT KÍCH THÍCH TĂNG TRƯỞNG INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA) CỦA VI KHUẨN *Serratia nematodiphila* CT-78 52

Nguyễn Vân Anh, Nguyễn Quang Tiến, Nguyễn Đắc Khoa

8. XÁC ĐỊNH HIỆU QUẢ QUẢN LÝ BỆNH CHÁY LÁ KHOAI MÔN CỦA CHẾ PHẨM XẠ KHUẨN ĐỐI KHÁNG TRIỂN VỌNG Ở ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM VÀ NHÀ LƯỚI 58

Nguyễn Phú Dũng, Nguyễn Tấn Thạnh và Phạm Văn Dư

9. XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN VI KHUẨN GÂY BỆNH LOÉT THÂN XÌ MỦ TRÊN CÂY MÍT (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) 71

Hứa Thanh Hải, Nguyễn Huỳnh Cao Quí, Đoàn Thị Kiều Tiên, Lê Thanh Toàn, Mai Văn Trị, Nguyễn Thị Thu Nga

10. NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN VI KHUẨN VÙNG RỄ TRONG PHÒNG TRỪ BỆNH THỐI HẠT TRÊN LÚA DO VI KHUẨN *Burkholderia glumae* 81

Nguyễn Thị Thu Nga, Nguyễn Văn Khởi

11. TUYỂN CHỌN VI KHUẨN *Bacillus* sp. ĐỐI KHÁNG VỚI VI KHUẨN *Burkholderia glumae* VÀ CÓ HIỆU QUẢ PHÒNG TRỊ BỆNH LÉP VÀNG TRÊN LÚA TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI 89

Trần Vũ Phến và Phạm Hoàng Nhân

12. PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN VI KHUẨN GÂY BỆNH THỐI HẠT LÚA Ở MỘT SỐ TỈNH ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG 99

Đoàn Thị Kiều Tiên, Bùi Thị Thanh Mỹ, Trần Thị Thu Thủy và Nguyễn Thị Thu Nga

13. KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG CỦA XẠ KHUẨN ĐỐI VỚI NẤM *Helminthosporium maydis* GÂY BỆNH ĐỐM LÁ NHỎ HẠI BẮP 106

Lê Minh Tường, Lê Thị Ngọc Xuân và Nguyễn Thị Thanh Xuân

14. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ NHÂN TẠO KHẢ NĂNG CHỐNG CHỊU BỆNH ĐẠO ÔN LÁ CỦA MỘT SỐ GIỐNG LÚA THUẦN CHỦ LỰC VÙNG ĐỒNG BẰNG SÔNG HỒNG 113

Nguyễn Huy Chung, Nguyễn Tiến Hưng, Nguyễn Thị Tho, Lâm Thị Nhung, Lê Thị Phương Lan

15. MỘT SỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU BỆNH LỞ CỔ RỄ (*Rhizoctonia solani* Kühn) HẠI MỘT SỐ CÂY TRỒNG CẠN NĂM 2019 TẠI GIA LÂM, HÀ NỘI VÀ BIỆN PHÁP PHÒNG TRỪ 119

Đỗ Tấn Dũng

16. NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG LÂY NHIỄM CỦA MỘT SỐ CHỦNG NẤM PHÂN LẬP TỪ LÁ ĐẬU TƯƠNG BỊ BỆNH PHẤN TRẮNG 127

Trần Thị Hoa, Lý Khánh Linh, Tạ Thị Đông, Bùi Phương Thảo, Trần Thị Trường, Chu Hoàng Hà, Phạm Bích Ngọc, Đỗ Tiến Phát

17. THÀNH PHẦN VÀ ẢNH HƯỞNGCỦA MỘT SỐ YẾU TỐ SINH THÁI ĐẾN MẬT ĐỘ NẤM *Fusarium* spp. TRONG ĐẤT TRỒNG CÂY HỒ TIÊU (*Piper nigrum* L.) TẠI TỈNH ĐẮK LẮK 135

Trần Thị Huế, Trần Thị Lệ Trà, Ngô Đăng Duyên, Trịnh Thị Huyền Trang, Đỗ Thị Kiều An

18. KẾT QUẢ ĐIỀU TRA BỆNH THỐI GỐC MỐC TRẮNG (*Sclerotium rolfsii*) TRÊN CÂY ĐẬU PHỘNG TẠI HUYỆN DƯƠNG MINH CHÂU, TỈNH TÂY NINH 145

Mai Bá Nghĩa, Võ Thị Thu Oanh

19. XÁC ĐỊNH NẤM *Fusarium solani* GÂY BỆNH HÉO DÂY, THỐI CỦ TRÊN KHOAI LANG 151

Nguyễn Trường Sơn và Lê Minh Tường

20. XÁC ĐỊNH NẤM BỆNH TRÊN HẠT LÚA GIỐNG IR 50404 TẠI AN GIANG 157

Nguyễn Quang Tiến, Nguyễn Thị Kiều My, Nguyễn Đắc Khoa

21. PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ENZYME NGOẠI BÀO CÁC CHỦNG NẤM KÝ SINH RỆP SÁP TRÊN DỨA 162

Nguyễn Thị Ngọc Trúc , Nguyễn Duy Khiêm, Trần Ngọc Phú Tịnh, Phan Thị Mỹ Dung, Trương Thanh Xuân Liên

22. BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU BỆNH THỐI THÂN, THỐI CỦ SEN Ở THỪA THIÊN HUẾ 169

Nguyễn Vĩnh Trường và Lê Minh Vương

23. ĐIỀU TRA THÀNH PHẦN BỆNH HẠI CHÍNH HẠI NGÔ TRÊN ĐỒNG RUỘNG VÀ SAU THU HOẠCH Ở VIỆT NAM 176

Nguyễn Văn Tuất, Nguyễn Văn Liêm

24. PHÂN LẬP NẤM GÂY BỆNH THỐI CỔ RỄ TRÊN CÂY LAN THỦY TIÊN THÂN VUÔNG (*Dendrobium farmeri*) VÀ THỬ NGHIỆM TÁC DỤNG DIỆT NẤM CỦA MỘT SỐ CHẾ PHẨM 182

Nguyễn Thị Hải Yến, Nguyễn Thị Thu Huyền

25. HIỆU QUẢ PHÒNG TRỪ CỦA NẤM *Paecilomyces* sp. ĐỐI VỚI TUYẾN TRÙNG *Meloidogyne incognita* VÀ *Pratylenchus penetrans* TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM 189

Nguyễn Thị Duyên, Nguyễn Hữu Tiền, Lê Thị Mai Linh, Trịnh Quang Pháp

26. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KÝ SINH TRỨNG TUYẾN TRÙNG *Meloidogyne* sp. TRONG ĐIỀU KIỆN *in vitro* CỦA NẤM *Trichoderma* spp. PHÂN LẬP TẠI ĐẮK LẮK 200

Nguyễn Văn Nam, Đỗ Thị Kiều An, Nguyễn Thị Hương Cẩm

27. HIỆU QUẢ CỦA MỘT SỐ CHẾ PHẨM SINH HỌC TRONG PHÒNG TRỊ TUYẾN TRÙNG GÂY BỆNH VÀNG LÁ CHẾT CHẬM TRÊN CÂY TIÊU (*Piper nigrum* L.) TẠI HẬU GIANG 207

Nguyễn Quốc Thái, Lê Hoàng Xuyên, Nguyễn Thanh Phong, Phạm Vũ Linh và Ngô Thị Kim Ngọc

28. MỘT SỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TUYẾN TRÙNG HẠI CHÈ *Pratylenchus* spp. Ở VÙNG MIỀN NÚI PHÍA BẮC 215

Nguyễn Văn Thiệp, Nguyễn Thị Kim Oanh, Trịnh Thị Kim Mỹ, Trần Đặng Việt, Nguyễn Huy Thịnh

29. CÁC NHÓM TUYẾN TRÙNG QUAN TRỌNG TRÊN MỘT SỐ CÂY DƯỢC LIỆU Ở VIỆT NAM 220

Nguyễn Hữu Tiền, Nguyễn Thị Duyên, Lê Thị Mai Linh, Trịnh Quang Pháp

30. HIỆU LỰC CỦA MỘT SỐ LOẠI THUỐC PHÒNG CHỐNG BỆNH ĐỐM NÂU (*Alternaria sesami)* HẠI CHANH LEO TẠI NGHỆ AN 230

Võ Thị Dung, Hà Minh Thanh, Vũ Triệu Mân, Nguyễn Đình Tiến

31. KHẢO SÁT HIỆU QUẢ PHÒNG TRỊ BỆNH BẠC LÁ TRÊN RUỘNG LÚA CỦA VI KHUẨN *Serratia nematodiphila* CT-78 SAU 12 THÁNG TỒN TRỮ 238

Nguyễn Thị Thùy Dung, Nguyễn Nguyệt Ánh, Nguyễn Đắc Khoa

32. ẢNH HƯỞNG CỦA CHẾ PHẨM HTD-CNSH-CF LÊN SINH TRƯỞNG CÂY CÀ PHÊ 243

Nguyễn Thị Hồng Hà, Trần Thị Hoa, Đỗ Thị Gấm, Hà Việt Sơn, Hoàng Thị HuyềnTrang, Chu Hoàng Hà, Đỗ Tiến Phát, Phạm Bích Ngọc

33. ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ PHÒNG TRỪ CỦA NANO BẠC ĐỐI VỚI BỆNH THÁN THƯ ỚT DO NẤM *Colleteotrichum* sp. GÂY RA 249

Nguyễn Thị Hai, Lê Danh Lam

34. MỘT SỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CƠ CHẾ ĐỐI KHÁNG VÀ KÍCH KHÁNG TRONG PHÒNG TRỊ BỆNH BẠC LÁ LÚA, LÚA VON VÀ THỐI NHŨN HÀNH TÍM 255

Nguyễn Đắc Khoa và Nguyễn Thị Phi Oanh

35. ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI ĐIỂM PHUN NANO BẠC ĐẾN HIỆU QUẢ PHÒNG TRỪ BỆNH PHẤN TRẮNG TRÊN CÂY DƯA LEO 263

Chu Trung Kiên, Nguyễn Hiếu Hạnh, Trần Anh Tuấn, Hồ Thị Thanh Huyền, Huỳnh Hữu Tín, Chu Văn Khương và Mai Hải Châu

36. ĐÁNH GIÁ HIỆU LỰC PHÒNG TRỪ BỆNH BẠC LÁ LÚA CỦA NANO Cu_2O-Cu/Alginate TẠI TỈNH TIỀN GIANG 267

Chu Trung Kiên, Nguyễn Hiếu Hạnh, Trần Anh Tuấn, Hồ Thị Thanh Huyền, Huỳnh Hữu Tín, Chu Văn Khương, Bùi Duy Du, Lê Nghiêm Anh Tuấn và Mai Hải Châu

37. ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ GIẢM BỆNH THÁN THƯ TRÊN DƯA CHUỘT CỦA HAI CHỦNG VI KHUẨN *Bacillus* sp. TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI 272

Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Thị Phi Oanh và Nguyễn Đắc Khoa

38. HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CAO CHIẾT THỰC VẬT ĐỐI VỚI BỆNH CHÁY BÌA LÁ LÚA DO *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI 280

Dương Thành Lộc, Đào Thị Hồng Xuyến, Nguyễn Chí Cương, Trần Thị Thu Thủy

39. PHƯƠNG THỨC CANH TÁC MÔI TRƯỜNG LỢI KHUẨN CHO NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM PHÁT TRIỂN BỀN VỮNG 287

Saburo Matsui

40. KHẢO SÁT HÀM LƯỢNG POLYPHENOL, FLAVONOID, TANNIN, ALKALOID VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA, KHÁNG VI KHUẨN GÂY BỆNH THỰC VẬT CỦA CAO CHIẾT NĂM LOÀI CÂY VÙNG ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG 336

Vũ Phan Thiên Nga, Lý Ngọc Phụng, Vũ Thị Hồng Nhung, Đào Thị Trúc Đào và Nguyễn Đức Độ

41. NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM *Pyricularia oryzae* GÂY BỆNH ĐẠO ÔN TRÊN CÂY LÚA CỦA CÁC CAO DỊCH CHIẾT THẢO MỘC TRONG ĐIỀU KIỆN *in vitro* 344

Nguyễn Thị Thu Thủy, Nguyễn Thanh Hải, Nguyễn Tiến Long, Nguyễn Thị Ái Nhung

42. KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM CHIẾT XUẤT TỪ CÂY SẢ CHANH (*Cymbopogon citratus)* PHÒNG TRỪ TUYẾN TRÙNG *Meloidogyne incognita* GÂY HẠI CÀ PHÊ TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM 351

Trần Thị Thường, Nguyễn Xuân Hòa

43. HIỆU QUẢ CỦA DỊCH TRÍCH CỎ HÔI, CỎ CỨT HEO, CỎ CÚ ĐỐI VỚI NẤM *Curvularia* sp. VÀ *Fusarium* sp. PHÂN LẬP TỪ HẠT LÚA 357

Lê Thanh Toàn, Nguyễn Thúy Vy, và Lê Thị Huỳnh Vy

44. ĐẶC ĐIỂM SINH HÓA VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM GÂY BỆNH CÂY TRỒNG CỦA CAO CHIẾT PHÂN ĐOẠN LÁ BÌNH BÁT NƯỚC, MÙ U VÀ DIỆP HẠ CHÂU ĐẮNG 362

Nguyễn Phạm Thanh Trúc, Nguyễn Minh Dương, Đặng Phúc Vinh, Trần Thị Nhựt An, và Nguyễn Đức Độ

45. KHẢO SÁT HIỆU QUẢ PHÒNG TRỊ BỆNH BẠC LÁ TRÊN RUỘNG LÚA CỦA VI KHUẨN *Serratia nematodiphila* CT-78 SAU 6 THÁNG TỒN TRỮ 370

Nguyễn Thanh Tùng, Cao Đình An Giang, Nguyễn Đắc Khoa

46. HIỆU LỰC DIỆT CỎ TRANH (*Imperata cylindrica*) TRÊN VƯỜN CÂY CAO SU (*Hevea brasiliensis*) CỦA THUỐC *Glufosinate ammonium* 377

Nguyễn Phương Vinh, Nguyễn Anh Nghĩa, Trần Ánh Pha và Nguyễn Thị Thanh Trang

47. TUYỂN CHỌN DỊCH TRÍCH THỰC VẬT CÓ KHẢ NĂNG GIÚP GIẢM BỆNH BẠC LÁ LÚA (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 384

Trương Văn Xạ và Nguyễn Đắc Khoa

48. ẢNH HƯỞNG CỦA GLYPHOSATE ĐẾN CHỨC NĂNG HÔ HẤP VI SINH VẬT ĐẤT 396

Nguyễn Bình Duy

HỘI THẢO QUỐC GIA BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM

Chịu trách nhiệm xuất bản
Giám đốc - Tổng biên tập
TS. LÊ LÂN

Biên tập và sửa bản in
ĐINH VĂN THÀNH - PHẠM THANH THỦY
Trình bày, bìa
VŨ HẢI YẾN

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
167/6 Phương Mai - Đống Đa - Hà Nội
ĐT: (024) 38523887, (024) 38521940 - Fax: 024.35760748
Website: http://www.nxbnongnghiep.com.vn
E - mail: nxbnn1@gmail.com
CHI NHÁNH NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
58 Nguyễn Bỉnh Khiêm - Q.I - Tp. Hồ Chí Minh
ĐT: (028) 38299521, 38297157 - Fax: (028) 39101036

In 165 bản khổ 19 × 27cm tại Công ty Cổ phần In Sao Việt.
Địa chỉ: Số 9/40 Ngụy Như Kon Tum, Thanh Xuân, Hà Nội.
Đăng ký KHXB số 4215-2020/CXBIPH/1-182/NN ngày 15/10/2020.
Quyết định XB số: 39/QĐ-NXBNN ngày 19/10/2020.
ISBN: 978-604-60-3239-7
In xong và nộp lưu chiểu quý IV/2020.