

**HỘI THẢO QUỐC GIA**  
**BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM**

Lần thứ 21

Tại Trường Đại học Đông Á, Thành phố Đà Nẵng  
Ngày 22/7/2022

THE 21<sup>st</sup> NATIONAL CONFERENCE OF PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY OF VIETNAM  
V.P.S. 22/7/2022



2022

HỘI THẢO QUỐC GIA BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM



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

**HỘI THẢO QUỐC GIA**  
**BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM**



ISBN 978-604-60-3647-

Lần thứ 21

Tại Trường Đại học Đông Á, Thành phố Đà Nẵng  
Ngày 22/7/2022

THE 21<sup>st</sup> NATIONAL CONFERENCE OF PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY OF VIETNAM  
V.P.S. 22/7/2022



Sách không bán



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 21**

**Tại Trường Đại học Đông Á, Thành phố Đà Nẵng**

**Ngày 22/7/2022**

**THE 21<sup>th</sup> NATIONAL CONFERENCE OF PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY OF VIETNAM  
V.P.S. 22/7/ 2022**

**NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP**

**HÀ NỘI - 2022**

## **HỘI THẢO QUỐC GIA BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM**

---

### **Chủ trì Hội thảo:**

GS.TS. VŨ TRIỆU MÂN  
GS.TS. NGUYỄN THƠ  
GS.TS. NGUYỄN VĂN TUẤT  
PGS.TS. TRỊNH XUÂN HOẠT  
PGS.TS. NGUYỄN ĐẮC KHOA

### **Ban Biên tập:**

GS.TS. VŨ TRIỆU MÂN - Trưởng ban  
GS.TS. BÙI CHÍ BỬU - Phó Trưởng ban  
PGS.TS. NGUYỄN ĐẮC KHOA - Thường trực Ban Biên tập  
GS.TS. BÙI CÁCH TUYẾN - Ủy viên  
GS.TS. NGUYỄN VĂN TUẤT - Ủy viên  
PGS.TS. TRỊNH XUÂN HOẠT - Ủy viên  
PGS.TS. PHẠM VĂN DƯ - Ủy viên  
PGS.TS. NGUYỄN VĂN VIẾT - Ủy viên  
PGS.TS. HÀ VIẾT CƯỜNG - Ủy viên  
TS. ĐẶNG VŨ THỊ THANH - Ủy viên  
PGS.TS. NGUYỄN VĂN NAM - Ủy viên  
TS. MAI VĂN HÀO - Ủy viên  
PGS.TS. TRẦN THỊ THU HÀ - Ủy viên  
TS. PHẠM THANH THUYẾT - PT Xuất bản

# LỜI KHAI MẠC HỘI THẢO LẦN THỨ 21 CỦA HỘI NGHIÊN CỨU BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM

Kính thưa các vị Đại biểu!

Kính thưa toàn thể Hội nghị!

Hôm nay chúng ta rất vui mừng tổ chức Hội thảo Quốc gia về Bệnh hại thực vật Việt Nam lần thứ 21 tại Trường Đại học Đông Á, Thành phố Đà Nẵng. Năm 2021 là năm kỷ niệm lần thứ 20 thành lập Hội chúng ta đã không họp được. Năm nay chúng tôi xin phép tóm tắt lại hoạt động 20 năm của Hội trước khi đi vào nội dung Hội thảo năm nay.

## I. ĐẶC ĐIỂM TÌNH HÌNH

Gần những năm 2000, hầu hết các ngành khoa học trong khối sinh học đã lần lượt thành lập các Hội, tập hợp các cán bộ khoa học cùng nhau đoàn kết chia sẻ kinh nghiệm, phát triển nghiên cứu trong nước và hợp tác quốc tế. Trong khi đó, suốt 4 năm Hội Bệnh cây dự định thành lập mà không tổ chức được. GS. Vũ Triệu Mân lúc đó đã triệu tập các đồng nghiệp gồm GS. Phạm Văn Biên - Viện trưởng Viện KHKT Nông nghiệp miền Nam, PGS. Bùi Cách Tuyến - Hiệu trưởng Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, PGS. Nguyễn Văn Tuất - Viện trưởng Viện Bảo vệ thực vật, PGS. Nguyễn Văn Việt - Trưởng Bộ môn Bảo vệ thực vật, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm. Sau đó đã vận động được 60 hội viên ở các trường và viện trong toàn quốc tham gia. Ngày 29/9/2001, Đại hội thành lập Hội đã được tổ chức tại Trường Đại học Nông nghiệp I Hà Nội với sự có mặt đông đủ của các Bộ, ngành, các chuyên gia bệnh cây Pháp và Australia và nhiều doanh nghiệp. Đặc biệt Đại hội đã được GS.VS. Vũ Tuyên Hoàng tham dự và cho ý kiến chỉ đạo.

Năm 2001, Hội có tên là Hội Sinh học phân tử bệnh lý thực vật. Sau đó để hội nhập phù hợp với Ngành Bệnh cây Thế giới, từ năm 2008 Hội xin đổi tên là Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam. Đến nay, Hội đã phát triển lớn mạnh qua 20 cuộc Hội thảo toàn quốc về Bệnh cây và Sinh học phân tử/Hội thảo Quốc gia về Bệnh hại thực vật Việt Nam và lần này là Hội thảo lần thứ 21. Hội từ một tổ chức nhỏ bé với 60 hội viên lúc ban đầu đã thành một đơn vị với 17 Viện và 7 Trường Đại học có cán bộ tham gia Hội. Nhiều công trình khoa học của Hội và các hội viên đã được công bố, đặc biệt ở cả nước ngoài làm tăng sự uy tín của Hội ngày càng cao. Vì những lý do trên Hội chúng ta

đã được Hội Các ngành Sinh học Việt Nam, Liên hiệp Hội Khoa học và Kỹ thuật Việt Nam, Bộ Nội vụ, Bộ Nông nghiệp và PTNT giúp đỡ và đã tiến hành họp Đại hội thành lập Hội mới có tư cách pháp nhân vào ngày 23/8/2019 tại Thành phố Hồ Chí Minh (theo Nghị định số 45/2010/NĐ-CP và Quyết định số 515/QĐ-BNV ngày 26/6/2019 của Bộ Nội vụ). Ngày 29 tháng 4 năm 2020, Bộ trưởng Bộ Nội vụ đã ký Quyết định công nhận Điều lệ của Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam. Ngày 07 tháng 5 năm 2020 Bộ Công an đã cấp dấu cho Hội.

Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam hiện nay là **Hội có tư cách pháp nhân** hoạt động trên phạm vi toàn quốc với gần 800 hội viên, trong đó có 10 Giáo sư, hơn 20 Phó Giáo sư, hơn 100 Tiến sĩ và nhiều Thạc sĩ, là tổ chức phi Chính phủ duy nhất tập hợp các nhà nghiên cứu, giảng dạy, ứng dụng phòng chống bệnh hại thực vật của người Việt Nam trong nước và nước ngoài.

## II. CHỨC NĂNG, NHIỆM VỤ CỦA HỘI

Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam là tổ chức xã hội - nghề nghiệp của các tổ chức và công dân Việt Nam hoạt động trong lĩnh vực nghiên cứu bệnh hại thực vật tự nguyện thành lập. Mục đích của Hội nhằm tập hợp, đoàn kết hội viên, hỗ trợ và giúp đỡ nhau trong hoạt động nghiên cứu, tuyên truyền, phổ biến, phát triển, ứng dụng khoa học và công nghệ để phát hiện, phòng chống các loại Bệnh hại thực vật ở Việt Nam, góp phần phát triển nông, lâm nghiệp và kinh tế của đất nước.

## III. THÀNH TÍCH ĐẠT ĐƯỢC

Trong 20 năm qua Hội đã hoạt động năng động với 20 cuộc Hội thảo Quốc gia tổ chức tại các địa điểm khác nhau trong nước như: Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh, Đại học Nông nghiệp I Hà Nội, Viện Cây ăn quả miền Nam (Long Định, Mỹ Tho, Tiền Giang), Đại học Vinh (Nghệ An), Học viện Nông nghiệp Việt Nam, Viện KHKT Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên, Viện KHKT Nông Lâm nghiệp miền núi phía Bắc, Viện Nghiên cứu Bông và PTNN Nha Hồ (Ninh Thuận), Đại học Nông Lâm Huế, Đại học Sư phạm Đà Nẵng, Đại học Đông Á Đà Nẵng, Đại học Cần Thơ. Các cuộc hội thảo đã công bố hơn 649 công trình nghiên cứu khoa học với trên 5.617 trang in. Trong số các công trình này có tới 569 công trình có ứng dụng phòng trừ trực tiếp mang lại hiệu quả kinh tế thiết thực cho cây trồng gồm lúa, các cây rau, hoa, quả, cây công nghiệp, trong đó có nhiều cây có giá trị xuất khẩu cao như cà phê, hồ tiêu, cam, chanh, bưởi và các loại rau. Các công trình lớn của các hội viên đã được công bố trên các tạp chí hàng đầu về bệnh cây trên thế giới ở Mỹ, Nhật Bản, Đức, Pháp, Hà Lan, Australia, Đan Mạch... và có một số lượng lớn bài báo trong nước. Nhiều vi sinh vật gây bệnh mới có tên các tác giả Việt Nam đã có trong Ngân hàng Gene Thế giới.

Đưa ra các hệ thống, các phương hướng phòng trừ mới đã thực sự đi đúng định hướng mà Hội nêu lên trong kế hoạch hoạt động 20 năm qua: 80% là các công trình nghiên cứu về giống chống bệnh, giống sạch bệnh, nghiên cứu chất kháng sinh, chất kích kháng, vi sinh vật đối kháng, nghiên cứu áp dụng IPM, ICM trong phòng trừ tổng hợp bệnh hại. Một số chuyên đề đã đề cập đến độc tố trên rau, quả đi theo hướng tạo thực phẩm sạch và bảo vệ môi trường sống của cây trồng và con người. Hội đã phối hợp với Trung tâm Nghiên cứu Bảo vệ sức khỏe cây trồng, vật nuôi và Công ty Vinaxanh thực hiện áp dụng chăm sóc cây trồng theo hướng hữu cơ sinh học kết hợp phòng chống thành công nhiều bệnh hại nguy hiểm như bệnh gây chết cây hồ tiêu, bệnh tuyến trùng hại hồ tiêu, bệnh *Phytophthora*, bệnh thán thư trên ớt xuất khẩu, bệnh hại thanh long, cây cam, cây xoài và các cây ăn quả xuất khẩu. Đã thực nghiệm thành công ở các điểm thí nghiệm trên hơn 10 tỉnh và hơn 20 loại cây trồng khác nhau trong 8 năm gần đây. Đây là một kết quả rất quan trọng.

Hội đã tổ chức Hội đồng tư vấn phòng chống thành công bệnh virus hại lúa ở miền Nam và các bệnh virus hại lúa ở miền Bắc trong các năm 1997 - 2011.

Đặc biệt trong chẩn đoán nhanh và trong nghiên cứu nhiều kỹ thuật mới đã được áp dụng trong 5 năm gần đây, được các Chi hội Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long, Viện Cây ăn quả miền Nam, các Trường Đại học ứng dụng như: Sử dụng marker phân tử hay chuyển gene đa đoạn để tạo giống kháng nấm, kháng vi khuẩn, kháng virus. Đặc biệt Hội đã phát hiện sớm bệnh lúa lùn xoắn lá, bệnh vàng lùn lúa cỏ, bệnh lúa lùn sọc đen và lúa vàng lụi giúp Bộ Nông nghiệp và PTNT kịp thời có chủ trương dập tắt dịch bệnh trên lúa và một số cây trồng (*Bộ trưởng Cao Đức Phát, Thứ trưởng Bùi Bá Bổng đã có thư cảm ơn gửi Giáo sư Chủ tịch Hội*). Các đơn vị tham gia Hội đi đầu trong việc áp dụng kỹ thuật RNAi, áp dụng phương pháp Metagenomix một phương pháp mới hiện đại trong nghiên cứu sinh học phân tử. Phát triển kỹ thuật sử dụng giống kích kháng, vi sinh vật đối kháng. Nghiên cứu áp dụng kỹ thuật nano trong phòng chống bệnh cây... Hội trở thành nơi tập hợp các đơn vị đi đầu trong nước về nghiên cứu cải tiến kỹ thuật mới trong nghiên cứu bệnh lý thực vật và giống kháng bệnh. Hiện nay các nhà nghiên cứu của Hội đã phát hiện thêm hàng trăm bệnh hại mới và đang nghiên cứu nhiều biện pháp sinh học và giống kháng để hạn chế bệnh hại.

### **Nhiều sản phẩm chẩn đoán và phòng trừ bệnh hại tiêu biểu:**

Hội và phòng thí nghiệm Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới (Chi hội Học viện Nông nghiệp Việt Nam) đã sản xuất kit ELISA bằng phương pháp tái tổ hợp protein thành công. Các bộ kit chẩn đoán đã phản ứng tương đương với kit nhập nội từ Mỹ, Pháp, IRRRI và đã được nhận cúp vàng trong Hội chợ Triển lãm kinh tế kỹ thuật Việt Nam -

ASEAN + 3 (Kit đã được Trung tâm Kiểm định Sinh phẩm - Bộ Y tế làm thử nghiệm so sánh với kit do Hãng AGDIA (Mỹ) nhập khẩu có kết quả như nhau). Đây cũng là kết quả vô cùng quan trọng, giúp Việt Nam tiết kiệm một lượng ngoại tệ phục vụ chẩn đoán bệnh.

Chế phẩm *Trichoderma* của nhóm hội viên (Chi hội Trường Đại học Cần Thơ) đã đạt kết quả phòng trừ cao với bệnh hại cây ăn trái đồng bằng sông Cửu Long và đã được thương mại hóa nhiều năm mang lại kết quả lớn cho vùng cây ăn trái. Các sản phẩm *Trichoderma* khác của Viện Bảo vệ thực vật, Viện Nghiên cứu Bông và PTNN Nha Hố, Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã có tác dụng ở nhiều địa phương trên nhiều đối tượng cây trồng. Chế phẩm vi sinh trừ tuyến trùng trên cây hồ tiêu của Chi hội Đại học Tây Nguyên đã có tác dụng tốt áp dụng được kỹ thuật của Hàn Quốc thành công tại Đắk Lắk. Chế phẩm sinh học trừ rầy của Chi hội Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long, chế phẩm *Pseudomonas putida* của Chi hội Đại học Huế chống bệnh hại vùng rễ cây có hiệu quả được công nhận là sản phẩm tự hào trí tuệ Việt Nam 2016. Sáng kiến gieo mạ trong mùng cũng được Chi hội Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long đề xuất đã áp dụng có kết quả tại miền Tây Nam Bộ năm 2009. Bảo vệ được mạ non chống rầy truyền bệnh virus khi cây nhỏ, yếu sức chống chịu.

Trong tình hình bệnh virus lúa hại nghiêm trọng trên vùng đồng bằng sông Cửu Long, Hội đã đề xuất hai sáng kiến gieo sạ đồng loạt, né rầy được Bộ Nông nghiệp và PTNT và các tỉnh phía Nam áp dụng trên 1 triệu ha lúa cùng làm, đem lại mùa vụ bội thu 2009 - 2010.

Hội hiện có 10 Giáo sư (Hà Minh Trung, Vũ Triệu Mân, Nguyễn Thơ, Bùi Chí Bửu, Nguyễn Thị Lang, Nguyễn Thị Thu Cúc, Nguyễn Văn Tuất, Bùi Cách Tuyến, Phan Hữu Tôn, Phạm Xuân Hội), hơn 20 Phó Giáo sư và hơn 100 Tiến sĩ. Với các hoạt động trong và ngoài nước rất phong phú, thể hiện rõ vai trò của Ngành Bệnh cây với sản xuất và đời sống xã hội. Ngày nay Hội đã có tư cách pháp nhân, là thành viên của Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Châu Á - Thái Bình Dương và có quan hệ với nhiều hội bệnh cây Thế giới.

Giờ phút này chúng ta luôn tưởng nhớ đến các thế hệ đi trước và các đồng nghiệp cùng thế hệ đã mãi mãi đi xa như các nhà nghiên cứu bệnh cây Nguyễn Hữu Thụy, Bùi Văn Ích, Vũ Khắc Nhượng, Lê Văn Thuyết, Vũ Hoan, Phạm Văn Biên... Các đóng góp của các anh cho Ngành Bệnh cây Việt Nam sẽ mãi mãi được chúng tôi ghi nhớ.

#### **IV. TÀI CHÍNH CỦA HỘI**

Nguồn tài chính của Hội luôn chỉ có số lượng nhỏ phục vụ cho mỗi kỳ Hội thảo và xuất bản tài liệu, cho chi phí văn phòng và cho hợp tác Quốc tế. Hàng năm hội phí của

các hội viên, tiền ủng hộ của các đơn vị và cá nhân được đưa vào quỹ của Hội. Một số đơn vị đã cho mượn hội trường, góp cơ sở vật chất cho các cuộc Hội thảo cũng giúp giảm kinh phí hàng năm. Nói về tài trợ cho Hội, chúng ta luôn tưởng nhớ tới Giám đốc Công ty Hợp danh Sinh học Nông nghiệp Trần Minh Thành đã rất nhiều năm lúc sinh thời anh luôn tài trợ, giúp đỡ Hội, giúp Hội chúng ta ổn định hoạt động. Chúng tôi cũng luôn nhớ Công ty Nông Việt do Giám đốc Đinh Quốc Hòa đã nhiều năm đóng góp cho các cuộc Hội thảo của Hội. Công ty Cổ phần BVTV Trung ương 1, nhiều doanh nghiệp, nhiều chi hội hàng năm ngoài hội phí đã quan tâm tài trợ cho Hội như: Chi hội Đại học Cần Thơ, các Chi hội Viện CNSH Hà Nội, Chi hội Học viện Nông nghiệp Việt Nam, Chi hội Viện BVTV, Chi hội Phú Thọ (Viện KHKT Nông Lâm nghiệp miền núi phía Bắc), Chi hội Viện Cây ăn quả miền Nam, Chi hội Viện Nghiên cứu Bông và PTNN Nha Hồ, Chi hội Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long, Chi hội Trường ĐH Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, Chi hội Viện KHKT Nông nghiệp miền Nam, Chi hội Đại học Tây Nguyên và Viện KHKT Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên, Chi hội Đại học Thái Nguyên, Chi hội Đại học Nông Lâm Huế,... Kể cả các hội viên cá nhân ở Sơn La, Thanh Hóa, Tây Nguyên, Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Đại học Mở TP. Hồ Chí Minh, Cục BVTV... đều bằng mọi cách giúp Hội ổn định hoạt động. Đặc biệt trong dịp Đại hội thành lập Hội có tư cách pháp nhân năm 2019, TS. Trần Thanh Hùng và Viện KHKT Nông nghiệp miền Nam đã giúp đỡ nhiệt tình cho Đại hội, ông Trần Văn Toàn đối tác của Viện đã tài trợ Đại hội 100 triệu đồng. ThS. Chu Trung Kiên và CTV. hiện đang tích cực vận động các đơn vị ủng hộ Hội. Sau Đại hội, tầm hoạt động của Hội ngày càng rộng lớn, việc gây quỹ cho hoạt động Hội càng cần thiết. Năm 2021 Công ty ADAMA đã ủng hộ Hội 10 triệu đồng. Năm nay 2022 Trường Đại học Đông Á tại Đà Nẵng đã ủng hộ Hội 20 triệu đồng, các chi hội ủng hộ 40 triệu đồng không kể hội phí. Kỷ yếu Hội thảo Quốc gia của chúng ta đã tồn tại và phát triển đúng 20 năm, nhiều năm gần đây đã được công nhận là tài liệu khoa học có giá trị cao được cấp chỉ số ISBN. Đóng góp vào việc này là công lao của toàn Hội trong đó Ban Biên tập có công lớn cho việc duy trì chất lượng tài liệu này. Biên tập viên Phạm Thanh Thủy - thường trực Ban Biên tập là người sắp bài đưa in cuối cùng, là cán bộ trong Ban biên tập có công lao lớn suốt 20 năm qua cho sự tồn tại của Kỷ yếu Hội thảo. Những năm gần đây biên tập viên Nguyễn Đắc Khoa - Phó Tổng thư ký Hội được phân công cùng thường trực Ban Biên tập đã đóng góp cho việc tiếp tục nâng cao chất lượng bài. Năm nay Ban Biên tập chính thức thành lập, mặc dù bận nhiều việc, các thành viên đã rất cố gắng duyệt và góp ý các bài đúng thời hạn. Ban Chấp hành Hội chân thành cảm ơn các anh, chị. Ban Chấp hành xin cảm ơn các hội viên đã thường xuyên đóng hội phí, các đơn vị tài trợ đã giúp cho Kỷ yếu Hội thảo tồn tại và phát triển.

## **V. BÁO CÁO HOẠT ĐỘNG CỦA HỘI NĂM 2021 VÀ 6 THÁNG ĐẦU NĂM 2022**

### **1. Công tác Tập hợp trí thức**

Phát huy truyền thống đoàn kết nhất trí của Hội từ khi mới thành lập, hưởng ứng lời kêu gọi của Đảng và Chính phủ, Hội đã nhắc nhở các đơn vị trong toàn quốc khôi phục các hoạt động sau đại dịch trong tình hình mới. Ban Chấp hành đã chú ý tiếp tục phát triển tổ chức và xây dựng các đơn vị chi hội lớn hơn không chỉ bó hẹp trong một cơ quan mà có thể mở rộng trong một tỉnh, một thành phố. Phổ biến rộng rãi điều lệ của Hội chuẩn bị tiếp tục phát triển nghiên cứu khoa học và phục vụ sản xuất sau đại dịch. Đến đầu năm nay Hội đã ủng hộ Quỹ Phòng chống dịch 150 triệu đồng.

### **2. Công tác Xây dựng và phát triển tổ chức**

Hội đã thành lập thêm một chi hội mới ở Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam, mở rộng Chi hội Viện KHKT Nông Lâm nghiệp miền núi phía Bắc thành Chi hội Phú Thọ (bao gồm cả thành viên của Trường Đại học Hùng Vương và Trường Đại học Sư phạm Hà Nội II). Hội đã chuyển dịch Văn phòng từ Học viện Nông nghiệp Việt Nam sang Viện Bảo vệ thực vật do nhà trường đang xây dựng mới nhiều công trình lớn, củng cố hai văn phòng phía Bắc và phía Nam. Từ cuối năm 2021 đến nay đã có thêm hơn 20 hội viên mới xin tham gia Hội ở khắp các vùng miền trên cả nước. Tính đến nay Hội đã có hơn 900 hội viên và phấn đấu đến hết nhiệm kỳ này Hội sẽ có 1.000 hội viên.

### **3. Công tác Thông tin phổ biến kiến thức**

Bệnh khảm lá sắn là một bệnh virus nguy hiểm, nhanh chóng làm chết cây hàng loạt gây mất mùa sắn - cây lương thực hàng đầu của châu Phi. Bệnh đã lan dần qua các châu lục và một số năm gần đây đã xuất hiện và phá hoại ở một số vùng miền núi nước ta gây thiệt hại nghiêm trọng. Để thực hiện nhiệm vụ phổ biến kiến thức, Hội đã giao Chi hội Viện Bảo vệ thực vật tổ chức Hội nghị tập huấn tại xã Thượng Ninh, huyện Như Xuân, tỉnh Thanh Hóa cho 60 học viên của địa phương về Kỹ thuật nhận dạng và phòng chống bệnh virus khảm lá sắn. Hội nghị tập huấn đã thực hiện từ ngày 03 đến ngày 05/6/2022 với các nội dung lý thuyết và thực nghiệm đồng ruộng mang lại hiệu quả thiết thực cho việc phòng chống bệnh tại địa phương.

### **4. Công tác Nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ**

Trong năm 2021 và 6 tháng đầu năm 2022 đã có 72 công trình nghiên cứu của các hội viên được công bố (48 công trình được công bố năm 2021 và 24 công trình được công bố trong 6 tháng đầu năm 2022). Các báo cáo khoa học công bố năm 2021 có đến 23 công trình nghiên cứu các biện pháp sinh học dùng tác nhân đối kháng, 8 bài dùng vi khuẩn đối kháng, 6 bài dùng xạ khuẩn đối kháng, 5 bài dùng nấm đối kháng, 2 bài về

bacteriophage, 2 bài dùng dịch trích thực vật; 25 bài còn lại thì 9 bài về các biện pháp canh tác, hữu cơ, dùng giống chống bệnh...; 12 bài nghiên cứu về nguyên nhân gây bệnh nấm và 4 bài về nguyên nhân gây bệnh do vi khuẩn. Nói chung các nghiên cứu đã đi đúng hướng và năm 2022 cũng có xu hướng tương tự. Tuy nhiên hiện nay các sản phẩm muốn có giá trị cao phải tuân theo chuỗi giá trị qua nhiều bước thực hiện vì vậy nghiên cứu của chúng ta cần phát hiện bệnh trên nhiều dạng của một loại sản phẩm.

## 5. Công tác Đối ngoại

Hiện nay Hội đã trở thành thành viên của Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Châu Á - Thái Bình Dương và có nhiều quan hệ với Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Nhật Bản, Australia và nhiều nước khác.

Hiện nay biến đổi khí hậu là nguy cơ to lớn ảnh hưởng đến cuộc sống của loài người. Để chống lại biến đổi khí hậu và thiên tai thì quan trọng nhất là bảo vệ cây xanh trên Trái đất của chúng ta. Trong đó bệnh hại cây là nguyên nhân gây hại lớn nhất với cây xanh so với các dịch hại khác. Không những chúng hủy hoại thảm thực vật xanh của Trái đất mà ảnh hưởng ngay đến nguồn thức ăn xanh của con người. Ngay cả cây trồng trong nhà kính, cây con trong ống nghiệm ở các trung tâm nông nghiệp công nghệ cao không còn sợ côn trùng gây hại thì các loài vi sinh vật nhỏ bé như virus, phytoplasma, viroide, vi khuẩn vẫn xâm nhập và phá hại. Chính vì vậy, trên thế giới Ngành Bệnh hại thực vật ngày một phát triển với sự tham gia đông đảo các nhà khoa học và có nhiều Hội Nghiên cứu rất lớn ở các nước Mỹ, Anh, Pháp, Nhật Bản, Đức, Hà Lan, Đan Mạch, Australia, Ấn Độ, Nga, Trung Quốc, Hàn Quốc,... Hội chúng ta cần phấn đấu tiếp tục mở rộng các hoạt động và trong những năm tới cần trở thành thành viên của Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Thế giới.

## 6. Các hoạt động khác

Theo Điều lệ Hội do Bộ Nội vụ phê duyệt, Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam đang xin chuyển Kỷ yếu Hội thảo Quốc gia hàng năm thành **Tạp chí Nghiên cứu Bệnh hại Thực vật Việt Nam (Vietnamese Phytopathology)** bằng hai thứ tiếng (tiếng Việt và tiếng Anh). Tạp chí này sẽ giúp cho Hội thực hiện giao lưu quốc tế một cách rộng rãi.

Tôi xin thay mặt Ban Chấp hành Hội, Ban Tổ chức Hội thảo chân thành cảm ơn Trường Đại học Đông Á, Thành phố Đà Nẵng; các nhà tài trợ đã giúp đỡ và tạo mọi điều kiện cho Hội thảo lần này được diễn ra. Xin chúc các vị khách quý, các vị đại biểu và toàn thể hội viên Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam sức khỏe, thành công.

**GS.TS. Vũ Triệu Mân - Chủ tịch Hội**



# ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG BỆNH VIRUS CỦA GIỐNG CHANH LEO MỚI QUẾ PHONG 1

Nguyễn Văn Viết<sup>1\*</sup>, Hoàng Mạnh Hùng<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Hiền<sup>1</sup>, Nguyễn Đức Trung<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Công ty Chanh leo Nafoods

\* Tác giả liên hệ: vietnv@nafoods.com

## TÓM TẮT

Hiện nay tại Việt Nam đã xác định có 6 loài virus gây hại chanh leo (*Passiflora edulis* Sims). Trong điều kiện lây bệnh nhân tạo, cả hai giống chanh leo Quế Phong 1 và Đài Nông 1 đều bị nhiễm 2 loại virus phổ biến và gây tác hại lớn nhất là *Passiflora mottle virus* thuộc chi *Potyvirus* và *Papaya leaf curl Guangdong virus* thuộc chi *Begomovirus* nhưng giống chanh leo mới Quế Phong 1 có mức độ nhiễm bệnh 2,78 - 3,89%, thấp hơn giống Đài Nông 1 (3,22 - 4,33%). Trên đồng ruộng sau trồng 10 tháng cả 2 giống đều bị nhiễm bệnh virus với tỷ lệ 22,2%. Để hạn chế tác hại của bệnh virus cần sử dụng cây giống sạch bệnh và chống tái nhiễm bệnh trên đồng ruộng.

**Từ khóa:** Chanh leo, lây bệnh nhân tạo, *Papaya leaf curl Guangdong virus*, *Passiflora mottle virus*, *Passiflora edulis* Sims.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sản xuất chanh leo (*Passiflora edulis* Sims) ở nước ta đang có xu hướng tăng lên ở các vùng trồng chính tại Tây Nguyên, Tây Bắc, Bắc Trung Bộ với khoảng 10,5 nghìn ha, sản lượng quả tươi ước đạt 222,3 nghìn tấn năm 2019 (Cục Trồng trọt, 2020). Trong 5 năm gần đây, Việt Nam nổi lên là một quốc gia sản xuất và xuất khẩu chanh leo hàng đầu trong khu vực ASEAN do điều kiện tự nhiên thuận lợi. Đây là yếu tố thúc đẩy khả năng sản xuất và đáp ứng nhu cầu thị trường quốc tế ngày càng tăng, đặc biệt là các thị trường cao cấp như EU.

Tuy nhiên hiện nay các vùng trồng chanh leo đang phải đối mặt với trở ngại lớn nhất là sản xuất không bền vững do sâu bệnh hại, trong đó bệnh virus gây tác hại lớn nhất làm giảm năng suất, chất lượng và gây thoái hóa giống trong khi biện pháp phòng chống chưa hiệu quả. Sử dụng giống kháng bệnh và trồng cây giống sạch bệnh được xem là giải pháp tối ưu để hạn chế tác hại của bệnh virus. Kết quả nghiên cứu thời gian gần đây đã xác định tại Việt Nam có 6 loài virus (*East Asian Passiflora virus*, *Passiflora mottle virus*, *Telosma mosaic virus*, *Papaya leaf curl Guangdong virus*, *Euphorbia leaf curl virus*, *Cucumber*

Người phân biên: TS. Nguyễn Huy Chung

*mosaic virus*) với mức độ tác hại đối với chanh leo rất lớn (Nguyễn Thị Bích Ngọc và cs., 2021).

Bộ giống chanh leo ở Việt Nam rất nghèo nàn với duy nhất một giống chanh leo Đài Nông 1 đang trồng chủ yếu ở các vùng sản xuất có nguồn gốc nhập nội từ Đài Loan được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận là giống chính thức từ năm 2015. Trong thời gian gần đây trên đồng ruộng giống Đài Nông 1 bị nhiễm bệnh, thoái hóa, giảm sút năng suất và hiệu quả kinh tế nghiêm trọng nhưng chưa có công trình nghiên cứu chuyên sâu về khả năng kháng bệnh của giống để đưa ra giải pháp quản lý bệnh hiệu quả. Trước thực trạng trên, Công ty Chanh leo Nafoods đã chọn tạo giống chanh leo Quế Phong 1 mang bản quyền Việt Nam và đã nghiên cứu khả năng kháng bệnh của giống Quế Phong 1 cũng như giống Đài Nông 1 với 2 loài virus phổ biến và gây tác hại lớn nhất trên chanh leo ở Việt Nam hiện nay là *Passiflora mottle virus* thuộc chi *Potyvirus* và *Papaya leaf curl Guangdong virus* thuộc chi *Begomovirus*.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Mẫu lá bị bệnh virus được thu thập trên chanh leo tại xã Tri Lễ, huyện Quế Phong, tỉnh Nghệ An. Thí nghiệm lây bệnh nhân tạo cho giống mới Quế Phong 1 do Công ty Chanh leo Nafoods chọn tạo, đối chứng là giống Đài Nông 1.

Cặp mồi để phân tích RT-PCR giám định *Passiflora mottle virus* (Duy-Hung

Do *et al.*, 2021) là: PMV CP fwd: CGT CGC AGC CAA AGA GAA AGA TG

PMV CP rev: GAC AGC TTC CTT AGC TCT GAC AGG TG

Cặp mồi để phân tích PCR giám định *Papaya leaf curl Guangdong virus* (*PaLCuGDV*) (Cheng *et al.*, 2014) là:

PFGP dw: AGA ACT TGA AAC CTA TCT CTG TTG T

CP1 up: TGT GAA GGN CCD TGT AAR GT

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Thu thập nguồn bệnh và xác định virus gây bệnh

Nguồn bệnh được thu thập ngoài đồng, sau đó sử dụng kỹ thuật RT-PCR để xác định virus gây bệnh với loài *Passiflora mottle virus* thuộc chi *Potyvirus* gây khảm lá, cứng trái và kỹ thuật PCR với loài *Papaya leaf curl Guangdong virus* (*PaLCuGDV*) thuộc chi *Begomovirus* gây biến dạng và xoắn lá, chùn ngọn.

#### 2.2.2. Tách chiết ADN và phản ứng RT-PCR

*Tách chiết ADN:* Các mẫu nghiên cứu được tách chiết ADN, ARN tổng số từ 0,1g lá non (thu tươi) theo hướng dẫn tương ứng của E.Z.N.A.® Plant DNA Kit và E.Z.N.A.® Plant RNA Kit từ nhà sản xuất OMEGA bio-tek. Chất lượng và nồng độ ADN, ARN tổng số được kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Những mẫu ADN, ARN chất lượng xấu, nhiều tạp chất sẽ được tách lại.

*Thành phần và chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR, RT-PCR:* Phản ứng PCR,

RT-PCR được chuẩn bị trong eppendorf 0,2ml và thực hiện theo hướng dẫn tương ứng từ MyTaq™ DNA Polymerase Kit và Mytaq™ One-Step RT-PCR Kit của nhà sản xuất Meridian Bioscience.

Thành phần và chu trình nhiệt của phản ứng PCR cho cặp mồi đặc hiệu phát hiện virus *Papaya leaf curl Guangdong virus - PaLCuGDV* (cặp mồi này được thiết kế nhân được đoạn gen có kích thước 300bp).

| Thành phần               | Thể tích    | Chu kỳ nhiệt |         |
|--------------------------|-------------|--------------|---------|
| 5x MyTaq Reaction Buffer | 10,0µl      | 95°C         | 1 phút  |
| CP1 (10 µM)              | 1,0µl       | 95°C         | 15 giây |
| PFGP (10 µM)             | 1,0µl       | 57°C         | 15 giây |
| PFGE (10 µM)             | 1,0µl       | 72°C         | 10 giây |
| MyTaq DNA Polymerase     | 1,0µl       | 72°C         | 5 phút  |
| DEPC-H <sub>2</sub> O    | 31,0µl      |              |         |
| Template                 | 5µl         |              |         |
| <b>Tổng thể tích</b>     | <b>50µl</b> |              |         |

Thành phần và chu trình nhiệt của phản ứng RT-PCR cho cặp mồi đặc hiệu phát hiện *Passiflora mottle virus* (cặp mồi

này được thiết kế nhân được đoạn gen có kích thước 571bp).

| Thành phần               | Thể tích    | Nồng độ | Chu kỳ nhiệt |         |
|--------------------------|-------------|---------|--------------|---------|
| 2x MyTad One-Step Mix    | 25,0µl      | 1x      | 45°C         | 20 phút |
| PMV Forward (10µM)       | 2,0µl       | 400nM   | 95°C         | 1 phút  |
| PMV reverse (10µM)       | 2,0µl       | 400nM   | 95°C         | 10 giây |
| Reverse transcriptase    | 0,5µl       | -       | 56°C         | 10 giây |
| RiboSafe Rnase Inhibitor | 1,0µl       | -       | 72°C         | 30 giây |
| DEPC-H <sub>2</sub> O    | 14,5µl      | -       | 72°C         | 5 phút  |
| Template                 | 5µl         | -       |              |         |
| <b>Tổng thể tích</b>     | <b>50µl</b> |         |              |         |

*Phân tích kết quả và xử lý số liệu:*  
Sản phẩm của phản ứng PCR, RT-PCR được kiểm tra kích thước và độ đặc hiệu trên gel agarose 1,5%, đệm TBE 1X.

### 2.2.3. Bố trí thí nghiệm lây bệnh nhân tạo

Thí nghiệm lây bệnh nhân tạo cho giống Quế Phong 1, đối chứng là giống

Đài Nông 1, mỗi giống 12 cây trong đó có 9 cây lây nhiễm virus, 3 cây phun nước cất. Cây giống là gốc chanh leo vàng 1,5 tháng tuổi, mắt ghép là mắt bánh tẻ của giống Quế Phong 1, Đài Nông 1 được ghép lên gốc ghép chanh leo vàng sau 15 - 20 ngày (khi có 2 - 3 lá thật). Để cây dưới ánh sáng tán xạ và có lưới cách lý để tránh lây nhiễm chéo.

**Kỹ thuật lây bệnh nhân tạo:** Theo Quy trình lây nhiễm nhân tạo của của Burget L.W. (2009) và Hà Việt Cường (2009) gồm 4 bước: Bước 1: Chuẩn bị dịch lây nhiễm: Lấy một số lá non có biểu hiện triệu chứng ở cây đã xác định bị nhiễm virus bằng kỹ thuật RT-PCR, nghiền lá bằng chày và cối sứ sạch trong đệm photphate 0,1 M, pH 7,5 theo tỷ lệ 1g mô lá/5ml đệm, lọc qua vải lọc hoặc rây lọc (trong quá trình làm luôn giữ trên đá lạnh); Bước 2: Thổi bột Carborandum 600 mesh lên 2 - 3 lá non của mắt ghép cây cần lây nhiễm; Bước 3: Dùng ngón tay hoặc tăm bông thấm dịch virus và lướt nhẹ trên lá từ cuống đến chót, không trà ngược lại. Chú ý không chà quá mạnh sẽ gây chết các tế bào biểu bì, tuy nhiên chà nhẹ quá lại không làm tổn thương các tế bào để virus dễ dàng xâm nhập; Bước 4: Rửa lại bằng nước cất vô trùng.

#### **2.2.4. Bố trí thí nghiệm đánh giá khả năng kháng bệnh trong điều kiện tự nhiên**

Thí nghiệm đánh giá khả năng kháng bệnh trong điều kiện tự nhiên với 2 giống Quế Phong 1 và Đài Nông 1. Chuẩn bị cây giống bằng cách lấy mắt ghép cây F1 ghép trên cây gốc ghép chanh leo vàng có nguồn gốc từ Ecuador sau trồng 45 - 50 ngày tuổi có bộ rễ phát triển tốt có màu trắng và phủ trên 30% bề mặt bầu, đường kính thân 0,3 - 0,6 cm, chiều cao 12 - 20cm đạt tiêu chuẩn để ghép. Cây giống sau ghép 13 - 15 ngày, mắt ghép đã liền, mắt ghép bật lộc cao từ 2 - 5cm đủ tiêu chuẩn trồng. Mỗi ô 36m<sup>2</sup> trồng 3 cây, nhắc lại 3 lần với khoảng cách cây cách cây 3m, hàng cách hàng 4m. Các biện pháp kỹ thuật theo quy

trình trồng và chăm sóc chanh leo của Công ty Chanh leo Nafoods (2016).

#### **2.2.5. Chỉ tiêu và phương pháp theo dõi**

Theo dõi số cây bị bệnh trong thí nghiệm lây bệnh nhân tạo vào 3, 5, 7, 9 ngày/lần sau lây để xác định tỷ lệ bệnh và cấp bệnh theo Hà Việt Cường (2009) như sau: Cấp 0: Không biểu hiện triệu chứng; Cấp 1: Triệu chứng nhẹ trên 1 lá non; Cấp 2: Triệu chứng biểu hiện trên hơn 2 lá; Cấp 3: Triệu chứng khảm rõ ràng hơn ở lá già hơn và biến dạng nhẹ trên 2 lá non; Cấp 4: Khảm rõ ràng trên lá già hơn, biến dạng nhẹ trên 2 lá non, cây còi cọc; Cấp 5: Lá biến dạng rõ ràng, cây còi cọc mạnh.

Theo dõi tỷ lệ nhiễm bệnh virus trên đồng ruộng sau 1, 5 và 10 tháng sau trồng.

### **3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

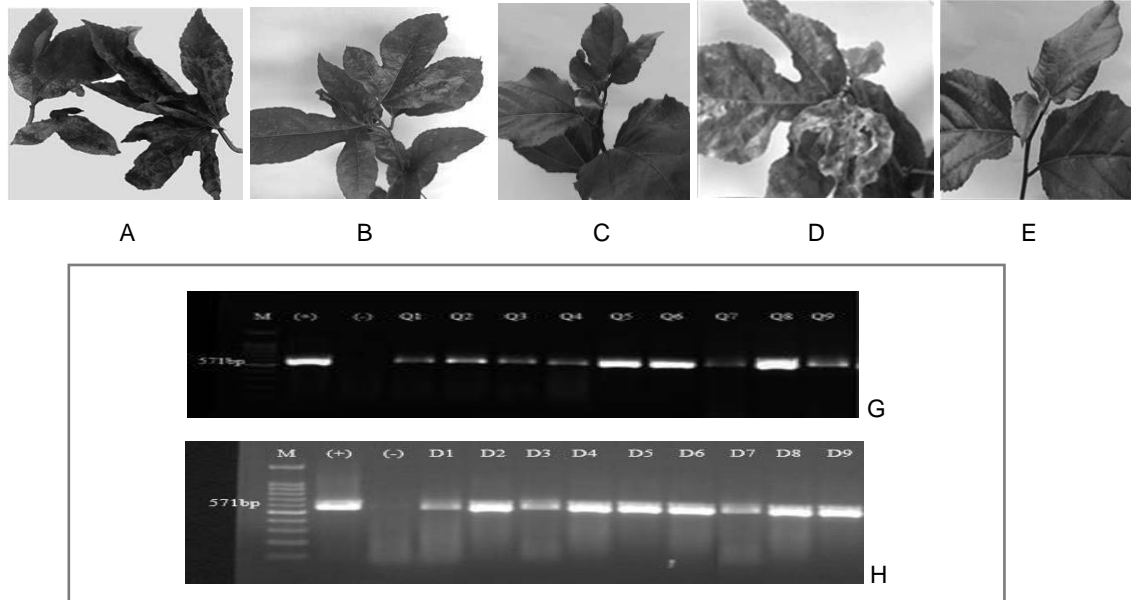
#### **3.1. Đánh giá khả năng kháng bệnh virus giống Quế Phong 1 bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo**

##### **3.1.1. Đánh giá khả năng kháng bệnh *Passiflora mottle virus* (PMV)**

Kết quả đánh giá khả năng kháng bệnh virus *Passiflora mottle virus* của hai giống Quế Phong 1 và Đài Nông 1 được thể hiện trên hình 1 và bảng 1 cho thấy triệu chứng bệnh sau lây biểu hiện khá đặc trưng với mức độ bệnh nặng hơn trên giống Đài Nông 1. Toàn bộ các cây sau lây nhiễm đều xuất hiện *Passiflora Vietnam virus* qua phân tích RT-PCR. Sau lây nhiễm 5 ngày, triệu chứng bệnh đã xuất hiện với tỷ lệ (TL) 22,22 - 33,33% nhưng cấp bệnh trung bình

(CBTB) thấp (0,22 - 0,33%). Giống Đài Nông 1 đã bị nhiễm bệnh với tỷ lệ 100% sau 7 ngày lây nhiễm, còn giống Quế Phong 1 bị nhiễm bệnh 100% sau 9 ngày

lây nhiễm. Giống Quế Phong 1 có mức độ nhiễm bệnh nhẹ hơn so giống Đài Nông 1 (cấp bệnh trung bình 3,89 so 4,33 tương ứng).



Hình 1. Mẫu lá nhiễm PMV (A); Giống Quế Phong 1 sau nhiễm PMV 9 ngày (B) và không lây nhiễm bệnh (C); Giống Đài Nông 1 sau nhiễm PMV 9 ngày (D) và không lây nhiễm bệnh (E); Kết quả điện di 9 cây giống Quế Phong 1 lây bệnh PMV (giếng (+) là đối chứng dương, giếng (-) là đối chứng âm, giếng 1 - 9 là cây thí nghiệm lây nhiễm PMV) (G) và điện di 9 cây giống Đài Nông 1 lây bệnh PMV (giếng (+) là đối chứng dương, giếng (-) là đối chứng âm, giếng 1 - 9 là cây thí nghiệm lây nhiễm PMV) (H)

**Bảng 1. Kết quả đánh giá khả năng kháng bệnh Papaya leaf curl Guangdong virus (PaLCuGDV) bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo (Quế Phong, Nghệ An, 5/2021)**

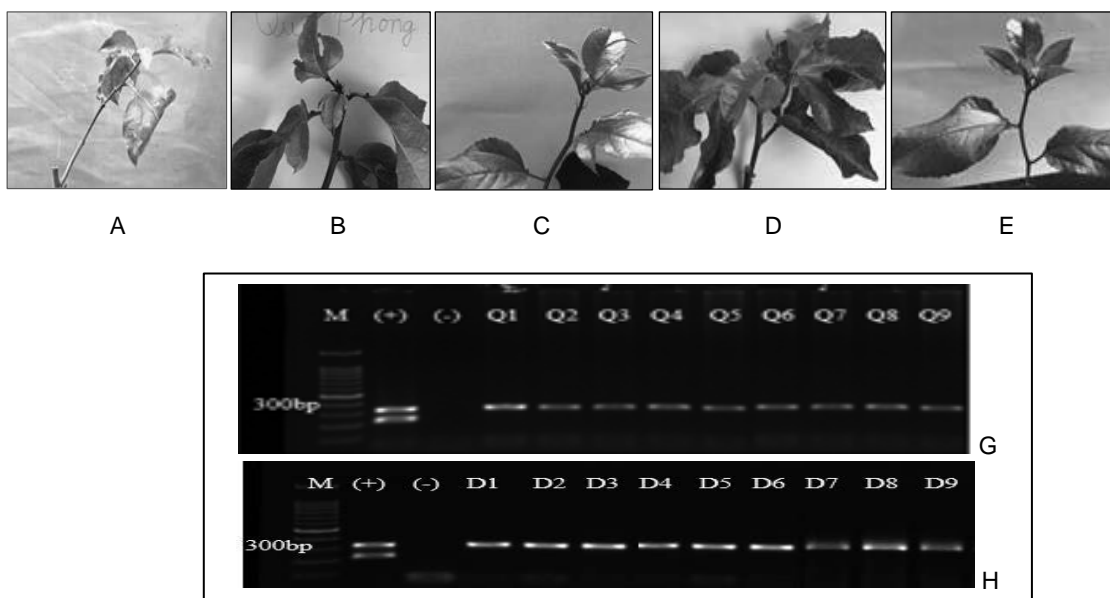
| STT | Tên giống   | Số cây lây nhiễm | 3 ngày sau lây bệnh |      | 5 ngày sau lây bệnh |      | 7 ngày sau lây bệnh |      | 9 ngày sau lây bệnh |      |
|-----|-------------|------------------|---------------------|------|---------------------|------|---------------------|------|---------------------|------|
|     |             |                  | TLB (%)             | CBTB | TLB (%)             | CBTB | TLB (%)             | CBTB | TLB (%)             | CBTB |
| 1   | Quế Phong 1 | 9                | 0                   | 0    | 22,22               | 0,22 | 66,67               | 1,33 | 100                 | 3,89 |
| 2   | Đài Nông 1  | 9                | 0                   | 0    | 33,33               | 0,33 | 100                 | 2,11 | 100                 | 4,33 |

### 3.1.2. Đánh giá khả năng kháng bệnh Papaya leaf curl Guangdong virus (PaLCuGDV)

Kết quả thể hiện trên hình 2 và bảng 2 đánh giá khả năng kháng bệnh Papaya leaf

curl Guangdong virus của hai giống Quế Phong 1 và Đài Nông 1 cho thấy triệu chứng bệnh sau lây biểu hiện khá đặc trưng. Toàn bộ các cây sau lây nhiễm đều xuất hiện Papaya leaf curl Guangdong virus qua phân tích PCR. Cả 2 giống Đài

Nông 1 và Quế Phong 1 đều xuất hiện bệnh ở 5 ngày sau lây và bị nhiễm bệnh với tỷ lệ 100% sau 9 ngày lây nhiễm. Giống Quế Phong 1 có mức độ nhiễm bệnh nhẹ hơn so giống Đài Nông 1 (cấp bệnh trung bình 2,78 so 3,22% tương ứng).



**Hình 2.** Mẫu lá nhiễm PaLCuGDV (A); Giống Quế Phong 1 sau nhiễm PaLCuGDV 9 ngày (B) và không lây nhiễm bệnh (C); Giống Đài Nông 1 sau nhiễm PaLCuGDV 9 ngày (D) và không lây nhiễm bệnh (E); Kết quả điện di 9 cây giống Quế Phong 1 lây bệnh PaLCuGDV (giếng (+) là đối chứng dương, giếng (-) là đối chứng âm, giếng 1 - 9 là cây thí nghiệm lây nhiễm PaLCuGDV) (G) và điện di 9 cây giống Đài Nông 1 lây bệnh PaLCuGDV (giếng (+) là đối chứng dương, giếng (-) là đối chứng âm, giếng 1 - 9 là cây thí nghiệm lây nhiễm PaLCuGDV) (H)

**Bảng 2. Kết quả đánh giá khả năng kháng bệnh Papaya leaf curl Guangdong virus (PaLCuGDV) bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo (Quế Phong, Nghệ An, 5/2021)**

| STT | Tên giống   | Số cây lây nhiễm | 3 ngày sau lây bệnh |      | 5 ngày sau lây bệnh |      | 7 ngày sau lây bệnh |      | 9 ngày sau lây bệnh |      |
|-----|-------------|------------------|---------------------|------|---------------------|------|---------------------|------|---------------------|------|
|     |             |                  | TLB (%)             | CBTB | TLB (%)             | CBTB | TLB (%)             | CBTB | TLB (%)             | CBTB |
| 1   | Quế Phong 1 | 9                | 0                   | 0    | 22,22               | 0,22 | 66,67               | 1,33 | 100                 | 2,78 |
| 2   | Đài Nông 1  | 9                | 0                   | 0    | 22,22               | 0,22 | 66,67               | 1,56 | 100                 | 3,22 |

### 3.2. Đánh giá khả năng kháng bệnh virus giống Quế Phong 1 trong điều kiện tự nhiên

Kết quả đánh giá khả năng kháng bệnh virus giống Quế Phong 1 trong điều

kiện tự nhiên (bảng 3) cho thấy, do sử dụng cây giống sạch bệnh để trồng trong điều kiện tự nhiên nên sau trồng (ST) 5 tháng cả giống Quế Phong 1 và giống đối chứng Đài Nông 1 vẫn chưa bị nhiễm

bệnh virus và tới tháng thứ 10 cả 2 giống mới bị nhiễm bệnh virus khảm lá, vỏ quả hóa bần (do virus PMV) với tỷ lệ 11,1% và bệnh virus khác với tỷ lệ 11,1%.

**Bảng 3. Tỷ lệ bệnh virus giống Quế Phong 1 (%) trong điều kiện tự nhiên (Quế Phong, Nghệ An, 2021)**

| STT | Tên giống   | Bệnh virus khảm lá, vỏ quả hóa bần (do virus PMV) |            |             | Bệnh virus khảm lá (do virus PaLCuGDV) |            |             | Bệnh virus khác |            |             |
|-----|-------------|---|------------|-------------|--|------------|-------------|-----------------|------------|-------------|
|     |             | ST 1 tháng  | ST 5 tháng | ST 10 tháng | ST 1 tháng                             | ST 5 tháng | ST 10 tháng | ST 1 tháng      | ST 5 tháng | ST 10 tháng |
| 1   | Quế Phong 1 | 0   | 0          | 11,1        | 0                                      | 0          | 0           | 0               | 0          | 11,1        |
| 2   | Đài Nông 1  | 0   | 0          | 11,1        | 0                                      | 0          | 0           | 0               | 0          | 11,1        |

Từ kết quả đánh giá khả năng kháng bệnh *Passiflora Vietnam virus* và *Papaya leaf curl Guangdong virus* cho thấy mặc dù giống chanh leo mới Quế Phong 1 có mức độ nhiễm bệnh virus thấp hơn giống Đài Nông 1 nhưng cả hai giống đều bị nhiễm bệnh trong điều kiện lây bệnh nhân tạo, tức là không có khả năng kháng bệnh. Do vậy sử dụng cây giống sạch bệnh để trồng là giải pháp quan trọng để hạn chế tác hại của bệnh virus.

#### 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Trong điều kiện lây bệnh nhân tạo, cả hai giống Quế Phong 1 và Đài Nông 1 đều bị nhiễm 2 loại virus phổ biến và gây tác hại lớn nhất trên chanh leo là *Passiflora Vietnam virus* và *Papaya leaf curl Guangdong virus* nhưng giống chanh leo mới Quế Phong 1 có mức độ nhiễm bệnh 2,78 - 3,89%, thấp hơn giống Đài Nông 1 (3,22 - 4,33%).

Trên đồng ruộng sau trồng 10 tháng cả 2 giống đều bị nhiễm bệnh virus với tỷ lệ 22,2%.

Để hạn chế tác hại của bệnh virus cần sử dụng cây giống sạch bệnh và chống tái nhiễm bệnh trên đồng ruộng.

**Lời cảm ơn:** Nhóm tác giả xin cảm ơn Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã tài trợ cho nghiên cứu này trong khuôn khổ đề tài cấp Bộ “Nghiên cứu chọn tạo giống chanh leo phục vụ các vùng nguyên liệu trọng điểm đáp ứng nhu cầu nội tiêu và xuất khẩu”

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cục Trồng trọt, 2020. Chanh dây sang Châu Âu theo Hiệp định EVFTA (<http://www.cuctrongtrot.gov.vn/>). 1 p.
2. Hà Viết Cường, 2009. Bài giảng “Công nghệ sinh học trong bệnh cây”. Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
3. Cheng Y.H, T. C. Deng, and C. C. Chen, 2014. First report Euphorbia leaf curl virus and Papaya leaf curl Guangdong virus on passion fruit in Taiwan. *American Phytopathological Society*, 05 - 13 - 0554 - PDN. Volume 98. P 1746.
4. Công ty Cổ phần Chanh leo Nafoods, 2016. Quy trình trồng và chăm sóc chanh leo. 12 P.
5. Duy-Hung Do, Yee-Hang Chong, Viet-Cuong Ha, Hao-Wen Cheng, Yuh-Kun Chen, Thi-Ngoc-Lan Bui, Thi-Bich-Ngoc Nguyen, Shyi-Dong Yeh, 2021. Characterization and Detection of *Passiflora Mottle Virus* and Two Other Potyviruses Causing Passionfruit Woodiness Disease in Viet Nam. *Phytopathological*, 10 - 20 - 0481 - R. p 1675 - 1685.

6. Nguyễn Thị Bích Ngọc, Nguyễn Văn Liêm, Hà Minh Thanh, Nguyễn Nam Dương, Phạm Thị Dung, Đỗ Duy Hưng, Ngô Thị Thanh Hoàng, Vũ Duy Minh, Nguyễn Viêt Hải, Nguyễn Văn Viêt, 2021. Quy trình quản lý tổng hợp sâu, bệnh gây hại chính trên cây chanh leo. *Ban hành kèm theo Quyết định của Cục trưởng Cục Bảo vệ thực vật*. 14 p.

## ABSTRACT

### **Evaluaton of the virus resistance of new passionfruit variety Que Phong 1**

*Currently in Vietnam there are 6 species of viruses cause damage passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). In the artificial inoculation, both passion fruit varieties Que Phong 1 and Dai Nong 1 were infected with 2 most harmful viruses, *Passiflora mottle virus* belonging to the Potyvirus and Papaya leaf curl Guangdong virus belonging to the Begomovirus, but the new passion fruit variety Que Phong. 1 has an infection rate of 2.78 - 3.89%, lower than that of Dai Nong 1 (3.22 - 4.33%). In the field, after planting 10 months, both varieties were infected with viruses with the rate of 22.2%. To limit the effects of viral diseases, it is necessary to use disease-free seedlings and prevent re-infection in the field.*

**Keywords:** *Passion fruit, artificial inoculation, Papaya leaf curl Guangdong virus, Passiflora mottle virus, Passiflora edulis Sims.*

# KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG CỦA XẠ KHUẨN ĐỐI VỚI NẤM *Colletotrichum* sp. GÂY BỆNH THÁN THƯ HẠI MĂNG CẦU XIÊM (*Annona muricata* Linn.)

Đình Hoàng Kha<sup>1</sup> và Lê Minh Tường<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Sinh viên ngành Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

\* Tác giả liên hệ: [lmtuong@ctu.edu.vn](mailto:lmtuong@ctu.edu.vn)

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tại đồng bằng sông Cửu Long, cây măng cầu Xiêm (*Annona muricata*) đang được trồng phổ biến vì chúng đem lại nguồn thu nhập ổn định cho nông dân, đặc biệt là ở những vùng đất kém màu mỡ. Trong quá trình canh tác cây măng cầu Xiêm cũng xuất hiện nhiều loại sâu bệnh hại trong đó đặc biệt chú ý là bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* spp. gây ra. Bệnh có thể tấn công ở nhiều giai đoạn phát triển của cây măng cầu Xiêm từ khi cây còn trong vườn ươm đến khi cây ra lá non, hoa, trái non, trái già, chín và ngay cả ở giai đoạn bảo quản, tồn trữ sau thu hoạch. Để đối phó với bệnh, nông dân phải sử dụng số lượng lớn thuốc hóa học dẫn đến ảnh hưởng xấu đến môi trường và sức khỏe của người tiêu dùng. Vì thế việc áp dụng các biện pháp sinh học để quản lý bệnh hại cây trồng nói chung và bệnh thán thư nói riêng rất cần thiết. Nhiều nghiên cứu cho thấy, xạ khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư

trên nhiều loại cây trồng ở đồng bằng sông Cửu Long như bệnh thán thư hại ớt (Đỗ Văn Sử và Lê Minh Tường, 2016), bệnh thán thư hại sen (Lê Minh Tường và Đỗ Văn Sử, 2016), bệnh thán thư hại xoài (Lê Minh Tường và Trần Quốc Phú, 2016), bệnh thán thư hại gấc (Lê Minh Tường, 2014),... Do đó, nghiên cứu và ứng dụng xạ khuẩn trong phòng trừ bệnh thán thư hại cây măng cầu Xiêm là rất cần thiết và có tính khả thi.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

- Nguồn nấm *Colletotrichum* sp.: Dòng nấm *Colletotrichum* sp. (dòng Col. PH-HG) do Phòng Thí nghiệm Bệnh cây, Bộ môn Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ cung cấp. Đây là dòng nấm được thu thập từ mẫu bệnh có triệu chứng của thán thư hại cây măng cầu Xiêm tại huyện Phụng Hiệp, tỉnh Hậu Giang và có khả năng gây bệnh nặng nhất trong 10 dòng phân lập được.

Người phân biên: TS. Nguyễn Đức Cường

- *Nguồn xạ khuẩn*: Mẫu đất được thu trên các vườn măng cầu Xiêm ở một số tỉnh đồng bằng sông Cửu Long ở độ sâu từ 10 - 20 cm. Các mẫu đất sau khi thu thập ở những vườn khác nhau được cho vào túi nylon riêng và mang về phòng thí nghiệm tiến hành phân lập theo phương pháp của Hsu và Lockwood (1975).

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Đánh giá khả năng đối kháng của xạ khuẩn đối với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại măng cầu Xiêm trong điều kiện phòng thí nghiệm

\* *Tiến hành thí nghiệm*: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 nhân tố và 5 lần lặp lại. Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong môi trường MS trong 6 ngày, xác định mật số và chuyển về huyền phù xạ khuẩn cần dùng là  $10^8$  cfu/ml. Dòng nấm *Colletotrichum* sp. được nuôi cấy trong môi trường PDA trong 6 ngày.

\* *Cách thực hiện*: Khoanh khuẩn ty nấm *Colletotrichum* sp. có đường kính 5mm được đặt vào giữa đĩa petri có chứa 10ml môi trường PDA. Khoanh giấy thấm có đường kính 5mm được tẩm huyền phù các chủng xạ khuẩn thí nghiệm và được đặt đối xứng với khoanh khuẩn ty nấm, cách thành đĩa 1cm. Ở nghiệm thức đối chứng, khoanh giấy thấm tẩm xạ khuẩn được thay bằng khoanh giấy thấm tẩm nước cất thanh trùng.

\* *Chỉ tiêu theo dõi*: Đo bán kính vòng vô khuẩn ở các thời điểm 3, 4, 5 và 6 ngày sau khi bố trí thí nghiệm.

Tính hiệu suất đối kháng ở các thời điểm 3, 4, 5 và 6 ngày sau khi bố trí thí nghiệm theo công thức của Palanayandi *et al.* (2013):

$$\text{HSDK (\%)} = \frac{[\text{BKTNđc} - \text{BKTNxk}]}{\text{BKTNđc}} \times 100$$

*Trong đó*: BKTNđc: Bán kính tán nấm ở nghiệm thức đối chứng.

BKTNxk: Bán kính tán nấm ở nghiệm thức chủng xạ khuẩn.

### 2.2.2. Khả năng ức chế sự hình thành bào tử nấm *Colletotrichum* sp. của các chủng xạ khuẩn trong điều kiện phòng thí nghiệm

\* *Bố trí thí nghiệm*: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 nhân tố và 5 lần lặp lại. Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy 6 ngày trong môi trường MS, xác định mật số và chuyển về huyền phù xạ khuẩn cần dùng là  $10^8$  cfu/ml. Dòng nấm *Colletotrichum* sp. được nuôi cấy trên môi trường PDA trong 7 ngày.

\* *Tiến hành thí nghiệm*: Cho ba khoanh khuẩn ty nấm *Colletotrichum* sp. (đường kính 5mm) vào bình tam giác chứa 98 ml PDA lỏng + 2ml huyền phù xạ khuẩn  $10^8$  cfu/ml. Sau đó nuôi lắ ở điều kiện nhiệt độ phòng với tốc độ 100 (vòng/phút). Ở nghiệm thức đối chứng, thay huyền phù xạ khuẩn bằng nước cất thanh trùng.

\* *Chỉ tiêu ghi nhận*: Xác định mật số bào tử nấm *Colletotrichum* sp. hình thành ở các nghiệm thức tại bốn thời điểm 3, 5, 7 và 9 ngày sau nuôi lắ.

### 2.3. Xử lý số liệu

Tất cả số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel. Phân tích bằng phần mềm thống kê qua chương trình MSTATC với phép thử Duncan.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Khả năng đối kháng của xạ khuẩn đối với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại cây măng cầu Xiêm

Kết quả phân lập được 98 chủng xạ khuẩn từ đất vườn trồng măng cầu Xiêm ở một số tỉnh đồng bằng sông Cửu Long

như: An Giang, Đồng Tháp, Hậu Giang, Sóc Trăng, Vĩnh Long và Thành phố Cần Thơ. Qua đánh giá nhanh khả năng đối kháng của 98 chủng xạ khuẩn phân lập với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên măng cầu Xiêm đã chọn được 18 chủng xạ khuẩn thực sự có khả năng đối kháng từ đó tiếp tục đánh giá khả năng đối kháng nấm *Colletotrichum* sp. trong điều kiện phòng thí nghiệm với 5 lần lặp lại. Kết quả đánh giá khả năng đối kháng thông qua bán kính vòng vô khuẩn (BKVVK) và hiệu suất đối kháng (HSDK) của các chủng xạ khuẩn thí nghiệm được trình bày ở bảng 1 và bảng 2.

**Bảng 1. Bán kính vòng vô khuẩn (mm) thể hiện khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn với nấm qua các thời điểm khảo sát**

| STT                | Chủng xạ khuẩn | Bán kính vòng vô khuẩn (mm) ở các thời điểm khảo sát |                    |                     |                    |
|--------------------|----------------|--|--------------------|---------------------|--------------------|
|                    |                | 3 NSBT   | 4 NSBT             | 5 NSBT              | 6 NSBT             |
| 1                  | BT-VL.1        | 10,0 <sup>fi</sup>                                   | 5,6 <sup>ghi</sup> | 4,6 <sup>d-g</sup>  | 2,8 <sup>ef</sup>  |
| 2                  | BT-VL.2        | 11,0 <sup>c-g</sup>                                  | 5,8 <sup>e-i</sup> | 6,2 <sup>cd</sup>   | 4,6 <sup>d</sup>   |
| 3                  | CE-CT.1        | 9,8 <sup>f-j</sup>                                   | 5,2 <sup>ghi</sup> | 3,8 <sup>f-i</sup>  | 2,4 <sup>efg</sup> |
| 4                  | CL-ĐT.1        | 7,8 <sup>kl</sup>                                    | 5,6 <sup>f-i</sup> | 4,6 <sup>efg</sup>  | 2,8 <sup>ef</sup>  |
| 5                  | VC-ST.1        | 8,4 <sup>l</sup>                                     | 3,3 <sup>jk</sup>  | 2,6 <sup>ijk</sup>  | 2,4 <sup>efg</sup> |
| 6                  | HN-ĐT.1        | 13,6 <sup>a</sup>                                    | 12,0 <sup>a</sup>  | 11,2 <sup>a</sup>   | 10,4 <sup>a</sup>  |
| 7                  | LV-ĐT.1        | 13,0 <sup>ab</sup>                                   | 10,0 <sup>b</sup>  | 8,0 <sup>b</sup>    | 7,4 <sup>b</sup>   |
| 8                  | CT-AG.1        | 8,8 <sup>ijk</sup>                                   | 4,6 <sup>g-j</sup> | 2,4 <sup>ijk</sup>  | 1,2 <sup>hi</sup>  |
| 9                  | TM-ĐT.1        | 12,4 <sup>a-d</sup>                                  | 9,4 <sup>bc</sup>  | 6,0 <sup>cde</sup>  | 1,6 <sup>ghi</sup> |
| 10                 | AP-AG.1        | 12,0 <sup>a-e</sup>                                  | 11,8 <sup>a</sup>  | 8,2 <sup>b</sup>    | 5,6 <sup>c</sup>   |
| 11                 | CT-AG.2        | 8,6 <sup>ijk</sup>                                   | 2,0 <sup>k</sup>   | 4,4 <sup>fgh</sup>  | 2,4 <sup>efg</sup> |
| 12                 | CT-AG.3        | 9,6 <sup>f-k</sup>                                   | 4,4 <sup>hij</sup> | 2,8 <sup>hijk</sup> | 1,0 <sup>ij</sup>  |
| 13                 | TM-ĐT.2        | 9,40 <sup>g-k</sup>                                  | 7,2 <sup>def</sup> | 4,4 <sup>fgh</sup>  | 3,4 <sup>e</sup>   |
| 14                 | LV-ĐT.3        | 12,4 <sup>a-d</sup>                                  | 9,8 <sup>b</sup>   | 8,0 <sup>b</sup>    | 7,8 <sup>b</sup>   |
| 15                 | CT-HG.3        | 10,8 <sup>d-h</sup>                                  | 8,0 <sup>c</sup>   | 7,8 <sup>b</sup>    | 6,9 <sup>c</sup>   |
| 16                 | BT-VL.4        | 12,8 <sup>abc</sup>                                  | 6,2 <sup>efg</sup> | 4,4 <sup>e-h</sup>  | 1,2 <sup>hi</sup>  |
| 17                 | VC-ST.3        | 12,8 <sup>abc</sup>                                  | 7,4 <sup>de</sup>  | 6,2 <sup>cd</sup>   | 1,6 <sup>gh</sup>  |
| 18                 | VC-ST.4        | 12,0 <sup>a-e</sup>                                  | 7,4 <sup>de</sup>  | 5,0 <sup>def</sup>  | 2,2 <sup>fgh</sup> |
| <i>Mức ý nghĩa</i> |                | *  | *                  | *                   | *                  |
| <i>CV (%)</i>      |                | 11,85  | 10,97              | 19,76               | 13,96              |

*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.

- *Bán kính vòng vô khuẩn (BKVVK)* (bảng 1): Ở thời điểm 3 ngày sau khi bố trí thí nghiệm (NSBT), chủng xạ khuẩn HN-ĐT.1 thể hiện khả năng đối kháng cao thông qua BKVVK là 13,6 mm tuy không khác biệt so với các chủng LV-ĐT.1, AP-AG.1, LV-ĐT.3, CT-HG.3, BT-VL.4, VC-ST.3 và VC-ST.4 nhưng lớn hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại (bảng 1). Tại thời điểm 4NSBT, 2 chủng HN-ĐT.1 và AP-AG.1 có BKVVK cao nhất lần lượt là 12,0mm và 11,8mm; tiếp theo là 2 chủng LV-ĐT.1 và LV-ĐT.3 có BKVVK tương ứng với 10,0 mm và 9,8mm tuy không khác biệt so với chủng TM-ĐT.1 nhưng lớn hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại. Đến thời điểm 5 NSBT, chủng HN-ĐT.1 có BKVVK cao nhất là 11,2mm; kế đến là 4 chủng LV-ĐT.1, AP-AG.1, LV-ĐT.3 và CT-HG.3 với BKVVK lần lượt là 8,0 mm; 8,2mm; 8,0mm và 7,8mm lớn hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại. Ở thời điểm 6 NSBT, chủng HN-ĐT.1 vẫn thể hiện khả năng đối kháng cao với BKVVK cao nhất là 10,4mm; kế đến là 2 chủng LV-ĐT.1 và LV-ĐT.3 có BKVVK lần lượt là 7,4mm và 7,8mm; tiếp theo là 2 chủng AP-AG.1 và CT-HG.3 có BKVVK lần lượt là 5,6mm và 6,9mm, lớn hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại.

- *Hiệu suất đối kháng (HSDK)* (bảng 2): Ở thời điểm 3NSBT, 2 chủng xạ khuẩn HN-ĐT.1 và LV-ĐT.1 cho khả năng đối kháng cao thể hiện qua HSDK cao nhất lần lượt là 48,04% và 46,39%; kế đến là chủng AP-AG.1 có HSDK 38,14%, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn còn lại (bảng 2). Tại thời điểm 4 NSBT, 3 chủng HN-ĐT.1, LV-ĐT.1 và AP-AG.3 có HSDK cao nhất tương ứng với 60,57%; 58,28% và 60,00%; kế đến là chủng LV-ĐT.3 có HSDK 48,67% tuy không khác biệt so với chủng CT-HG.3 (46,87%) nhưng cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại. Sang thời điểm 5 NSBT, chủng HN-ĐT.1 vẫn cho HSDK cao nhất là 64,55%; kế đến là chủng LV-ĐT.1 với HSDK 60,72%; tiếp theo là chủng AP-AG.3 với HSDK 57,37% và chủng LV-ĐT.3 có HSDK 53,53% tuy không khác biệt so với chủng CT-HG.3 (49,75%) nhưng cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại. Đến thời điểm 6NSBT, chủng HN-ĐT.1 vẫn thể hiện khả năng đối kháng cao với HSDK cao nhất 65,33%; kế đến là chủng LV-ĐT.1 với HSDK 61,33%; tiếp theo là 3 chủng AP-AG.3, LV-ĐT.3 và CT-HG.3 với HSDK lần lượt là 56,89%; 57,798% và 56,83%, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại.

**Bảng 2. Hiệu suất đối kháng (%) của các chủng xạ khuẩn với nấm *Colletotrichum* sp. qua các thời điểm khảo sát**

| STT                | Kí hiệu | Hiệu suất đối kháng (%) ở các thời điểm khảo sát |  |  |  |
|--------------------|---------|--|--|--|--|
|                    |         | 3 NSBT   | 4 NSBT                                       | 5 NSBT                                       | 6 NSBT                                       |
| 1                  | BT-VL.1 | 20,00 <sup>g</sup> <sup>j</sup>                  | 32,00 <sup>f</sup> <sup>i</sup>              | 41,08 <sup>g</sup> <sup>h</sup>              | 41,33 <sup>g</sup> <sup>h</sup>              |
| 2                  | BT-VL.2 | 22,63 <sup>g</sup> <sup>j</sup>                  | 31,43 <sup>g</sup> <sup>h</sup> <sup>i</sup> | 41,07 <sup>g</sup> <sup>h</sup>              | 44,00 <sup>e</sup> <sup>f</sup>              |
| 3                  | CĐ-CT.1 | 19,18 <sup>h</sup> <sup>k</sup>                  | 31,43 <sup>g</sup> <sup>h</sup> <sup>i</sup> | 39,16 <sup>g</sup> <sup>h</sup> <sup>i</sup> | 41,33 <sup>g</sup> <sup>h</sup>              |
| 4                  | CL-ĐT.1 | 10,93 <sup>l</sup> <sup>m</sup>                  | 32,00 <sup>f</sup> <sup>i</sup>              | 39,64 <sup>g</sup> <sup>h</sup> <sup>i</sup> | 40,89 <sup>g</sup> <sup>h</sup> <sup>i</sup> |
| 5                  | VC-ST.1 | 16,70 <sup>i</sup> <sup>l</sup>                  | 27,43 <sup>j</sup>                           | 37,72 <sup>h</sup> <sup>j</sup>              | 41,78 <sup>f</sup> <sup>g</sup>              |
| 6                  | HN-ĐT.1 | 48,04 <sup>a</sup>                               | 60,57 <sup>a</sup>                           | 64,55 <sup>a</sup>                           | 65,33 <sup>a</sup>                           |
| 7                  | LV-ĐT.1 | 46,39 <sup>a</sup>                               | 58,28 <sup>a</sup>                           | 60,72 <sup>b</sup>                           | 61,33 <sup>b</sup>                           |
| 8                  | CT-AG.1 | 19,18 <sup>h</sup> <sup>k</sup>                  | 33,14 <sup>e</sup> <sup>h</sup>              | 37,72 <sup>h</sup> <sup>j</sup>              | 39,56 <sup>g</sup> <sup>k</sup>              |
| 9                  | TM-ĐT.1 | 31,55 <sup>cd</sup>                              | 44,00 <sup>c</sup>                           | 45,87 <sup>e</sup>                           | 40,00 <sup>g</sup> <sup>j</sup>              |
| 10                 | AP-AG.1 | 38,14 <sup>b</sup>                               | 60,00 <sup>a</sup>                           | 57,37 <sup>c</sup>                           | 56,89 <sup>c</sup>                           |
| 11                 | CT-AG.2 | 15,05 <sup>i</sup> <sup>m</sup>                  | 21,14 <sup>k</sup>                           | 34,37 <sup>jk</sup>                          | 34,67 <sup>l</sup> <sup>o</sup>              |
| 12                 | CT-AG.3 | 19,17 <sup>h</sup> <sup>k</sup>                  | 29,14 <sup>hi</sup>                          | 36,76 <sup>ji</sup>                          | 37,34 <sup>i</sup> <sup>l</sup>              |
| 13                 | TM-ĐT.2 | 23,30 <sup>f</sup> <sup>g</sup> <sup>h</sup>     | 38,86 <sup>d</sup>                           | 44,43 <sup>ef</sup>                          | 46,22 <sup>de</sup>                          |
| 14                 | LV-ĐT.3 | 32,37 <sup>c</sup>                               | 48,57 <sup>b</sup>                           | 53,53 <sup>d</sup>                           | 57,78 <sup>c</sup>                           |
| 15                 | CT-HG.3 | 26,60 <sup>c</sup> <sup>f</sup>                  | 46,87 <sup>bc</sup>                          | 49,75 <sup>de</sup>                          | 56,43 <sup>c</sup>                           |
| 16                 | BT-VL.4 | 24,95 <sup>e</sup> <sup>h</sup>                  | 33,71 <sup>e</sup> <sup>h</sup>              | 42,03 <sup>fg</sup>                          | 36,45 <sup>klm</sup>                         |
| 17                 | VC-ST.3 | 29,90 <sup>ode</sup>                             | 37,71 <sup>de</sup>                          | 41,56 <sup>fg</sup>                          | 38,67 <sup>g</sup> <sup>k</sup>              |
| 18                 | VC-ST.4 | 25,77 <sup>d</sup> <sup>g</sup>                  | 36,57 <sup>def</sup>                         | 40,60 <sup>gh</sup>                          | 36,44 <sup>klm</sup>                         |
| <i>Mức ý nghĩa</i> |         | *  | *  | *  | *  |
| CV (%)             |         | 19,11  | 10,11  | 6,12   | 6,04   |

*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.

Nhìn chung, qua kết quả bảng 1 và bảng 2 cho thấy 5 chủng HN-ĐT.1, LV-ĐT.1, AP-AG.1, LV-ĐT.3 và CT-HG.3 thể hiện khả năng đối kháng cao với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại măng cầu Xiêm với bán kính vòng vô khuẩn cao (bảng 1) và hiệu suất đối kháng cao (bảng 2) và kéo dài đến thời điểm 6 ngày sau khi bố trí thí nghiệm.

### 3.2. Khả năng ức chế sự hình thành bào tử nấm *Colletotrichum* sp. của các chủng xạ khuẩn trong điều kiện phòng thí nghiệm

Khả năng ức chế sự hình thành bào tử nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư

trên măng cầu Xiêm của 4 chủng xạ khuẩn HN-ĐT.1, LV-ĐT.3, LV-ĐT.1, AP-AG.1 và CT-HG.3 được trình bày ở bảng 3. Tại thời điểm 3 ngày sau khi nuôi cấy (NSNL), 2 chủng xạ khuẩn HN-ĐT.1 và LV-ĐT.3 thể hiện khả năng ức chế sự hình thành bào tử nấm cao với log mật số bào tử nấm đều là 0,00 (bào tử/ml), thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Đến thời điểm 5 NSNL, chủng HN-ĐT.1 vẫn thể hiện khả năng ức chế sự hình thành bào tử nấm cao với log mật số bào tử nấm thấp là 0,00 (bào tử/ml) thấp hơn và khác biệt

có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Tương tự ở thời điểm 7 NSNL và 9 NSNL, chủng HN-ĐT.1 luôn

có log mật số bào tử nấm thấp lần lượt là 0,00 (bào tử/ml) ở 7 NSNL và 2,78 (bào tử/ml) ở 9 NSNL.

**Bảng 3. Khả năng hình thành bào tử nấm *Colletotrichum* sp. qua các thời điểm khảo sát**

| STT                | Nghiệm thức | Log (bào tử/ml) qua các thời điểm khảo sát |                   |                   |                   |
|--------------------|-------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|
|                    |             | 3 NSNL                                     | 5 NSNL            | 7 NSNL            | 9 NSNL            |
| 1                  | HN-ĐT.1     | 0,00 <sup>e</sup>                          | 0,00 <sup>f</sup> | 0,00 <sup>e</sup> | 2,78 <sup>f</sup> |
| 2                  | LV-ĐT.3     | 0,00 <sup>e</sup>                          | 2,75 <sup>d</sup> | 2,85 <sup>d</sup> | 3,20 <sup>e</sup> |
| 3                  | LV-ĐT.1     | 2,30 <sup>d</sup>                          | 2,45 <sup>e</sup> | 3,17 <sup>c</sup> | 3,51 <sup>d</sup> |
| 4                  | CT-HG.3     | 2,89 <sup>b</sup>                          | 3,62 <sup>b</sup> | 3,78 <sup>b</sup> | 3,99 <sup>b</sup> |
| 5                  | AP-AG.1     | 2,70 <sup>c</sup>                          | 2,99 <sup>c</sup> | 3,30 <sup>c</sup> | 3,63 <sup>c</sup> |
| 6                  | Đối chứng   | 4,20 <sup>a</sup>                          | 4,55 <sup>a</sup> | 4,69 <sup>a</sup> | 4,91 <sup>a</sup> |
| <i>Mức ý nghĩa</i> |             | *  | *                 | *                 | *                 |
| <i>CV (%)</i>      |             | 3,18                                       | 3,83              | 3,11              | 1,58              |

*Ghi chú:* Trong cùng một cột các chữ theo sau giống nhau không khác biệt ý nghĩa qua phép thử Duncan.  
\*: Khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%. NSNL: Ngày sau nuôi cấy.

Tóm lại, qua kết quả thí nghiệm cho thấy chủng xạ khuẩn HN-ĐT.1 thể hiện khả năng đối kháng cao với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại măng cầu Xiêm thông qua bán kính vòng vô khuẩn cao (bảng 1), hiệu suất đối kháng cao (bảng 2) và mật số bào tử nấm hình thành thấp nhất (bảng 3). Khả năng đối kháng của xạ khuẩn đối với nấm gây bệnh thán thư hại cây trồng cũng đã được công bố qua nhiều nghiên cứu trước đây, kết quả nghiên cứu của Shimizu *et al.* (2009) đã cho thấy chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. MBCu-56 có khả năng ức chế sự phát triển của khuẩn ty nấm *Colletotrichum orbiculare* gây bệnh thán thư trên dưa leo trong điều kiện phòng thí nghiệm. Bên cạnh đó, Lee *et al.*, 2011 cho rằng chủng *Streptomyces* sp. A1022 cho hiệu quả cao trong phòng trị bệnh thán thư trên ớt do nấm *C. gloeosporioides* gây ra. Lê Minh Tường và Trần Quốc Phú (2016) cũng đã tuyển chọn được một số chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng cao với

nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên xoài.

## 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1. Kết luận

- Nấm (05) chủng xạ khuẩn HN-ĐT.1, LV-ĐT.1, AP-AG.1, LV-ĐT.3 và CT-HG.3 thể hiện khả năng đối kháng cao với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại măng cầu Xiêm trong điều kiện phòng thí nghiệm

- Chủng xạ khuẩn HN-ĐT.1 thể hiện khả năng ức chế sự hình thành bào tử nấm cao thông qua log mật số bào tử thấp nhất trong số 5 chủng xạ khuẩn thí nghiệm.

### 4.2. Đề nghị

Tiếp tục đánh giá khả năng phòng trị của chủng xạ khuẩn HN-ĐT.1 đối với bệnh thán thư hại măng cầu Xiêm do nấm *Colletotrichum* sp. gây ra trong điều kiện nhà lưới.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Đỗ Văn Sử và Lê Minh Tường, 2016. Hiệu quả phòng trị của xạ khuẩn đối với bệnh thán thư trên cây ớt do nấm *Colletotrichum* sp. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 28 - 35.
2. Lê Minh Tường và Đỗ Văn Sử, 2016. Đánh giá khả năng phòng trị của xạ khuẩn đối với bệnh thán thư trên cây sen ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 78 - 84.
3. Lê Minh Tường và Trần Quốc Phú, 2016. Đánh giá khả năng kiểm soát bệnh thán thư trái xoài của xạ khuẩn. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 4: 7 - 14.
4. Lê Minh Tường, 2014. Hiệu quả của xạ khuẩn trong phòng trị bệnh thán thư hại gốc do nấm *Colletotrichum* spp. gây ra. *Hội thảo Quốc gia về Bệnh hại thực vật Việt Nam*, 238 - 248.
5. Lee S.Y., H. Tindwa, Y.S. Lee, K.W. Naing, S.H. Hong, Y. Nam and K.Y. Kim, 2012. Biocontrol of anthracnose in pepper using chitinase,  $\beta$ -1,3 - glucanase, and 2 - furancarboxaldehyde produced by *Streptomyces cavourensis* SY224. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 22(10): 1359 - 1366.
6. Palaniyandi, 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. Shimizu M., S. Yazawa and Y. Ushijima, 2009. A promising strain of endophytic *Streptomyces* sp. for biological control of cucumber anthracnose. *Journal General Plant Pathology* 75:27 - 36.

**ABSTRACT****Evaluation of antagonistic activity of actinomycetes isolates on *Colletotrichum* sp. causing anthracnose disease on Soursop (*Annona muricata*)**

The objective of this research was to find out the actinomycetes isolates capable of inhibiting the growth and sporulation of *Colletotrichum* sp. fungus causing anthracnose disease on Soursop. There are 18 of 98 actinomycetes isolates in total presented antagonistic activity against *Colletotrichum* sp. and among these, 5 actinomycetes isolates HN-ĐT.1, LV-ĐT.1, LV-ĐT.3, AP-AG.1 and CT-HG.3 showed highly antagonistic ability with the radiuses of inhibition zones reaches 10.4mm; 7.4mm; 7.8mm; 5.6mm and 6.9mm, respectively and antagonistic effect reaches 65.33%; 61.33%; 57.798%; 56.89% and 56.83%, respectively at 6 days after testing. On the other hand, the ability of inhibiting sporulation of *Colletotrichum* sp. by 5 actinomycetes isolates (HN-ĐT.1, LV-ĐT.1, LV-ĐT.3, AP-AG.1 and CT-HG.3) was conducted in Laboratory condition with 5 replications. The result showed that HN-ĐT.1 isolate had the highest inhibition efficacy with the lowest log conidia concentration reaches 2.78 (spores/ml) at 9 days after testing.

**Keywords:** Actinomyces, anthracnose disease on Soursop, *Colletotrichum* sp., antagonistic activity, inhibiting sporulation.

# TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐỂ KÍCH THÍCH KHẢ NĂNG TẠO BÀO TỬ CỦA VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG *Bacillus subtilis* ST-14 PHÒNG TRỊ BỆNH BẠC LÁ LÚA

Bí Trường Giang<sup>1</sup>, Nguyễn Quang Tiến<sup>1</sup>, Nguyễn Đắc Khoa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học,  
Trường Đại học Cần Thơ

\* Tác giả liên hệ: ndkhoa@ctu.edu.vn

## TÓM TẮT

*Bacillus subtilis* ST-14 là vi khuẩn đối kháng được phân lập từ đất ruộng lúa tỉnh Sóc Trăng có khả năng phòng trừ bệnh bạc lá lúa. Kết quả sử dụng ma trận Plackett-Burman để sàng lọc các yếu tố có ảnh hưởng đến quá trình tạo bào tử của vi khuẩn ST-14 cho thấy glucose,  $KH_2PO_4$  và thời gian nuôi cấy là ba yếu tố chính. Giá trị của các yếu tố này được tối ưu hóa bằng cách kết hợp phương pháp đáp ứng bề mặt (Response Surface Methodology) và phương án cấu trúc có tâm (Central Composite Designs). Kết quả giá trị tối ưu của glucose là 7g/L,  $KH_2PO_4$  là 3g/L và thời gian nuôi cấy là 72 giờ. Mật số bào tử đạt  $3,02 \times 10^6$  CFU/mL khi áp dụng các giá trị này.

**Từ khoá:** *Bacillus subtilis*, bạc lá, bào tử, lúa, ma trận Plackett-Burman, phương án cấu trúc có tâm, phương pháp đáp ứng bề mặt.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn chi *Bacillus* là đối tượng được nghiên cứu từ lâu bởi khả năng ứng dụng được vào nhiều lĩnh vực trong cuộc sống. Trong đó, *Bacillus subtilis* được ứng dụng nhiều trong các lĩnh vực như phòng trị bệnh hại trên lúa đã được khảo sát bởi nhóm Nghiên cứu Bệnh cây thuộc Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ (Võ Thị Phương Trang, 2013; Nguyễn Đặng Ngọc Giàu, 2014; Nguyễn Hoàng Thông, 2014; Tô Anh Khoa, 2014; Hàng Anh Tài, 2015; Nguyễn Mộng Huyền Trang, 2015; Trần Kim Thoa, 2015; Nguyễn Ngọc Lộc,

2018); sản xuất probiotic hay vi khuẩn đối kháng sinh học trong lĩnh vực y tế (Monteiro *et al.*, 2005); sinh ra các chất hoạt động bề mặt ứng dụng trong hóa dầu, thực phẩm và công nghiệp mỹ phẩm (Pereira *et al.*, 2013). Một trong các lý do *B. subtilis* được quan tâm nghiên cứu là khả năng hình thành nội bào tử (endospore) giúp vi khuẩn tồn tại khi trong thời gian dài. Nghiên cứu này được thực hiện để tìm ra môi trường nuôi cấy tối ưu, rút ngắn thời gian tạo bào tử của *B. subtilis*. Trong nghiên cứu này, các yếu tố trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn *B. subtilis* được sàng lọc bằng ma trận Plackett-Burman (Plackett và Burman, 1946) và tối ưu hóa theo phương pháp bề

Người phân biên: TS. Nguyễn Đức Độ

mặt đáp ứng (RSM) - phương án cấu trúc có tâm (CCD), làm tiền đề cho các thí nghiệm sử dụng bào tử vi khuẩn *B. subtilis*.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST-14 được phân lập tại huyện Mỹ Xuyên, tỉnh Sóc Trăng (Trần Kim Thoa, 2015) và được nhóm Nghiên cứu Bệnh cây thuộc Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ cung cấp. Các loại hóa chất dùng cho khảo sát yếu tố ảnh hưởng: Glucose, Peptone, Yeast extract,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ .

#### 2.1.1. Chuẩn bị vi khuẩn, xác định mật số tế bào và mật số bào tử vi khuẩn

Vi khuẩn *B. subtilis* ST-14 được nuôi cấy trên đĩa môi trường nutrient agar (NA) (Shivaji *et al.*, 2006). Sau 48 giờ, một loop khuẩn lạc *B. subtilis* được chủng vào bình tam giác có chứa 100 mL dung dịch nutrient broth (NB), ủ lắc ở tốc độ 130 rpm, 30°C trong 24 giờ để tạo chủng gốc.

#### 2.1.2. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy bào tử

Glucose được lọc bằng màng lọc vi khuẩn để tránh hỏng.  $MnCl_2$  và  $CaCl_2$  được chuẩn bị dạng dung dịch khử trùng riêng để tránh kết tủa với các muối có gốc  $SO_4^{2-}$ . Các thành phần môi trường khác được hòa tan vào nước cất, khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 30 phút, sau đó để nguội và bổ sung glucose,  $MnCl_2$  và  $CaCl_2$ . Muối mililit huyền phù vi khuẩn được cho vào túi nylon vô trùng chứa 90mL môi trường (tỉ lệ chủng khuẩn

10%), cột kĩ, lắc ủ ở tốc độ 130rpm, 30°C và thời gian tùy mỗi nghiệm thức.

#### 2.1.3. Phương pháp xử lí bào tử và đếm mật số bào tử

Mật số bào tử được xác định bằng phương pháp trải đếm huyền phù bào tử.

Huyền phù bào tử được chuẩn bị bằng cách đun cách thủy huyền phù vi khuẩn ở 80°C trong 20 phút, phương pháp sốc nhiệt tạo điều kiện cho tế bào sinh dưỡng chuyển về dạng bào tử trong dung dịch, rồi mới pha loãng và trải đếm (Posada-Urbe *et al.*, 2015). Đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng ( $26 \pm 2^\circ C$ ) trong 48 giờ rồi tiến hành đếm khuẩn lạc, lặp lại ba lần.

Cách đếm khuẩn lạc: Đếm tất cả khuẩn lạc đơn mọc trên môi trường, chọn những đĩa petri có số khuẩn lạc thỏa điều kiện từ 30 đến 300 để tính mật số vi khuẩn có trong huyền phù ban đầu theo công thức:

$$M = \frac{A}{V \times (n1 + 0,1n2 + 0,01n3) \times d}$$

Trong đó:

M là mật số vi khuẩn/bào tử (CFU/mL); d là hệ số pha loãng thứ nhất; A là tổng số khuẩn lạc đếm được; V là thể tích huyền phù vi khuẩn cho vào mỗi đĩa ( $V = 30\mu L$ );

$n1$ ,  $n2$ ,  $n3$  lần lượt là số đĩa được chọn đếm ở các nồng độ pha loãng liên tiếp.

## 2.2. Thiết kế ma trận Plackett-Burman và phương pháp RSM-CCD

Thí nghiệm được thiết kế theo ma trận Plackett-Burman (Plackett và Burman, 1946) với 11 yếu tố và 12 nghiệm thức. Mức dưới (-1) và trên (+1) của 11 yếu tố được liệt kê trong bảng 1.

**Bảng 1. Các yếu tố trong ma trận Plackett-Burman**

| Ký hiệu | Tên yếu tố  | Mức       |           |
|---------|---|-----------|-----------|
|         |   | Dưới (-1) | Trên (+1) |
| A       | Glucose (g/L)   | 2         | 15        |
| B       | Peptone (g/L)   | 3         | 15        |
| C       | MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)            | 0,2       | 0,5       |
| D       | MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O (g/L)            | 0,5       | 2         |
| E       | Yeast extract (g/L)                                   | 1         | 5         |
| F       | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)                 | 1         | 5         |
| G       | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L) | 0,5       | 2         |
| H       | CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (g/L)            | 0,5       | 1         |
| I       | FeSO <sub>4</sub> 24 μM (mL/L)                        | 0         | 5         |
| J       | ZnSO <sub>4</sub> 30 μM (mL/L)                        | 0         | 5         |
| K       | Thời gian nuôi cấy (giờ)                              | 48        | 72        |

Ma trận được thiết kế, phân tích và tính toán bằng phần mềm Design-Expert (phiên bản 10.0.1.0, Copyright©2016, Stat-Ease Inc., USA). Hệ số ảnh hưởng (E) của yếu tố thứ i được tính bằng công thức:

$$E_i = \frac{\sum_{r=1}^{12} Y_{ir}}{N-1}$$

Trong đó: E là hệ số ảnh hưởng của yếu tố; i là số thứ tự của yếu tố; r là số thứ tự của nghiệm thức; N là số yếu tố; Y là mật số bào tử vi khuẩn.

**Tối ưu hóa môi trường bằng phương pháp Bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology) - Phương án Cấu trúc có tâm (Central Composite Design)**

Mục tiêu của thí nghiệm là tối ưu được 3 yếu tố chọn ra từ thí nghiệm sàng lọc bằng ma trận Plackett-Burman là glucose, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> và thời gian nuôi cấy, đồng thời theo dõi sự tương tác giữa chúng. Trong bảng 2, ba yếu tố ảnh hưởng chính được xác định giá trị tối ưu và được nghiên cứu ở 5 mức (-α, -1, 0, +1, +α) bằng phương pháp Bề mặt đáp ứng, kết hợp phương án Cấu trúc có tâm (CCD) gồm 20 thí nghiệm.

**Bảng 2. Nồng độ các yếu tố trong thí nghiệm tối ưu hóa RSM**

| Ký hiệu        | Tên yếu tố                            | Mức   |     |      |     |       |
|----------------|---------------------------------------|-------|-----|------|-----|-------|
|                |                                       | -α    | -1  | 0    | +1  | +α    |
| x <sub>1</sub> | Glucose (g/L)                         | 4,61  | 7   | 10,5 | 14  | 16,39 |
| x <sub>2</sub> | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L) | 1,98  | 3   | 4,5  | 6   | 7,02  |
| x <sub>3</sub> | Thời gian nuôi cấy (giờ)              | 39,82 | 0,2 | 60   | 0,5 | 80,18 |

Từ kết quả thực nghiệm, phần mềm sẽ đưa ra mô hình đáp ứng của ba yếu tố đối với mật số bào tử vi khuẩn. Hàm đáp

ứng được chọn là mật số bào tử (CFU/mL), được mô hình hóa bằng phương trình hồi quy đa thức dạng:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2$$

Trong đó:  $Y$  là hàm mục tiêu;  $\beta_0$  là hệ số tự do;  $\beta_i$  là hệ số ảnh hưởng của yếu tố  $i$ ;  $\beta_{ij}$  là hệ số ảnh hưởng tương tác của hai yếu tố  $i$  và  $j$ ;  $\beta_{ii}$  là hệ số ảnh hưởng bậc hai.

### 2.3. Kiểm định mô hình trên thực tế

Dựa vào kết quả thực nghiệm thu được từ thí nghiệm theo RSM-CCD, phần mềm Design-Expert 10.0.1.0<sup>®</sup> phân tích và đề xuất các giải pháp để thu được mật số bào tử *B. subtilis* cao nhất dựa trên ba yếu tố khảo sát. Sau đó thí nghiệm kiểm định mô hình được thực hiện, lặp lại ba lần.

### 2.4. Xử lý số liệu

Phương sai (ANOVA), hệ số của phương trình hồi quy và đề xuất giải pháp cho mô hình tối ưu hóa được phân tích và tính toán bằng phần mềm Design-Expert (phiên bản 10.0.1.0, Copyright©2016, Stat-Ease Inc., USA).

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến mật số bào tử *B. subtilis* ST-14 trên môi trường nuôi cấy

Kết quả mật số bào tử *B. subtilis* thu được sau khi thực hiện thí nghiệm nằm trong khoảng từ  $2,32 \times 10^4$  đến  $3,05 \times 10^6$  CFU/mL (bảng 4). Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) được trình bày trong Bảng 3, với  $p$ -value của mô hình là 0,0456,  $R^2$  đạt 0,9897 cho thấy mô hình có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy cao. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình hình thành bào tử được chọn là glucose,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  và thời gian nuôi cấy với  $p$ -value lần lượt là 0,0149; 0,0301; 0,0184 ( $< 0,05$ ) (bảng 3). Hai yếu tố là glucose và  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  có hệ số ảnh hưởng âm, lần lượt là -0,70 và -0,48; cho thấy glucose và  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ảnh hưởng ở mức dưới đến quá trình tạo bào tử. Trong khi của yếu tố thời gian nuôi cấy mang giá trị hệ số ảnh hưởng là dương (0,62), nên ảnh hưởng ở mức trên.

**Bảng 3. Mức độ ảnh hưởng của một số yếu tố đến mật số bào tử của *B. subtilis* ST-14 trong thí nghiệm sàng lọc Plackett-Burman**

| Yếu tố  | Mức       |           | Mức độ ảnh hưởng |            |
|---|-----------|-----------|------------------|------------|
|   | Dưới (-1) | Trên (+1) | Ảnh hưởng        | $p$ -value |
| Mô hình   |           |           |                  | 0,0456*    |
| A Glucose (g/L)                                   | 2         | 15        | -0,70            | 0,0149*    |
| C $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L) | 0,2       | 0,5       | -0,15            | 0,2241     |
| D $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (g/L) | 0,5       | 2         | -0,17            | 0,1893     |
| E Yeast extract (g/L)                             | 1         | 5         | 0,14             | 0,2525     |
| F $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g/L)                  | 1         | 5         | -0,48            | 0,0301*    |
| H $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (g/L) | 0,5       | 1         | 0,30             | 0,0726     |
| I $\text{FeSO}_4$ 2,4 $\mu\text{M}$ (mL/L)        | 0         | 50        | 0,20             | 0,1487     |
| J $\text{ZnSO}_4$ 3 $\mu\text{M}$ (mL/L)          | 0         | 50        | -0,33            | 0,0626     |
| K Thời gian nuôi cấy (giờ)                        | 48        | 72        | 0,62             | 0,0184*    |
| $R^2$   | 0,9897    |           |                  |            |
| CV (%)  | 2,63      |           |                  |            |

\* Có ý nghĩa ở độ tin cậy  $\alpha = 0,05$ .

Chú thích: Số liệu được chuyển về dạng logarit trước khi xử lý.

**Bảng 4. Kết quả sàng lọc yếu tố ảnh hưởng bằng ma trận Plackett-Burman**

| Thí nghiệm<br>thức | Các yếu tố |      |     |     |     |     |     |     |     |     |    | Mật số bào tử<br>( $\times 10^6$ CFU/mL) |
|--------------------|------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|--|
|                    | A          | B    | C   | D   | E   | F   | G   | H   | I   | J   | K  |  |
| 1                  | 15,0       | 15,0 | 0,2 | 2,0 | 5,0 | 5,0 | 0,5 | 0,5 | 0   | 5,0 | 48 | 0,023                                    |
| 2                  | 2,0        | 15,0 | 0,5 | 0,5 | 5,0 | 5,0 | 2,0 | 0,5 | 0   | 0   | 72 | 1,400                                    |
| 3                  | 15,0       | 3,0  | 0,5 | 2,0 | 1,0 | 5,0 | 2,0 | 1,0 | 0   | 0   | 48 | 0,059                                    |
| 4                  | 2,0        | 15,0 | 0,2 | 2,0 | 5,0 | 1,0 | 2,0 | 1,0 | 5,0 | 0   | 48 | 3,050                                    |
| 5                  | 2,0        | 3,0  | 0,5 | 0,5 | 5,0 | 5,0 | 0,5 | 1,0 | 5,0 | 5,0 | 48 | 0,343                                    |
| 6                  | 2,0        | 3,0  | 0,2 | 2,0 | 1,0 | 5,0 | 2,0 | 0,5 | 5,0 | 5,0 | 72 | 0,656                                    |
| 7                  | 15,0       | 3,0  | 0,2 | 0,5 | 5,0 | 1,0 | 2,0 | 1,0 | 0   | 5,0 | 72 | 0,703                                    |
| 8                  | 15,0       | 15,0 | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 5,0 | 0,5 | 1,0 | 5,0 | 0   | 72 | 0,110                                    |
| 9                  | 15,0       | 15,0 | 0,5 | 0,5 | 1,0 | 1,0 | 2,0 | 0,5 | 5,0 | 5,0 | 48 | 1,530                                    |
| 10                 | 2,0        | 15,0 | 0,5 | 2,0 | 1,0 | 1,0 | 0,5 | 1,0 | 0   | 5,0 | 72 | 0,638                                    |
| 11                 | 15,0       | 3,0  | 0,5 | 2,0 | 5,0 | 1,0 | 0,5 | 0,5 | 5,0 | 0   | 72 | 0,726                                    |
| 12                 | 2,0        | 3,0  | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 1,0 | 0,5 | 0,5 | 0   | 0   | 48 | 1,030                                    |

Trong ba yếu tố ảnh hưởng trên, glucose được nghiên cứu và nhận định về mức độ qua nhiều nghiên cứu. Lượng dư của glucose có tác động ức chế đến quá trình kích hoạt bào tử hóa của *B. subtilis* (Yamashita *et al.*, 1989), Chibazakura *et al.* (1991) cũng ủng hộ kết quả đó vì cho thấy ở glucose nồng độ 2% gây ức chế đến promotor  $P_s$  (sporulation specific promotor), nhưng promotor  $P_v$  (vegetative promotor) thì không bị ảnh hưởng. Hai promotor  $P_v$  và  $P_s$  là hai promotor riêng biệt phiên mã cho gene *spo0A*. Gene *spo0A* là gene mã hóa cho protein Spo0A, đóng vai trò là nhân tố điều hòa các quá trình kích thích nội bào và ngoại bào; và cũng là nhân tố quyết định tế bào bắt đầu quá trình bào tử hóa (Grimshaw *et al.*, 1998). Theo Monteiro *et al.* (2014) cũng cho rằng nồng độ glucose ở mức 20 g/L gây ức chế quá trình hình thành bào tử, mặc dù tổng mật số tế bào sinh dưỡng đạt mức cao. Kết quả thí nghiệm tương đối phù hợp với các

công bố trên khi nồng độ glucose mang giá trị ảnh hưởng âm (-) và nồng độ khảo sát ở mức 2g/L đến 14g/L. Mặc dù lượng dư glucose có khả năng gây ức chế quá trình bào tử hóa nhưng Jolliffe *et al.*, (1981) chỉ ra rằng glucose có tác dụng trách xu hướng tự tiêu hủy của tế bào ở cuối giai đoạn tăng trưởng của vi khuẩn.

Ở các nghiên cứu tương đồng, yếu tố thời gian thường không được đưa vào sàng lọc Plackett-Burman (Sreekumar và Krishnan (2010); Posada-Urabe *et al.* (2015); Vũ Thanh Thảo *et al.* (2018)). Tuy nhiên kết quả cho thấy rằng thời gian nuôi cấy cũng có ảnh hưởng quan trọng đến mật số bào tử thu được. Minh *et al.* (2011) công bố kết quả về sự ảnh hưởng của việc thay đổi thành phần môi trường nuôi cấy, pH, nhiệt độ, tốc độ sục khí cũng ảnh hưởng đến thời gian hình thành bào tử ở *B. subtilis* ATCC31324. Thời gian tiêu chuẩn là 3 ngày, tương đương 72 giờ trong điều kiện 37°C, pH 8.0 và độ

hoạt động nước (water activity) cao trong môi trường Nutrient Broth tiêu chuẩn. Nhưng khi giảm tốc độ sục khí thì cần đến 8 ngày để bào tử phát triển hoàn toàn (mật số đạt tương đương với thí nghiệm tiêu chuẩn ở mức  $10^9$  bào tử/mL).

Yếu tố ảnh hưởng thứ ba theo thí nghiệm sàng lọc Plackett-Burman là  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  là một hợp chất vô cơ cấu thành từ hai gốc ion là  $\text{K}^+$  và  $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$  và cả hai gốc này đều đóng góp đến quá trình sinh trưởng cũng như tạo thành bào tử ở vi khuẩn *B. subtilis*. Nester *et al.* (1995) đề cập đến vai trò của phosphorus trong việc hình thành nucleic acid, phospholipid và nhân tố chính tổng hợp năng lượng ATP của tế bào và cả ATP dự trữ trong lõi bào tử thường được cung cấp ở dạng hợp chất muối như  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  hay  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . El-Bisi *et al.* (1955) thử nghiệm điều kiện bào tử hóa và tỉ lệ nhiệt độ gây chết của chủng vi khuẩn *Baillus coagulans* var. *thermoacidurans*, cho thấy sự ảnh hưởng tương tác giữa  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , thời gian nuôi cấy và pH ban đầu của môi trường nuôi cấy đến sự tỉ lệ sống của bào tử. Như là ở nồng độ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5%, pH 5,5 thì tỉ lệ bào tử thu được xấp xỉ 90%. Tuy nhiên khi tăng nồng độ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  lên 2%, trong môi trường pH 5,5 thì tỉ lệ giảm còn 10%, trong thời gian nuôi cấy là 3 ngày.

Trong các yếu tố chính khảo sát thì yeast extract có hệ số ảnh hưởng thấp nhất là 0,14. Cho thấy sự đóng góp của yeast extract vào việc kích thích khả năng tạo bào tử của *B. subtilis* ST-14 không nổi trội hơn ba yếu tố ảnh hưởng chính là glucose,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  và thời gian nuôi cấy. Điều này cũng phù hợp với công bố trước

đó của Posada-Urbe *et al.* (2015) về khả năng kích thích tế bào sinh dưỡng nhân mật số cao của yeast extract, nhưng không đóng góp cho quá trình tạo bào tử trên chủng *B. subtilis* EA-CB0575.

Kết quả cũng cho thấy thêm rằng ở mỗi chủng *B. subtilis* được phân lập ở những nơi khác nhau lại có hành vi khác nhau trong quá trình tạo bào tử, chi phối bởi sự đa dạng của hệ thống tín hiệu *rap-phr* trong bộ gene của các chủng *B. subtilis* khác nhau (Mutlu *et al.*, 2020). Theo Shi, F., & Zhu, Y. (2007) công bố rằng  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , tinh bột bắp (corn flour) và  $\text{MgSO}_4$  là ba yếu tố chính, ảnh hưởng nhất đến quá trình tạo bào tử của *B. subtilis* chủng QHD-1-1 (chủng được phân lập từ bề mặt của quả táo ở ngoại ô Qinhuangdao, Trung Quốc. Chủng này có khả năng kiểm soát nhiều bệnh trên cây trồng). Thí nghiệm của Shi, F., và Zhu, Y. (2007) cũng bố trí khảo sát với glucose,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Theo Vũ Thanh Thảo *et al.* (2018) với chủng *B. subtilis* KP3 được phân lập từ mẫu đất ở Krongpa, Gia Lai vì có các đặc điểm probiotic có lợi thì đáp ứng tốt với mật ri, ammonium citrate và  $\text{MnCl}_2$  trong quá trình hình thành bào tử.

### 3.2. Kết quả tối ưu hóa môi trường bằng phương pháp Bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology)

Trong thí nghiệm tối ưu hóa, mức trên và mức dưới của glucose và  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  đã được điều chỉnh so với thí nghiệm sàng lọc để phù hợp với thuật toán phần mềm và đảm bảo sự chính xác hơn, với glucose là từ 7 đến 14g/L và  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  là 3 đến 6g/L.

Kết quả tối ưu hóa đạt từ  $7,5 \times 10^4$  đến  $3,67 \times 10^6$  CFU/mL bào tử. Giá trị cao nhất ở nghiệm thức có giá trị glucose (g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (g/L) ở mức thấp lần lượt là 7g/L và 3g/L và thời gian nuôi cấy (giờ) ở mức cao là 72 giờ.

Sau khi tiến hành phân tích thực nghiệm RSM-CCD tìm ra được phương trình hồi quy tiên đoán, phương trình đa thức bậc hai được xác định như một mô hình để tiên đoán mật số bào tử vi khuẩn:

$$Y = -3113,1 - 110,9x_1 + 226,8x_2 + 132,8x_3 - 27,5x_2^2 - 0,6x_3^2 + 32,6x_1x_2 - 6,8x_2x_3$$

Với Y là mật số bào tử (CFU/mL),  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  lần lượt là glucose (g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (g/L) và thời gian nuôi cấy (giờ).

của mô hình thể hiện chỉ có 4,64% cơ hội để F-value của mô hình xảy ra do sự nhiễu. Độ chính xác thích hợp AP (Adequate precision) là 7,522 lớn hơn 4, điều đó chứng tỏ tín hiệu đã đủ để sử dụng cho điều hướng không gian thiết kế tối ưu hóa mật số bào tử vi khuẩn.

Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) được trình bày trong bảng 5, với F-value của mô hình là 3,10 cho thấy mô hình có ý nghĩa thống kê và p-value

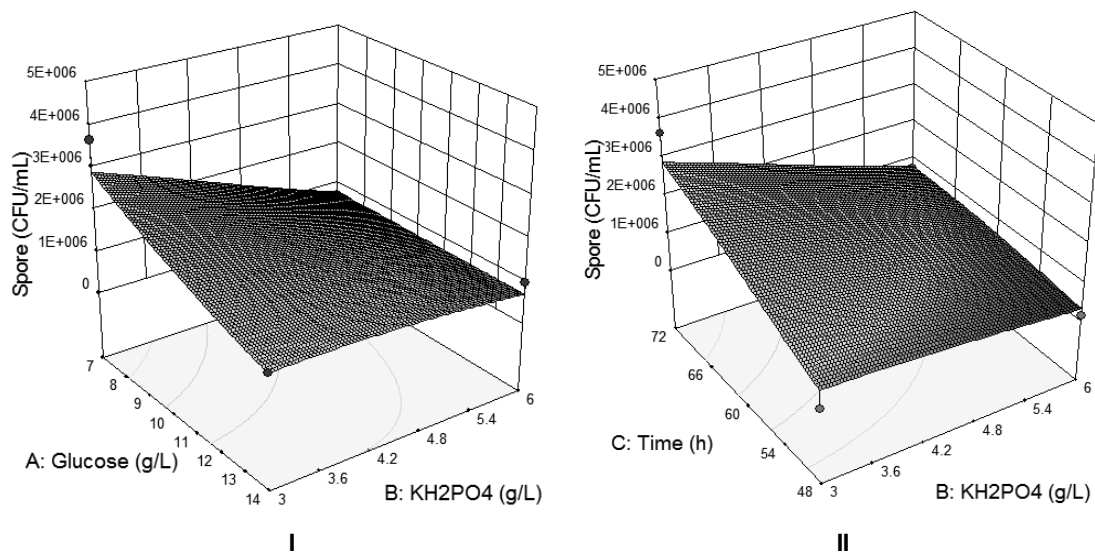
**Bảng 5. Phân tích phương sai ANOVA trong thí nghiệm tối ưu hóa theo phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) - Phương án cấu trúc có tâm (CCD)**

|                                  | Tổng bình phương   | df | Trung bình bình phương | F-value | P-value |
|----------------------------------|--------------------|----|------------------------|---------|---------|
| Mô hình                          | $1,75 \times 10^6$ | 9  | $1,94 \times 10^5$     | 3,10    | 0,0464* |
| $x_1$ - Glucose                  | $2,46 \times 10^5$ | 1  | $2,47 \times 10^5$     | 3,93    | 0,0754  |
| $x_2$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | $2,32 \times 10^5$ | 1  | $2,32 \times 10^5$     | 3,71    | 0,0829  |
| $x_3$ - Thời gian nuôi cấy       | $7,46 \times 10^5$ | 1  | $7,46 \times 10^5$     | 11,91   | 0,0062* |
| $x_1x_2$                         | $2,34 \times 10^5$ | 1  | $2,34 \times 10^5$     | 3,74    | 0,0820  |
| $x_2x_3$                         | $1,20 \times 10^5$ | 1  | $1,20 \times 10^5$     | 1,92    | 0,1964  |
| $x_2^2$                          | $5,52 \times 10^4$ | 1  | $5,53 \times 10^4$     | 0,88    | 0,3698  |
| $x_3^2$                          | $9,90 \times 10^4$ | 1  | $9,90 \times 10^4$     | 1,58    | 0,2373  |

Ghi chú: \* Có ý nghĩa ở độ tin cậy  $\alpha = 0,05$ .

Sự tương tác của 3 yếu tố với nhau và sự tương tác theo từng cặp được thể hiện trong biểu đồ bề mặt đáp ứng (hình 1). Mỗi mô hình không gian ba chiều thể hiện hai trong ba yếu tố khảo sát, yếu tố

còn lại được cố định. Glucose và  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  thể hiện sự ảnh hưởng ở mức thấp, lần lượt là 7g/L và 3g/L. Bên cạnh đó, thời gian nuôi cấy nằm ở mức giá trị cao là 72 giờ.



**Hình 1. Bề mặt đáp ứng mật số bào tử *B. subtilis* ST-14.**  
**Mô hình thể hiện sự tương tác của hai trong ba yếu tố đến mật số bào tử,**  
**trong khi giá trị của yếu tố thứ ba được giữ ở mức cố định**

I. Tương tác giữa nồng độ glucose (A) và nồng độ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (B) (với thời gian nuôi cấy cố định ở mức cao nhất là 72 giờ); II. Tương tác giữa nồng độ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (B) và thời gian nuôi cấy (C) (với nồng độ glucose cố định ở mức thấp nhất là 7 g/L)

### 3.3. Kết quả thí nghiệm kiểm định

Phần mềm Design-Expert 10.0.1® đề xuất mô dự đoán mật số bào tử vi khuẩn đạt mức cao nhất ( $2,9 \times 10^6$  CFU/mL) ở các giá trị các yếu tố lần lượt là glucose

7g/mL,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g/mL và thời gian nuôi cấy là 72 giờ. Kết quả mật số bào tử trung bình là  $3,02 \times 10^6$  CFU/mL (bảng 6), tương thích kết quả dự đoán từ đề xuất của phần mềm.

**Bảng 6. Kết quả kiểm định mô hình**

| Lần lặp lại            | 1                  | 2                  | 3                  | Trung bình                  |
|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|
| Mật số bào tử (CFU/mL) | $3,05 \times 10^6$ | $2,98 \times 10^6$ | $3,04 \times 10^6$ | $3,02 \pm 0,04 \times 10^6$ |

Một số yếu tố ảnh hưởng ngoài phạm vi nghiên cứu đến mật số bào tử được đề cập bởi Baweja *et al.* (2008), Mazas *et al.* (1997), Minh *et al.* (2008 và 2011) nhiệt độ ủ, độ hoạt động nước ảnh hưởng quan trọng đến quá trình sinh trưởng và tạo bào tử của *B. subtilis*. Kết quả từ El-Bisi *et al.* (1955) cho thấy rõ sự ảnh hưởng lớn của pH ban đầu

trong mối tương quan với thời gian nuôi cấy và nồng độ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  cần dùng. Sự sục khí (aeration) và quá trình lắc (agitation) kết hợp theo tỉ lệ có ảnh hưởng quan trọng đến quá trình tạo bào tử của *B. subtilis* (Posada-Urabe *et al.*, 2015). Những yếu tố khó kiểm soát trên quy mô bình tam giác, nên chỉ khảo sát trên quy mô bình lên men.

#### 4. KẾT LUẬN

Sử dụng Ma trận Plackett-Burman có thể sàng lọc được các yếu tố ảnh hưởng quan trọng nhưng giảm thiểu số lượng thí nghiệm. Kết hợp với phương pháp Bề mặt đáp ứng (RSM) có thể tối ưu hóa được một số yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành và quá trình nhân mật số vi khuẩn *B. subtilis*.

Đề tài sàng lọc được ba yếu tố ảnh hưởng đến quá trình hình thành bào tử của vi khuẩn *B. subtilis* ST-14 và mức độ tối ưu của glucose là 7g/mL, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> là 3g/mL và thời gian nuôi cấy là 72 giờ. Có thể sử dụng trong việc nuôi cấy kích thích tạo bào tử trong phòng thí nghiệm ở quy mô bình tam giác. Kết quả nghiên cứu là tiền đề để nghiên cứu các yếu tố tiếp theo như pH, độ sục khí và tốc độ lắc ở quy mô bình lên men, cũng như hiệu quả đối kháng và giảm bệnh của tế bào sinh dưỡng được sinh ra từ các bào tử vi khuẩn *B. subtilis* ST-14.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Baweja, R.B., Zaman, M.S., Mattoo, A.R., 2008. Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions. Arch Microbiol. 189: 71 - 79.
2. Chibazakura, T., Kawamura, F., Takahashi, H., 1991. Differential regulation of spo0A transcription in *Bacillus subtilis*: glucose represses promoter switching at the initiation of sporulation. Journal of Bacteriology. 173(8): 2625 - 2632.
3. Coleman, G., 1967. Studies on the regulation of extracellular enzyme formation by *Bacillus subtilis*. Microbiology. 49(3): 421 - 431.
4. El-Bisi, H.M., and Ordal, Z.J., 1955. The effect of certain sporulation conditions on the thermal death rate of *Bacillus coagulans* var. *thermoacidurans*. Journal of bacteriology. 71(1): 1.
5. Grimshaw, C.E., Huang, S., Hanstein, C.G., Strauch, M.A., Burbulys, D., Wang, L., and Whiteley, J.M., 1998. Synergistic kinetic interactions between components of the phosphorelay controlling sporulation in *Bacillus subtilis*. Biochemistry. 37(5): 1365 - 1375.
6. Jolliffe, L.K., Doyle, R.J. and Streips, U.N., 1981. The energized membrane and cellular autolysis in *Bacillus subtilis*. Cell. 25(3): 753 - 763.
7. Mazas, M., Lopez, M., Gonzalez, I., Bernardo, A., and Martin, R., 1997. Effects of sporulation pH on the heat resistance and the sporulation of *Bacillus cereus*. Letters in Applied Microbiology. 25(5): 331 - 334.
8. Minh, H.N.T., Durand, A., Loison, P., Perrier-Cornet, J.M. and Gervais, P., 2011. Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. Applied Microbiology and Biotechnology. 90(4): 1409 - 1417.
9. Monteiro, S.M.S., Clemente, J.J., Henriques, A.O., Gomes, R.J., Carrondo, M.J.T. and Cunha, A.E., 2005. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. Biotechnol Prog. 21(4): 1026 - 31.
10. Monteiro, S.M.S., Clemente, J.J., Carrondo, M.J.T., and Cunha, A.E., 2014. Enhanced spore production of *Bacillus subtilis* grown in a chemically defined medium. Advances in Microbiology. 4(08): 444.
11. Mutlu, A., Kaspar, C., Becker, N., and Bischofs, I.B., 2020. A spore quality-quantity tradeoff favors diverse sporulation strategies in *Bacillus subtilis*. The ISME journal. 14(11): 2703 - 2714.
12. Nester, E.W., Roberts, C.E., Nester, M.T., and O'Dell, W.D., 1995. Microbiology: A human perspective. WCB. 864 pages.
13. Nguyễn Huỳnh Nhã Uyên, Nguyễn Thị Cẩm Vân và Nguyễn Đắc Khoa, 2018. So sánh hiệu quả giảm bệnh của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. và *Serratia nematodiphila* đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh cháy bìa lá lúa. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(9B): 59 - 66.

14. Minh, H.N.T., Perrier-Cornet, J.M. and Gervais, P., 2008. Effect of the osmotic conditions during sporulation on the subsequent resistance of bacterial spores. *Appl Microbiol Biotechnol.* 80:107 - 14.
15. Pereira, J.F., Gudiña, E.J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J.A., Coutinho, J.A., and Rodrigues, L.R., 2013. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel.* 111: 259 - 268.
16. Plackett, R.L. and Burman, J.P., 1946. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika.* 33(4):305 - 325
17. Posada-Urbe, L.F., Romero-Tabarez, M., and Villegas-Escobar, V., 2015. Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess and Biosystems Engineerin.* 38(10): 1879 - 1888.
18. Shi, F. and Zhu, Y., 2007. Application of statistically-based experimental designs in medium optimization for spore production of *Bacillus subtilis* from distillery effluent. *BioControl.* 52(6): 845 - 853.
19. Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G.S.N., Dutt, C.B.S., Wainwright, M., and Bhargava, P.M., 2006. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 56(7): 1465 - 1473.
20. Sreekumar, G. and Krishnan, S., 2010. Enhanced biomass production study on probiotic *Bacillus subtilis* SK09 by medium optimization using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology.* 9(47): 8078 - 8084.
21. 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.
22. Vũ Thanh Thảo, Phan Cảnh Trình, Nguyễn Thị Linh Giang, Lê Văn Thanh và Trần Cát Đông, 2018. Nghiên cứu điều kiện nuôi cấy thu nhận bào tử *Bacillus subtilis* Kp3. *Y Học TP. Hồ Chí Minh.* 22(1): 453 - 459.
23. Yamashita, S., Kawamura, F., Yoshikawa, H., Takahashi, H., Kobayashi, Y. and Saito, H., 1989. Dissection of the expression signals of the spo0A gene of *Bacillus subtilis*: glucose represses sporulation-specific expression. *Microbiology.* 135(5): 1335 - 1345.

## ABSTRACT

### **Optimization of culture conditions to stimulate sporulation of the antagonistic *Bacillus subtilis* ST-14 against rice bacterial leaf blight**

*The antagonistic Bacillus subtilis ST-14 isolated from a rice field in Sóc Trăng Province of Vietnam could reduce rice bacterial leaf blight. Using the Plackett-Burman matrix, glucose, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and culture duration were found to be the major factors having impacts on the sporulation of ST-14. The values of these three factors were optimized using the Response Surface Methodology (RSM) combined with the Central Composite Designs (CCD). Optimal values of glucose, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and culture duration were 7 g/L, 3 g/L and 72 h, respectively. Spore density was 3.02 × 10<sup>6</sup> CFU/mL using these values.*

**Keywords:** *Bacillus subtilis, bacterial leaf blight, Central Composite Designs, Plackett-Burman matrix, Response Surface Methodology, rice, sporulation.*

# HIỆU QUẢ GIẢM BỆNH BẠC LÁ LÚA CỦA HỖN HỢP HAI CHỦNG VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG *Bacillus pumilus* TG-71 VÀ *Bacillus aerophilus* HG-33 TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI

Huỳnh Yến Nhi<sup>1</sup>, Nguyễn Quang Tiến<sup>1</sup>, Nguyễn Đắc Khoa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học,  
Trường Đại học Cần Thơ

\* Tác giả liên hệ: ndkhoa@ctu.edu.vn

## TÓM TẮT

Vi khuẩn đối kháng *Bacillus pumilus* TG-71 và *Bacillus aerophilus* HG-33 có khả năng giúp giảm bệnh bạc lá lúa (cháy bìa lá) do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây ra. Hai chủng vi khuẩn này không đối kháng lẫn nhau khi thực hiện phương pháp đồng nuôi cấy trên cùng đĩa thạch. Kết quả khảo sát khả năng giúp giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới của hỗn hợp huyền phù hai chủng vi khuẩn TG-71 và HG-33 ở các tỷ lệ 1:1, 1:2 và 2:1 cho thấy cả ba tỷ lệ phối trộn đều có hiệu quả tương đương với đối chứng dương sử dụng thuốc hóa học nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với biện pháp sử dụng từng chủng vi khuẩn riêng lẻ. Tỷ lệ phối trộn hai chủng vi khuẩn này cần được nghiên cứu thêm để đạt được hiệu quả cao hơn.

**Từ khóa:** Bạc lá, *Bacillus pumilus*, *Bacillus aerophilus*, lúa, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa là một trong những cây lương thực chính của hơn 65% dân số trên thế giới, sản lượng và diện tích đất trồng lúa tập trung phần lớn ở các quốc gia châu Á. Việt Nam là một trong những quốc gia có sản lượng và giá trị xuất khẩu gạo đứng thứ hai trên thế giới (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2020). Bệnh bạc lá lúa (cháy bìa lá) do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây ra là một trong những bệnh hại lúa

ng nghiêm trọng nhất, làm giảm khả năng quang hợp, hạt bị lem lép, giảm năng suất và chất lượng hạt lúa đến 50% (Khush *et al.*, 1989). Theo Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, tính đến tháng 3/2017, diện tích đất trồng lúa bị nhiễm bệnh bạc lá là 7.125ha, tập trung tại các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Việc nghiên cứu các vi sinh vật đối kháng để phòng trừ bệnh hại cây trồng đã và đang là hướng nghiên cứu được quan tâm, nhằm hạn chế các biện pháp phòng trừ bệnh hại cây trồng bằng thuốc hóa học hay giống kháng.

Người phân biện: TS. Trần Thị Giang

Hai chủng vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71 và *Bacillus aerophilus* HG-33 được phân lập lần lượt ở Tiền Giang, Hậu Giang và khảo sát khả năng đối kháng với vi khuẩn *Xoo*. Cụ thể, chủng vi khuẩn TG-71 có khả năng đối kháng mạnh với vi khuẩn *Xoo* trên đĩa thạch với bán kính vòng vô khuẩn là 13,6mm (Trần Kim Thoa, 2015); tương tự chủng vi khuẩn HG-33 cũng cho bán kính vòng vô khuẩn đạt 15,3 mm (Nguyễn Đặng Ngọc Giàu, 2014). Bên cạnh đó, hai chủng vi khuẩn TG-71 và HG-33 đều duy trì hiệu quả giảm bệnh cao ở mật số  $10^8$  CFU/mL đến thời điểm 15 ngày sau chủng bệnh (NSCB). Các nghiên cứu trong và ngoài nước đã chỉ ra rằng vi khuẩn nội sinh trong cây lúa rất phong phú với nhiều hoạt tính tốt như tổng hợp các chất kích thích sinh trưởng hoặc tiết ra chất kháng sinh để đối kháng và ngăn chặn tác nhân gây bệnh. Tuy nhiên, các nghiên cứu trên chỉ được tiến hành với từng chủng vi khuẩn đối kháng riêng lẻ. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện dựa trên hỗn hợp huyền phù hai chủng vi khuẩn đối kháng TG-71 và HG-33 nhằm khai thác tối đa hiệu quả đối kháng với mầm bệnh; đồng thời đánh giá được hiệu quả giảm bệnh trong sản xuất lúa bền vững (Mohamed and Gomaa, 2012; Jha and Subramanian, 2013; Zhou *et al.*, 2014).

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu

Vi khuẩn *Xoo* và hai chủng vi khuẩn đối kháng *B. pumilus* TG-71 và *B. aerophilus* HG-33 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.

### 2.2. Khảo sát khả năng tương thích của hai chủng vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71 và *Bacillus aerophilus* HG-33 nuôi cấy trên đĩa thạch

Khả năng tương thích của hai chủng vi khuẩn *B. pumilus* TG-71 và *B. aerophilus* HG-33 được xác định bằng phương pháp đồng nuôi cấy trên đĩa thạch. Huyền phù vi khuẩn đối kháng được chuẩn bị bằng cách lấy 1 loop từng chủng vi khuẩn lần lượt cho vào hai ống nghiệm chứa 10mL môi trường NB, đồng nhất bằng máy vortex, sau đó lắc ủ với tốc độ 150 vòng/phút ở  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  trong 48 giờ. Tiếp theo, hút 50 $\mu\text{L}$  huyền phù của từng chủng vi khuẩn đối kháng được cấy trải trên môi trường NA; đồng thời trên cùng đĩa đó một khuẩn lạc của chủng vi khuẩn còn lại được chấm lên bề mặt của môi trường, tất cả các đĩa được ủ ở  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  trong 48 giờ.

### 2.3. Khảo sát khả năng đối kháng của hai chủng vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71 và *Bacillus aerophilus* HG-33 với vi khuẩn *Xoo* trên đĩa thạch

*Khảo sát khả năng đối kháng với vi khuẩn Xoo trên đĩa thạch bằng khuẩn lạc vi khuẩn đối kháng:* 50 $\mu\text{L}$  huyền phù vi khuẩn *Xoo* với mật số  $10^9$  CFU/mL được trải đều trên đĩa chứa môi trường Wakimoto cải tiến bằng tấm bông vô trùng. Sau đó, khuẩn lạc vi khuẩn TG-71 và HG-33 lần lượt được cấy vào 2 điểm trên đĩa petri, tất cả các đĩa được ủ ở  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  trong 48 giờ.

**Khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn *Xoo* trên đĩa thạch bằng dịch nuôi cấy vi khuẩn đối kháng:** 50 $\mu$ L huyền phù vi khuẩn *Xoo* với mật số  $10^9$  CFU/mL được trải đều trên đĩa chứa môi trường Wakimoto cải tiến bằng tằm bông vô trùng. Các giếng được tạo bằng phương pháp đục lỗ, với đường kính mỗi giếng là 6 mm. Sau đó, 20 $\mu$ L dịch nuôi cấy của hai chủng vi khuẩn đối kháng, nước cất và môi trường NB được bơm lần lượt vào các giếng.

#### 2.4. Khảo sát hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm gồm 7 nghiệm thức, trong đó ba nghiệm thức chính được xử lý với hỗn hợp huyền phù hai chủng vi khuẩn đối kháng ở mật số  $10^8$  CFU/mL với tỷ lệ 1:1, 1:2 và 2:1; hai nghiệm thức xử lý với từng vi khuẩn riêng lẻ và hai nghiệm thức đối chứng âm và đối chứng dương được xử lý lần lượt với nước cất và thuốc hóa học Starner 20 WP.

**Xử lý đất:** Đất được thu tại phường Long Xuyên, quận Bình Thủy, thành phố Cần Thơ, băm nhỏ, phơi khô và trộn với vôi bột. Đất sau khi xử lý được cho vào chậu (7 kg đất cho vào chậu khoảng  $\frac{3}{4}$  chiều cao chậu - chậu có bán kính 17,5cm). Sau đó ngâm nước trong 3 - 4 ngày, làm nhuyễn và phơi ráo mặt trước khi gieo hạt.

**Xử lý hạt giống:** Hạt giống lúa Jasmine 85 An Giang (từ Tập đoàn Lộc Trời) được ngâm với nước theo tỷ lệ 3 sôi 2 lạnh (khoảng 50 - 55°C) trong 20 -

30 phút để loại bỏ các hạt lép và hạn chế mầm bệnh. Sau đó, ngâm hạt 1 ngày với nước (đã khử trùng) và ủ 48 giờ trước khi gieo.

**Chăm sóc lúa:** Tưới nước hàng ngày và bón phân theo công thức N - P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> - K<sub>2</sub>O (100 - 40 - 30kg/ha). Phân bón được chia thành 4 đợt bón:

- Đợt 1 (trước khi gieo): 100% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (2,4g/chậu).

- Đợt 2 (10 ngày sau khi gieo): 1/5 N (0,5g/chậu) + 1/4 K<sub>2</sub>O (0,12g/chậu).

- Đợt 3 (18 ngày sau khi gieo): 2/5 N (1g/chậu) + 1/4 K<sub>2</sub>O (0,12g/chậu).

- Đợt 4 (40 ngày sau khi gieo): 1/5 N (0,5g/chậu) + 1/4 K<sub>2</sub>O (0,12g/chậu).

**Phương pháp xử lý với vi khuẩn đối kháng:** Vi khuẩn đối kháng được nuôi trong bình tam giác chứa môi trường NB, ủ ở  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  trong 48 giờ. Huyền phù vi khuẩn gốc được xác định mật số bằng phương pháp trải đếm khuẩn lạc. Sau đó, điều chỉnh mật số vi khuẩn về  $10^8$  CFU/mL. Sau đó, mỗi chậu được chủng 40mL huyền phù vi khuẩn đối kháng theo các tỷ lệ phối trộn ở phần bố trí thí nghiệm trước khi gieo hạt 24 giờ.

**Phương pháp chủng bệnh:** Một loop đầy vi khuẩn *Xoo* đã được nuôi ở 48 - 72 giờ cho vào 10mL nước cất vô trùng, đồng nhất hỗn hợp bằng máy vortex. Mật số tế bào vi khuẩn được chuẩn bị theo cách này là khoảng  $10^9$  CFU/mL (Nguyễn Đắc Khoa, 2005). Chủng bệnh bằng phương pháp cắt chóp lá theo Kauffman *et al.* (1973). Nhúng kéo vô trùng vào

huyền phù vi khuẩn *Xoo* để tiến hành cắt chóp lá lúa trưởng thành của từng cây lúa ở giai đoạn đẻ nhánh (40 - 45 ngày sau khi gieo).

## 2.5. Xử lý số liệu

Số liệu khảo sát khả năng đối kháng được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016. Tiêu chuẩn đánh giá vi khuẩn đối kháng mạnh hoặc yếu dựa vào bán kính vòng vô khuẩn. Theo Ahmed và Zahran (2006) vi khuẩn có mức độ đối kháng yếu có bán kính từ 1 - 4mm, vi khuẩn đối kháng trung bình có bán kính từ 5 - 8mm, vi khuẩn đối kháng mạnh có bán kính từ 9 - 12mm và vi khuẩn đối kháng rất mạnh có bán kính từ 9 - 12mm.

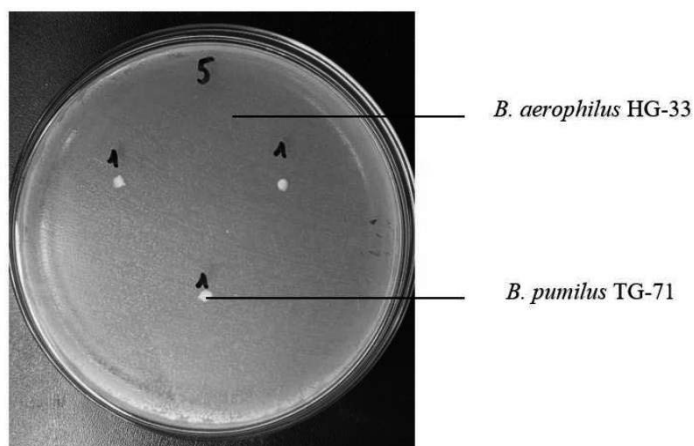
Số liệu khả năng làm giảm chiều dài vết bệnh ở hai chủng vi khuẩn đối kháng TG-71 và HG-33 trong điều kiện nhà lưới được so sánh trung bình bằng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) với mức ý nghĩa 5%. Sau đó, các số liệu này được phân tích bằng phần mềm R 4.1.0 bằng kiểm định Tukey.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả khảo sát khả năng tương thích của hai chủng vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71 và *Bacillus aerophilus* HG-33 nuôi cấy trên đĩa thạch

Kết quả cho thấy không xuất hiện vòng vô khuẩn giữa hai chủng vi khuẩn TG-71 và HG-33. Điều này đã chứng minh hai chủng vi khuẩn này không ức chế sự phát triển của nhau khi nuôi cấy trên cùng môi trường. Do đó, có thể phối trộn hai chủng vi khuẩn TG-71 và HG-33 với nhau để làm cơ sở cho quá trình đối kháng giữa hỗn hợp huyền phù vi khuẩn đối kháng và vi khuẩn *Xoo* trong điều kiện nhà lưới.

Hai chủng vi khuẩn này có thể không tiết ra các chất ức chế sự phát triển cũng như tiêu diệt lẫn nhau. Mặt khác, cũng không thể loại trừ trường hợp một trong hai chủng vi khuẩn có thể tiết ra độc tố nhưng chủng vi khuẩn còn lại có khả năng tiết ra enzyme để phân giải độc tố đó. Do đó, hai chủng vi khuẩn đối kháng này có thể sinh trưởng và phát triển cùng nhau trên cùng môi trường.

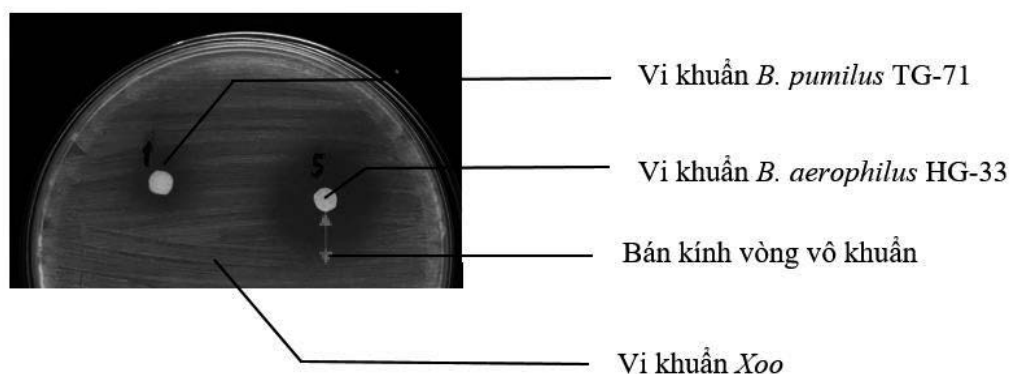


Hình 1. Đồng nuôi cấy hai chủng vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71 và *Bacillus aerophilus* HG-33 trên môi trường NA sau 48 giờ

### 3.2. Kết quả khảo sát khả năng đối kháng của hai chủng vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71 và *Bacillus aerophilus* HG-33 với vi khuẩn *Xoo* trên đĩa thạch

*Kết quả khảo sát khả năng đối kháng với vi khuẩn Xoo trên đĩa thạch bằng khuẩn lạc vi khuẩn đối kháng:* Sau 48 giờ, cả hai

chủng vi khuẩn TG-71 và HG-33 đều tạo vòng vô khuẩn với bán kính trung bình lần lượt là  $2,76 \pm 0,6$ mm và  $7,67 \pm 0,6$ mm. Từ kết quả này, có thể nhận định khả năng đối kháng với *Xoo* của hai chủng vi khuẩn này vẫn được duy trì sau nhiều năm lưu trữ nhưng chỉ còn đối kháng ở mức trung bình (bảng 1).



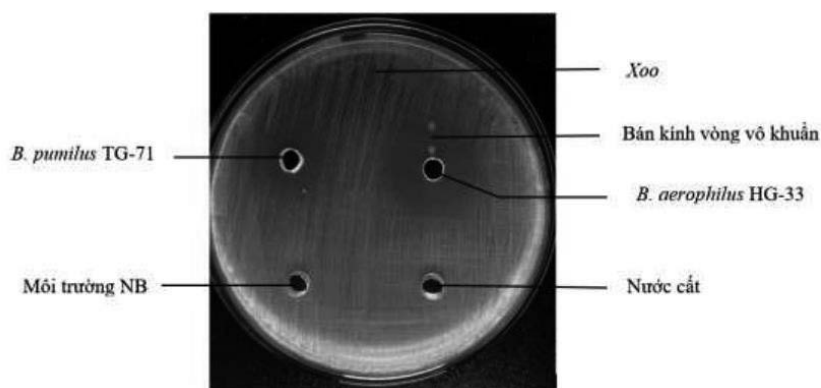
Hình 2. Vòng vô khuẩn được tạo ra bởi hai chủng vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71 và *Bacillus aerophilus* HG-33 sau 48 giờ

Bảng 1. So sánh hiệu quả đối kháng giữa vi khuẩn *Xoo* và khuẩn lạc hai chủng vi khuẩn đối kháng *Bacillus pumilus* TG-71 và *Bacillus aerophilus* HG-33 sau 48 giờ

| Tên vi khuẩn đối kháng           | Bán kính vòng vô khuẩn (mm) |   |
|----------------------------------|-----------------------------|---|
|                                  | Nghiên cứu này              | Nghiên cứu trước                                |
| <i>Bacillus pumilus</i> TG-71    | $2,76 \pm 0,6$              | $13,6 \pm 0,5$<br>(Trần Kim Thoa, 2015)         |
| <i>Bacillus aerophilus</i> HG-33 | $7,76 \pm 0,6$              | $15,3 \pm 0,5$<br>(Nguyễn Đặng Ngọc Giàu, 2014) |

*Kết quả khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn Xoo trên đĩa thạch bằng dịch nuôi cấy vi khuẩn đối kháng:* Dịch nuôi cấy của hai chủng vi khuẩn *B. pumilus* TG-71 và *B. aerophilus* HG-33 được thu sau 7 ngày nuôi lỏng trong môi trường NB. Bán kính vòng vô khuẩn do hai chủng vi khuẩn

TG-71 và HG-33 tạo ra lần lượt là  $5,33 \pm 0,6$ mm và  $10,67 \pm 0,6$ mm sau 48 giờ. Kết quả cho thấy khả năng ức chế của hai chủng vi khuẩn này đạt mức cao, chứng tỏ vi khuẩn đối kháng vẫn còn khả năng tổng hợp và tiết ra các hợp chất có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Xoo* (bảng 2).



Hình 3. Vòng vô khuẩn được tạo ra bởi dịch nuôi của hai chủng vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71 và *Bacillus aerophilus* HG-33 sau 48 giờ

**Bảng 2. So sánh hiệu quả đối kháng giữa vi khuẩn *Xoo* và dịch nuôi cấy hai chủng vi khuẩn đối kháng *Bacillus pumilus* TG-71 và *Bacillus aerophilus* HG-33 sau 48 giờ**

| Tên vi khuẩn đối kháng           | Bán kính vòng vô khuẩn (mm) |   |
|----------------------------------|-----------------------------|---|
|                                  | Nghiên cứu này              | Nghiên cứu trước                            |
| <i>Bacillus pumilus</i> TG-71    | 5,33 ± 0,6                  | 12,5 ± 0,5<br>(Trần Kim Thoa, 2015)         |
| <i>Bacillus aerophilus</i> HG-33 | 10,67 ± 0,6                 | 12,7 ± 0,5<br>(Nguyễn Đặng Ngọc Giàu, 2014) |

Các chủng vi khuẩn đối kháng có khả năng tiết ra các chất biến dưỡng khác nhau nhằm mục đích ức chế sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *Xoo*. Tùy vào hoạt tính đối kháng mạnh hay yếu với vi khuẩn *Xoo* mà vòng vô khuẩn có bán kính lớn hoặc nhỏ (Simonen and Palva, 1993).

Môi trường Wakimoto cải tiến không phải là môi trường thích hợp và tối ưu để vi khuẩn *Bacillus* spp. có thể sống và phát triển một cách tốt nhất. Việc cấy khuẩn lạc lên môi trường Wakimoto cải tiến sẽ phần nào hạn chế sự sinh trưởng, khả năng tổng hợp ra các hợp chất cũng như sự khuếch tán các hợp chất đó trên môi trường nhằm ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Xoo*. Ngoài ra, môi trường NB là

môi trường thích hợp để nuôi tăng sinh các dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. nhằm nâng cao khả năng sản sinh các enzyme và kháng sinh để đối kháng với vi khuẩn gây bệnh. Do đó, bán kính vòng kháng khuẩn được tạo ra từ khuẩn lạc vi khuẩn sẽ thấp hơn bán kính vòng vô khuẩn được tạo ra từ dịch nuôi cấy vi khuẩn.

### 3.3. Kết quả khảo sát hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa trong điều kiện nhà lưới

Nhìn chung, các nghiệm thức được xử lý với huyền phù vi khuẩn đối kháng đều cho hiệu quả giảm bệnh tương đương với nghiệm thức xử lý thuốc hóa học và cao hơn nghiệm thức xử lý với nước cất ở cả ba thời điểm khảo sát là 10, 15 và 20 NSCB.

**Bảng 3. Chiều dài vết bệnh (mm) trên lá lúa Jasmine 85 khi xử lý với vi khuẩn đối kháng ở mật số  $10^8$  CFU/mL**

| Nhóm nghiệm thức   | Nghiệm thức                     | Chiều dài vết bệnh (mm) |                    |                    | Hiệu quả giảm bệnh sau 20 NSCB (%) |
|--|---------------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|------------------------------------|
|  |                                 | 10 NSCB                 | 15 NSCB            | 20 NSCB            |                                    |
| Vi khuẩn đơn lẻ  | NT1: <i>B. pumilus</i> TG-71    | 23,56 <sup>b</sup>      | 33,78 <sup>b</sup> | 51,89 <sup>b</sup> | 41,18 <sup>b</sup>                 |
|  | NT2: <i>B. aerophilus</i> HG-33 | 18,56 <sup>b</sup>      | 32,33 <sup>b</sup> | 52,11 <sup>b</sup> | 40,93 <sup>b</sup>                 |
| Phối trộn vi khuẩn <i>B. pumilus</i> TG-71 và <i>B. aerophilus</i> HG-33 | NT3: Tỷ lệ 1:1                  | 19,56 <sup>b</sup>      | 38,11 <sup>b</sup> | 52,11 <sup>b</sup> | 40,93 <sup>b</sup>                 |
|  | NT4: Tỷ lệ 1:2                  | 21,22 <sup>b</sup>      | 34,22 <sup>b</sup> | 54,78 <sup>b</sup> | 37,91 <sup>b</sup>                 |
|  | NT5: Tỷ lệ 2:1                  | 18,56 <sup>b</sup>      | 26,56 <sup>b</sup> | 42,33 <sup>b</sup> | 52,02 <sup>b</sup>                 |
| Đối chứng  | NT6: Stamer 20 WP               | 20,78 <sup>b</sup>      | 32,11 <sup>b</sup> | 55,00 <sup>b</sup> | 37,67 <sup>b</sup>                 |
|  | NT7: Nước cất                   | 36,89 <sup>a</sup>      | 62,33 <sup>a</sup> | 88,22 <sup>a</sup> | -                                  |
|  | <i>p</i> -value                 | < 0,001                 | < 0,001            | < 0,001            |                                    |
|  | CV (%)                          | 28,52                   | 31,57              | 25,71              |                                    |

*Ghi chú:* Các số trung bình trong cùng thời điểm theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% bằng kiểm định Tukey.

Nhóm nghiệm thức phối trộn huyền phù vi khuẩn đối kháng và nhóm nghiệm thức huyền phù từng chủng vi khuẩn đối kháng riêng lẻ cho chiều dài vết bệnh khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê. Nguyên nhân dẫn đến kết quả này do trong lúc phối trộn huyền phù hai chủng vi khuẩn đối kháng thì mật số vi khuẩn không đảm bảo duy trì ở mức  $10^8$  CFU/mL. Tuy nhiên, nghiệm thức xử lý với hỗn hợp huyền phù vi khuẩn TG-71 và HG-33 theo tỷ lệ 2:1 luôn có chiều dài vết bệnh ngắn nhất nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức xử lý từng chủng vi khuẩn riêng lẻ. Vì vậy, có thể nhận định sơ bộ rằng ở nghiệm thức phối trộn huyền phù vi khuẩn theo tỷ lệ 2:1 cho kết quả tích cực hơn các nghiệm thức phối trộn còn lại.

Vì mục đích của việc sử dụng vi sinh vật trong kiểm soát bệnh cây trồng là do tính duy trì hiệu quả giảm bệnh lâu dài. Nên trong nghiên cứu này, khả năng đối kháng với mầm bệnh ở nghiệm thức phối trộn được duy trì theo thời gian dài là một kết quả tích cực vì môi trường nhà lưới và ngoài đồng luôn luôn phải đối mặt với mầm bệnh tấn công. Bên cạnh đó, việc phối trộn các chủng vi khuẩn còn mang

lại hiệu quả tăng năng suất cây trồng nhờ cơ chế hỗ trợ kích thích tăng trưởng thực vật bởi các dòng *Bacillus* spp. Đặc biệt, *B. pumilus* TG-71 được chứng minh có khả năng sản sinh siderophore giúp hoạt hóa các enzyme trong quá trình quang hợp và hô hấp của cây (Heidarzadeh and Baghaee-Ravari, 2015). Theo nghiên cứu của Cao Ngọc Điệp *et al.* (2016) cho thấy các chủng vi khuẩn có khả năng tiết siderophore đều có hiệu quả cao trong việc gia tăng chiều cao, khối lượng thân lá và rễ tươi của cây bắp so với đối chứng âm.

#### 4. KẾT LUẬN

Đề tài đã đánh giá được hiệu quả phòng trị bệnh bạc lá lúa của hỗn hợp hai chủng vi khuẩn *B. pumilus* TG-71 và *B. aerophilus* HG-33 trong điều kiện nhà lưới. Hai chủng vi khuẩn TG-71 và HG-33 không đối kháng lẫn nhau khi nuôi cấy trên cùng môi trường. Các nghiệm thức phối trộn huyền phù vi khuẩn đối kháng TG-71 và HG-33 cho hiệu quả giảm bệnh trung bình là 43,62% tương đương đối chứng dương nhưng hiệu quả khác biệt không có ý nghĩa so với các nghiệm thức được xử lý với từng chủng vi khuẩn riêng lẻ.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmed, N.A. and Zahran, E.B., 2006. Inhibition of soil borne *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* in cotton by *Bacillus* spp. In: W. Zeller and C. Ullrich (Editors). Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. ISBN 978 - 3 - 930037 - 29 - 2. Darmstadt, Germany.
- Đặng Thị Ngọc Thanh và Cao Ngọc Diệp, 2016. Sự sản xuất IAA và siderophore của các dòng vi khuẩn liên hiệp thực vật và ảnh hưởng lên sự tăng trưởng của cây bắp (*Zea Mays* L.) trồng trong chậu. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số 47. 59 - 67.
- Jha, Y. and Subramanian, R.B., 2013. Paddy plants inoculated with PGPR show better growth physiology and nutrient content under saline conditions. Chilean Journal of Agricultural Research. 73(3): 213 - 219.
- Kauffman, H.E., Reddy, A.P.K., Hsieh S.P.Y. and Nera, S.D., 1973. An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Plant disease reporter. 57: 537 - 543.
- Khoa, N.D., 2005. Effect of single resistance genes and their pyramid on the diversity *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* population under field conditions as revealed by insertion sequecepolymerase chain reaction (IS-PCR). Master thesis. College of Arts and Sciences, University of Philippines, Los Baños, Philippines.
- Khush, G.S and Ogawa, T., 1989. Major gen for restance to bacterial blight in rice. 177 - 192.
- Heidarzadeh, N., and Baghaee-Ravari, S., 2015. Application of *Bacillus pumilus* as a potential biocontrol agent of *Fusarium* wilt of tomato. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 48(13 - 16), 841 - 849.
- Nguyễn Đăng 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 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.
- Simonen, M. and Palva, I., 1993. Protein secretion in *Bacillus* species. Microbiol Rev. 57(1): 109 - 137.
- 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.
- Zhou, D.M., Wang, K.P., Liu, H.X., Gu, C., and Guo, J.H., 2014. Field evaluation of different application methods of the mixture of *Bacillus cereus* strain AR156 and *Bacillus subtilis* strain SM21 on pepper growth and disease resistance. Biocontrol Science and Technology. 24(12): 1451 - 1468.

## ABSTRACT

**Disease-reducing effects of mixtures of the antagonistic *Bacillus pumilus* TG-71 and *Bacillus aerophilus* HG-33 against rice bacterial leaf blight under greenhouse conditions**

*The antagonistic Bacillus pumilus TG-71 and Bacillus aerophilus HG-33 could reduce rice bacterial leaf blight caused by Xanthomonas oryzae pv. oryzae under field conditions. These bacterial strains did not show any antagonistic effects against each other in their dual culture test. Disease-reducing effects of their combinations using three different mixing ratios, i.e., 1:1, 1:2 and 2:1, were tested under greenhouse conditions. Results showed that the effects of all mixing ratios were similar to that of the chemical control while they were not significantly different from the effects of each bacterial strain. Further studies on mixing ratios of these strains should be done to improve the effects.*

**Keywords:** Bacterial leaf blight, *Bacillus pumilus*, *Bacillus aerophilus*, rice, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

# MỘT SỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TỒN TRỮ, PHỐI TRỘN VÀ TẠO BÀO TỬ CÁC VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG VỚI VI KHUẨN *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* GÂY BỆNH BẠC LÁ LÚA

Nguyễn Đắc Khoa<sup>1\*</sup> và Nguyễn Thị Phi Oanh<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử,  
Viện NC&PT Công nghệ Sinh học

<sup>2</sup> Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên,  
Trường Đại học Cần Thơ

\* Tác giả liên hệ: ndkhoa@ctu.edu.vn

## TÓM TẮT

Bệnh bạc lá (cháy bìa lá) lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây ra là một trong những bệnh phổ biến và quan trọng trên ruộng lúa. Sáu chủng vi khuẩn đối kháng được phân lập tại các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long có khả năng giúp giảm bệnh đã được định danh lần lượt là *Serratia nematodiphila* CT-78, *Bacillus safensis* AG-131, *B. stratosphericus* AG-62, *B. aerophilus* HG-33, *B. pumilus* TG-71 và *B. subtilis* ST-14. Bài viết này tổng hợp một số kết quả nghiên cứu trong năm 2022 của Nhóm nghiên cứu Bệnh cây tại Viện NC&PT Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ về: (i) hiệu quả sau 24 tháng tồn trữ vi khuẩn CT-78, (ii) hiệu quả khi phối trộn các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. và (iii) các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo bào tử của các chủng vi khuẩn này. Vi khuẩn CT-78 vẫn duy trì được mật số và hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa trong điều kiện nhà lưới sau 24 tháng tồn trữ trong chất mang trấu và bột talc. Tuy huyền phù chứa hỗn hợp hai chủng vi khuẩn TG-71 và HG-33 (tỷ lệ 2:1) và hỗn hợp hai chủng AG-131 và AG-26 (tỷ lệ 1:2) vẫn có hiệu quả giúp giảm bệnh bạc lá lúa trong điều kiện nhà lưới, tỷ lệ phối trộn các chủng vi khuẩn này cần được tiếp tục nghiên cứu để đạt được hiệu quả cao hơn. Ngoài thời gian nuôi cấy, quá trình tạo bào tử của mỗi chủng vi khuẩn còn chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố khác, bao gồm glucose và  $FeSO_4$  đối với chủng AG-62, peptone,  $(NH_4)_2SO_4$  và  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  đối với hai chủng HG-33 và TG-71 và glucose và  $KH_2PO_4$  đối với chủng ST-14.

**Từ khóa:** *Bacillus* sp., bạc lá, bào tử, lúa, *Serratia nematodiphila*, tồn trữ, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

---

Người phân biên: TS. Nguyễn Đức Độ

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bạc lá (cháy bìa lá) lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) gây ra là một trong những bệnh phổ biến và quan trọng trên ruộng lúa, đặc biệt vào mùa mưa. Giống kháng thường không bền do mầm bệnh có khả năng tiến hóa nhanh để tạo nòi mới (Nguyễn Đắc Khoa, 2018). Độc tính của mầm bệnh có sự tương quan với nhiệt độ môi trường (Webb *et al.*, 2010) nên khả năng gây hại ngày càng nghiêm trọng trong điều kiện biến đổi khí hậu. 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 có khả năng giúp giảm bệnh trong điều kiện ngoài đồng đã được định danh lần lượt là *Serratia nematodiphila* CT-78, *Bacillus safensis* AG-131, *B. stratosphericus* AG-62, *B. aerophilus* HG-33, *B. pumilus* TG-71 và *B. subtilis* ST-14 (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). Bài viết này trình bày các kết quả nghiên cứu tiếp theo trong năm 2022 của Nhóm nghiên cứu Bệnh cây tại Viện NC&PT Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ về biện pháp tồn trữ vi khuẩn CT-78, phối trộn các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. và xác định các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo bào tử của

các chủng vi khuẩn này, làm tiền đề sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng phòng trừ bệnh bạc lá trên ruộng lúa, bảo vệ môi trường và sức khỏe cộng đồng.

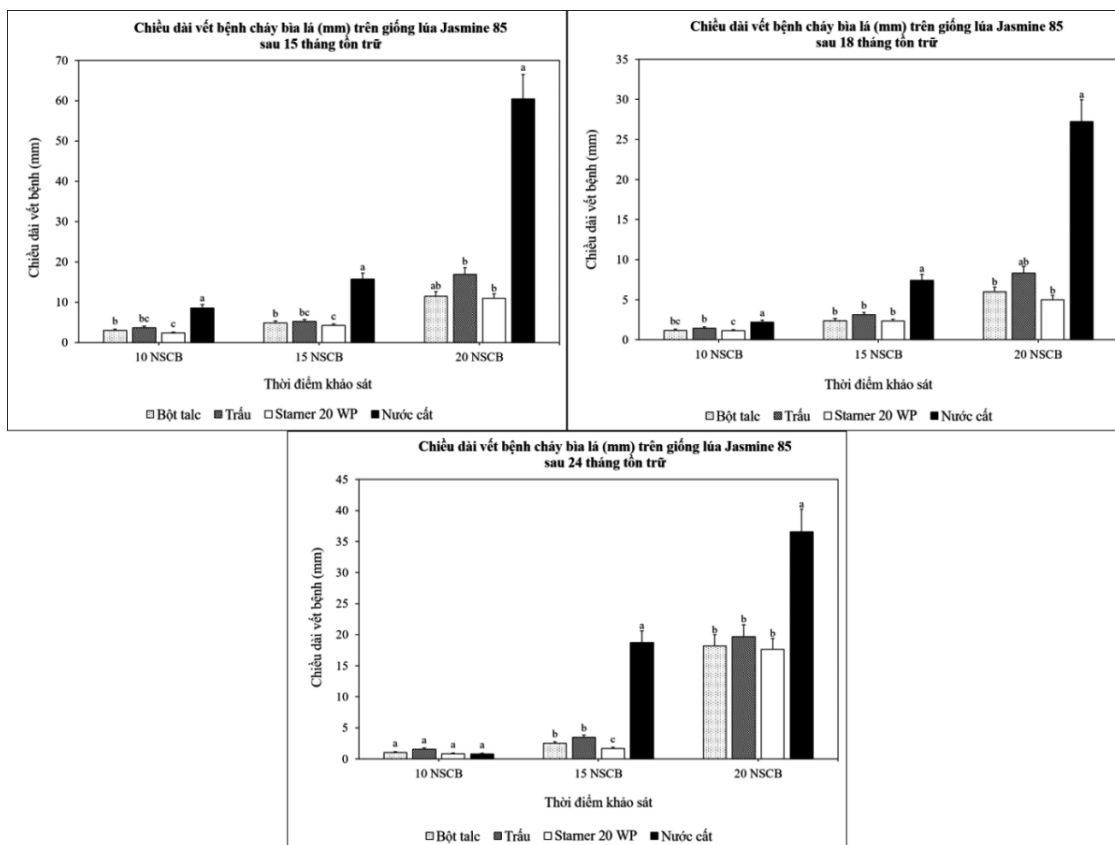
## 2. TỔNG HỢP KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 2.1. Hiệu quả phòng trị bệnh bạc lá trong điều kiện nhà lưới của vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78 sau thời gian tồn trữ

Chủng vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78 được phân lập từ đất ruộng lúa tại thành phố Cần Thơ có hiệu quả làm giảm bệnh bạc lá cao nhất trong 6 chủng vi khuẩn đối kháng (Khoa *et al.*, 2016; Nguyễn Huỳnh Nhã Uyên và ctv., 2018) nhờ vào khả năng tạo hợp chất siderophore và sinh ra các chất điều hòa sinh trưởng như indole-3-acetic acid, gibberellin (Nguyễn Văn Anh, 2021) nên được chọn để nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh bạc lá. Chế phẩm sinh học chứa vi khuẩn đối kháng cần đảm bảo duy trì được mật số vi khuẩn cao, độ thuần và sự ổn định về hiệu quả phòng trừ bệnh trong suốt quá trình tồn trữ (Brar *et al.*, 2006). Hồ Nguyễn Lam Linh (2018) đã tuyển chọn được các chất mang gồm cám, trấu, mùn cưa, bột talc và than bùn để tồn trữ chủng vi khuẩn đối kháng CT-78. Sau 12 tháng tồn trữ, chế phẩm trong chất mang cám và trấu có độ ẩm 50%; bột talc được lên men bán rắn và trữ ở độ ẩm 20% duy trì được mật số trên  $10^6$  CFU/g chế phẩm, duy trì được khả năng đối kháng với vi khuẩn *Xoo* và

hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa trong điều kiện nhà lưới (Hồ Nguyễn Lam Linh, 2018). Đồng thời, ba chế phẩm (cám, trấu và bột talc) vẫn duy trì hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa trong điều kiện ngoài đồng ở cả bốn vụ lúa đông xuân và hè thu (Nguyễn Thanh Tùng, 2020; Nguyễn Thị Thùy Dung, 2020) sau 6 và 12 tháng tồn trữ. Do đó, ba loại chất mang này tiếp tục được sử dụng để tồn trữ vi khuẩn CT-78 trong nghiên cứu khảo sát hiệu quả làm giảm bệnh bạc lá trong điều kiện nhà lưới sau 24 tháng tồn trữ. Sau 24 tháng tồn trữ, hai chất mang trấu và bột talc duy trì được mật số vi khuẩn trên  $10^5$  CFU/g chế phẩm. Riêng chất mang

bột talc duy trì được khả năng đối kháng với vi khuẩn *Xoo* đến thời điểm tháng 13 tồn trữ. Từ kết quả khảo sát hiệu quả giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới tại ba thời điểm gồm 15, 18 và 24 tháng tồn trữ cho thấy, tuy không còn khả năng đối kháng trên đĩa thạch nhưng ở mật số  $10^5$  CFU/mL vi khuẩn đối kháng vẫn duy trì hiệu quả giảm bệnh sau thời gian dài tồn trữ (hình 1) (Thái Trần Anh Thư, 2022; Nguyễn Thảo Tâm, 2022). Tuy nhiên, vết bệnh ở thời điểm tháng 24 tồn trữ dài hơn so với giai đoạn 15 và 18 tháng tồn trữ, chứng tỏ hiệu quả giảm bệnh của vi khuẩn CT-78 đã suy giảm sau thời gian dài tồn trữ.



Hình 1. Chiều dài vết bệnh bạc lá (mm) được xử lý vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78 ở mật số  $10^5$  CFU/g sau 15, 18 và 24 tháng tồn trữ

## 2.2. Hiệu quả phòng trị bệnh bạc lá của hỗn hợp vi khuẩn đối kháng *Bacillus* sp. trong điều kiện nhà lưới

Bốn chủng vi khuẩn *Bacillus safensis* AG-131, *Bacillus stratosphericus* AG-62, *Bacillus aerophilus* HG-33 và *Bacillus pumilus* TG-71 đã được phân lập, định danh và khảo sát hiệu quả phòng trừ bệnh bạc lá lúa (Võ Thị Phương Trang, 2013; Nguyễn Đăng Ngọc Giàu, 2014; Trần Kim Thoa, 2015). Ngoài khả năng đối kháng, bốn chủng vi khuẩn này có khả năng kích thích cây trồng tiết ra các enzyme phenylalanine ammonialyase, polyphenol oxydase, catalase và peroxidase 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). Tiếp nối kết quả này, nghiên cứu phối trộn hai chủng vi khuẩn đối kháng được thực hiện. Qua kết quả khảo sát đối kháng lẫn nhau, khảo sát khả năng đối kháng với vi khuẩn Xoo bằng khuẩn lạc và dịch nuôi cấy vi khuẩn đối kháng trên đĩa thạch cho thấy hai chủng vi khuẩn TG-71 và HG-33 có khả năng phát triển trên cùng môi trường nuôi cấy, duy trì khả năng tổng hợp và tiết ra các hợp chất có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn Xoo. Hỗn hợp hai chủng vi khuẩn AG-131 và AG-62 cũng được thực hiện các khảo sát tương tự, kết quả cho thấy hai chủng vi khuẩn này không đối kháng với nhau và vẫn duy trì khả năng đối kháng với vi khuẩn Xoo. Tuy nhiên, khả năng

đối kháng của các chủng vi khuẩn có sự suy giảm do bán kính vòng vô khuẩn ghi nhận được nhỏ hơn so với các nghiên cứu trước đây.

Trong điều kiện nhà lưới, hỗn hợp hai chủng vi khuẩn TG-71 và HG-33 cho chiều dài vết bệnh ngắn nhất và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với đối chứng âm khi được phối trộn ở tỷ lệ 2:1 (2 vi khuẩn TG-71:1 vi khuẩn HG-33). Hiệu quả này được duy trì qua cả ba thời điểm khảo sát (10, 15 và 20 NSCB) (Huỳnh Yến Nhi, 2021). Tương tự, bằng phương pháp chủng vi khuẩn đối kháng vào đất ở mật số  $10^7$  CFU/mL, hỗn hợp hai chủng vi khuẩn AG-131 và AG-62 duy trì hiệu quả giảm bệnh qua cả ba thời điểm khảo sát khi được phối trộn ở tỷ lệ 1:2 (bảng 1) (Nguyễn Thị Mỹ Á, 2021).

Nhìn chung, các nghiệm thức phối trộn vi khuẩn cho thấy hiệu quả giảm bệnh nhưng khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê so với các nghiệm thức từng chủng vi khuẩn riêng lẻ. Kết quả này do thể tích phối trộn vi khuẩn chưa phù hợp. Khi phối trộn huyền phù hai chủng vi khuẩn này theo các tỷ lệ đã thực hiện thì mật số tế bào của hỗn hợp huyền phù được đảm bảo, tuy nhiên mật số từng chủng vi khuẩn đã giảm theo tỷ lệ phối trộn so với ban đầu. Bên cạnh đó, hệ số biến thiên (CV%) trong các thí nghiệm tương đối cao nên dẫn đến các nghiệm thức phối trộn có hiệu quả giảm bệnh tương đương với các nghiệm thức không phối trộn.

**Bảng 1. Chiều dài vết bệnh (mm) trên lá lúa Jasmine 85 khi xử lý với vi khuẩn đối kháng AG-131 và AG-62 ở mật số  $10^7$  CFU/mL**

| Nhóm<br>nghiệm thức              | Nghiệm thức (NT)     | Chiều dài vết bệnh (mm) |                     |                     |
|----------------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|
|                                  |                      | 10 NSCB                 | 15 NSCB             | 20 NSCB             |
| Riêng lẻ                         | NT1: AG-131          | 20,44 <sup>b</sup>      | 29,78 <sup>bc</sup> | 42,56 <sup>c</sup>  |
|                                  | NT2: AG-62           | 18,89 <sup>b</sup>      | 27,78 <sup>bc</sup> | 37,78 <sup>c</sup>  |
| Phối trộn:<br>AG-131 và<br>AG-62 | NT3: Tỷ lệ 1:1       | 22,89 <sup>b</sup>      | 27,00 <sup>bc</sup> | 34,22 <sup>c</sup>  |
|                                  | NT4: Tỷ lệ 1:2       | 11,67 <sup>b</sup>      | 18,00 <sup>c</sup>  | 35,22 <sup>c</sup>  |
|                                  | NT5: Tỷ lệ 2:1       | 29,11 <sup>ab</sup>     | 36,78 <sup>bc</sup> | 50,89 <sup>c</sup>  |
| Đối chứng                        | NT6: Đối chứng dương | 30,67 <sup>ab</sup>     | 44,67 <sup>b</sup>  | 74,33 <sup>b</sup>  |
|                                  | NT7: Đối chứng âm    | 44,78 <sup>a</sup>      | 85,89 <sup>a</sup>  | 135,44 <sup>a</sup> |
| p-value                          |                      | 0,003                   | 0,004               | <0,001              |
| CV (%)                           |                      | 41,72                   | 58,29               | 62,45               |

Các số trung bình trong cùng thời điểm theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% bằng kiểm định Tukey

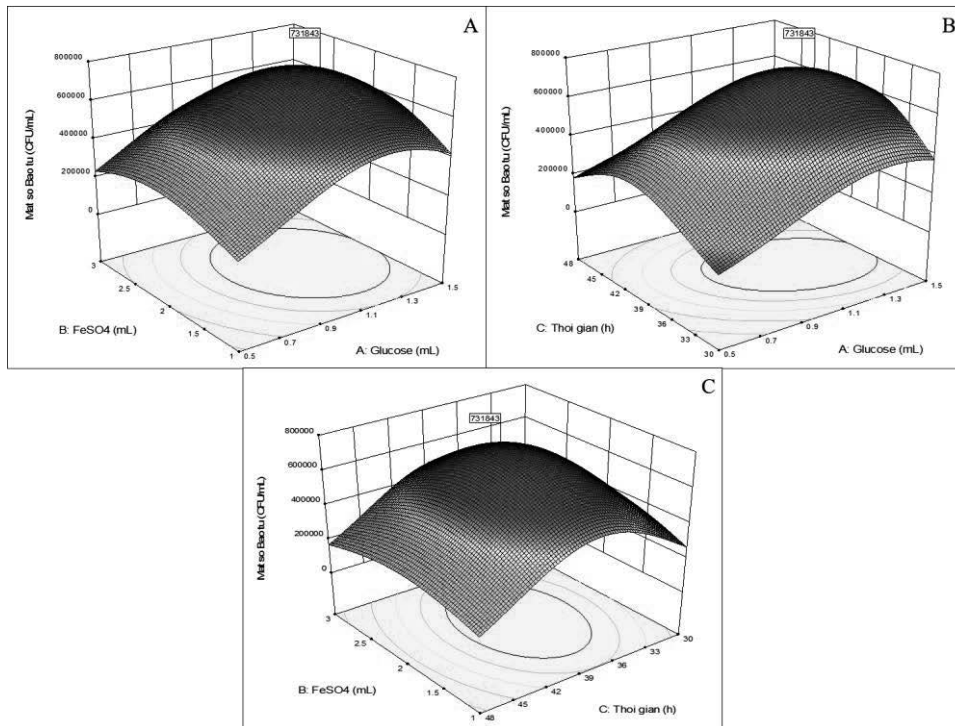
### 2.3. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy để kích thích khả năng tạo bào tử của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.

Bốn chủng vi khuẩn *Bacillus stratosphericus* AG-62, *Bacillus aerophilus* HG-33, *Bacillus pumilus* TG-71, *Bacillus subtilis* ST-14 đã được xác định có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Xoo* gây bệnh bạc lá lúa và hiệu quả làm giảm bệnh ở điều kiện nhà lưới và ngoài đồng (Võ Thị Phương Trang, 2013; Nguyễn Đặng Ngọc Giàu, 2014; Nguyễn Hoàng Thông, 2014; Trần Kim Thoa, 2015; Nguyễn Mộng Huyền Trang, 2015; Nguyễn Ngọc Lộc, 2018). Một trong những đặc tính nổi bật của vi khuẩn *Bacillus* sp. là khả năng tạo bào tử. Bào tử giúp vi khuẩn *Bacillus* sp. chịu đựng áp lực trong môi trường khắc nghiệt (nhiệt độ cao, thiếu dinh dưỡng,...) và khi gặp điều kiện thuận lợi thì bào tử dễ dàng nảy mầm và phát triển thành tế bào vi khuẩn bình thường (Paidhungat *et al.*,

2002; Setlow, 2006). Vì thế, bào tử của vi khuẩn có rất nhiều ứng dụng khác nhau như công nghệ sinh học kiểm soát và xử lý chất lượng nước, sản xuất vật liệu nano (Yang *et al.*, 2020) và một số ứng dụng khác. Tuy nhiên, chi phí sản xuất bào tử sử dụng môi trường nuôi cấy tương đối đắt và khó được chấp nhận trong sản xuất hàng loạt (Shi *et al.*, 2007). Do đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm tìm ra giá trị tối ưu của các yếu tố tác động trực tiếp đến quá trình tạo bào tử của bốn chủng vi khuẩn (AG-62, HG-33, TG-71 và ST-14), làm tiền đề tạo chế phẩm ứng dụng vào sản xuất. Sử dụng ma trận Plackett-Burman để sàng lọc các yếu tố vật lý và hóa học tác động đến sự hình thành bào tử vi khuẩn và tối ưu hóa nồng độ của các yếu tố đó bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) - phương pháp cấu trúc có tâm (CCD). Nghiên cứu thực hiện dựa vào 11 yếu tố có vai trò quan trọng trong môi trường kích thích tạo bào tử *Bacillus* gồm glucose (g), yeast extract (g),

peptone (g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (g),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (g),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (g),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (g),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (g),  $\text{ZnSO}_4$  (g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (g) và thời gian (giờ). Từng chủng vi khuẩn khác nhau có các yếu tố ảnh hưởng và giá trị tối ưu hóa của các

yếu tố khác nhau. Đối với chủng vi khuẩn AG-62, mật số bào tử đạt cực đại ( $6,93 \times 10^5$  CFU/mL) khi chịu ảnh hưởng bởi ba yếu tố là glucose (2,586 g/L),  $\text{FeSO}_4$  (0,5 mL/L) và thời gian nuôi cấy (38,5 giờ) (hình 2) (Huỳnh Nguyễn Trúc Nhi, 2022).



**Hình 2. Bề mặt đáp ứng của mật số bào tử vi khuẩn *Bacillus stratosphericus* AG-62 theo đề xuất**

A. Glucose và  $\text{FeSO}_4$ ; B. Glucose và thời gian; C.  $\text{FeSO}_4$  và thời gian

Huỳnh Kim Phương (2022) đã xác định được peptone 2,66g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,66g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,475g/L và thời gian nuôi cấy trong 48 giờ là các yếu tố chính giúp bào tử của vi khuẩn HG-33 đạt cực đại ( $3,58 \times 10^5$  CFU/mL). Tương tự vi khuẩn HG-33, quá trình tạo bào tử của vi khuẩn TG-71 đạt  $9,4 \times 10^6$  CFU/mL khi chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố peptone,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  và thời gian nuôi cấy với các giá trị tối ưu lần lượt là 12g/L, 4g/L, 2,699g/L và sau 72 giờ (Hồ Xuân

Bách, 2021). Đối với vi khuẩn ST-14, giá trị tối ưu của các yếu tố ảnh hưởng là glucose 7g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g/L và thời gian nuôi cấy trong 72 giờ với mật số bào tử đạt  $3,02 \times 10^6$  CFU/mL (Bí Trường Giang, 2021). Kết quả nghiên cứu cũng tương đồng so với những nghiên cứu trước đây, khi cho thấy các chất ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình hình thành bào tử của vi khuẩn bao gồm glucose, peptone, yeast extract,... Ngoài những yếu tố trên, điều kiện kích thích khả năng tạo bào tử của vi

khuẩn *Bacillus* bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác cả vô cơ lẫn hữu cơ và hóa học lẫn vật lý.

### 3. NHẬN XÉT CHUNG

Vi khuẩn CT-78 vẫn duy trì được mật số và hiệu quả giảm bệnh bạc lá trong điều kiện nhà lưới sau 24 tháng tồn trữ trong chất mang trấu và bột talc. Huyền phù chứa hỗn hợp hai chủng vi khuẩn TG-71 và HG-33; AG-131 và AG-26 với tỷ lệ lần lượt là 2:1 và 1:2 cho thấy hiệu quả giúp giảm bệnh bạc lá trong điều kiện nhà lưới. Tuy nhiên, tỷ lệ phối trộn để đạt được hiệu quả cao hơn cần được tiếp tục nghiên cứu. Các yếu tố chính ảnh hưởng đến quá trình tạo bào tử của bốn chủng vi khuẩn AG-62, HG-33, TG-71 và ST-14 đã được xác định bao gồm glucose, peptone, FeSO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> và thời gian nuôi cấy, làm cơ sở tạo chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh bạc lá trong thực tế sản xuất.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D. and Valéro, J.R., 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process biochemistry*, 41: 323 - 342.
2. Bí Trường Giang, 2021. Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy để kích thích khả năng tạo bào tử của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST-14. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
3. 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.
4. 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 tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
5. Hồ Xuân Bách, 2021. Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy để kích thích khả năng tạo bào tử của vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
6. Huỳnh Kim Phương, 2021. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy để kích thích khả năng tạo bào tử của vi khuẩn *Bacillus aerophilus* HG-33. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
7. Huỳnh Nguyễn Trúc Nhi, 2021. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy để kích thích khả năng tạo bào tử của vi khuẩn *Bacillus stratosphericus* AG-62. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
8. Huỳnh Yến Nhi, 2021. Khảo sát hiệu quả phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa của hỗn hợp hai dòng vi khuẩn đối kháng *Bacillus pumilus* TG-71 và *Bacillus aerophilus* HG-33. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Vi sinh vật học, Trường Đại học Cần Thơ.
9. Khoa, N.Đ., Giau, N.Đ.N., and Tuan, T.Q., 2016. Effects of *Serratia nematodiphila* CT-78 on bacterial leaf blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control*, 103: 1 - 10.
10. 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
11. 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).
12. Nguyễn Đắc Khoa, Dương Minh và Phạm Văn Kim, 2010. Sản xuất các sản phẩm sinh học để quản lý 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.

13. Nguyễn Đăng 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.
14. Nguyễn Hoàng Thông, 2014. Khảo sát khả năng phòng trị bệnh cháy bìa lá của vi khuẩn *Bacillus safensis* trên ruộng lúa tại hai tỉnh An Giang và Tiền Giang. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Vi sinh vật học, Trường Đại học Cần Thơ.
15. Nguyễn Huỳnh Nhã Uyên, Nguyễn Thị Cẩm Vân và Nguyễn Đắc Khoa, 2018. So sánh hiệu quả giảm bệnh của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. và *Serratia nematodiphila* đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh cháy bìa lá lúa. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 54(9B): 59 - 66.
16. 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.
17. 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.
18. Nguyễn Thanh Tùng, Cao Đình An Giang và Nguyễn Đắc Khoa, 2020. Khảo sát hiệu quả phòng trị bệnh bạc lá trên ruộng lúa của vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78 sau 6 tháng tồn trữ. Hội thảo Quốc gia Bệnh hại Thực vật Việt Nam lần thứ 19, ngày 23 - 25/10/2020. Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Hà Nội. Việt Nam.
19. Nguyễn Thảo Tâm, 2022. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian tồn trữ lên mật số và hiệu quả giảm bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78 sau 24 tháng. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
20. Nguyễn Thị Mỹ Á, 2021. Khảo sát hiệu quả phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa của hỗn hợp hai dòng vi khuẩn đối kháng *Bacillus safensis* AG-131 và *Bacillus stratosphericus* AG-62. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Vi sinh vật học, Trường Đại học Cần Thơ.
21. Nguyễn Thị Thùy Dung, Nguyễn Nguyệt Ánh và Nguyễn Đắc Khoa, 2020. Khảo sát hiệu quả phòng trị bệnh bạc lá trên ruộng lúa của vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78 sau 12 tháng tồn trữ. Hội thảo Quốc gia Bệnh hại Thực vật Việt Nam lần thứ 19, ngày 23 - 25/10/2020. Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Hà Nội. Việt Nam.
22. Nguyễn Văn Anh, 2021. Khảo sát khả năng tại IAA, gibberellin, siderophore, nano bạc và ảnh hưởng lên sự tăng trưởng cây lúa của vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78. Luận văn tốt nghiệp Cao học ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
23. Paidhungat, M. and Setlow, P., 2002. Spore germination and outgrowth. *Bacillus subtilis* and its Relatives: From Genes to Cells. Edited by Hoch JA, Losick R, Sonenshein AL. Washington, DC: American Society for Microbiology: 537-548.
24. 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.
25. Setlow, P., 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of applied microbiology*. 101(3): 514 - 525.
26. Shi, F., and Zhu, Y., 2007. Application of statistically-based experimental designs in medium optimization for spore production of *Bacillus subtilis* from distillery effluent. *BioControl*. 52(6): 845 - 853.
27. Thái Trần Anh Thu, 2021. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian tồn trữ lên mật số và hiệu quả giảm bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78 sau 18 tháng. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
28. 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.

29. van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M.O.J., 2006. Significance of Inducible Defense-related Protein in Infected Plant. Annual Review of Phytopathology. 44: 135 - 62
30. Vidhyasekaran, P., Ponmalar, T.R., Samiyappan, R., Velazhahan, R., Vimala, R. and Ramanathan, A., 1997. Host specific toxin production by *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. Phytopathology. 87: 1258 - 1263
31. 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.
32. Webb, K.M., Oña, I., Bai, J., Garrett, K.A., Mew, W., Vera Cruz, C.M. and Leach, J.E. 2010. A benefit of high temperature: increased effectiveness of a rice bacterial blight disease resistance gene. New Phytology, 185: 568 - 576.
33. Yang, M., Zhu, G., Korza, G., Sun, X., Setlow, P. and Li, J., 2020. Engineering *Bacillus subtilis* as a versatile and stable platform for production of nanobodies. Applied Environmental Microbiology. 86:e02938 - 19.

## ABSTRACT

### **Recent studies on disease-reducing effects after storage, strain combinations and sporulation of antagonistic soil bacteria against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing rice bacterial leaf blight**

*Bacterial leaf blight caused by Xanthomonas oryzae pv. oryzae is one of the major rice diseases. Six antagonistic soil bacteria capable of reducing the disease were isolated from the Mekong Delta of Vietnam thus identified as Serratia nematodiphila CT-78, Bacillus safensis AG-131, B. stratosphericus AG-62, B. aerophilus HG-33, B. pumilus TG-71 and B. subtilis ST-14. This paper presents recent results of the Plant Pathology Research Group at the Biotechnology R&D Institute of Can Tho University during 2022 on the disease-reducing effects after 24 - month storage of CT-78, the effects of different combinations among the Bacillus sp. strains and culture conditions having impacts on sporulation of these strains. The disease-reducing effects of CT-78 were observed under greenhouse conditions after 24 - month storage in rice husk and talcum powder. The combination of TG-71 and HG-33 (2:1) and of AG-131 and AG-26 (1:2) showed disease-reducing effects under greenhouse conditions. Further studies on combination ratios of these strains should be done to improve the effects. Beside culture duration, different factors having impacts on sporulation of each bacterial strain were identified, i.e., concentrations of glucose and FeSO<sub>4</sub> for AG-62, those of peptone, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O for HG-33 and TG-71 and those of glucose and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> for ST-14.*

**Keywords:** *Bacillus* sp., bacterial leaf blight, rice, *Serratia nematodiphila*, sporulation, storage, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

# HIỆU QUẢ GIẢM BỆNH BẠC LÁ LÚA CỦA HỖN HỢP HAI CHỦNG VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG *Bacillus safensis* AG-131 VÀ *Bacillus stratosphericus* AG-62 TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI

Thái Trần Anh Thu<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Mỹ Á<sup>1</sup>,  
Nguyễn Quang Tiến<sup>1</sup>, Nguyễn Đắc Khoa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học,  
Trường Đại học Cần Thơ

\* Tác giả liên hệ: ndkhoa@ctu.edu.vn

## TÓM TẮT

Vi khuẩn đối kháng *Bacillus safensis* AG-131 và *Bacillus stratosphericus* AG-62 có khả năng giúp giảm bệnh bạc lá trên ruộng lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây ra. Sử dụng phương pháp đồng nuôi cấy trên cùng đĩa thạch cho thấy hai chủng vi khuẩn này không cạnh tranh nhau. Kết quả khảo sát khả năng giúp giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới của hỗn hợp huyền phù hai chủng vi khuẩn AG-131 và AG-62 cho thấy cả ba tỷ lệ phối trộn bao gồm 1:1, 1:2 và 2:1 đều có hiệu quả tương đương với đối chứng dương sử dụng thuốc hóa học nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với biện pháp sử dụng từng chủng vi khuẩn riêng lẻ. Tỷ lệ phối trộn hai chủng vi khuẩn này cần được nghiên cứu thêm để đạt được hiệu quả cao hơn.

**Từ khóa:** Bạc lá, *Bacillus safensis*, *Bacillus stratosphericus*, lúa, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây bệnh bạc lá (cháy bìa lá) lúa ảnh hưởng nghiêm trọng trên đồng ruộng (Swings *et al.*, 1990). Để phòng trừ bệnh bạc lá, người nông dân thường sử dụng thuốc hóa học và giống kháng. Tuy nhiên các biện pháp này chưa tối ưu vì chi phí cao, gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng sức khỏe của con người và vật nuôi, mầm bệnh kháng thuốc và dễ phát

sinh nội mới phá vỡ tính kháng (Kiyosawa, 1989). Để khắc phục vấn đề trên, phòng trừ bệnh hại bằng vi sinh vật đối kháng đang được quan tâm nghiên cứu góp phần quản lý bệnh hại lúa theo hướng nông nghiệp bền vững (Nguyễn Đắc Khoa và *ctv.*, 2010; Khoa *et al.*, 2016; Nguyễn Đắc Khoa, 2018).

Hai chủng vi khuẩn *Bacillus safensis* AG-131 và *B. stratosphericus* AG-62 được phân lập tại đất trồng lúa ở tỉnh An Giang đã được xác định có khả năng duy trì hiệu quả giảm bệnh đến 15 ngày sau

Người phân biên: TS. Trần Thị Giang

chúng bệnh (NSCB) bằng phương pháp chủng huyền phù vi khuẩn đối kháng vào đất với mật số  $10^7$  CFU/mL trong điều kiện nhà lưới (Võ Thị Phương Trang, 2013). Tiếp nối nghiên cứu này, Nguyễn Hoàng Thông (2014) và Tô Anh Khoa (2014) đã lần lượt khảo sát khả năng phòng trị bệnh bạc lá lúa của hai chủng vi khuẩn AG-131 và AG-62 trên ruộng lúa tỉnh An Giang và Tiền Giang. Kết quả cho thấy biện pháp chủng huyền phù vi khuẩn (mật số  $10^7$  CFU/mL) vào đất cho hiệu quả giảm bệnh cao hơn hai biện pháp ngâm hạt và phun qua lá. Đến năm 2018, Nguyễn Huỳnh Nhã Uyên *et al.* một lần nữa đã khẳng định khả năng làm giảm bệnh bạc lá lúa do *Xoo* gây ra của hai chủng vi khuẩn này với phương pháp chủng huyền phù vi khuẩn ở mật số  $10^7$  CFU/mL vào đất đều cho hiệu quả giảm bệnh cao, đặc biệt là chủng vi khuẩn AG-62 cho hiệu quả tốt nhất. Trên cơ sở đó, nghiên cứu này sử dụng hỗn hợp huyền phù hai chủng vi khuẩn để khai thác tối đa hiệu quả giảm bệnh làm tiền đề ứng dụng vào thực tế sản xuất.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu

Hai chủng vi khuẩn đối kháng *Bacillus safensis* AG-131 (AG-131) và *Bacillus stratosphericus* AG-62 (AG-62) 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.

### 2.2. Khảo sát khả năng đối kháng của *Bacillus safensis* AG-131 và *Bacillus stratosphericus* AG-62 trên đĩa thạch

Để kích thích hoạt tính của hai chủng vi khuẩn đối kháng sau thời gian trữ trong dung dịch glycerol 50% ở  $-20^{\circ}\text{C}$ , một loop mỗi chủng vi khuẩn AG-131 và AG-62 được cho vào 10mL môi trường NB và ủ lắc 150 vòng/phút trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng ( $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Sau đó, hai chủng vi khuẩn này được cấy chuyển sang môi trường NA, ủ trong 48 giờ để thu sinh khối.

Một loop vi khuẩn AG-131 được cho vào môi trường NB để tạo huyền phù. Tiếp theo, 50 $\mu\text{L}$  huyền phù vi khuẩn này được trải đều trên môi trường NA bằng tăm bông vô trùng. Sau đó, khuẩn lạc của vi khuẩn AG-62 được cấy tại ba điểm cách đều nhau trên đĩa tương ứng với 3 lần lặp lại (và thực hiện ngược lại). Sau 48 giờ ủ, 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. Hai chủng vi khuẩn AG-131 và AG-62 có khả năng phát triển cùng nhau khi không xuất hiện vòng vô khuẩn.

### 2.3. Khảo sát khả năng đối kháng của vi khuẩn *Bacillus safensis* AG-131 và *Bacillus stratosphericus* AG-62 với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

#### *Thí nghiệm 1: Khảo sát khả năng đối kháng của vi khuẩn*

Vi khuẩn *Xoo* được nuôi trên môi trường Wakimoto cải tiến trong 48 giờ ở nhiệt độ phòng. Một loop vi khuẩn *Xoo* được cho vào 10mL nước cất thanh trùng

và đồng nhất bằng máy vortex để tạo huyền phù vi khuẩn. Sau đó, 50 $\mu$ L huyền phù vi khuẩn *Xoo* được trải lên đĩa thạch chứa môi trường Wakimoto cải tiến bằng tấm bông vô trùng. Khuẩn lạc của vi khuẩn AG-131 và AG-62 lần lượt được cấy lên hai điểm trên đĩa thạch. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Quan sát và đo bán kính vòng vô khuẩn sau 48 giờ.

**Thí nghiệm 2: Khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* của dịch nuôi cấy vi khuẩn đối kháng**

Một loop mỗi chủng vi khuẩn đối kháng được nuôi lắc trong 10 mL môi trường NB trong 5 ngày. Sau đó, 1 mL huyền phù được ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, phần dịch trong được hút chuyển sang ống mới. Huyền phù vi khuẩn *Xoo* được chuẩn bị tương tự như đã mô tả ở thí nghiệm 1 mục 2.3. Sau khi đĩa thạch được trải 50 $\mu$ L huyền phù vi khuẩn *Xoo* bằng tấm bông vô trùng, tiến hành đục lỗ tạo 4 giếng (đường kính 6 mm). Lần lượt 20  $\mu$ L huyền phù vi khuẩn AG-131, AG-62, môi trường NB và nước cất đã khử trùng được bơm vào 4 giếng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Quan sát và đo bán kính vòng vô khuẩn sau 48 giờ.

**2.4. Khảo sát hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa trong điều kiện nhà lưới**

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Thí nghiệm gồm 7 nghiệm thức: Xử lý với vi khuẩn AG-131 (NT1), vi khuẩn AG-62 (NT2), xử lý với hỗn hợp vi khuẩn AG-131 và AG-62 theo tỷ lệ lần lượt là 1:1, 1:2 và 2:1 (NT3, NT4 và NT5), đối

chứng dương: Xử lý với thuốc hóa học Starner 20WP (NT6) và đối chứng âm: Xử lý với nước cất (NT7). Sử dụng phương pháp chủng vào đất ở mật số 10<sup>7</sup> CFU/mL.

*Xử lý đất:* Đất được thu từ phường Long Xuyên, quận Bình Thủy, Thành phố Cần Thơ. Sau khi được băm nhỏ, phơi khô và trộn với, đất được cho vào chậu (đường kính 35cm), ngâm nước trong 4 ngày. Tháo nước và làm ráo mặt trước khi gieo hạt.

*Xử lý hạt giống:* Sử dụng hạt lúa giống Jasmine 85 An Giang (từ Tập đoàn Lộc Trời) ngâm trong nước khoảng 55°C trong 20 - 30 phút (loại bỏ hạt lép) để hạn chế mầm bệnh. Tiếp theo, hạt được ngâm nước trong 24 giờ và ủ trong 48 giờ để hạt nảy mầm trước khi gieo.

*Bón phân:* Theo công thức 100 - 40 - 30kg/ha (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O) và được chia thành 4 đợt bón. Đợt 1 (1 ngày trước khi gieo): 2,4g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; Đợt 2 (10 NSKG): 0,5g N và 0,12g K<sub>2</sub>O; Đợt 3 (18 NSKG): 1g N và 0,12g K<sub>2</sub>O; Đợt 4 (40 NSKG): 0,5g N và 0,12g K<sub>2</sub>O (lượng phân bón được tính trên tổng diện tích của các chậu lúa).

*Xử lý vi khuẩn đối kháng:* Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn đối kháng tương tự mô tả ở mục 2.2. Sau 24 giờ, lần lượt trải 50 $\mu$ L huyền phù vi khuẩn được pha loãng ở 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> và 10<sup>5</sup> lên môi trường NA. Thí nghiệm lặp lại 3 lần. Dựa vào mật số ban đầu, điều chỉnh huyền phù vi khuẩn về mật số 10<sup>7</sup> CFU/mL. Sau đó, 40 mL huyền phù của từng chủng vi khuẩn đối kháng và hỗn hợp vi khuẩn AG-131 và AG-62 phối trộn ở ba tỷ lệ lần lượt là 1:1, 1:2 và 2:1 được chủng vào đất trước khi gieo hạt 24 giờ.

**Phương pháp chủng bệnh:** Huyền phù vi khuẩn *Xoo* được chuẩn bị tương tự như mô tả ở mục 2.3. Huyền phù này được đo quang phổ ở bước sóng 600nm, điều chỉnh chỉ số OD = 0,3 tương ứng mật số vi khuẩn *Xoo* khoảng  $10^9$  CFU/mL (Trần Kim Thoa, 2015). Sử dụng kéo vô trùng nhúng vào huyền phù vi khuẩn *Xoo* đã chuẩn bị và cắt 3 - 5 chóp lá trưởng thành (45 NSKG) (Kauffman *et al.*, 1973).

**Ghi nhận chỉ tiêu:** Quan sát và đo chiều dài vết bệnh bạc lá của 3 lá/cây lúa vào 3 thời điểm 10, 15 và 20 NSCB. Chiều dài vết bệnh bạc lá được tính từ vết cắt đến vị trí lan cuối cùng của vết bệnh.

**Chọn tỷ lệ phối trộn tối ưu:** Các nghiệm thức phối trộn huyền phù hai chủng vi khuẩn cần đảm bảo hai tiêu chí. Thứ nhất, nghiệm thức thể hiện được hiệu quả giảm bệnh so với các nghiệm thức được xử lý vi khuẩn riêng lẻ và so với đối chứng dương; thứ hai, nghiệm thức có thể duy trì hiệu quả giảm bệnh đến thời điểm 20 NSCB.

## 2.5. Xử lý số liệu

Số liệu bán kính vòng vô khuẩn là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại và độ lệch chuẩn được tính bằng phần mềm Microsoft Excel 2016. Số liệu chiều dài vết bệnh được phân tích ANOVA và được so sánh bằng kiểm định Tukey ở mức ý nghĩa 5% bằng phần mềm R v. 4.1.0.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả khảo sát khả năng đối kháng của *Bacillus safensis* AG-131 và *Bacillus stratosphericus* AG-62 trên đĩa thạch

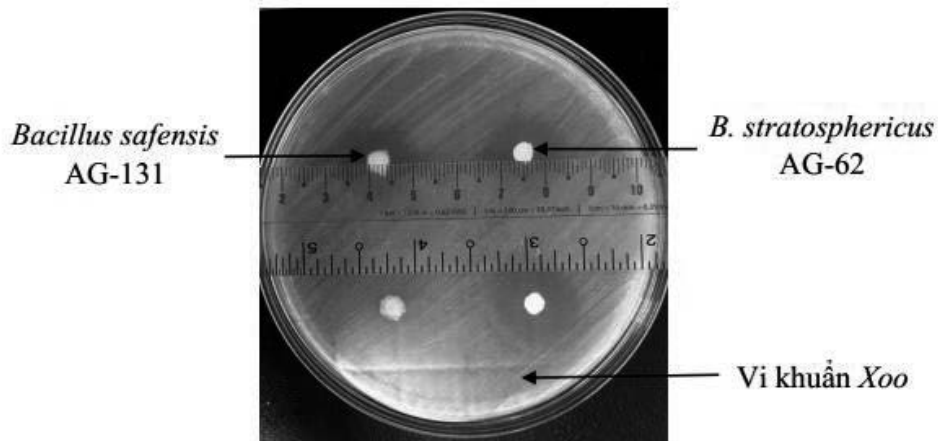
Kết quả khảo sát cho thấy hai chủng vi khuẩn AG-131 và AG-62 không đối

kháng nhau, có khả năng phát triển cùng nhau. Khi sống trên cùng môi trường, hai chủng vi khuẩn này tổng hợp nên các chất kháng khuẩn tương tự nhau (Kothari *et al.*, 2013; Satomi *et al.*, 2006; Sasser, 1990; Shiivaji *et al.*, 2006) nên không có khả năng ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn còn lại mà chỉ có tác dụng đối kháng với mầm bệnh. Kết quả này là cơ sở cho việc phối trộn hai chủng vi khuẩn đối kháng để khảo sát khả năng làm giảm bệnh bạc lá lúa trong điều kiện nhà lưới.

### 3.2. Kết quả khảo sát khả năng đối kháng của vi khuẩn *Bacillus safensis* AG-131 và *Bacillus stratosphericus* AG-62 với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

#### **Thí nghiệm 1: Khảo sát khả năng đối kháng của vi khuẩn**

Qua khảo sát đã xác định được hai chủng vi khuẩn AG-131 và AG-62 vẫn còn duy trì khả năng đối kháng với vi khuẩn *Xoo* trên đĩa thạch. Tuy nhiên, khả năng đối kháng của vi khuẩn đã suy giảm đáng kể sau quá trình trừ do bán kính vòng vô khuẩn tương đối nhỏ (hình 1). Bán kính vòng vô khuẩn do vi khuẩn AG-131 tạo ra là  $4,67 \pm 0,58$ mm và vi khuẩn AG-62 tạo ra là  $6,33 \pm 0,58$ mm giảm một nửa so với kết quả nghiên cứu của Võ Thị Phương Trang (2013) (lần lượt là  $11,30 \pm 0,60$ mm và  $13,30 \pm 0,60$ mm). Khả năng đối kháng của vi khuẩn AG-131 thấp hơn vi khuẩn AG-62 do có bán kính vòng vô khuẩn nhỏ hơn, điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Võ Thị Phương Trang (2013).

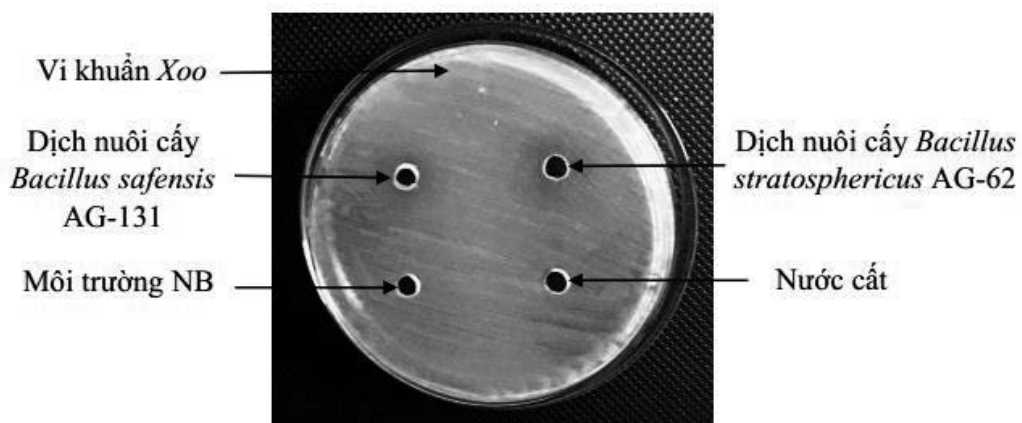


Hình 1. Vòng vô khuẩn do hai chủng vi khuẩn *Bacillus safensis* AG-131 và *Bacillus stratosphericus* AG-62 tạo ra trên môi trường Wakimoto cải tiến

**Thí nghiệm 2: Khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* của dịch nuôi cấy vi khuẩn đối kháng**

Thí nghiệm sử dụng dịch nuôi cấy vi khuẩn sau 5 ngày để xác định khả năng ức chế với vi khuẩn *Xoo*, do đây là thời điểm vi khuẩn tạo ra bán kính vòng vô khuẩn lớn nhất theo kết quả nghiên cứu

của Võ Thị Phương Trang (2013). Kết quả cho thấy dịch nuôi cấy của hai dòng vi khuẩn này vẫn còn khả năng ức chế vi khuẩn *Xoo* trên đĩa thạch (hình 2). Tuy nhiên, vòng vô khuẩn được tạo ra có bán kính rất nhỏ. Bán kính vòng vô khuẩn do dịch nuôi cấy của hai chủng vi khuẩn AG-131 và AG-62 lần lượt là  $1,67 \pm 0,58\text{mm}$  và  $2,00 \pm 1,00\text{mm}$ .



Hình 2. Vòng vô khuẩn do dịch nuôi cấy của hai chủng vi khuẩn *Bacillus safensis* AG-131 và *Bacillus stratosphericus* AG-62 tạo ra trên môi trường Wakimoto cải tiến

Qua hai thí nghiệm trên cho thấy, khi có mặt trực tiếp tế bào của vi khuẩn đối kháng và vi khuẩn gây bệnh trên cùng

một môi trường thì khả năng hình thành vòng vô khuẩn của hai chủng vi khuẩn cao hơn khi sử dụng dịch nuôi cấy.

### 3.3. Khảo sát hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa trong điều kiện nhà lưới

Bảng 1 cho thấy tại thời điểm 10 NSCB, các nghiệm thức đều cho vết bệnh

ngắn hơn và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với đối chứng âm, ngoại trừ nghiệm thức xử lý với hỗn hợp huyền phù hai chủng vi khuẩn đối kháng AG-131 và AG-62 ở tỷ lệ 2:1.

**Bảng 1. Chiều dài vết bệnh (mm) trên lá lúa Jasmine 85 khi xử lý với vi khuẩn đối kháng ở mật số  $10^7$  CFU/mL**

| Nhóm nghiệm thức                 | Nghiệm thức (NT)     | Chiều dài vết bệnh (mm) |                     |                     |
|----------------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|
|                                  |                      | 10 NSCB                 | 15 NSCB             | 20 NSCB             |
| Riêng lẻ                         | NT1: AG-131          | 20,44 <sup>b</sup>      | 29,78 <sup>bc</sup> | 42,56 <sup>c</sup>  |
|                                  | NT2: AG-62           | 18,89 <sup>b</sup>      | 27,78 <sup>bc</sup> | 37,78 <sup>c</sup>  |
| Phối trộn:<br>AG-131 và<br>AG-62 | NT3: Tỷ lệ 1:1       | 22,89 <sup>b</sup>      | 27,00 <sup>bc</sup> | 34,22 <sup>c</sup>  |
|                                  | NT4: Tỷ lệ 1:2       | 11,67 <sup>b</sup>      | 18,00 <sup>c</sup>  | 35,22 <sup>c</sup>  |
|                                  | NT5: Tỷ lệ 2:1       | 29,11 <sup>ab</sup>     | 36,78 <sup>bc</sup> | 50,89 <sup>c</sup>  |
| Đối chứng                        | NT6: Đối chứng dương | 30,67 <sup>ab</sup>     | 44,67 <sup>b</sup>  | 74,33 <sup>b</sup>  |
|                                  | NT7: Đối chứng âm    | 44,78 <sup>a</sup>      | 85,89 <sup>a</sup>  | 135,44 <sup>a</sup> |
| p-value                          |                      | 0,003                   | 0,004               | <0,001              |
| CV (%)                           |                      | 41,72                   | 58,29               | 62,45               |

Các số trung bình trong cùng thời điểm theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% bằng kiểm định Tukey

Ở thời điểm 15 NSCB, tất cả các nghiệm thức đều cho hiệu quả giảm bệnh so với đối chứng âm. Tại thời điểm này, nghiệm thức với tỷ lệ 1:2 của hỗn hợp huyền phù AG-131 và AG-62 cho vết bệnh ngắn nhất và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với đối chứng dương. Đến thời điểm 20 NSCB, tất cả các nghiệm thức đều cho hiệu quả giảm bệnh so với đối chứng dương và đối chứng âm. Trong đó, nghiệm thức được xử lý bằng hỗn hợp huyền phù vi khuẩn AG-131 và AG-62 ở tỷ lệ 1:1 thể hiện chiều dài vết bệnh ngắn nhất nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức xử lý vi khuẩn riêng lẻ. Qua ba thời điểm khảo sát, không có nghiệm thức phối trộn nào được lựa chọn là tối ưu do không đáp ứng được hai tiêu chí đã đề ra.

Nhìn chung, các tỷ lệ phối trộn thể hiện được hiệu quả giảm bệnh nhưng khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê so với các nghiệm thức riêng lẻ. Kết quả này có thể do thể tích phối trộn chưa phù hợp. Khi kết hợp huyền phù hai chủng vi khuẩn này với các tỷ lệ trên thì mật số của hỗn hợp huyền phù được đảm bảo, tuy nhiên mật số của từng chủng vi khuẩn đã giảm theo tỷ lệ phối trộn so với huyền phù của từng chủng vi khuẩn. Bên cạnh đó, hệ số biến thiên (CV%) tương đối cao nên dẫn đến các nghiệm thức phối trộn có hiệu quả giảm bệnh tương đương với các nghiệm thức không phối trộn. Mặc dù khả năng đối kháng với vi khuẩn *Xoo* trên đĩa thạch của hai chủng vi khuẩn đối kháng này đã bị suy giảm đáng kể sau quá trình trữ nhưng hiệu quả làm giảm bệnh bạc lá lúa khả quan hơn

nhiều so với kết quả nghiên cứu của Võ Thị Phương Trang (2013) và Nguyễn Huỳnh Nhã Uyên (2018) bằng phương pháp chủng huyền phù vi khuẩn đối kháng vào đất với mật số  $10^7$  CFU/mL.

#### 4. KẾT LUẬN

Hai chủng vi khuẩn AG-131 và AG-62 có khả năng sinh trưởng và phát triển trên cùng môi trường. Sau quá trình lưu trữ, hai chủng vi khuẩn này vẫn còn duy trì khả năng đối kháng và khả năng ức chế vi khuẩn *Xoo* trên đĩa thạch nhưng bán kính vòng vô khuẩn đã suy giảm nhiều so với các nghiên cứu trước. Khảo sát khả năng giảm bệnh bạc lá trong điều kiện nhà lưới cho thấy các nghiệm thức phối trộn hai chủng vi khuẩn AG-131 và AG-62 có hiệu quả giảm bệnh tương đương với các nghiệm thức không phối trộn.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kauffman, H.E., Reddy, A.P.K., Hsieh S.P.Y. and Nera, S.D., 1973. An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Plant disease reporter. 57: 537 - 543.
2. Khoa, N.D., Giau, N.D.N. and Tuan, 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.
3. Kiyosawa, S., Leonard K, J., Fry, W.E., 1989. Breakdown of blast resistance in rice in relation to general strategies of resistance gene deployment to prolong effectiveness of disease resistance in plants. Plant Disease Epidemiology. New York: McGraw-Hill Publishing Company. 361 - 385.
4. Kothari, V.V., Kothari, R.K., Kothari, C.R., Bhatt, V.D., Nathani, N.M., Koringa, P.G., Joshi, C.G. and Vyas, B.R.M., 2013. Genome Sequence of Salt-Tolerant *Bacillus safensis* Strain VK, Isolated from Saline Desert Area of Gujarat, India. Genome Announcements. 1 (5). e00671 - 13.
5. Nguyễn Đắc Khoa, Dương Minh và Phạm Văn Kim, 2010. Sản xuất các sản phẩm sinh học để quản lý 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.
6. 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.
7. Nguyễn Hoàng Thông, 2014. Khảo sát khả năng phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn *Bacillus safensis* trên ruộng lúa tại tỉnh An Giang và Tiền Giang. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
8. 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.
9. Sasser, M., 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical Note 101. Newark, DE: MIDI, Inc.
10. Satomi, M., Duc, M.T.L. and Venkateswaran, K., 2006. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 56: 1735 - 1740.
11. Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G.S.N., Dutt, C.B.S., Wainwright, M., Narlikar, J.V., Bhargava, P.M., 2006. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. Int J Syst Evol Microbiol. 56:1465 - 1473.

12. Swings, J., Vandem, M.M., Vauterin, L., Home, B., Gillis, M. and *et al.*, 1990. Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathogens of *Xanthomonas oryzae* (ex. Ishiyama, 1922). International Journal of Systematic Bacteriology. 40: 309 - 311.
13. Tô Anh Khoa, 2014. Khảo sát khả năng phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn *Bacillus stratosphericus* trên ruộng lúa tại tỉnh An Giang và Tiền Giang. Luận văn tốt nghiệp Cao học ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
14. 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.
15. 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.

### ABSTRACT

#### **Disease-reducing effects of mixtures of the antagonistic *Bacillus safensis* AG-131 and *Bacillus stratosphericus* AG-62 against rice bacterial leaf blight under greenhouse conditions**

*The antagonistic Bacillus safensis AG-131 and Bacillus stratosphericus AG-62 could reduce rice bacterial leaf blight caused by Xanthomonas oryzae pv. oryzae under field conditions. Using dual culture test, these bacterial strains did not show any antagonistic effects against each other. Disease-reducing effects of their combinations were tested under greenhouse conditions. Results showed that the effects of three different mixing ratios, i.e., 1:1, 1:2 and 2:1 were similar to that of the chemical control while they are not significantly different from the effects of each bacterial strain. Further studies on mixing ratios of these strains should be done to improve the effects.*

**Keywords:** *Bacillus safensis, Bacillus stratosphericus, bacterial leaf blight, rice, Xanthomonas oryzae pv. oryzae.*

# ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÒNG TRỪ SINH HỌC BỆNH THÁN THƯ TRÊN ỚT DO NẤM *Colletotrichum* sp. CỦA 2 DÒNG VI KHUẨN *Bacillus* sp. M3 VÀ *Bacillus* sp. G5 Ở ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM VÀ NHÀ LƯỚI

Nguyễn Khởi Nghĩa<sup>1\*</sup>, Trần Thị Cẩm Nhung<sup>2</sup>,  
Lê Thị Xã<sup>3</sup> và Nguyễn Hữu Thiện<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bộ môn Khoa học đất, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Sinh viên ngành Bảo vệ Thực vật, Khoa Nông nghiệp,  
Trường Đại học Cần Thơ

<sup>3</sup> Khoa Sư phạm, Trường Cao đẳng Cộng đồng Sóc Trăng

\* Tác giả liên hệ: nknghia@ctu.edu.vn

## 1. GIỚI THIỆU

Ớt cay (*Capsicum annuum* L.) là loại rau gia vị có giá trị kinh tế cao, chứa nhiều vitamin A, C và E (Pickersgill, 1997). Ở nước ta, cây ớt ngày càng được chú trọng phát triển rộng khắp khu vực đồng bằng sông Cửu Long. Tuy nhiên, trong quá trình canh tác người nông dân phải đối mặt với nhiều loại dịch bệnh trên cây ớt như bệnh chết cây con do *Rhizoctonia solani*, bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*, bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* spp,... Trong đó bệnh thán thư gây thiệt hại và thất thoát năng suất nghiêm trọng. Có nhiều biện pháp để quản lý bệnh thán thư, từ việc luân canh cây trồng khác họ (canh tác), vật lý, sinh học và hóa học (Vũ Triệu Mân, 2007). Hiện nay, việc áp dụng các biện pháp phòng trị sinh học bằng cách sử dụng các chế phẩm chứa các tác nhân phòng trừ sinh học như vi khuẩn,

nấm và xạ khuẩn được nhận định là hướng đi mới, bởi biện pháp sinh học vừa quản lý tốt bệnh hại, thân thiện với môi trường sinh thái, không ảnh hưởng sức khỏe người tiêu dùng. Nhiều công trình nghiên cứu của các nhà khoa học trong và ngoài nước đã ghi nhận các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng kiểm soát tốt nấm *Colletotrichum* spp. gây hại trên nhiều loại cây trồng và mang lại hiệu quả cao.

Nghiên cứu của Kim *et al.* (2010) đã chứng minh rằng dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* CMB32 được phân lập từ đất có khả năng sản xuất ra ba polypeptit kháng nấm: iturin A, fengycin và surfactin A kiểm soát tốt bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây ra ở điều kiện phòng thí nghiệm. Sariah (1994) đã báo cáo vi khuẩn *Bacillus subtilis* hoặc dịch lọc nuôi cấy vi khuẩn giúp giảm đáng kể vết bệnh trên trái ớt nhiễm nhân tạo nấm *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*

Người phân biên: PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Nga

so với đối chứng không xử lý vi khuẩn. Huỳnh Thị Ngọc Hân (2016) ghi nhận ba chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. P81, *Bacillus* sp. P2, *Bacillus* sp. P17 có khả năng kiểm soát tốt bệnh thán thư ớt thông qua hiệu suất ức chế lần lượt đạt 76,19%, 78,74% và 75,12% ở điều kiện nhà lưới. Nghiên cứu của Nguyễn Hữu Thiện và Nguyễn Thị Thúy Kiều (2019) đã phân lập hai chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có ký hiệu *Bacillus subtilis* M3 và *Bacillus velezensis* G5 từ hạt mè và hạt gạo lên men có khả năng đối kháng tốt với ba dòng nấm gây bệnh trên ớt gồm nấm *Colletotrichum* sp., nấm *Fusarium oxysporum* và nấm *Rhizoctonia solani* ở quy mô phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, việc đánh giá hiệu quả của hai dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập này lên khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. ở điều kiện *in vivo* và nhà lưới vẫn chưa được thực hiện. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu xác định hiệu quả phòng trị bệnh thán thư ớt *Colletotrichum* sp. của 2 dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. M3 và *Bacillus* sp. G5 trong điều kiện *in vitro*, *in vivo* và nhà lưới.

## 2. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu thí nghiệm

Nguồn nấm *Colletotrichum* sp. có khả năng gây bệnh trên ớt được cung cấp từ Bộ môn Khoa học Đất, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

Hai dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. M3 và *Bacillus* sp. G5 được phân lập lần lượt từ hạt mè và hạt gạo lên men được cung cấp từ phòng thí nghiệm Vi sinh vật Đất, Bộ

môn Khoa học Đất, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

### 2.2. Khảo sát khả năng đối kháng của 2 dòng vi khuẩn M3 và G5 đối với dòng nấm gây bệnh *Colletotrichum* sp. trong điều kiện *in vitro*

#### 2.2.1. Nguồn vi khuẩn đối kháng và nấm bệnh

Vi khuẩn M3 và G5 được nhân nuôi trong môi trường TSB ở điều kiện phòng thí nghiệm trong 2 ngày và được hiệu chỉnh mật số về  $10^7$  CFU/mL.

**Nấm gây bệnh:** Nấm *Colletotrichum* sp. được nuôi cấy trên môi trường PDA trong vòng 7 ngày trước thời gian bố trí thí nghiệm. Sau đó, dùng pasteur pipette thủy tinh tiệt trùng, đường kính 5mm để cắt thành các khối agar có hệ sợi nấm phát triển để bố trí thí nghiệm.

#### 2.2.2. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm khảo sát khả năng đối kháng của 2 dòng vi khuẩn tuyển chọn với nấm *Colletotrichum* sp. được thực hiện với 3 kiểu bố trí khác nhau gồm: (1) Vi khuẩn đối kháng được đặt trước nấm *Colletotrichum* sp. 24 giờ; (2) Vi khuẩn đối kháng được đặt cùng thời điểm với nấm *Colletotrichum* sp. và (3) Vi khuẩn đối kháng được đặt sau nấm *Colletotrichum* sp. 24 giờ. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 9 nghiệm thức với 3 lần lặp lại. Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Nihorimbere *et al.* (2017). Hiệu suất đối kháng được đánh giá theo Abbott (được trích dẫn bởi Phạm Văn Biên và ctv., 2005) và được tính theo công thức được tính theo công thức:

$$PI = \frac{R-r}{R} \times 100$$

*Trong đó:* PI: Phần trăm đối kháng của vi khuẩn.

R: Bán kính khuẩn ty của dòng nấm gây bệnh về phía đối chứng (mm).

r: Bán kính khuẩn ty của dòng nấm gây bệnh về phía có vi khuẩn (mm).

### 2.3. Khảo sát khả năng phòng trừ bệnh thán thư trên ớt của 2 dòng vi khuẩn M3 và G5 ở điều kiện *in vivo*

*Dung dịch vi khuẩn đối kháng:* Đã được nhân nuôi và hiệu chỉnh về cùng mật số là  $10^7$  CFU/mL.

*Nấm bệnh:* Dung dịch huyền phù chứa bào tử nấm *Colletotrichum* sp. bố trí trong thí nghiệm này ở mật số  $2,5 \times 10^6$  bào tử/mL.

*Trái ớt thí nghiệm:* Giống ớt Chánh Phong 01 được trồng và chăm sóc theo quy trình của Trần Thị Ba và Võ Thị Bích Thủy (2019) và cách ly thuốc hóa học 10 ngày trước khi thu hoạch trái để thực hiện bố trí thí nghiệm. Chọn những trái ớt có kích thước và màu sắc tương đối đồng đều, không bị nhiễm bệnh. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 13 nghiệm thức, 3 lặp lại, các nghiệm thức được liệt kê trong bảng 1.

**Bảng 1. Các nghiệm thức xử lý bệnh do nấm *Colletotrichum* sp. trên trái ớt trong điều kiện *in vivo***

| STT | Ký hiệu          | Nghiệm thức                                      |
|-----|------------------|--|
| 1   | ĐC               | Đối chứng (nước cất vô trùng)                    |
| 2   | M3>Col.          | Vi khuẩn M3 chủng trước nấm bệnh 1 ngày          |
| 3   | G5>Col.          | Vi khuẩn G5 chủng trước nấm bệnh 1 ngày          |
| 4   | M3+G5>Col.       | Vi khuẩn M3 và G5 chủng trước nấm bệnh 1 ngày    |
| 5   | 250 mg>Col.      | Kresoxim-methyl (250 mg/L) trước nấm bệnh 1 ngày |
| 6   | M3<Col.          | Vi khuẩn M3 chủng sau nấm bệnh 1 ngày            |
| 7   | G5<Col.          | Vi khuẩn G5 chủng sau nấm bệnh 1 ngày            |
| 8   | M3+G5<Col.       | Vi khuẩn M3 và G5 chủng sau nấm bệnh 1 ngày      |
| 9   | 250 mg<Col.      | Kresoxim-methyl (250 mg/L) sau nấm bệnh 1 ngày   |
| 10  | M3>Col.>M3       | Vi khuẩn M3 chủng trước và chủng sau 1 ngày      |
| 11  | G5>Col.>G5       | Vi khuẩn G5 chủng trước và chủng sau 1 ngày      |
| 12  | M3+G5>Col.>M3+G5 | Vi khuẩn M3 và G5 trước và chủng sau 1 ngày      |
| 13  | Col.>250 mg>Col. | Kresoxim-methyl (250 mg/L) trước và sau 1 ngày   |

Thí nghiệm khảo sát khả năng phòng, trị nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên ớt trong điều kiện *in vivo* được tiến hành theo phương pháp của Trần Thị

Lệ Trinh (2011). Đo chiều dài phát triển của vết bệnh vào các thời điểm 5, 6 và 7 ngày sau khi chủng bệnh.

## 2.4. Đánh giá hiệu quả phòng, trị bệnh thán thư trên ớt của 2 chủng vi khuẩn M3 và G5 trong điều kiện nhà lưới

### 2.4.1. Chuẩn bị nguồn vi khuẩn đối kháng, nấm bệnh và cây ớt thí nghiệm

*Nguồn vi khuẩn đối kháng và nấm:*  
Tham khảo mục 2.2.1 và 2.3.1.

*Chuẩn bị ớt khỏe:* Trồng ớt (giống ớt Chánh Phong 01) trong chậu có kích thước 30 cm x 50 cm và được chăm sóc theo quy trình của Trần Thị Ba và Võ Thị Bích Thủy (2019). Ngoài ra, thực hiện phun thuốc trừ sâu theo định kỳ nhằm phòng ngừa bọ trĩ và nhện vào giai đoạn

cây con và trước khi chủng bệnh 15 ngày. Khi cây 75 ngày tuổi và cho trái rộ thì tiến hành bố trí thí nghiệm.

### 2.4.2. Nghiệm thức thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 11 nghiệm thức và 3 lần lặp lại cho 1 nghiệm thức tương ứng với 3 chậu thí nghiệm. Mỗi chậu thí nghiệm được trồng 1 cây ớt. Chăm sóc cây ớt cho đến đạt 75 ngày tuổi, khi cây cho trái đồng đều tiến hành bố trí thí nghiệm. Các nghiệm thức được liệt kê như sau:

**Bảng 2. Các nghiệm thức xử lý bệnh do nấm *Colletotrichum* sp. trên cây ớt trong điều kiện nhà lưới**

| STT | Ký hiệu            | Nghiệm thức  |
|-----|--------------------|--|
| 1   | ĐC                 | Đối chứng (nước cất vô trùng)                        |
| 2   | M3>Col.            | Vi khuẩn M3 phun trước nấm bệnh 2 ngày               |
| 3   | G5>Col.            | Vi khuẩn G5 phun trước nấm bệnh 2 ngày               |
| 4   | M3+G5>Col.         | Vi khuẩn M3 và G5 phun trước nấm bệnh 2 ngày         |
| 5   | M3<Col.            | Vi khuẩn M3 phun sau khi chủng nấm bệnh 2 ngày       |
| 6   | G5<Col.            | Vi khuẩn G5 phun sau khi chủng nấm bệnh 2 ngày       |
| 7   | M3+G5<Col.         | Vi khuẩn M3 và G5 phun sau khi chủng nấm bệnh 2 ngày |
| 8   | M3=Col.            | Vi khuẩn M3 phun khi vừa chủng nấm bệnh              |
| 9   | G5=Col.            | Vi khuẩn G5 phun khi vừa chủng nấm bệnh              |
| 10  | M3+G5=Col.         | Vi khuẩn M3 và G5 phun khi vừa chủng nấm bệnh        |
| 11  | Thuốc BVTV hóa học | Kresoxim-methyl 250 mg/L phun khi vừa chủng nấm bệnh |

Thực hiện trồng và chăm sóc ớt theo quy trình kỹ thuật của Trần Thị Ba và Võ Thị Bích Thủy (2019). Khi cây ớt khoảng 70 - 75 ngày, giai đoạn bắt đầu có trái già chuẩn bị thu hoạch, tiến hành bỏ đợt trái

đầu, sau đó cây ra đợt trái thứ 2 thì tiến hành bố trí thí nghiệm. Việc đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh thán thư trên ớt trong điều kiện nhà lưới được tiến hành theo phương pháp của Huỳnh Thị Ngọc

Hân (2016). Chọn những cây ớt có số lượng và chất lượng quả tương đối đồng đều để thực hiện bố trí thí nghiệm, sau đó dùng dụng cụ phun vi sinh vật để phun 40mL huyền phù bào tử nấm/chậu với mật số  $2,5 \times 10^6$  bào tử/mL, phun ướt đều toàn cây vào lúc chiều mát, sau đó thực hiện che mát và tạo điều kiện giữ ẩm cho nấm bệnh xâm nhiễm. Các nghiệm thức phun vi khuẩn đối kháng được thực hiện tương tự như phun huyền phù bào tử nấm, tuy nhiên với thể tích phun 80 mL ở mật số  $10^7$  CFU/mL cho một lần lặp lại (mỗi cây), phun ướt đều lên toàn cây theo từng nghiệm thức tương ứng.

Tỷ lệ bệnh (%) = Số trái ớt bị nhiễm bệnh/Tổng số quả khảo sát của nghiệm thức\*100.

Hiệu quả giảm bệnh (%) = (Tỷ lệ bệnh của đối chứng - Tỷ lệ bệnh của nghiệm thức có xử lý vi khuẩn đối kháng)/Tỷ lệ bệnh của đối chứng\*100.

## 2.5. Xử lý số liệu

Các số liệu được thống kê trên bảng tính Excel và phân tích ANOVA theo kiểm định Tukey test bằng phần mềm MINITAB 16.2.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Khả năng đối kháng của 2 dòng vi khuẩn M3 và G5 đối với dòng nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên ớt trong điều kiện *in vitro*

Kết quả khảo sát khả năng đối kháng của 2 dòng vi khuẩn M3 và G5

với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên ớt trong điều kiện *in vitro* trình bày trong bảng 4 cho thấy các nghiệm thức chủng vi khuẩn đối kháng 24 giờ trước khi chủng nấm gây bệnh hoặc chủng vi khuẩn đối kháng cùng lúc với chủng nấm bệnh cho hiệu suất đối kháng cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê khi so với các nghiệm thức chủng vi khuẩn đối kháng 24 giờ sau khi chủng nấm bệnh ( $p < 0,05$ ) và hiệu suất đối kháng của 2 dòng vi khuẩn tăng lên theo thời gian thí nghiệm.

Cụ thể, khả năng ức chế sự phát triển khuẩn ty nấm *Colletotrichum* sp. của hai dòng vi khuẩn M3 và G5 đạt tốt nhất khi hai dòng vi khuẩn này được đặt lên trên môi trường PDA 24 giờ trước nấm *Colletotrichum* sp., đặc biệt hai nghiệm thức sử dụng dòng đơn vi khuẩn đối kháng (M3 và G5) với hiệu suất đối kháng cao nhất, đạt 52,3% được ghi nhận ở ngày thứ 9 sau khi chủng bệnh, trong khi đó nghiệm thức sử dụng hỗn hợp 2 dòng vi khuẩn M3 và G5 cho hiệu quả ức chế khuẩn ty nấm *Colletotrichum* sp. tốt nhất khi chúng được đặt cùng thời điểm thí nghiệm với nấm *Colletotrichum* sp. Ngược lại, ở thí nghiệm vi khuẩn đối kháng được đặt sau nấm 24 giờ, hầu hết các nghiệm thức khảo sát gồm sử dụng dòng đơn vi khuẩn M3, G5 và hỗn hợp 2 dòng vi khuẩn đều có hiệu suất đối kháng thấp hơn khi so sánh với 2 kiểu bố trí còn lại (vi khuẩn đối kháng được đặt trước và cùng lúc với nấm đối kháng).

**Bảng 4. Hiệu suất đối kháng của 2 dòng vi khuẩn M3 và G5 với nấm *Colletotrichum* sp. trong điều kiện *in vitro* ở thời điểm 5, 7 và 9 ngày sau khi bố trí**

| STT | Nghiệm thức   |                | Hiệu suất đối kháng (%) |                   |                   |
|-----|---|----------------|-------------------------|-------------------|-------------------|
|     |   |                | 5 NSKC                  | 7 NSKC            | 9 NSKC            |
| 1   | VK đối kháng nuôi cấy trước nấm <i>Colletotrichum</i>       | Vi khuẩn M3    | 28,3 <sup>d</sup>       | 37,0 <sup>c</sup> | 52,3 <sup>a</sup> |
| 2   |   | Vi khuẩn G5    | 34,8 <sup>a</sup>       | 38,9 <sup>b</sup> | 52,3 <sup>a</sup> |
| 3   |   | Vi khuẩn M3+G5 | 30,5 <sup>c</sup>       | 40,7 <sup>a</sup> | 47,7 <sup>d</sup> |
| 4   | VK đối kháng và nấm <i>Colletotrichum</i> nuôi cấy cùng lúc | Vi khuẩn M3    | 28,3 <sup>d</sup>       | 33,3 <sup>d</sup> | 50,7 <sup>b</sup> |
| 5   |   | Vi khuẩn G5    | 32,6 <sup>b</sup>       | 37,0 <sup>c</sup> | 46,2 <sup>e</sup> |
| 6   |   | Vi khuẩn M3+G5 | 34,8 <sup>a</sup>       | 37,0 <sup>c</sup> | 52,3 <sup>a</sup> |
| 7   | VK đối kháng nuôi cấy sau nấm <i>Colletotrichum</i>         | Vi khuẩn M3    | 28,2 <sup>d</sup>       | 31,5 <sup>e</sup> | 49,2 <sup>c</sup> |
| 8   |   | Vi khuẩn G5    | 19,5 <sup>f</sup>       | 18,5 <sup>g</sup> | 33,9 <sup>g</sup> |
| 9   |   | Vi Khuẩn M3+G5 | 21,7 <sup>e</sup>       | 20,4 <sup>f</sup> | 38,4 <sup>f</sup> |
|     | F   |                | *                       | *                 | *                 |
|     | CV (%)  |                | 17,81                   | 23,54             | 13,53             |

\* Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ số có phần chữ theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% theo phép thử Tukey's.

Ngoài ra, hai dòng vi khuẩn M3 và G5 thể hiện khả năng đối kháng tốt với nấm *Colletotrichum* sp. và có hiệu suất đối kháng tăng dần theo thời gian. Điều này cho thấy, có thể theo thời gian thí nghiệm hai dòng vi khuẩn đối kháng vẫn tiếp tục tiết ra các hợp chất ức chế sự phát triển của nấm *Colletotrichum* sp. tuy nhiên có sự khác biệt về khả năng và mức độ đối kháng khi chúng xuất hiện trước, hoặc sau, hoặc cùng thời điểm với nấm bệnh. Bên cạnh đó kết quả cũng cho thấy việc xử lý hỗn hợp 2 dòng vi khuẩn đối kháng chưa làm gia tăng hiệu suất đối kháng với nấm bệnh *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên ớt trong điều kiện *in vitro* của hai dòng vi khuẩn đối kháng khi so với hiệu quả đối kháng của hai dòng riêng lẻ. Như vậy trung bình chung hiệu suất đối kháng của dòng vi khuẩn M3, G5 và hỗn hợp 2 dòng M3 và G5 đối với nấm *Colletotrichum* sp. tương ứng lần

lượt là 50,7%; 44,1% và 46,1%. Theo Shama (2004) khi mật số của vi khuẩn phát triển vượt trội sẽ thể hiện khả năng cạnh tranh dinh dưỡng, cạnh tranh nguồn sắt, không gian sống hoặc tiết enzyme để phân giải vách tế bào sợi nấm bệnh. Sự cạnh tranh này có thể diễn ra theo nhiều cách như gây ra những sự biến đổi bất thường trong hình thành bào tử, làm trương phồng sợi nấm, phá hủy hoặc làm hư hại các cấu trúc của sợi nấm, hay tiết enzyme phân giải sợi nấm. Khi nguồn dinh dưỡng trên môi trường không còn hoặc giảm xuống mức tối thiểu, sự phát triển của nấm sẽ bị cản trở. Bên cạnh đó, việc hai dòng vi khuẩn thể hiện khả năng đối kháng cao khi được đặt 24 giờ trước nấm *Colletotrichum* sp. có thể giải thích theo Sigeo (1993) rằng, vi khuẩn đối kháng phải có khả năng sống sót và phát triển bền vững, để cho sự cạnh tranh diễn ra có hiệu quả thì nhân tố đối kháng phải

chiếm giữ một nơi cư trú và có đặc điểm phát triển gần giống mầm bệnh.

Kết quả nghiên cứu này tương tự với kết quả nghiên cứu của Prihatiningsih *et al.* (2019) cho thấy chủng *Bacillus subtilis* B298 ức chế 56% sự phát triển của nấm bệnh *Colletotrichum* sp. trong điều kiện *in vitro*. Hay nghiên cứu của Trịnh Kiều Mân (2008) về khả năng đối kháng của ba dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. với 10 chủng nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên cây hoa hồng.

### 3.2. Khả năng phòng, trị của 2 dòng vi khuẩn M3 và G5 với bệnh thán thư trên ớt trong điều kiện *in vivo*

Kết quả đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh thán thư do *Colletotrichum* sp. trên

trái ớt (bảng 5) cho thấy ở cả 3 thời điểm khảo sát với ba biện pháp xử lý vi khuẩn đối kháng khác nhau thể hiện khả năng kiểm soát mầm bệnh ở những mức độ khác nhau thông qua chiều dài vết bệnh khác nhau có khác biệt ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Trong đó, dòng vi khuẩn M3 thể hiện hiệu quả phòng trị nấm gây bệnh *Colletotrichum* sp. và duy trì ổn định hiệu quả theo thời gian thí nghiệm, chỉ đứng sau hiệu quả thuốc hóa học, đồng thời vượt trội hơn so với dòng vi khuẩn G5 và nghiệm thức xử lý kết hợp 2 dòng vi khuẩn M3 và G5 trong cả 3 tình huống xử lý vi khuẩn đối kháng với chiều dài vết bệnh trên trái ớt xử lý của dòng vi khuẩn M3 là nhỏ nhất trong cả 3 thời điểm xử lý đối kháng.

**Bảng 5. Chiều dài vết bệnh trên trái ớt ở ba thời điểm xử lý vi khuẩn đối kháng qua các thời điểm khảo sát**

| STT | Nghiệm thức   | Chiều dài vết bệnh (cm) |                    |                     |                    |
|-----|---|-------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
|     |   | 5 NSCB                  | 6 NSCB             | 7 NSCB              |                    |
| 1   | Đối chứng   | 1,25 <sup>a</sup>       | 1,55 <sup>a</sup>  | 1,82 <sup>a</sup>   |                    |
| 2   | Vi khuẩn M3   | 0,9 <sup>c</sup>        | 0,99 <sup>ef</sup> | 1,23 <sup>de</sup>  |                    |
| 3   | VK đối kháng phun trước khi chủng bệnh 24 giờ                       | Vi khuẩn G5             | 0,91 <sup>c</sup>  | 1,28 <sup>bc</sup>  | 1,45 <sup>bc</sup> |
| 4   |   | Vi Khuẩn M3+G5          | 1,07 <sup>b</sup>  | 1,23 <sup>bcd</sup> | 1,33 <sup>cd</sup> |
| 5   | Thuốc hóa học   | 0,43 <sup>d</sup>       | 0,88 <sup>f</sup>  | 1,10 <sup>ef</sup>  |                    |
| 6   | Vi khuẩn M3   | 0,91 <sup>c</sup>       | 1,16 <sup>cd</sup> | 1,23 <sup>de</sup>  |                    |
| 7   | VK đối kháng phun sau khi chủng bệnh 24 giờ                         | Vi khuẩn G5             | 0,95 <sup>bc</sup> | 1,36 <sup>b</sup>   | 1,53 <sup>b</sup>  |
| 8   |   | Vi Khuẩn M3+G5          | 0,98 <sup>bc</sup> | 1,22 <sup>bcd</sup> | 1,36 <sup>cd</sup> |
| 9   | Thuốc hóa học   | 0,84 <sup>c</sup>       | 1,07 <sup>de</sup> | 1,22 <sup>de</sup>  |                    |
| 10  | Vi khuẩn M3   | 0,91 <sup>c</sup>       | 0,98 <sup>ef</sup> | 1,03 <sup>f</sup>   |                    |
| 11  | VK đối kháng phun trước khi chủng bệnh và sau khi chủng bệnh 24 giờ | Vi khuẩn G5             | 0,9 <sup>c</sup>   | 1,24 <sup>bc</sup>  | 1,27 <sup>d</sup>  |
| 12  |   | Vi Khuẩn M3+G5          | 0,91 <sup>c</sup>  | 1,23 <sup>bc</sup>  | 1,30 <sup>cd</sup> |
| 13  | Thuốc hóa học   | 0,43 <sup>d</sup>       | 0,87 <sup>f</sup>  | 1,22 <sup>de</sup>  |                    |
|     | F   | *                       | *                  | *                   |                    |
|     | CV (%)  | 25,16                   | 16,78              | 15,19               |                    |

\* Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ số có phần chữ theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% theo phép thử Tukey's.

Theo Sigeo (1993), vi khuẩn đối kháng có khả năng xác lập và phát triển quần thể tại nơi mà chúng thể hiện vai trò cạnh tranh với các vi sinh vật khác, điều này sẽ dẫn đến sự đối kháng sẽ trở nên bền vững. Kết quả khảo sát cũng chỉ ra rằng các nghiệm thức được xử lý với vi khuẩn đối kháng trước và sau khi chủng bệnh 24 giờ cho hiệu quả kiểm soát bệnh tốt hơn thậm chí khi so sánh với các nghiệm thức phun hoá học trước hoặc sau khi nhiễm bệnh. Điều này có nghĩa là có thể áp dụng phun vi khuẩn đối kháng trong quá trình canh tác ớt một cách thường xuyên và theo định kỳ để phòng ngừa và điều trị bệnh thán thư do vi khuẩn *Colletotrichum* sp. gây ra.

Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Reyes-Estebanez *et al.* (2020) cho thấy loài vi khuẩn *Bacillus velezensis* có khả năng ức chế tốt nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên ớt trong điều kiện *in vivo*. Hay nghiên cứu của Trần Thị Lệ Trinh (2011) đã ghi nhận hiệu quả phòng trị bệnh thán thư trên trái ớt do nấm *Colletotrichum* ST2 của 5 chủng vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* và biện pháp phun vi sinh đối kháng kết hợp phun trước và phun sau khi chủng nấm cho kết quả kiểm soát bệnh hiệu quả nhất. Theo Sharma (2004) khi hai loài vi sinh vật cùng định vị ở một vị trí trên bề mặt ký chủ thì sự cạnh tranh có thể xảy ra. Bên cạnh đó, loài nào suy yếu hơn về mật số thì loài còn lại sẽ

lấn át và phát triển nhanh chóng (Sigeo, 1993). Việc bổ sung mật số vi khuẩn đối kháng dẫn đến hiệu quả giảm bệnh cao hơn và bền vững theo thời gian.

### **3.3. Hiệu quả phòng trị của 2 chủng vi khuẩn M3 và G5 với bệnh thán thư trên ớt ở điều kiện nhà lưới**

Kết quả khảo sát khả năng phòng trị của 2 dòng vi khuẩn đối kháng M3 và G5 với bệnh thán thư trên ớt trong điều kiện nhà lưới được trình bày trong bảng 6. Nhìn chung, khả năng phòng trị bệnh thán thư trên ớt của các nghiệm thức khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Đối với kết quả phân tích tỷ lệ bệnh của trái ớt cho thấy khi không xử lý bằng bất kỳ biện pháp nào khi xuất hiện nấm bệnh hại tấn công tỷ lệ bệnh trên trái ớt là 78,5%, trong khi đó, nếu xử lý bằng thuốc hóa học hoặc vi khuẩn đối kháng tỷ lệ trái ớt bị bệnh giảm xuống rất đáng kể, và các thời điểm xử lý vi khuẩn đối kháng khác nhau cho hiệu quả phòng trị nấm bệnh cũng khác nhau. Qua kết quả phân tích cho thấy dòng vi khuẩn M3 cho hiệu quả trong phòng trị tốt nhất trong số 3 nghiệm thức xử lý vi khuẩn đối kháng. Nghiệm thức xử lý dòng vi khuẩn đơn G5 và xử lý bằng hỗn hợp 2 dòng vi khuẩn M3 và G5 để phòng trừ bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* sp. tốt nhất vẫn là khi được phun trước để phòng ngừa bệnh thán thư ớt và tiếp tục phun để điều trị khi xuất hiện mầm bệnh của nấm *Colletotrichum* sp.

**Bảng 6. Tỷ lệ bệnh và hiệu quả giảm bệnh khi xử lý vi khuẩn đối kháng của các nghiệm thức thí nghiệm trong điều kiện nhà lưới sau 16 ngày chủng bệnh**

| STT      | Nghiệm thức                                 |                | Tỷ lệ bệnh (%)     | Hiệu quả giảm bệnh (%) |
|----------|---|----------------|--------------------|------------------------|
| 1        | Đối chứng không phun vi khuẩn đối kháng     |                | 78,5 <sup>a</sup>  | 0,0 <sup>e</sup>       |
| 2        | Đối chứng phun thuốc hóa học trị nấm        |                | 42,4 <sup>e</sup>  | 46,0 <sup>a</sup>      |
| 3        | Phun VK đối kháng trước khi gây bệnh 1 ngày | Vi khuẩn M3    | 42,9 <sup>e</sup>  | 45,4 <sup>a</sup>      |
| 4        |   | Vi khuẩn G5    | 68,0 <sup>b</sup>  | 13,4 <sup>d</sup>      |
| 5        |   | Vi Khuẩn M3+G5 | 65,6 <sup>b</sup>  | 16,4 <sup>d</sup>      |
| 6        | Phun VK đối kháng trước và sau khi gây bệnh | Vi khuẩn M3    | 40,8 <sup>e</sup>  | 48,0 <sup>a</sup>      |
| 7        |   | Vi khuẩn G5    | 61,3 <sup>bc</sup> | 21,9 <sup>cd</sup>     |
| 8        |   | Vi Khuẩn M3+G5 | 55,2 <sup>cd</sup> | 29,8 <sup>bc</sup>     |
| 9        | Phun VK sau khi gây bệnh 1 ngày             | Vi khuẩn M3    | 42,7 <sup>e</sup>  | 45,6 <sup>a</sup>      |
| 10       |   | Vi khuẩn G5    | 65,6 <sup>b</sup>  | 16,5 <sup>d</sup>      |
| 11       |   | Vi Khuẩn M3+G5 | 52,4 <sup>d</sup>  | 33,3 <sup>b</sup>      |
| <i>F</i> |   |                | *                  | *                      |
| CV (%)   |   |                | 22,5               | 43,4                   |

\* Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ số có phần chữ theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% theo phép thử Tukey's.

Do tỷ lệ bệnh giảm nên kết quả phân tích hiệu quả giảm bệnh của các nghiệm thức xử lý vi khuẩn đối kháng cho hiệu quả tốt theo cùng xu hướng tỷ lệ giảm bệnh và các nghiệm thức xử lý với dòng vi khuẩn M3 cho hiệu quả giảm bệnh cao nhất, 45 - 48% ở cả 3 thời điểm xử lý khác biệt không ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) khi so sánh với nghiệm thức xử lý nấm bệnh bằng thuốc hóa học (46%). Các nghiệm thức xử lý bằng vi khuẩn G5 và hỗn hợp vi khuẩn M3 và G5 cũng cho hiệu quả giảm bệnh tốt tuy nhiên thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê khi so sánh với nghiệm thức xử lý bằng vi khuẩn M3 ( $p < 0,05$ ).

Tóm lại, qua kết quả khảo sát cho thấy các nghiệm thức phun dòng đơn vi khuẩn M3 thể hiện khả năng kiểm soát bệnh tốt và duy trì hiệu quả ổn định hơn theo thời gian thí nghiệm so với dòng đơn vi khuẩn G5, đồng thời không khác biệt ý nghĩa

thống kê ( $p > 0,05$ ) khi so sánh với nghiệm thức xử lý thuốc hóa học. Bên cạnh đó, các nghiệm thức phun dòng đơn vi khuẩn M3, cho hiệu quả đối kháng bệnh ở hầu hết các thời điểm khảo sát ở nghiệm thức xử lý vi khuẩn đối kháng trước và sau khi chủng bệnh 2 ngày cho hiệu quả cao nhất, đồng thời không khác biệt ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) khi so sánh với nghiệm thức phun thuốc hóa học.

Kết quả nghiên cứu này tương tự với kết quả nghiên cứu của Huỳnh Thị Ngọc Hân (2016) ghi nhận ba chủng vi khuẩn *Bacillus*-P2, P17 và P81 thể hiện khả năng đối kháng tốt với nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên ớt trong điều kiện *in vitro* với hiệu suất đối kháng trung bình (52,59 - 56,57%). Đồng thời, thời điểm xử lý một lần trước khi lây nhiễm bệnh 2 ngày cho hiệu quả cao hơn trong xử lý nấm bệnh sau khi lây bệnh

cho cây. Một nghiên cứu khác của Huỳnh Thanh Toàn (2014) cho thấy chế phẩm vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* có khả năng kiểm soát tốt nấm *Colletotrichum* spp. khi phun vi khuẩn trước 2 ngày; phun vi khuẩn kết hợp xử lý trước và sau khi chủng bệnh 2 ngày. Theo Bailey (2006) hiệu quả của tác nhân phòng trừ sinh học liên quan đến nhiều cơ chế tác động khác nhau. Thứ nhất cơ chế tác động trực tiếp lên mầm bệnh bởi khả năng tiết kháng sinh, cạnh tranh dinh dưỡng, không gian hoặc ký sinh; thứ hai bằng cách can thiệp vào cơ chế bệnh của mầm bệnh gây hại trên cây trồng; Thứ ba bằng cách điều chỉnh sự tương tác của mầm bệnh đối với cây ký chủ, điển hình như cảm ứng tính kích kháng bệnh tại chỗ hoặc toàn thân. Tuy nhiên Bardin *et al.* (2015) cũng chỉ ra rằng hiệu quả của tác nhân phòng trừ sinh học cũng chịu tác động của điều kiện ngoại cảnh (nhiệt độ, độ ẩm, bức xạ), khả năng thích ứng sinh thái (sống sót, thiết lập quần thể) của tác nhân phòng trừ sinh học. Ngoài ra, vi khuẩn đối kháng phải có khả năng sống sót và phát triển bền vững để cho sự cạnh tranh diễn ra hiệu quả (Sigeo, 1993). Bardin *et al.*, (2015) ghi nhận mối tương quan giữa liều lượng và số lần xử lý tác nhân kiểm soát sinh học với độc tính của mầm bệnh gây hại cây trồng.

#### 4. KẾT LUẬN

Cả 2 dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. M3 và *Bacillus* sp. G5 đều thể hiện khả năng đối kháng tốt với nấm bệnh *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên ớt. Trong điều kiện *in vivo*, dòng vi khuẩn *Bacillus* M3 cho hiệu quả phòng trừ và điều trị tốt nhất khi được xử lý trước khi

nấm *Colletotrichum* sp. xuất hiện và tiếp tục phun xử lý sau 1 ngày chủng nấm bệnh. Ở điều kiện nhà lưới, dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. M3 thể hiện hiệu quả cao hơn so với dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. G5 trong kiểm soát nấm gây bệnh thán thư trên ớt. Như vậy có thể ứng dụng dòng vi khuẩn *Bacillus* M3 để kiểm soát bệnh thán thư trên cây ớt do nấm *Colletotrichum* sp. gây ra trong quá trình canh tác ớt để giảm thiệt hại trái, duy trì và gia tăng năng suất trái đồng thời thực hành sản xuất nông nghiệp an toàn và bền vững.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2014. Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về khảo nghiệm trên đồng ruộng hiệu lực phòng trừ bệnh thán thư (*Colletotrichum* spp.) hại ớt của các thuốc trừ bệnh.
2. Huỳnh Thị Ngọc Hân, 2016. Đánh giá hiệu quả của một số chủng vi khuẩn *Bacillus* đối với bệnh thán thư trên ớt trong điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới. Luận văn cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
3. Kim, P.-I., Ryu, J.-W., Kim, Y.-H., and Chi, Y.-T., 2010. Production of Biosurfactant Lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for Control of *Colletotrichum gloeosporioides*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 20(1). pp. 138 - 145.
4. Nguyễn Hữu Thiện và Nguyễn Thị Thúy Kiều, 2019. Phân lập và định danh một số dòng vi khuẩn từ hạt ngũ cốc lên men có khả năng đối kháng với một số nấm bệnh gây hại trên ớt trong điều kiện *in vitro*. Luận văn tốt nghiệp đại học ngành Bảo vệ thực vật. Trường Đại học Cần Thơ. 107 trang.
5. Nihorimbere, V., Ongena, M., 2017. Isolation of Plant growth-promoting *Bacillus* Strains with Biocontrol Activity *In vitro*. Merit Research Journal of Microbiology and Biological Sciences, 5. pp. 2408 - 7076.

6. Phạm Văn Biên, Bùi Cách Tuyến & Nguyễn Mạnh Chính, 2005. Cẩm nang thuốc bảo vệ thực vật. Nhà xuất bản Nông nghiệp Tp. Hồ Chí Minh, 624 trang.
7. Pickersgill, B., 1997. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, 96(1). pp. 129 - 133.
8. Prihatiningsih, N., Djatmiko, H. A., and Erminawati, 2019. Bio-management of anthracnose disease in chilli with microencapsulates containing *Bacillus subtilis* B298. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 250(1).
9. Reyes, E.M., Sanmartín, P., Camacho, J.C., García, S.C., Chan, M.J., Águila, R.N., Carrillo, F., Escalante, E., Garma, J.L., Serrano, M., and Ortega-Morales, B. O., 2020. Characterization of a native *Bacillus velezensis*-like strain for the potential biocontrol of tropical fruit pathogens. *Biological Control*, 141.
10. Sariah Meon (Pertanian Malaysia Univ., S., 1994. Potential of *Bacillus* spp. As a biocontrol agent for anthracnose fruit rot of chilli. *Malaysian Applied Biology* (Malaysia).
11. Sharma, P.D., 2004. *Plant pathology*. Alpha Science International Ltd. Oxford, 550 pages.
12. Sigeo, D.C., 1993. *Bacterial plant pathology: cell and molecular aspects*, Published by the press syndicate of the University of Cambridge, United Kingdom, 325pp.
13. Trần Thị Ba và Võ Thị Bích Thủy, 2019. *Giáo trình cây rau*. Khoa Nông nghiệp. Trường Đại học Cần Thơ. 233 trang.
14. Trần Thị Lệ Trinh, 2011. *Nghiên cứu khả năng gây hại của các chủng nấm Colletotrichum spp. Trên ớt và biện pháp phòng trị bệnh thán thư trên ớt bằng vi khuẩn vùng rễ*. Luận văn cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
15. Trịnh Kiều Mân, 2008. *Giám định bệnh hại trên hồng và hiệu quả của vi khuẩn Bacillus spp. và thuốc hóa học đối với nấm Colletotrichum sp. và Pestalotia sp. gây bệnh trên hồng*. Luận văn tốt nghiệp kỹ sư ngành Trồng trọt. Trường Đại học Cần Thơ. Trang 28 - 42.
16. Vũ Triệu Mân, 2007. *Giáo trình Bệnh cây chuyên khoa*. Trường Đại học Nông nghiệp I - Hà Nội. 233 trang.

## ABSTRACT

### **Evaluation of the biological controlling capacity against anthracnose disease on chilli caused by *Colletotrichum* sp. of two strains bacteria *Bacillus* sp. M3 and *Bacillus* sp. G5 under laboratory and greenhouse conditions**

*The study was aimed to evaluate the efficacy of anthracnose control in chilli caused by Colletotrichum sp. of two bacterial strains including Bacillus sp. M3 and Bacillus sp. G5 under in vitro, in vivo and greenhouse conditions. In vitro, in vivo and greenhouse evaluations were performed under 3 different scenarios including antagonistic bacteria were inoculated 1 day before or after pathogenic fungi and bacteria and fungi were inoculated at the same time. The results showed that the antagonistic performance was found to be highest when the bacteria were inoculated 24 hours before the fungi. Under the in vivo condition, Bacillus sp. M3 showed the same disease control effect as chemical pesticide when inoculated 1 day before and after the fungi. Similarly, under greenhouse condition, this strain had the best effect when inoculated 2 days before and after pathogenic fungi. Thus, it is possible to apply Bacillus sp. M3 in chilli cultivation to control anthracnose caused by Colletotrichum sp., helping to reduce fruit yield losses and practice safe and sustainable chilli cultivation.*

**Keywords:** *Bacillus* sp., chilli anthracnose, *Colletotrichum* sp., biological antagonists, antagonistic performance, disease reduction efficiency.

# TUYỂN CHỌN VI KHUẨN VÙNG RỄ CÂY HỒ TIÊU (*Piper nigrum* L.) CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG TUYẾN TRÙNG (*Meloidogyne* sp.) TẠI TỈNH GIA LAI

Trịnh Thị Huyền Trang<sup>1\*</sup>, Trần Thị Phương Hạnh<sup>1</sup>,  
Trang Thị Nguyệt Quế<sup>1</sup>, Nguyễn Anh Dũng<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Tây Nguyên

\* Tác giả liên hệ: tthtrang@ttn.edu.vn; 0932. 012.705

## TÓM TẮT

Hiện nay, bệnh chết chậm do tuyến trùng ký sinh thực vật (*Meloidogyne* sp.) gây nên đang làm cho canh tác hồ tiêu ở Gia Lai gặp phải nhiều khó khăn và thách thức. Từ 72 chủng vi khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu đã phân lập tại Gia Lai, nghiên cứu đã tuyển chọn được 2 chủng RB.CP14 và RB.CS30 có khả năng kháng tuyến trùng cao trong điều kiện *in vitro* với tỷ lệ tử vong tuyến trùng tuổi 2 (J2) lần lượt là 88,08% và 87,38%. Hai chủng này được định danh với tên khoa học *Bacillus mojavensis* RB.CP14 và *Bacillus cereus* RB.CS30 bằng phương pháp Bergey's Manual of Determinative Bacteriology và Bruker Daltonik MALDI. Cả hai chủng đều có hoạt tính phân giải phosphat khó tan, cố định đạm và sinh tổng hợp IAA. Enzyme protease do chủng RB.CS30 tổng hợp tác động lên tỷ lệ tử vong của tuyến trùng tại thời điểm 12 giờ và 48 giờ, enzyme chitinase tác động tại thời điểm 24 giờ. Tuy nhiên, enzyme chitinase tác động lên tỉ lệ nở của trứng tuyến trùng tại cả 4 thời điểm khảo sát, enzyme protease chỉ tác động vào thời điểm 24 giờ và 48 giờ.

**Từ khóa:** Cây hồ tiêu, tuyến trùng, vi khuẩn vùng rễ, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus cereus*.

## 1. MỞ ĐẦU

Gia Lai là một trong 5 tỉnh Tây Nguyên có điều kiện khí hậu, đất đai phù hợp để phát triển hồ tiêu trở thành ngành sản xuất hàng hóa tập trung và xuất khẩu trên thị trường thế giới (Cục Trồng trọt - Bộ NN&PTNT, 2020). Tuy nhiên, canh tác hồ tiêu ở Gia Lai đang gặp phải nhiều khó khăn và thách thức do dịch bệnh tàn

phá đặc biệt là bệnh chết nhanh và chết chậm (Sở NN&PTNT tỉnh Gia Lai, 2021). Tuyến trùng sần rễ (*Meloidogyne* sp.) là một trong những tác nhân gây bệnh chết chậm trên cây hồ tiêu (Thuy *et al.*, 2013; Nguyễn Vũ Phong *et al.*, 2020). Kiểm soát tuyến trùng gặp nhiều khó khăn vì chúng sống trong đất và thường tấn công vào các bộ phận dưới đất của thực vật (Stirling, 2011). Khi nhiễm tuyến trùng, cây hồ tiêu bị vàng lá, rễ có nhiều nốt

Người phân biện: TS. Nguyễn Văn Bốn

sung, cây khô chết dần (Trần Thị Thu Hà, Nguyễn Tăng Tôn, 2011). Do vậy, các tác nhân kiểm soát sinh học được coi là phương pháp quản lý mới và thân thiện với môi trường nhằm kiểm soát tuyến trùng trong đất (Kaushal *et al.*, 2017). Vi khuẩn vùng rễ thúc đẩy sinh trưởng thực vật được xem là tác nhân sinh học tiềm năng mà nhiều nghiên cứu hướng tới hiện nay vì chúng vừa có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật thông qua các hoạt tính như cố định đạm, phân giải phosphate khó tan, tổng hợp các phytohormone vừa có khả năng kháng bệnh thực vật bằng cách tổng hợp các enzyme phân giải, các hợp chất thứ cấp có khả năng bay hơi cũng như các hợp chất không bay hơi tấn công vào mầm bệnh (Mhatre *et al.*, 2019). Do đó, việc sử dụng các vi khuẩn có lợi trong vùng rễ rất quan trọng cho sự sinh trưởng, phát triển của cây cũng như độ phì của đất (Basyony *et al.*, 2018). Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu tuyển chọn, định danh, và đánh giá hoạt tính kháng tuyến trùng của các chủng vi khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu nhằm ứng dụng trong phòng ngừa tuyến trùng hại rễ cây hồ tiêu tại tỉnh Gia Lai.

## 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nội dung nghiên cứu

1. Tuyển chọn và định danh được chủng vi khuẩn vùng rễ có hoạt tính kháng tuyến trùng cao trong điều kiện *in vitro*.
2. Đánh giá hoạt tính kháng tuyến trùng của các chủng vi khuẩn vùng rễ tuyển chọn.

### 2.2. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: Các chủng vi khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu được phân lập tại tỉnh Gia Lai đang được bảo quản tại Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường (CNSH&MT) và Bộ môn Sinh học, Trường Đại học Tây Nguyên thuộc chương trình đề tài cấp Bộ “*Nghiên cứu phát triển bền vững cây hồ tiêu ở Tây Nguyên*”. Tuyến trùng và trứng gây u sưng rễ cây hồ tiêu *Meloidogyne* sp.

- Vật liệu nghiên cứu: Môi trường nuôi cấy vi khuẩn Luria-Bertani (LB) Agar gồm: Tryptone (10g), cao nấm men (5g), NaCl (10g), Agar (20g), nước cất (1000ml), pH 7,5 - 8,0; thuốc thử DNS, dung dịch huyền phù chitin 1%, dung dịch N-acetylglucosamin, đệm tris HCl 0.05M pH 8, dung dịch casein 1%, dung dịch TCA 5%, dung dịch NaOH 0,5N, HCl 0,2N, thuốc thử Folin, dung dịch Tyrosin.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Tuyển chọn chủng vi khuẩn vùng rễ có khả năng kháng tuyến trùng *Meloidogyne* spp. trong điều kiện *in vitro*

Thu nhận tuyến trùng từ trứng: Thu nhận rễ tiêu bị u sưng (khi thu nhận sử dụng kéo sạch và cắt sát, không để vết thương hở tiếp xúc với đất), đựng trong túi nilon sạch. Rửa sạch rễ đã thu nhận, dùng dao lam hoặc dao rọc giấy, cắt phần vỏ, lấy các bọc trứng chuyển vào đĩa petri, bổ sung nước cất vô trùng, đặt nắp đĩa petri, để tối, ủ ở nhiệt độ phòng từ 24 - 48 giờ. Đếm xác định mật độ tuyến trùng.

Chuẩn bị dịch vi khuẩn: Cây vi khuẩn từ ống giống sang bình tam giác chứa 50ml môi trường LB lỏng, nuôi trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút, ở nhiệt độ thường trong 12 giờ. Hút 0,4ml huyền phù vi khuẩn pha loãng đạt OD<sub>610nm</sub> khoảng 0,2 - 0,3, ly tâm lạnh ở 8000 vòng/phút trong 10 phút, loại bỏ dịch trong, thu nhận cặn chứa tế bào vi khuẩn.

Xác định hoạt tính kháng tuyến trùng của vi khuẩn vùng rễ trong điều kiện *in vitro* được thực hiện theo hai bước:

*Bước 1:* Sàng lọc sơ bộ hoạt tính kháng tuyến trùng của các chủng vi khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu nhằm thu hẹp tổng số chủng vi khuẩn phải tập trung nghiên cứu, chúng tôi sử dụng phương pháp của Aravind cải tiến. Bổ sung 0,1ml nước cất vô trùng chứa khoảng 30 tuyến trùng vào cặn chứa tế bào vi khuẩn sau khi thu nhận ở trên, ủ ở nhiệt độ thường trong 24 giờ. Đối chứng là nước cất. Đếm số tuyến trùng chết trong mỗi giếng bằng kính hiển vi soi nổi. Tuyến trùng được cho là đã chết khi kiểm tra thấy cơ thể chúng nằm bất động, duỗi thẳng, nội tạng bị phá hủy.

*Bước 2:* Tuyển chọn các chủng vi khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu có hoạt tính kháng tuyến trùng được thực hiện theo phương pháp của Aravind (2010) và Chen (2000). Các bước tiến hành: Xây dựng đường chuẩn vi khuẩn vùng rễ đã thể hiện hoạt tính kháng tuyến trùng ở bước 1. Bổ sung 0,1ml nước cất vô trùng chứa khoảng 30 tuyến trùng vào cặn chứa tế bào vi khuẩn sau khi thu nhận ở trên, ủ ở nhiệt độ thường trong 24 giờ. Đếm số tuyến trùng chết trong mỗi giếng.

Chỉ tiêu theo dõi: Số lượng tuyến trùng chết lô thí nghiệm so với lô đối chứng. Tỷ lệ tuyến trùng chết được tính theo công thức: Tỷ lệ tử vong % = (Số tuyến trùng chết/Tổng số tuyến trùng) \* 100%.

### **2.3.2. Phương pháp định danh vi khuẩn vùng rễ có hoạt tính kháng tuyến trùng cao**

Chủng vi khuẩn vùng rễ có hoạt tính kháng tuyến trùng cao được gửi định danh dựa vào khóa phân loại của Bergey's và phương pháp Bruker Daltonik MALDI tại Trung tâm Khoa học và Công nghệ sinh học - Trường Đại học Khoa học tự nhiên Tp. Hồ Chí Minh.

### **2.3.3. Xác định hoạt tính phân giải phosphate khó tan, cố định nitơ và sinh IAA của chủng vi khuẩn vùng rễ có khả năng kháng tuyến trùng**

Hoạt tính phân giải phosphate khó tan được thực hiện theo phương pháp blue molidate (Olsen và Sommer, 1982), hoạt tính cố định nitơ được thực hiện theo phương pháp Indophenol blue Page và Miler (1982) và hoạt tính sinh IAA được thực hiện theo phương pháp so màu Salkowski (Glicman và Dessaux, 1995).

### **2.3.4. Xác định ảnh hưởng của enzyme protease và chitinase đến tỷ lệ tử vong của tuyến trùng theo thời gian**

Thu nhận enzyme chitinase từ dịch nuôi cấy vi khuẩn bổ sung chitin 1%: Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường lỏng thích hợp có bổ sung chitin 1% ở 30°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút, nuôi cấy trong 5 ngày, sau đó ly tâm dịch nuôi cấy (8000 vòng/10 phút) ở 4°C để loại bỏ vi khuẩn,

thu dịch trong. Dịch này được sử dụng để xác định hoạt tính enzyme chitinase bằng phương pháp định lượng đường khử và đánh giá hoạt tính kháng tuyến trùng.

Thu nhận enzyme protease từ dịch nuôi cấy vi khuẩn bổ sung casein 1%: Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường thích hợp có bổ sung casein 1% không có agar ở 30°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút, nuôi cấy trong 5 ngày, sau đó ly tâm dịch nuôi cấy (8000 vòng/10 phút) ở 4°C để loại bỏ vi khuẩn, thu dịch trong. Xác định hoạt tính enzyme protease theo phương pháp Anson cải biên và đánh giá hoạt tính kháng tuyến trùng.

Thu dịch vi khuẩn có bổ sung tuyến trùng: Vi khuẩn được nuôi trong môi trường LB lỏng, chuyển 1ml dịch vi khuẩn với nồng độ đạt  $10^8$ CFU/ml vào môi trường thích hợp bổ sung tuyến trùng làm cơ chất, lắc 150 vòng/phút ở nhiệt độ phòng. Sau 5 ngày ly tâm 8000 vòng/10 phút ở 4°C, thu dịch. Dịch này được sử dụng để xác định hoạt tính enzyme protease, chitinase và đánh giá hoạt tính kháng tuyến trùng.

Xác định ảnh hưởng của dịch nuôi cấy vi khuẩn có bổ sung tuyến trùng, enzyme protease và chitinase đến tỉ lệ chết của tuyến trùng theo thời gian được tiến hành theo phương pháp của Gao (2016) cải tiến: Hút 200 $\mu$ l dịch vi khuẩn có bổ sung tuyến trùng, chitin, casein sau khi thu nhận vào ống eppendorf 1,5ml chứa 100 $\mu$ l nước cất vô trùng có khoảng 30 tuyến trùng, bổ sung 100 $\mu$ g/ml streptomycine, 100 $\mu$ g/ml chloramphenicol, lắc đều. Ủ 20°C, theo dõi số tuyến trùng chết trong các ống eppendorf ở các thời

điểm 12 giờ, 24 giờ, 48 giờ. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần. Thí nghiệm được tiến hành tương tự với dịch vi khuẩn có bổ sung tuyến trùng, chitin, casein đã bất hoạt bằng nhiệt độ. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần. Đối chứng môi trường: 200 $\mu$ l môi trường nuôi vi khuẩn + 0,1ml nước cất vô trùng chứa khoảng 30 tuyến trùng + 100 $\mu$ g/ml streptomycine + 100 $\mu$ g/ml chloramphenicol. Đối chứng nước: 0,1ml nước cất vô trùng chứa 30 tuyến trùng + 200 $\mu$ l nước cất vô trùng. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần.

### **2.3.5. Xác định ảnh hưởng của enzyme protease và chitinase đến tỉ lệ nở của trứng tuyến trùng theo thời gian**

Hút 200 $\mu$ l dịch vi khuẩn có bổ sung tuyến trùng, chitin, casein sau khi thu nhận vào ống eppendorf 1.5ml chứa 100 $\mu$ l nước cất vô trùng có khoảng 30 trứng tuyến trùng, bổ sung 100 $\mu$ g/ml streptomycine, 100 $\mu$ g/ml chloramphenicol, lắc đều. Ủ 20°C, theo dõi số tuyến trùng chết trong các ống eppendorf ở các thời điểm 12 giờ, 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ. Thí nghiệm được tiến hành tương tự với dịch vi khuẩn có bổ sung tuyến trùng, chitin, casein đã bất hoạt bằng nhiệt độ. Đối chứng môi trường: 200 $\mu$ l môi trường nuôi vi khuẩn + 0,1ml nước cất vô trùng chứa khoảng 30 trứng tuyến trùng + 100 $\mu$ g/ml streptomycine + 100 $\mu$ g/ml chloramphenicol. Đối chứng nước: 0,1ml nước cất vô trùng chứa 30 tuyến trùng + 200 $\mu$ l nước cất vô trùng. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần.

### **2.3.6. Phương pháp xử lý số liệu**

Các số liệu được xử lý thống kê bằng chương trình SAS (Statistical Analysis

Systems) phiên bản 9.1. dùng cho Windows. Sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 0,01 của giá trị được biểu hiện bằng các mẫu tự khác nhau.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Tuyển chọn chủng vi khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu có khả năng kháng tuyến trùng trong điều kiện in vitro

Sau khi sàng lọc sơ bộ từ 72 chủng vi khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu phân lập tại

Gia Lai (bao gồm các huyện Chư Sê, Chư Púh và Đúc Cơ), nghiên cứu đã tuyển chọn được 10 chủng có khả năng kháng tuyến trùng cao bao gồm 6 chủng vi khuẩn vùng rễ tại Chư Sê (RB.CS1, RB.CS6, RB.CS7, RB.CS22, RB.CS25, RB.CS30), 2 chủng vi khuẩn vùng rễ tại Chư Púh (RB.CP9 và RB.CP14) và 2 chủng vi khuẩn vùng rễ tại Đúc Cơ (RB.ĐC12 và RB.ĐC13).

**Bảng 1. Khả năng kháng tuyến trùng của các chủng vi khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu phân lập tại Gia Lai**

| STT | Chủng   | Tỉ lệ tử vong (%)          | STT | Chủng         | Tỉ lệ tử vong (%)          |
|-----|---------|----------------------------|-----|---------------|----------------------------|
| 1   | RB.CS1  | 82,65 <sup>ab</sup> ± 2,67 | 8   | RB.CP14       | 87,38 <sup>ab</sup> ± 3,10 |
| 2   | RB.CS6  | 76,80 <sup>b</sup> ± 9,12  | 9   | RB.ĐC12       | 83,38 <sup>ab</sup> ± 2,18 |
| 3   | RB.CS7  | 81,05 <sup>ab</sup> ± 6,88 | 10  | RB.ĐC13       | 84,11 <sup>ab</sup> ± 1,56 |
| 4   | RB.CS22 | 83,29 <sup>ab</sup> ± 3,59 | 11  | ĐC mt         | 15,93 <sup>c</sup> ± 3,57  |
| 5   | RB.CS25 | 82,79 <sup>ab</sup> ± 5,11 | 12  | ĐC nước       | 7,87 <sup>c</sup> ± 2,47   |
| 6   | RB.CS30 | 88,07 <sup>ab</sup> ± 1,68 |     | <i>P</i>      | **                         |
| 7   | RB.CP9  | 75,87 <sup>b</sup> ± 5,82  |     | <i>CV</i> (%) | 6,23                       |

*Ghi chú:* ĐC: Đối chứng; mt: Môi trường; \*\*: Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức  $p < 0,01$ , các chữ cái giống nhau trên cùng một cột thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm phân hạng Duncan's Multiple Rang Test.

Kết quả bảng 1 cho thấy, tất cả các chủng đều gây tử vong tuyến trùng từ 75,87 - 88,8% sau 24 giờ. Trong đó, hai chủng RB.CS30 và RB.CP14 có hoạt tính kháng tuyến trùng cao với tỉ lệ tử vong tuyến trùng lần lượt đạt 88,08% và 87,38%. Hai chủng này được lựa chọn định danh dựa vào khóa phân loại của Bergey's và phương pháp Bruker Daltonik MALDI với tên khoa học lần lượt là *Bacillus mojavensis* CP14 và *Bacillus cereus* CS30 với mức độ tin cậy cao (Score value lần lượt đạt 1.786 và 2.225). Nghiên cứu của Ann (2013) đã tuyển chọn được hai chủng

vi khuẩn vùng rễ *Bacillus* spp. MPB04 và MPB93 có hoạt tính kháng tuyến trùng tại các vườn trồng hồ tiêu ở Malaysia lần lượt đạt 76,4 và 50,6%, có thể tiêu diệt tuyến trùng trong vòng 2 giờ và phá hủy hoàn toàn tuyến trùng trong vòng 12 giờ. Nghiên cứu của Mekete và cộng sự (2009) khi đánh giá ảnh hưởng của dịch lọc từ vi khuẩn vùng rễ cây cà phê kháng tuyến trùng *Meloidogyne incognita* cho thấy 3 chủng *B. megaterium*, *A. radiobacter* và *C. davisae* tỷ lệ tử vong tuyến trùng đạt 98,3%, 97,3% và 94,6%. Nguyễn Thị Hạnh và cộng sự (2019) tiến hành nghiên

cứu hoạt tính đối kháng tuyến trùng *Meloidogyne incognita* của vi khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu đã ghi nhận 3 chủng vi khuẩn BMT10, BMT11, BMT15 có hoạt tính đối kháng cao với tỷ lệ tử vong của tuyến trùng lần lượt đạt 81,67%, 98,33%, 88,33%.

### 3.2. Hoạt tính phân giải phosphate khó tan, cố định nitơ và sinh IAA của chủng vi khuẩn vùng rễ có khả năng kháng tuyến trùng cao

Vi khuẩn vùng rễ đóng vai trò quan trọng trong đối kháng tuyến trùng gây

bệnh thông qua việc sản xuất các chất điều hòa sinh trưởng thực vật như auxins, cytokines, ethylene, abscisic acid, cải thiện sự hấp thu/sản có chất dinh dưỡng cho cây bằng cách cố định đạm, hòa tan phốt phát, khoáng hóa các hợp chất hữu cơ cũng như tổng hợp siderophore (Mhatre, 2019). Do vậy, xác định hoạt tính phân giải phosphate khó tan, cố định nitơ và sinh IAA được xem là một trong những con đường xác định cơ chế kháng của vi khuẩn vùng rễ đối với tuyến trùng.

**Bảng 2. Hoạt tính tổng hợp phân giải phosphate khó tan, cố định nitơ và sinh IAA của các chủng kháng tuyến trùng**

| Chủng   | Nồng độ $PO_4^{3-}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Nồng độ $NH_4^+$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Nồng độ IAA ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|---------|--|---------------------------------------|----------------------------------|
| RB.CP14 | 0,281                                    | 14,63                                 | 1,723                            |
| RB.CS30 | 0,491                                    | 14,76                                 | 3,241                            |

Kết quả bảng 2 cho thấy, cả hai chủng vi khuẩn đều có khả năng phân giải phosphate khó tan, cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA. Trong đó, chủng RB.CS30 có khả năng phân giải phosphate khó tan và sinh tổng hợp IAA cao gấp 1,75 lần và 1,88 lần so với chủng RB.CP14. Cả hai chủng đều có hoạt tính cố định nitơ tương đồng nhau. Tuy nhiên, hoạt tính phân giải phosphate khó tan, cố định nitơ và sinh IAA của các chủng nghiên cứu khá thấp khi so sánh với các nghiên cứu khác. Dastager (2011) đã nghiên cứu tuyển chọn được chủng 14 vi khuẩn vùng rễ có hoạt tính kích thích sinh trưởng cây hồ tiêu là *Serratia nematodiphila* NII-0928. Chủng này có khả năng phân giải 76,6 $\mu\text{g/ml}$  phosphate khó tan; tổng hợp 58,9 $\mu\text{g/ml}$  IAA. Majeed và cộng sự (2015) cũng đã chứng minh chủng *Stenotrophomonas* sp.

AJK-9 có khả năng tổng hợp IAA với hàm lượng cao (77,98 $\mu\text{g/ml}$ ).

### 3.3. Hoạt tính enzyme protease và chitinase của các chủng vi khuẩn vùng rễ có khả năng kháng tuyến trùng

Tổng hợp enzyme phân giải thành tế bào là một trong những phương pháp kháng trực tiếp của vi khuẩn vùng rễ với tuyến trùng. Các enzyme như protease, chitinase có thể tác động lên da và trứng tuyến trùng. Do đó, nghiên cứu xác định hoạt tính enzyme protease và chitinase nhằm đánh giá tác động của enzyme lên khả năng kháng tuyến trùng. Kết quả bảng 3 cho thấy, cả hai chủng đều có hoạt tính enzyme chitinase và hoạt tính enzyme protease. Tuy nhiên hoạt tính của cả hai enzyme do chủng RB.CS30 tổng hợp cao hơn so với

chủng RB.CP14. Vì thế nghiên cứu tiếp tục đánh giá ảnh hưởng của enzyme protease và chitinase do chủng

RB.CS30 tổng hợp đến tỉ lệ chết của tuyến trùng và tỉ lệ nở của trứng tuyến trùng theo thời gian.

**Bảng 3. Hoạt tính enzyme chitinase và protease của các chủng vi khuẩn vùng rễ có hoạt tính kháng tuyến trùng cao**

| Chủng   | Hàm lượng đường khử trong dịch nuôi cấy (mg/ml) | Hoạt tính chitinase (UI/ml) | Hàm lượng tyrosin trong dịch nuôi cấy (mg/ml) | Hoạt tính protease (UI/ml) |
|---------|---|-----------------------------|---|----------------------------|
| RB.CP14 | 30,04   | 2,00                        | 0,25  | 0,08                       |
| RB.CS30 | 76,35   | 5,09                        | 0,8   | 0,18                       |

### 3.4. Ảnh hưởng của enzyme protease và chitinase đến tỷ lệ chết của tuyến trùng theo thời gian

Để xác định ảnh hưởng của dịch nuôi cấy vi khuẩn RB.CS30 bổ sung tuyến trùng, dịch chứa enzyme protease và dịch chứa enzyme chitinase đến tỉ lệ chết của tuyến trùng theo thời gian, tiến hành theo dõi số tuyến trùng chết tại các thời điểm 12 giờ, 24 giờ, 48 giờ. Kết quả bảng 4 cho thấy, tại thời điểm 12 giờ và 48 giờ,

enzyme protease có thể tác động lên tỷ lệ tử vong của tuyến trùng. Cụ thể, khi không bắt hoạt enzyme, tỉ lệ tử vong tuyến trùng lần lượt đạt 63% và 99,67%, nhưng khi bắt hoạt enzyme tỉ lệ tử vong tuyến trùng giảm lần lượt 1,08 lần và 1,11 lần chỉ còn 58% và 89,67%. Trong khi đó, tại thời điểm 24 giờ có thể có sự tác động của enzyme chitinase lên tỷ lệ tử vong của tuyến trùng đạt lần lượt 89%, dịch bất hoạt còn 86,67%.

**Bảng 4. Ảnh hưởng của enzyme protease và chitinase đến tỷ lệ tử vong của tuyến trùng**

| Thời gian          | 12 giờ             |                    | 24 giờ             |                    | 48 giờ             |                     |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
|                    | KBH                | BH                 | KBH                | BH                 | KBH                | BH                  |
| Dịch VK bổ sung TT | 91,33 <sup>a</sup> | 97,00 <sup>a</sup> | 92,00 <sup>a</sup> | 99,00 <sup>a</sup> | 99,00 <sup>a</sup> | 93,33 <sup>ab</sup> |
| Dịch protease      | 63,00 <sup>a</sup> | 58,00 <sup>c</sup> | 71,67 <sup>b</sup> | 82,00 <sup>b</sup> | 99,67 <sup>a</sup> | 89,67 <sup>b</sup>  |
| Dịch chitinase     | 68,67 <sup>a</sup> | 76,33 <sup>b</sup> | 89,00 <sup>a</sup> | 86,67 <sup>b</sup> | 96,67 <sup>a</sup> | 100,00 <sup>a</sup> |
| Dc nuoc            | 4,33 <sup>b</sup>  | 6,33 <sup>e</sup>  | 7,67 <sup>d</sup>  | 7,33 <sup>d</sup>  | 8,00 <sup>c</sup>  | 8,00 <sup>d</sup>   |
| Dc mt              | 22,00 <sup>b</sup> | 23,00 <sup>d</sup> | 29,67 <sup>c</sup> | 22,67 <sup>c</sup> | 23,67 <sup>d</sup> | 29,33 <sup>c</sup>  |
| <i>P</i>           | **                 | **                 | **                 | **                 | **                 | **                  |
| CV (%)             | 35,51              | 11,03              | 10,50              | 5,38               | 3,14               | 5,31                |

*Ghi chú:* MT: Môi trường, KBH: Không bắt hoạt enzyme, BH: Bắt hoạt enzyme, DC: Đối chứng. \*\*: Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức  $p < 0,01$ , các chữ cái giống nhau trên cùng một cột thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm phân hạng Duncan's Multiple Rang Test.

### 3.5. Ảnh hưởng enzyme protease và chitinase đến tỷ lệ nở của trứng tuyến trùng theo thời gian

Kết quả tỷ lệ nở của trứng tuyến trùng trình bày ở bảng 5 cho thấy, tại thời điểm 24 giờ, dịch vi khuẩn bổ sung tuyến trùng tác động đến tỷ lệ của trứng. Điều này, có thể do enzyme tác động. Cả 4 thời điểm 12 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ đều có sự tác động của enzyme chitinase lên tỷ lệ nở của trứng tuyến trùng. Trong khi đó, enzyme protease chỉ tác động vào thời điểm 24 giờ và 48 giờ. Cụ thể tỷ lệ trứng nở dịch không bất hoạt tại thời điểm, 24

giờ, 48 giờ, lần lượt, đạt 7%, 13,66%, tỷ lệ nở dịch bất hoạt tại thời điểm, 24 giờ, 48 giờ lần lượt đạt 9%, 20% (tăng 1,29, 1,46 lần). Như vậy, chủng RB.CS30 có khả năng tiết enzyme chitinase tác động lên tỷ lệ nở của trứng tuyến trùng tại cả 4 thời điểm khảo sát, enzyme protease tác động vào thời điểm 24 giờ và 48 giờ. Jung *et al.* (2002) cũng đã chứng minh, vi khuẩn *Paenibacillus illinoisensis* KJA-424 tổng hợp enzyme chitinase làm thay đổi hình dạng và gây vỡ trứng tuyến trùng *M. incognita* sau 48 giờ.

**Bảng 5. Ảnh hưởng enzyme protease và chitinase đến tỷ lệ nở của trứng tuyến trùng**

| Thời gian          | 12 giờ             |                     | 24 giờ             |                    | 48 giờ              |                    | 72 giờ             |                    |
|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                    | KBH                | BH                  | KBH                | BH                 | KBH                 | BH                 | KBH                | BH                 |
| Dịch VK bổ sung TT | 0,00 <sup>c</sup>  | 0,00 <sup>c</sup>   | 1,00 <sup>d</sup>  | 7,33 <sup>d</sup>  | 11,33 <sup>bc</sup> | 7,67 <sup>c</sup>  | 11,67 <sup>b</sup> | 8,67 <sup>c</sup>  |
| Dịch protease      | 2,00 <sup>bc</sup> | 0,00 <sup>c</sup>   | 7,00 <sup>c</sup>  | 9,00 <sup>d</sup>  | 8,00 <sup>c</sup>   | 13,67 <sup>c</sup> | 20,00 <sup>b</sup> | 5,33 <sup>c</sup>  |
| Dịch chitinase     | 7,00 <sup>b</sup>  | 16,67 <sup>c</sup>  | 11,67 <sup>c</sup> | 19,33 <sup>c</sup> | 17,67 <sup>b</sup>  | 21,33 <sup>b</sup> | 24,33 <sup>b</sup> | 24,67 <sup>b</sup> |
| Dc nuoc            | 22,67 <sup>a</sup> | 2,67 <sup>a</sup>   | 61,33 <sup>a</sup> | 61,33 <sup>a</sup> | 77,67 <sup>a</sup>  | 73,67 <sup>a</sup> | 87,67 <sup>a</sup> | 87,67 <sup>a</sup> |
| Dc mt              | 20,00 <sup>a</sup> | 20,00 <sup>ab</sup> | 39,67 <sup>b</sup> | 39,67 <sup>b</sup> | 82,00 <sup>a</sup>  | 82,00 <sup>a</sup> | 88,00 <sup>a</sup> | 88,00 <sup>a</sup> |
| <i>P</i>           | **                 | **                  | **                 | **                 | **                  | **                 | **                 | **                 |
| <i>CV</i> (%)      | 20,68              | 17,16               | 8,22               | 6,46               | 6,09                | 5,99               | 11,26              | 7,25               |

*Ghi chú:* MT: Môi trường, KBH: Không bất hoạt enzyme, BH: Bất hoạt enzyme; ĐC: Đối chứng. \*\*: Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức  $p < 0,01$ , các chữ cái giống nhau trên cùng một cột thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm phân hạng Duncan's Multiple Rang Test.

## 4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã tuyển chọn được chủng vi khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu RB.CS30 và RB.CP14 có khả năng kháng tuyến trùng cao trong điều kiện *in vitro* với tỉ lệ tử vong lần lượt 94,67% và 87,33%. Hai chủng này được định danh với tên khoa học *Bacillus mojavensis* RB.CP14 và *Bacillus cereus* RB.CS30 bằng phương pháp Bergey's Manual of Determinative Bacteriology và Bruker Daltonik MALDI.

Cả hai chủng đều có khả năng phân giải phosphate khó tan, cố định đạm và tổng hợp IAA. Enzyme protease do chủng RB.CS30 tổng hợp tác động của lên tỷ lệ tử vong của tuyến trùng tại thời điểm 12 giờ và 48 giờ, enzyme chitinase tác động tại thời điểm 24 giờ. Tuy nhiên, enzyme chitinase thu nhận từ chủng RB.CS30 đều tác động lên tỉ lệ nở của trứng tuyến trùng tại cả 4 thời điểm khảo sát, enzyme protease chỉ tác động vào thời điểm 24 giờ và 48 giờ.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cục Trồng trọt - Bộ Nông nghiệp và phát triển Nông thôn, 2020. Báo cáo thực trạng sản xuất và định hướng phát triển cây Hồ tiêu tại các tỉnh trồng tiêu trọng điểm: Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông, Bình Phước, Đồng Nai, Bà Rịa - Vũng Tàu.
2. Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn tỉnh Gia Lai, 2021. Báo cáo tình hình sản xuất hồ tiêu giai đoạn 2018 - 2021.
3. Trần Thị Thu Hà, Nguyễn Tăng Tôn, 2011. Nghiên cứu thành phần và mật số tuyến trùng gây hại trên cây hồ tiêu tại Cam Lộ, Quảng Trị. Tạp chí Khoa học, Đại học Huế, Số 67(4).
4. Ann, Y. C., 2013. Screening for nematicidal activities of *Bacillus* species against root knot nematode (*Meloidogyne incognita*). Am J Exp Agric, 3, 794 - 805..
5. Basyony, A. G., & Abo-Zaid, G. A., 2018. Biocontrol of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, using an eco-friendly formulation from *Bacillus subtilis*, lab. and greenhouse studies. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 28(1), 87.
6. Dastager, S. G., Deepa, C. K., & 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.
7. Jung, W. J., Jung, S. J., An, K. N., Jin, Y. L., Park, R. D., Kim, K. Y.,... & Kim, T. H., 2002. Effect of chitinase-producing *Paenibacillus illinoisensis* KJA-424 on egg hatching of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). Journal of microbiology and biotechnology, 12(6), 865 - 871.
8. Kaushal, M., 2017. Rhizobacterial Efficacy for Sustainable Crop Productivity in Agroecosystems. In: Microbes and Sustainable Agriculture. IK International Publishing House, New Delhi, pp. 50 - 61. ISBN 9789385909481.
9. Majeed, A., Abbasi, M. K., Hameed, S., Imran, A., & Rahim, N., 2015. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. Frontiers in microbiology, 6, 198.
10. Mekete, T., Hallmann, J., Kiewnick, S., & Sikora, R., 2009. Endophytic bacteria from Ethiopian coffee plants and their potential to antagonise *Meloidogyne incognita*. Nematology, 2009, 11(1), 117 - 127.
11. Mhatre, P. H., Karthik, C., Kadirvelu, K., Divya, K. L., Venkatasalam, E. P., Srinivasan, S.,... & Shanmuganathan, R., 2019. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A potential alternative tool for nematodes bio-control. Biocatalysis and agricultural biotechnology, 17, 119 - 128.
12. Nguyễn Thị Hạnh, Nguyễn Văn Nam và Nguyễn Văn Bốn, 2019. Tuyển chọn một số chủng vi khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu có hoạt tính đối kháng tuyến trùng *Meloidogyne incognita* tại Buôn Ma Thuột. Tạp chí Khoa Học Trường đại học Tây Nguyên, 2019, số 34, 25 - 31.
13. Phong Vũ Nguyễn, Phong Thanh Nguyễn, Oanh Thu Thị Võ, Đôn Đình Kê, 2020. A report of *Meloidogyne javanica* on black pepper (*Piper nigrum*) in Binh Phuoc province, Vietnam. Australasian Plant Disease Notes, 15(1), 1 - 4.
14. Stirling, G. R., 2011. Biological control of plant-parasitic nematodes: an ecological perspective, a review of progress and opportunities for further research. Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes:, 1 - 38.
15. Thuy T, Yen N, Tuyet N, Te L, De Waele D., 2012. Plant-parasitic nematodes and yellowing of leaves associated with black pepper plants in Vietnam. Arch Phytopathol Plant Protect. 45 (10): 1183 - s1200.

## ABSTRACT

### **Selection of rhizobacterial strains of black pepper plant (*Piper nigrum* L.) with resistance ability against nematodes in Gia Lai province**

Nowaday, pepper cultivation in Gia Lai has been facing to many challenges, including the slow decline disease caused by the root - knoot nematode (*Meloidogyne* sp.). From the 72 rhizobacterial strains isolated in Gia Lai province, two strains, including RB.CP14 and RB.CS30 were highly antinematodes strains with the J2 nematode mortality rate of 94,67%, and 87,33%, respectively. These potent strains were identified as *Bacillus mojavensis* RB.CP14 and *Bacillus cereus* RB.CS30 by Bergey's Manual of Determinative Bacteriology and Bruker Daltonik MALDI methods. All rhizobacterial strains also were subjected for functional characterization by fixing nitrogen, dissolving phosphates, producing IAA. Protease enzyme obtained from the strain RB.CS30 had an effect on J2 nematode mortality at 12h and 48h after treatment while chitinase enzyme impacted on nematode mortality at 24h. However, RB.CS30 chitinase affected the hatching rate of nematode eggs at all the tested time and RB.CS30 protease impacted on nematode mortality at 24h, 48h.

**Keywords:** black pepper, nematode, rhizobacteria, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus cereus*.

## NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM BỆNH HÉO XANH VI KHUẨN TRÊN HOA CÚC TẠI MÊ LINH, HÀ NỘI

La Việt Hồng<sup>1,2\*</sup>, Ong Xuân Phong<sup>1</sup>, Dương Tiến Viện<sup>1,2</sup>,  
Ngô Thị Thương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thu Hiền<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Thiệp<sup>3</sup>,  
Chu Đức Hà<sup>4</sup>, Nguyễn Thị Lệ Thùy<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu Khoa học và Ứng dụng, Trường ĐHSP Hà Nội 2

<sup>2</sup> Khoa Sinh-KTNN, Trường ĐHSP Hà Nội 2

<sup>3</sup> Viện Khoa học Kỹ thuật Nông lâm nghiệp Miền núi phía Bắc

<sup>4</sup> Khoa Công nghệ Nông nghiệp, Trường ĐH Công nghệ-ĐHQG Hà Nội

<sup>5</sup> Trường Cao đẳng Công thương Việt Nam

### TÓM TẮT

*Hoa cúc là một loại hoa được trồng phổ biến ở nước ta vì chúng có đặc điểm dễ trồng, hoa có nhiều màu sắc. Tuy nhiên, quá trình trồng hoa cúc thường gặp tình trạng héo xanh. Qua khảo sát 10 giống hoa cúc trồng ở 3 thời vụ thấy các giống trồng ở thời vụ chính nhiễm bệnh ít hơn trồng trái vụ; trồng bằng cây giống nhân bằng nuôi cấy mô có tỉ lệ nhiễm bệnh ít hơn so với cây giống giâm cành truyền thống. Quan sát ảnh chụp các bộ phận lá, thân cắt dọc, thân cắt ngang và bộ rễ thấy các cây bị bệnh có rễ và thân đen, một phần mạch dẫn trong thân bị đen dẫn đến hiện tượng héo ở lá. Bước đầu phân lập các dòng vi khuẩn gây bệnh đã thu được 2 dòng vi khuẩn có màu vàng chanh và màu trắng sữa.*

**Từ khóa:** Cây hoa cúc, héo xanh, rễ đen, vi khuẩn.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoa cúc là một trong những loại hoa được ưa chuộng và trồng phổ biến trên thế giới bởi hoa nhiều màu sắc đẹp, giá trị thẩm mỹ cao, lại có đặc tính dễ trồng và dễ nhân giống. Hoa cúc thích hợp trồng ở khắp nơi như ở ngoài đồng ruộng, trong vườn, trong chậu, ngoài ra cây có thể trồng nhiều thời vụ trong năm. Ở nước ta, hoa cúc được trồng rất phổ biến để phục vụ tiêu thụ trong nước và xuất khẩu. Hoa cúc còn có hương thơm nhẹ và bền lâu.

Việc bảo quản, vận chuyển dễ dàng để tiêu thụ ở nơi xa, các đặc tính này không phải bất cứ loài hoa nào cũng có. Vì vậy mà hoa cúc đặc biệt hấp dẫn các nhà sản xuất và kinh doanh hoa.

Vùng trồng hoa Mê Linh, Hà Nội từ lâu đã nổi tiếng với nghề trồng hoa với nhiều chủng loại hoa và hoa cúc là đối tượng được trồng phổ biến, đã mang lại hiệu quả kinh tế cao giúp nhiều gia đình làm giàu, đồng thời cung cấp sản phẩm hoa tươi tại chỗ cho người dân. Tuy nhiên, hầu hết các vườn trồng cúc hiện nay nhiễm

Người phân biên: TS. Hà Minh Thanh

một số bệnh làm giảm năng suất, chất lượng hoa, đặc biệt bệnh héo xanh gây hại làm chết cây gây thiệt hại cho người sản xuất. Trong phạm vi bài viết này, chúng tôi trình bày một số kết quả nghiên cứu về bệnh héo xanh vi khuẩn trên hoa cúc tại vùng Mê Linh, Hà Nội.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

10 giống cúc thương phẩm được trồng phổ biến tại Mê Linh, Hà Nội. Cây cấy mô được nhân giống và trồng sản xuất bởi Công ty TNHH Vật tư và Giống hoa Xuân Trường (Mê Linh, Hà Nội).

### 2.2. Thời gian

Thời gian nghiên cứu tiến hành trên 3 vụ: Vụ đông, vụ xuân và vụ hè kéo dài từ tháng 11 năm 2021 đến tháng 6 năm 2022.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp điều tra bệnh theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về phương pháp

điều tra phát hiện dịch hại cây trồng (QCVN 01-38: 2010/BNNPTNT).

Cắt, bỏ mẫu thân, lá, rễ để quan sát ảnh hưởng của bệnh tới các bộ phận của cây hoa cúc và nguyên nhân gây bệnh héo toàn thân theo Lester W.B. (Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam, 2009).

Phân lập vi khuẩn gây bệnh trên môi trường thạch đĩa theo Mai Thị Hằng (2011): Mẫu bệnh thu được đem khử trùng sạch rồi ngâm trong nước cất khử trùng thu dịch vi khuẩn trong 24 giờ. Hút 300µl dịch vi khuẩn trang trên môi trường thạch đĩa và để trong tủ ấm 37 độ trong 48 giờ để theo dõi sự phát triển của vi khuẩn.

Lây bệnh nhân tạo theo quy tắc Koch.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Điều tra bệnh héo xanh

Đã tiến hành khảo sát bệnh héo xanh vi khuẩn trên 10 giống cúc trồng tại vùng hoa Mê Linh, Hà Nội, kết quả điều tra được thể hiện qua bảng 1.

**Bảng 1. Tình trạng bệnh héo xanh vi khuẩn gây hại trên một số giống hoa cúc trồng vụ đông 2021**

| STT | Tên giống     | Cây giống từ nuôi cấy mô |                 | Cây giống từ giâm cành |                 |
|-----|---------------|--------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|
|     |               | Tỷ lệ bệnh (%)           | Mức độ phổ biến | Tỷ lệ bệnh (%)         | Mức độ phổ biến |
| 1   | Vàng tàu      | 5,10                     | +               | 12,50                  | ++              |
| 2   | Pha lê        | 5,12                     | +               | 15,10                  | ++              |
| 3   | Trắng mới     | 5,08                     | +               | 16,45                  | ++              |
| 4   | Vàng đồng     | 5,00                     | +               | 7,51                   | +               |
| 5   | Vàng cánh dài | 5,15                     | +               | 14,10                  | ++              |
| 6   | Trắng tuyết   | 7,05                     | +               | 7,52                   | +               |
| 7   | Kim cương     | 2,55                     | +               | 5,10                   | +               |
| 8   | Đỏ lơ         | 7,50                     | +               | 16,50                  | ++              |
| 9   | Trắng hè      | 7,45                     | +               | 16,65                  | ++              |
| 10  | Cúc họa mi    | 7,50                     | +               | 20,00                  | ++              |

Ghi chú: Mức độ phổ biến: +: TLB < 10%, ++: TLB 11 - 30%, +++: TLB > 30%.

Trong vụ đông, các giống hoa cúc vàng tàu, pha lê, trắng mới, vàng cánh dài, đỏ lơ, trắng hè và cúc họa mi được nhân giống bằng phương pháp nuôi cây mô có tỷ lệ bệnh hại thấp hơn cây giống được nhân bằng phương pháp giâm

cành. Các giống Vàng đông, Trắng tuyết và Kim cương nhiễm bệnh héo xanh ít hơn các giống khác cùng nhân bằng giâm cành.

Kết quả điều tra trong vụ xuân 2022 được thể hiện qua bảng 2.

**Bảng 2. Tình trạng bệnh héo xanh vi khuẩn gây hại trên một số giống hoa cúc trồng vụ xuân 2022**

| STT | Tên giống     | Cây giống từ nuôi cây mô |                 | Cây giống từ giâm cành |                 |
|-----|---------------|--------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|
|     |               | Tỷ lệ bệnh (%)           | Mức độ phổ biến | Tỷ lệ bệnh (%)         | Mức độ phổ biến |
| 1   | Vàng tàu      | 12,50                    | ++              | 14,25                  | ++              |
| 2   | Pha lê        | 7,50                     | +               | 16,20                  | ++              |
| 3   | Trắng mới     | 7,45                     | +               | 17,55                  | ++              |
| 4   | Vàng đông     | 5,10                     | +               | 11,06                  | ++              |
| 5   | Vàng cánh dài | 15,00                    | ++              | 16,00                  | ++              |
| 6   | Trắng tuyết   | 17,50                    | ++              | 8,75                   | ++              |
| 7   | Kim cương     | 5,52                     | +               | 7,50                   | +               |
| 8   | Đỏ lơ         | 7,50                     | +               | 16,52                  | ++              |
| 9   | Trắng hè      | 8,50                     | +               | 15,65                  | ++              |
| 10  | Cúc họa mi    | 7,50                     | +               | 21,50                  | ++              |

Ghi chú: Mức độ phổ biến: +: TLB < 10%, ++: TLB 11 - 30%, +++: TLB > 30%.

Hoa cúc trồng vụ xuân 2022, các giống vàng tàu, vàng cánh dài, trắng tuyết cây giống từ nuôi cây mô và giâm cành có mức độ nhiễm bệnh héo xanh tương đương. Các giống cúc pha lê, trắng mới,

vàng đông, kim cương, đỏ lơ, trắng hè và cúc họa mi nhân giống bằng nuôi cây mô có mức độ nhiễm bệnh nhẹ hơn cây giống bằng giâm cành.

**Bảng 3. Tình trạng bệnh héo xanh vi khuẩn gây hại trên một số giống hoa cúc trồng vụ hè 2022**

| STT | Tên giống     | Cây giống từ nuôi cây mô |                 | Cây giống từ giâm cành |                 |
|-----|---------------|--------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|
|     |               | Tỷ lệ bệnh (%)           | Mức độ phổ biến | Tỷ lệ bệnh (%)         | Mức độ phổ biến |
| 1   | Vàng tàu      | 15,00                    | ++              | 16,52                  | ++              |
| 2   | Pha lê        | 8,65                     | +               | 18,72                  | ++              |
| 3   | Trắng mới     | 12,54                    | ++              | 19,58                  | ++              |
| 4   | Vàng đông     | 12,55                    | ++              | 14,85                  | ++              |
| 5   | Vàng cánh dài | 17,09                    | ++              | 19,00                  | ++              |
| 6   | Trắng tuyết   | 18,50                    | ++              | 21,05                  | ++              |
| 7   | Kim cương     | 8,65                     | +               | 12,50                  | ++              |
| 8   | Đỏ lơ         | 16,58                    | ++              | 20,18                  | ++              |
| 9   | Trắng hè      | 9,64                     | +               | 18,65                  | ++              |
| 10  | Cúc họa mi    | 9,25                     | +               | 22,45                  | ++              |

Ghi chú: Mức độ phổ biến: +: TLB < 10%, ++: TLB 11 - 30%, +++: TLB > 30%.

Trong các giống hoa cúc trồng vụ hè, chỉ có giống pha lê, trắng hè và cúc họa mi nguồn giống từ nuôi cấy mô nhiễm bệnh héo xanh nhẹ hơn cây giống từ giâm cành, các giống còn lại đều nhiễm bệnh héo xanh ở tương đương nhau. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Kim Vân (2006) trên hoa cúc trồng vụ hè thu năm 2005 tại vùng hoa Tây Tựu, Hà Nội.

Qua điều tra thống kê ở 3 vụ trồng hoa cúc, nhận thấy cây giống hoa cúc được nhân giống bằng nuôi cấy mô có mức độ nhiễm bệnh héo xanh nhẹ hơn các cây giống nhân từ phương pháp giâm cành truyền thống.

Các giống trồng ở các mùa vụ khác nhau bệnh héo xanh gây hại ở mức độ khác nhau. Cùng một giống hoa cúc nhưng trồng ở vụ hè có tỷ lệ bệnh héo xanh cao hơn vụ xuân và vụ đông. Các giống vàng tàu, vàng cánh dài, trắng tuyết trồng ở vụ xuân có tỷ lệ nhiễm bệnh tương đương vụ hè. Đây cũng là điều chú ý chúng ta nên chọn các giống chính vụ trồng thì sẽ giảm thiểu được tác hại gây bệnh.

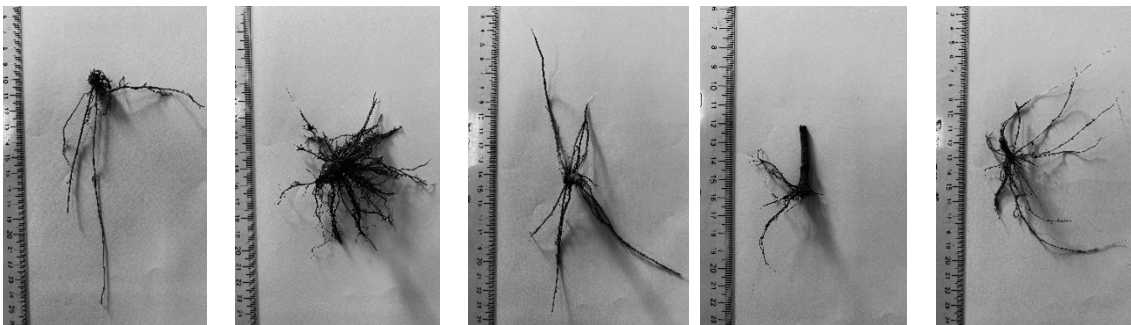
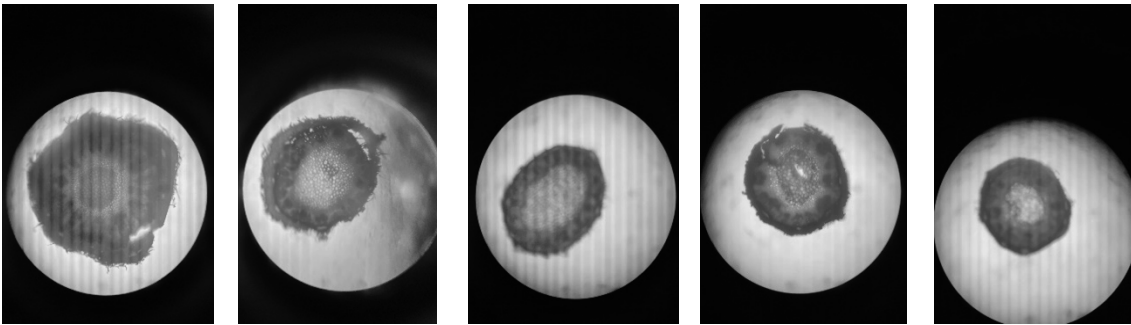
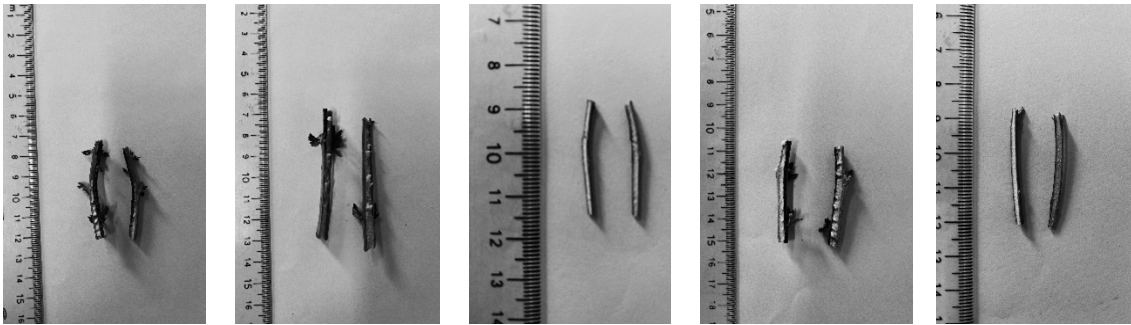
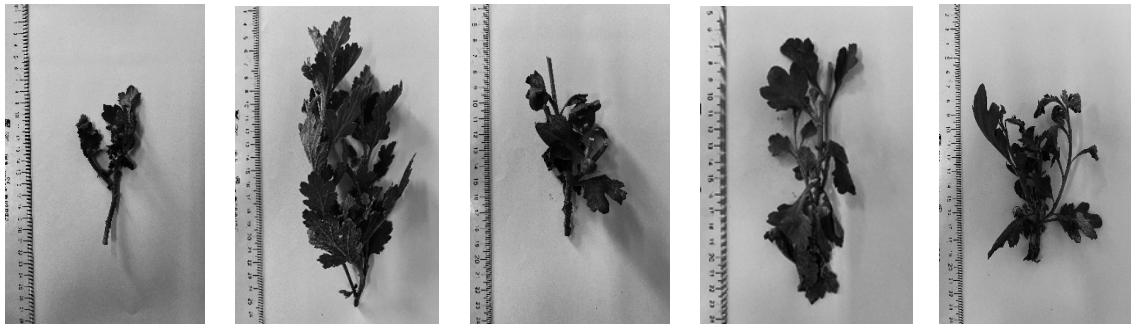
### 3.2. Đặc điểm bệnh héo xanh vi khuẩn

Trên hoa cúc có một số loại bệnh phổ biến như: Bệnh đốm đen (trên lá vết bệnh lúc đầu là những chấm nhỏ màu nâu đen, về sau vết bệnh lớn lên thành những đốm tròn hoặc bầu dục, đường kính 5 - 10mm); bệnh đốm nâu (vết bệnh thường lan từ mép lá vào trong

phiến lá, hình tròn hoặc hình bán nguyệt, hình bất định màu nâu xám hoặc nâu đen); bệnh đốm vàng (vết bệnh hình tròn hoặc hình bất định, màu xám nâu hoặc xám đen, vết bệnh thường lan từ mép lá, chót lá vào trong phiến lá, xung quanh có quầng vàng rộng); bệnh héo vàng (vết bệnh xuất hiện ở phía gốc thân, tạo thành các vết màu nâu đen, biểu bì chỗ vết bệnh hơi phình lên sau đó nứt ra, khi ẩm ướt chỗ vết nứt có lớp sợi nấm màu trắng); bệnh gỉ sắt (vết bệnh dạng ổ nổi màu trắng hoặc màu vàng nhạt, hình thái bất định, thường xuất hiện ở cả 2 mặt lá). Trong nghiên cứu này chỉ tập trung điều tra, khảo sát bệnh héo xanh vi khuẩn.

Bệnh héo xanh vi khuẩn là loại bệnh phổ biến và nguy hiểm đối với cây hoa cúc, bệnh làm chết cây hàng loạt. Vi khuẩn tồn tại trong đất, tàn dư cây trồng trên đồng ruộng, lan truyền theo nước tưới xâm nhập vào cây qua các vết thương và di chuyển vào trong bó mạch. Bệnh thường xảy ra vào thời kỳ cây đang tăng trưởng đến khi hình thành nụ. Biểu hiện ban đầu là các lá ngọn héo xanh rũ xuống, sau 1, 2 ngày các lá phía gốc tiếp tục héo xanh rũ xuống, cuối cùng dẫn tới toàn cây héo rũ tái xanh, gãy gục và chết. Cây héo đột ngột nhưng lá vẫn còn xanh.

Cắt ngang thân thấy mô mạch phần gốc thân hóa nâu, những đoạn thân vào cốc nước cắt thấy dịch nhầy trắng đục tiết ra.



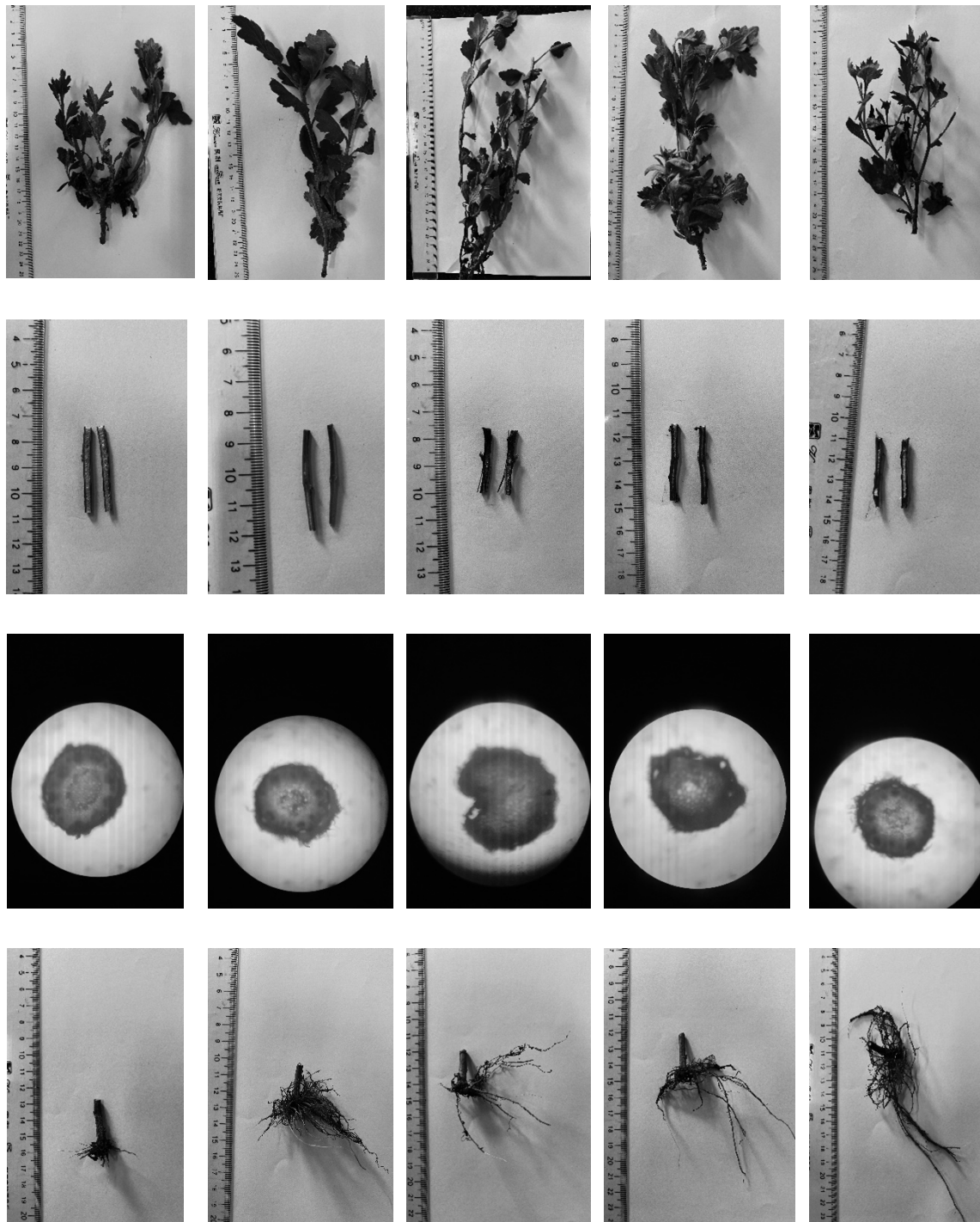
Vàng tàu

Pha lê

Trắng mới

Vàng đông

Vàng cánh dài



Tráng tuyết

Kim cương

Đở lờ

Tráng hè

Cúc họa mi

**Hình 1. Biểu hiện bệnh héo xanh vi khuẩn của một số giống hoa cúc trồng tại Mê Linh, Hà Nội**

Nguyên nhân gây bệnh héo xanh chủ yếu do các loại vi khuẩn gây ra. Các mẫu bệnh héo xanh do vi khuẩn được chụp ảnh lá, chẻ dọc thân, cắt ngang thân, rẽ thấy thân, rẽ có màu nâu đen và bắt đầu có biểu hiện thối. Qua ảnh chụp đoạn thân cắt dọc và cắt ngang ta thấy các cây bị bệnh có biểu hiện các mao mạch bị nâu đen, dẫn đến không vận chuyển được nước qua thân nên cây có hiện tượng héo rũ rồi lại tươi và sau đó cây chết nhưng lá vẫn xanh (hình 1).

Bệnh héo xanh vi khuẩn đã làm ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng của hoa cúc chính vì vậy mà chúng ta phải phòng ngừa và ngăn chặn sự phát tán của vi khuẩn gây bệnh.

### 3.3. Bước đầu phân lập vi khuẩn gây bệnh

Để xác định vi khuẩn gây bệnh héo xanh, tiến hành phân lập trên môi trường thạch đĩa. Kết quả ban đầu được hai dòng vi khuẩn có màu sắc khác nhau thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Kết quả phân lập chủng vi khuẩn gây bệnh héo xanh ở cây hoa cúc

Sau khi cấy dịch vi khuẩn 48 giờ, quan sát trên môi trường thạch đĩa thấy mọc lên 2 dòng tế bào vi khuẩn là dòng màu vàng chanh và dòng màu trắng sữa. Đây mới là kết quả bước đầu để có những khuyến cáo cụ thể thì cần các phân tích sâu hơn và định danh loại vi khuẩn để xem các đặc điểm, đặc tính của chúng.

## 4. KẾT LUẬN

Qua kết quả điều tra bệnh hại trên 10 giống hoa cúc ở 3 vụ khác nhau thấy tỉ lệ nhiễm bệnh các giống là khác nhau ở mùa vụ: những giống trồng chính vụ tính

kháng bệnh tốt hơn những giống trái vụ. Những cây giống từ nuôi cấy mô chống chịu bệnh tốt hơn cây giống giâm cành theo phương pháp truyền thống.

Quan sát lát cắt dọc, lát cắt ngang, rẽ và lá thấy tất cả những cây bị bệnh rẽ đều chuyển màu đen, thân bị đen ở ngoài, một phần bao bó mạch bị đen. Những biến đổi này đã gây ra hiện tượng héo lá trên cây hoa cúc.

Bước đầu phân lập các dòng vi khuẩn gây bệnh bệnh héo xanh hoa cúc ở vùng Mê Linh được hai dòng vi khuẩn màu trắng sữa và màu vàng chanh.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2010. QCVN 01 - 38 : 2010/BNNPTNT Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về phương pháp điều tra phát hiện dịch hại cây trồng.
2. Lester W. Burgess, Timothy E. Knight, Len Tesoriero, Phan Thúy Hiền, 2009. Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam, Chuyên khảo ACIAR số 129a, 210 pp. ACIAR: Canberra.
3. Mai Thị Hằng, Đinh Thị Kim Nhung, Vương Trọng Hào, 2011. Thực hành vi sinh vật học, Nxb Đại học Sư phạm, Hà Nội.
4. Nguyễn Kim Vân, 2006. Bệnh hại hoa lan, hồng, cúc tại vùng Hà Nội và vùng phụ cận năm 2005, *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, số 4, 2006, tr24 -28.

## ABSTRACT

*Chrysanthemums are a popular flower grown in our country because of their easy-to-grow characteristics and colorful flowers. However, the process of growing chrysanthemums often suffers from wilting and wilting. Through a survey of 10 varieties of chrysanthemums grown in 3 crops, it was found that the varieties grown in the main crop were less infected than those grown in the extra crop; plants grown with seedlings propagated by tissue culture have a lower infection rate than traditional cuttings. Observation of photographs of leaf parts, longitudinal stem, transverse stem and root system showed that diseased plants had black roots and stems, part of the blood vessels in the stem was black leading to leaf wilting. Initial isolation of pathogenic bacteria strains has obtained 2 strains of lemon yellow and milky white.*

**Keywords:** *Bacteria, Black root, Chrysanthemums, leaf wilting.*

# ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÒNG TRỪ CỦA XẠ KHUẨN *Actinomycetes* ĐỐI VỚI VI KHUẨN *Erwinia* sp. GÂY BỆNH THỐI GỐC LÚA TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI

Trần Thị Nam Lý<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Phong Lan<sup>1</sup>,  
Nguyễn Đức Cường<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long

\* Tác giả liên hệ: TS. Nguyễn Đức Cường - cuongomon@yahoo.com  
Trần Thị Nam Lý - lytranclrri@gmail.com

## TÓM TẮT

*Biện pháp phòng trừ sinh học là một trong những biện pháp đem lại hiệu quả kinh tế, giảm thiểu tính kháng thuốc hóa học và không ảnh hưởng đến môi trường. Sử dụng xạ khuẩn (Actinomycetes) để phòng trừ là một trong những biện pháp đã được nhiều nghiên cứu đề cập đến. Nghiên cứu này đã tiến hành thu thập, phân lập và đánh giá khả năng phòng trừ của xạ khuẩn Actinomycetes đối với vi khuẩn Erwinia sp trong điều kiện nhà lưới. Trong tổng số 290 chủng xạ khuẩn được phân lập từ đất vùng rễ cây lúa có 20 chủng thể hiện khả năng đối kháng vi khuẩn Erwinia sp. Kết quả đánh giá sơ khởi trong phòng thí nghiệm đã xác định năm chủng (AC.CT-274, AC.CT-260, AC.CT-154, AC.CT-72 và AC.CT-61) có khả năng đối kháng cao với vi khuẩn Erwinia sp. Kết quả thí nghiệm về khả năng phòng trừ vi khuẩn Erwinia sp. gây bệnh thối gốc lúa của xạ khuẩn đã ghi nhận ba chủng xạ khuẩn (AC.CT-274, AC.CT-260 và AC.CT-154) đều thể hiện khả năng phòng trừ bệnh thối gốc lúa cao, trong đó chủng xạ khuẩn AC.CT-274 có hiệu quả phòng trừ cao nhất.*

**Từ khóa:** Bệnh thối gốc lúa, *Erwinia* sp., Phòng trừ sinh học và Xạ khuẩn

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh thối gốc lúa (thối thân lúa) do vi khuẩn *Erwinia* sp. gây ra thường xuất hiện và gây hại vào giai đoạn đầu của cây lúa. Bệnh gây hại nghiêm trọng khi trên ruộng bị nhiễm đồng thời với ngộ độc hữu cơ, nhiễm phèn, nhiễm mặn và nhiễm

bệnh đạo ôn lá. Bệnh thường xuất hiện và gây hại nặng vào vụ hè thu và thu đông hàng năm tại vùng đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) (Phạm Văn Kim, 2015; Phùng Thị Thanh Thảo, 2014).

Lợi ích trong việc sử dụng biện pháp sinh học để phòng trị bệnh gây hại cho cây trồng ngày càng được xác định rõ. Sử dụng biện pháp sinh học không những có

---

Người phân biên: TS. Nguyễn Thị Ngọc Trúc

hiệu quả phòng trừ bệnh cây trồng mà còn hướng tới nền nông nghiệp sạch, an toàn cho môi trường và động vật sống xung quanh. Tiềm năng sử dụng vi sinh vật vùng rẫy trong đó có xạ khuẩn để thay thế thuốc diệt vi khuẩn đã được nhiều tác giả đề cập đến. Một trong những vi sinh vật sử dụng để phòng trừ bệnh cây trồng đang được nghiên cứu và ứng dụng khá phổ biến là nhóm xạ khuẩn (Shahidi Bonjar *et al.*, 2006).

Xạ khuẩn *Actinomyces* chiếm hầu hết trong tổng số nhóm vi sinh vật được phân tán trong tự nhiên. *Actinomyces* được tìm thấy nhiều trong đất vùng rẫy, có khả năng sinh sản tạo ra một khối lượng lớn vi sinh vật trong đất và có khả năng tạo ra các chủng loại kháng sinh cũng như các enzyme phân giải. Một vài chủng *Actinomyces* đã được tìm thấy có khả năng bảo vệ cây trồng chống lại mầm bệnh (Doubou *et al.*, 2001). Tại Malaysia nhóm xạ khuẩn *Actinomycetes* chứa khoảng 70% chất kháng sinh, enzyme và các hợp chất sinh học khác. Trong đó chi *Streptomyces* thì phổ biến được tìm thấy trong đất, trong sự tương tác giữa các vi sinh vật sống và môi trường tự nhiên (Sahilah *et al.*, 2010).

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Nguồn vi khuẩn *Erwinia* sp. trong thí nghiệm được sử dụng là nguồn có độc tính mạnh (E.AG-02), được thu thập tại tỉnh An Giang.

- Mẫu đất để phân lập xạ khuẩn được thu thập tại 2 tỉnh An Giang, Sóc Trăng và Thành phố Cần Thơ.

- Các môi trường nuôi cấy vi sinh vật gồm: Môi trường Yeast extract - peptone - agar (YP) (Goto & Matsumoto, 1987); môi trường Starch casein agar (SCA) (Williams & Kuster, 1964); môi trường Glycerol yeast extract agar (Waksman, 1961); môi trường King B (Atlas, 2004).

- Giống lúa Jasmine85 và các vật dụng cần thiết phục vụ cho thí nghiệm.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Thu thập, phân lập và đánh giá khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn vùng rẫy, với vi khuẩn *Erwinia* sp. trong điều kiện phòng thí nghiệm

##### 2.2.1.1. Thu thập và phân lập các chủng xạ khuẩn vùng rẫy trong điều kiện phòng thí nghiệm

Các chủng xạ khuẩn được phân lập từ các mẫu đất theo phương pháp của Adegbeye *et al.*, (2012) có cải tiến.

- Phân lập xạ khuẩn:

+ Cân 1g đất vào 9ml nước muối 0.85% vô trùng, tiến hành lắc trong vòng 1 giờ trên máy lắc ngang với tốc độ 220 vòng/phút.

+ Sử dụng pipette rút 1000 $\mu$ l dịch trích pha loãng với 9ml nước muối 0,85% đã thanh trùng, tiếp tục pha loãng tới nồng độ  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ .

+ Rút 50 $\mu$ l dịch trích đã pha loãng ở các nồng độ trên và trải lên bề mặt môi trường SCA, sử dụng đũa chà vi khuẩn

trải đều dung dịch trên bề mặt môi trường SCA, ủ đĩa petri ở nhiệt độ 28°C trong 4 ngày.

+ Quan sát khuẩn lạc xạ khuẩn phát triển trên môi trường SCA và tiến hành tách rỗng xạ khuẩn.

- Đặt tên các mẫu xạ khuẩn:

Các chủng xạ khuẩn sau khi phân lập được đặt tên theo trình tự: (1) Chữ viết tắt của xạ khuẩn (AC - *Actinomycetes*), (2) địa điểm thu mẫu (hai tỉnh An Giang, Sóc Trăng và Thành phố Cần Thơ) và (3) mã số mẫu (số thứ tự mẫu đất được phân lập từ mẫu đã thu thập).

2.2.1.2. Đánh giá khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn vùng rễ với vi khuẩn *Erwinia* sp. trong điều kiện phòng thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Almoneafy *et al.*, (2014) có cải tiến. Bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), 20 nghiệm thức với 4 lần lặp lại, trong đó mỗi chủng xạ khuẩn đại diện cho một nghiệm thức.

- Nhân mật số vi khuẩn *Erwinia* sp. và xạ khuẩn:

▪ Nhân nguồn vi khuẩn *Erwinia* sp.:

+ Cây vi khuẩn *Erwinia* sp. trên môi trường YP và ủ ở nhiệt độ 28°C trong 48 giờ.

+ Cây truyền 5 loop vi khuẩn đã phát triển 48 giờ trên môi trường YP sang 100ml môi trường YP lỏng đựng trong bình tam giác 250ml, đặt bình tam giác trên máy lắc trong 48 giờ ở nhiệt độ 28°C với tốc độ (220 vòng/phút).

+ Rút 15ml huyền phù vi khuẩn *Erwinia* sp. cho vào ống nhựa Falcon, ly tâm với tốc độ 1000 vòng phút trong 20 phút, loại bỏ phần nước phía trên ống đồng thời pha loãng tế bào vi khuẩn đọng dưới đáy ống bằng nước cất thanh trùng cho đến khi đạt mật số 10<sup>8</sup> (cfu/ml).

▪ Nhân nguồn xạ khuẩn:

Các chủng xạ khuẩn được cấy trên môi trường SCA, ủ ở nhiệt độ 28°C trong 4 ngày. Sử dụng dụng cụ đục khoan nấm (đường kính 5mm) để đục xạ khuẩn.

- Cấy vi khuẩn *Erwinia* sp. và xạ khuẩn trên môi trường dinh dưỡng:

Sử dụng pipette rút 2.5ml dung dịch huyền phù vi khuẩn *Erwinia* sp. có mật số 10<sup>8</sup> (cfu/ml) cho vào 20ml môi trường King's B đựng trong ống nghiệm. Giữ ống nghiệm ở nhiệt độ 50 - 54°C trong water bath, vortex trong 15 giây rồi trải đều trên đĩa Petri. Đặt đĩa petri 3 giờ trong tủ cấy cho môi trường đông lại. Sử dụng dụng cụ đục khoan đã thanh trùng đục khoan xạ khuẩn và đặt lên bề mặt môi trường King's B chứa vi khuẩn gây bệnh. Ủ đĩa petri ở nhiệt độ 30°C trong 3 ngày trước khi ghi nhận chỉ tiêu.

- Ghi nhận chỉ tiêu:

Chỉ tiêu được ghi nhận thông qua vùng ức chế của xạ khuẩn (mm) đối với sự phát triển của vi khuẩn *Erwinia* sp. tại thời điểm: 3, 5, 7 và 9 ngày sau thí nghiệm. Mức độ ức chế của xạ khuẩn đối với vi khuẩn qua ghi nhận (mm) được quy về theo thang đánh giá của Ahmed & Zahran (2006).

**Bảng 1. Thang đánh giá mức độ ức chế của xạ khuẩn đối với vi khuẩn *Erwinia* sp.**

| STT | Các mức độ ức chế | Bán kính vùng ức chế ghi nhận (mm) |
|-----|-------------------|------------------------------------|
| 1   | ++++              | > 12 mm                            |
| 2   | +++               | 9 - 12 mm                          |
| 3   | ++                | 5 - 8 mm                           |
| 4   | +                 | 1 - 4 mm                           |
| 5   | -                 | Không ức chế                       |

### 2.2.2. Đánh giá khả năng phòng trừ vi khuẩn *Erwinia* sp. gây bệnh thối gốc lúa của các chủng xạ khuẩn chọn lọc trong điều kiện nhà lưới

- Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) gồm 5 nghiệm thức và 4 lần lặp lại.

- Ba chủng xạ khuẩn (AC.CT-274, AC.CT-260 và AC.CT-154) có mức độ ức chế cao, ổn định và kéo dài được lựa chọn từ thí nghiệm đánh giá khả năng đối kháng của xạ khuẩn đối với vi khuẩn *Erwinia* sp. đã thực hiện trong phòng thí nghiệm.

- Thuốc Starner 20WP có khả năng ức chế vi khuẩn *Erwinia* sp. mạnh nhất

được lựa chọn từ kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng ức chế của các thuốc BVTV đối với vi khuẩn *Erwinia* sp. trong điều kiện phòng thí nghiệm.

- Thời điểm xử lý: Các nghiệm thức được xử lý bằng cách phun lên cây lúa tại hai thời điểm 2 ngày trước và 2 ngày sau khi lây nhiễm vi khuẩn *Erwinia* sp.

- Các nghiệm thức xử lý: Xạ khuẩn được xử lý bằng cách phun dung dịch huyền phù chứa xạ khuẩn trên thân lúa (tại vị trí sát gốc) với nồng độ  $10^8$  cfu/ml. Thuốc Starner 20WP được xử lý theo nồng độ khuyến cáo (1g/1L).

**Bảng 2. Các nghiệm thức và thời điểm xử lý trong thí nghiệm**

| STT | Nghiệm thức  | Thời điểm xử lý  | Liều lượng (cfu, gr/ml, L) |
|-----|--------------|--|----------------------------|
| 1   | AC.CT-154    |  | $10^8$                     |
| 2   | AC.CT-260    |  | $10^8$                     |
| 3   | AC.CT-274    | Phun 2 ngày trước và 2 ngày sau khi lây nhiễm vi khuẩn | $10^8$                     |
| 4   | Starner 20WP |  | 1,0                        |
| 5   | Đối chứng    | -  | -                          |

- Ghi nhận chỉ tiêu ở các thời điểm 4, 7, 10 và 13 ngày sau xử lý phòng trừ.

- Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft-Office Excel, phân tích Anova và kiểm định LSD bằng phần mềm MSTAT-C.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Thu thập và phân lập xạ khuẩn vùng rẫy, đánh giá khả năng đối kháng với vi khuẩn *Erwinia* sp. trong điều kiện phòng thí nghiệm

Tiến hành thu thập 15 mẫu đất vùng rẫy lúa trên địa bàn tỉnh An Giang, Sóc Trăng và Thành phố Cần Thơ. Đã phân lập được

290 chủng xạ khuẩn, trong đó có 75 chủng xạ khuẩn có biểu hiện đối kháng với vi khuẩn gây bệnh thối gốc lúa thông qua phương pháp đánh giá sơ bộ. Qua đó lựa chọn ra 20 chủng xạ khuẩn có biểu hiện đối kháng rõ ràng để thực hiện thí nghiệm chính thức về khả năng đối kháng của xạ khuẩn đối với vi khuẩn *Erwinia* sp. trong điều kiện phòng thí nghiệm.

**Bảng 3. Bán kính vòng vô khuẩn (mm) thể hiện sự ức chế của các chủng xạ khuẩn đối với vi khuẩn *Erwinia* sp. qua từng thời điểm quan sát**

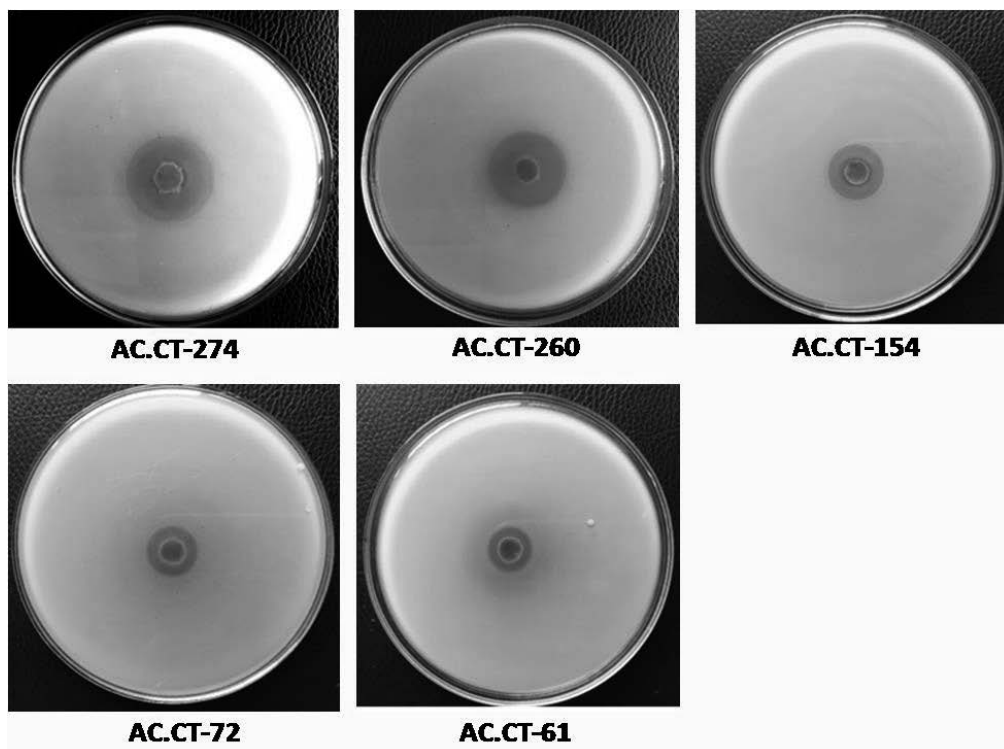
| STT | Nghiệm thức | Bán kính vòng vô khuẩn (mm) qua từng thời điểm quan sát |                     |                     |                    | Mức độ ức chế |
|-----|-------------|---|---------------------|---------------------|--------------------|---------------|
|     |             | 3 NSTN  | 5 NSTN              | 7 NSTN              | 9 NSTN             |               |
| 1   | AC.CT-47    | 1,88 <sup>l</sup>                                       | 2,63 <sup>k</sup>   | 2,38 <sup>hij</sup> | 2,25 <sup>gh</sup> | +             |
| 2   | AC.CT-61    | 4,13 <sup>cde</sup>                                     | 5,63 <sup>d</sup>   | 5,75 <sup>d</sup>   | 5,63 <sup>b</sup>  | ++            |
| 3   | AC.CT-68    | 3,13 <sup>gh</sup>                                      | 2,88 <sup>ijk</sup> | 2,75 <sup>h</sup>   | 3,00 <sup>f</sup>  | +             |
| 4   | AC.CT-72    | 4,13 <sup>cde</sup>                                     | 6,25 <sup>c</sup>   | 6,38 <sup>cd</sup>  | 5,75 <sup>b</sup>  | ++            |
| 5   | AC.CT-93    | 1,25 <sup>i</sup>                                       | 1,88 <sup>l</sup>   | 1,88 <sup>ij</sup>  | 3,38 <sup>ef</sup> | +             |
| 6   | AC.CT-117   | 3,88 <sup>def</sup>                                     | 4,50 <sup>e</sup>   | 4,75 <sup>ef</sup>  | 4,75 <sup>c</sup>  | +             |
| 7   | AC.CT-118   | 4,38 <sup>bcd</sup>                                     | 3,75 <sup>fgh</sup> | 4,00 <sup>g</sup>   | 4,00 <sup>de</sup> | +             |
| 8   | AC.CT-154   | 4,88 <sup>b</sup>                                       | 8,38 <sup>b</sup>   | 6,88 <sup>c</sup>   | 6,00 <sup>b</sup>  | ++            |
| 9   | AC.AG-158   | 4,25 <sup>b-e</sup>                                     | 3,88 <sup>fg</sup>  | 4,13 <sup>fg</sup>  | 4,38 <sup>cd</sup> | +             |
| 10  | AC.AG-167   | 3,25 <sup>fgh</sup>                                     | 3,38 <sup>ghi</sup> | 4,13 <sup>fg</sup>  | 4,38 <sup>cd</sup> | +             |
| 11  | AC.AG-184   | 3,38 <sup>fg</sup>                                      | 3,25 <sup>hij</sup> | 4,38 <sup>efg</sup> | 4,38 <sup>cd</sup> | +             |
| 12  | AC.AG-196   | 2,63 <sup>h</sup>                                       | 3,38 <sup>ghi</sup> | 4,88 <sup>e</sup>   | 4,63 <sup>cd</sup> | +             |
| 13  | AC.ST-212   | 1,88 <sup>i</sup>                                       | 1,75 <sup>l</sup>   | 1,75 <sup>j</sup>   | 1,75 <sup>h</sup>  | +             |
| 14  | AC.ST-220   | 3,63 <sup>efg</sup>                                     | 4,13 <sup>ef</sup>  | 4,75 <sup>ef</sup>  | 4,38 <sup>cd</sup> | +             |
| 15  | AC.ST-233   | 3,00 <sup>gh</sup>                                      | 2,75 <sup>jk</sup>  | 2,50 <sup>hi</sup>  | 2,75 <sup>fg</sup> | +             |
| 16  | AC.ST-249   | 4,13 <sup>cde</sup>                                     | 4,13 <sup>ef</sup>  | 4,13 <sup>fg</sup>  | 4,00 <sup>de</sup> | +             |
| 17  | AC.CT- 260  | 8,88 <sup>a</sup>                                       | 9,25 <sup>a</sup>   | 9,63 <sup>b</sup>   | 9,38 <sup>a</sup>  | +++           |
| 18  | AC.CT-274   | 9,25 <sup>a</sup>                                       | 9,63 <sup>a</sup>   | 10,50 <sup>a</sup>  | 9,63 <sup>a</sup>  | +++           |
| 19  | AC.CT-276   | 4,75 <sup>bc</sup>                                      | 4,13 <sup>ef</sup>  | 4,88 <sup>e</sup>   | 4,63 <sup>cd</sup> | +             |
| 20  | AC.CT-287   | 3,25 <sup>fgh</sup>                                     | 3,75 <sup>fgh</sup> | 4,00 <sup>g</sup>   | 4,00 <sup>de</sup> | +             |
|     | <i>F</i>    | *   | *                   | *                   | *                  |               |
|     | CV (%)      | 11,40   | 8,90                | 10,50               | 9,90               |               |

Ghi chú: \*: Khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử LSD; NSTN: Ngày sau thí nghiệm; AC.CT: *Actinomycetes* Cần Thơ.

Trong số 20 chủng xạ khuẩn đánh giá khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Erwinia* sp. trong điều kiện phòng thí nghiệm, đã ghi nhận hai chủng xạ khuẩn AC.CT-274 và AC.CT-260 có khả năng ức chế cao nhất. Khi so sánh với thang đánh giá của Ahmad *et al.* (2006) tương ứng với bán kính vòng vô khuẩn ở thời điểm 9 NSTN cho thấy, 2 chủng xạ khuẩn AC.CT-274 và AC.CT-260 có khả năng ức chế vi khuẩn *Erwinia* sp. ở mức khá cao (+++). Tiếp theo là ba chủng xạ khuẩn AC.CT-154, AC.CT-61 và AC.CT-72 có khả năng ức chế ở mức trung bình (++), ổn định và kéo dài.

Đã có nhiều nghiên cứu về xạ khuẩn vùng rễ có khả năng tiết kháng sinh ức chế

sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh. Trong nghiên cứu của Zamanian *et al.* (2005) cho thấy *Actinomycetes* có khả năng tiết ra kháng sinh đối kháng với vi khuẩn gây bệnh. Đặc biệt là chủng *Streptomyces plicatus* strain 101 có khả năng ức chế vi khuẩn *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* gây bệnh thối nhũn cây trồng trong điều kiện phòng thí nghiệm. Ngoài ra theo kết quả nghiên cứu của Karkouri *et al.* (2010), *Actinomycetes* có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Erwinia chrysanthemi* 3937VIII với bán kính vòng vô khuẩn ghi nhận trên môi trường SCA từ 5 - 37mm. Điều này cho thấy kết quả thí nghiệm trên hoàn toàn phù hợp với các kết quả nghiên cứu trước.



Hình 1. Năm chủng xạ khuẩn có khả năng ức chế tốt đối với vi khuẩn *Erwinia* sp. trong điều kiện phòng thí nghiệm

### 3.2. Đánh giá khả năng phòng trừ của các chủng xạ khuẩn triển vọng đối với vi khuẩn *Erwinia* sp. gây bệnh thối gốc lúa trong điều kiện nhà lưới

#### 3.2.1. Ảnh hưởng của các chủng xạ khuẩn áp dụng đối với tỷ lệ và hiệu quả giảm tỷ lệ lá nhiễm bệnh

Kết quả ghi nhận (bảng 4) cho thấy, tỷ lệ lá nhiễm bệnh thối gốc lúa trên tất cả các nghiệm thức có xu hướng tăng dần qua thời điểm quan sát. Các nghiệm thức phun xạ khuẩn đều có tỷ lệ lá nhiễm bệnh thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng và khác biệt có ý nghĩa thống kê mức 5%. Trong ba chủng xạ khuẩn thì chủng AC.CT-270 có tỷ lệ lá nhiễm bệnh thấp nhất và khác biệt thống kê so với hai chủng còn lại (AC.CT-260 và AC.CT-154). Đồng thời chủng xạ khuẩn này có tỷ lệ lá nhiễm bệnh tương đương

với nghiệm thức sử dụng thuốc hóa học (Stanner 20WP).

Tất cả các nghiệm thức áp dụng xạ khuẩn trong phòng trừ bệnh thối gốc lúa đều có hiệu quả giảm tỷ lệ lá nhiễm bệnh so với nghiệm thức đối chứng. Cao nhất ở thời điểm 4NSCB sau đó giảm dần qua từng thời điểm quan sát tại 7, 10 và 13NSCB. Hiệu quả giảm tỷ lệ lá nhiễm bệnh cao nhất và khác biệt thống kê được ghi nhận trên nghiệm thức áp dụng chủng xạ khuẩn AC.CT-274, tiếp theo là nghiệm thức áp dụng chủng xạ khuẩn AC.CT-260 và thấp nhất là nghiệm thức áp dụng chủng xạ khuẩn AC.CT-154. Hiệu quả giảm tỷ lệ lá nhiễm bệnh trên nghiệm thức áp dụng chủng xạ khuẩn AC.CT-274 tương đương và không khác biệt thống kê so với nghiệm thức áp dụng thuốc hóa học.

**Bảng 4. Tỷ lệ và hiệu quả giảm tỷ lệ lá nhiễm bệnh (%) trên các nghiệm thức áp dụng xạ khuẩn và thuốc BVTV qua từng thời điểm quan sát**

| STT | Nghiệm thức  | Tỷ lệ lá nhiễm bệnh (%) |                    |                    |                    | Hiệu quả giảm tỷ lệ lá nhiễm bệnh (%) |                     |                    |                    |
|-----|--------------|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
|     |              | 4 NSCB                  | 7 NSCB             | 10 NSCB            | 13 NSCB            | 4 NSCB                                | 7 NSCB              | 10 NSCB            | 13 NSCB            |
| 1   | AC.CT-154    | 21,56 <sup>b</sup>      | 34,21 <sup>b</sup> | 41,90 <sup>b</sup> | 63,57 <sup>b</sup> | 39,95 <sup>b</sup>                    | 21,55 <sup>c</sup>  | 30,15 <sup>c</sup> | 12,78 <sup>b</sup> |
| 2   | AC.CT-260    | 18,29 <sup>b</sup>      | 21,28 <sup>c</sup> | 36,86 <sup>c</sup> | 56,94 <sup>b</sup> | 49,09 <sup>b</sup>                    | 51,62 <sup>b</sup>  | 38,49 <sup>b</sup> | 21,73 <sup>b</sup> |
| 3   | AC.CT-274    | 9,89 <sup>c</sup>       | 15,08 <sup>d</sup> | 22,84 <sup>d</sup> | 43,46 <sup>c</sup> | 72,94 <sup>a</sup>                    | 65,19 <sup>ab</sup> | 61,92 <sup>a</sup> | 40,37 <sup>a</sup> |
| 4   | Stanner 20WP | 7,50 <sup>c</sup>       | 13,89 <sup>d</sup> | 23,34 <sup>d</sup> | 43,23 <sup>c</sup> | 79,13 <sup>a</sup>                    | 68,34 <sup>a</sup>  | 60,88 <sup>a</sup> | 41,30 <sup>a</sup> |
| 5   | Đối chứng    | 36,06 <sup>a</sup>      | 44,15 <sup>a</sup> | 60,19 <sup>a</sup> | 73,67 <sup>a</sup> | 0,00 <sup>c</sup>                     | 0,00 <sup>d</sup>   | 0,00 <sup>d</sup>  | 0,00 <sup>c</sup>  |
|     | <i>F</i>     | *                       | *                  | *                  | *                  | *                                     | *                   | *                  | *                  |
|     | CV (%)       | 9,10                    | 7,30               | 4,50               | 3,90               | 7,20                                  | 11,90               | 7,60               | 24,40              |

Ghi chú: \*: Khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử LSD; Số liệu đã chuyển đổi sang  $\sqrt{x} + 0,5$  để thống kê; NSCB: Ngày sau chủng bệnh; AC.CT: *Actinomycetes* Cần Thơ.

### 3.2.2. Ảnh hưởng của các chủng xạ khuẩn áp dụng đối với tỷ lệ và hiệu quả giảm tỷ lệ chồi nhiễm bệnh

Kết quả ghi nhận (bảng 5) cho thấy, tất cả các nghiệm thức áp dụng xạ khuẩn trong phòng trừ bệnh thối gốc lúa đều có tỷ lệ chồi nhiễm bệnh thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng. Tỷ lệ chồi nhiễm bệnh cũng tăng dần theo từng thời điểm quan sát. Trong số 3 chủng xạ khuẩn triển vọng sử dụng trong phòng trừ bệnh thối gốc lúa, đã ghi nhận chủng AC.CT-274 có tỷ lệ chồi nhiễm bệnh thối gốc thấp nhất, khác biệt thống kê so với các nghiệm thức áp dụng xạ khuẩn khác. Đồng thời chủng AC.CT-274 cũng có tỷ

lệ chồi nhiễm bệnh tương đương không khác biệt thống kê so với nghiệm thức áp dụng thuốc Stanner 20WP. Tương tự, tất cả các nghiệm thức áp dụng xạ khuẩn cũng có hiệu quả giảm tỷ lệ chồi nhiễm bệnh thối gốc do vi khuẩn *Erwinia* sp. gây ra so với nghiệm thức đối chứng trong điều kiện nhà lưới. Hiệu quả cao nhất được ghi nhận vào thời điểm 7 NSCB và giảm dần theo từng thời điểm quan sát. Trong đó nghiệm thức áp dụng chủng xạ khuẩn AC.CT-274 có hiệu quả giảm tỷ lệ chồi nhiễm bệnh cao nhất qua tất cả các thời điểm quan sát, khác biệt thống kê so với các nghiệm thức áp dụng các chủng xạ khuẩn khác.

**Bảng 5. Tỷ lệ và hiệu quả giảm tỷ lệ chồi nhiễm bệnh (%) trên các nghiệm thức áp dụng xạ khuẩn và thuốc BVTV qua từng thời điểm quan sát**

| STT | Nghiệm thức  | Tỷ lệ chồi nhiễm bệnh (%) |                     |                    |                    | Hiệu quả giảm tỷ lệ chồi nhiễm bệnh (%) |                     |                    |                    |
|-----|--------------|---------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---|---------------------|--------------------|--------------------|
|     |              | 4 NSCB                    | 7 NSCB              | 10 NSCB            | 13 NSCB            | 4 NSCB                                  | 7 NSCB              | 10 NSCB            | 13 NSCB            |
| 1   | AC.CT-154    | 37,70 <sup>b</sup>        | 53,50 <sup>b</sup>  | 64,37 <sup>b</sup> | 76,11 <sup>b</sup> | 13,40 <sup>b</sup>                      | 14,98 <sup>c</sup>  | 16,56 <sup>b</sup> | 14,46 <sup>b</sup> |
| 2   | AC.CT-260    | 36,68 <sup>b</sup>        | 42,23 <sup>c</sup>  | 62,99 <sup>b</sup> | 75,49 <sup>b</sup> | 15,68 <sup>b</sup>                      | 32,84 <sup>b</sup>  | 18,40 <sup>b</sup> | 15,31 <sup>b</sup> |
| 3   | AC.CT-274    | 26,91 <sup>c</sup>        | 34,82 <sup>d</sup>  | 55,67 <sup>c</sup> | 68,49 <sup>c</sup> | 38,05 <sup>a</sup>                      | 44,61 <sup>a</sup>  | 28,04 <sup>a</sup> | 23,33 <sup>a</sup> |
| 4   | Starner 20WP | 22,96 <sup>c</sup>        | 39,27 <sup>cd</sup> | 55,49 <sup>c</sup> | 68,03 <sup>c</sup> | 47,18 <sup>a</sup>                      | 37,45 <sup>ab</sup> | 27,94 <sup>a</sup> | 23,78 <sup>a</sup> |
| 5   | Đối chứng    | 43,74 <sup>a</sup>        | 63,17 <sup>a</sup>  | 77,16 <sup>a</sup> | 89,24 <sup>a</sup> | 0,00 <sup>c</sup>                       | 0,00 <sup>d</sup>   | 0,00 <sup>c</sup>  | 0,00 <sup>c</sup>  |
|     | <i>F</i>     | *                         | *                   | *                  | *                  | *                                       | *                   | *                  | *                  |
|     | CV (%)       | 4,30                      | 3,90                | 3,80               | 2,90               | 20,30                                   | 11,50               | 9,00               | 13,60              |

*Ghi chú:* \*: Khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử LSD; Số liệu đã chuyển đổi sang  $\sqrt{x+0.5}$  để thống kê; NSCB: Ngày sau chùng bệnh; AC.CT: *Actinomyces* Cần Thơ.

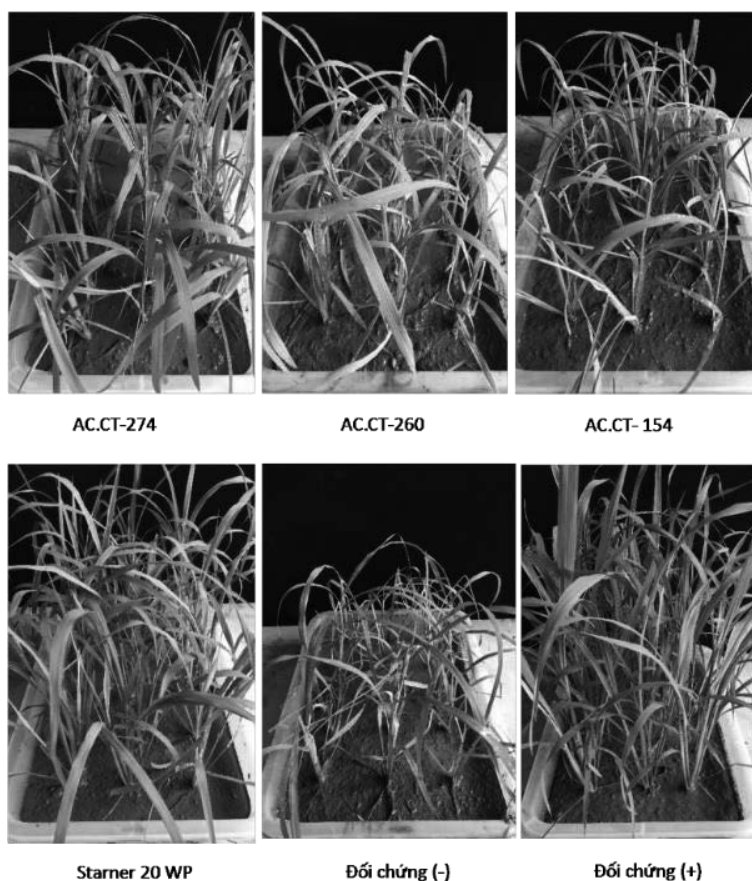
Như vậy cả 3 chủng xạ khuẩn đều có khả năng phòng trừ vi khuẩn *Erwinia* sp. (chủng E.AG-02) gây bệnh thối gốc lúa trong điều kiện nhà lưới. Trong số đó đã ghi nhận chủng xạ khuẩn AC.CT-274 có hiệu quả phòng trừ bệnh thối gốc lúa cao nhất, được thể hiện qua kết quả ghi nhận

đối với tỷ lệ lá nhiễm bệnh và tỷ lệ chồi nhiễm bệnh thấp nhất qua tất cả các thời điểm quan sát. Đồng thời hiệu quả giảm tỷ lệ lá nhiễm bệnh và tỷ lệ chồi nhiễm bệnh của nghiệm thức áp dụng chủng xạ khuẩn này cũng cao nhất trong số các chủng xạ khuẩn khảo sát. Điều này có thể

giải thích rằng xạ khuẩn có khả năng sản sinh các loại kháng sinh và rất nhiều loại kháng sinh trong số này đã được ghi nhận có khả năng ức chế sự phát triển của vi sinh vật gây bệnh trên cây trồng nói chung và vi khuẩn gây bệnh cây trồng nói riêng. Ngoài ra một số kết quả nghiên cứu còn cho thấy các chủng vi sinh vật có ích (xạ khuẩn) chỉ thể hiện khả năng phòng trừ cao đối với vi sinh vật gây bệnh trên cây trồng khi mật số của chúng trong tự nhiên phải đạt mức độ cao gấp đôi so với mật số của vi sinh vật gây bệnh. Do đó việc áp dụng phun xạ khuẩn ở cả hai thời điểm trước chủng và sau chủng bệnh

với khoảng thời gian cách nhau giữa hai lần là 4 ngày, giúp bổ sung đủ mật số xạ khuẩn ban đầu để từ đó tạo tiền đề cho chúng nhân mật số đông đảo trên cây lúa (trên thân cây) đủ để tạo ra áp lực đối với tác nhân gây bệnh trên cây trồng như vi khuẩn *Erwinia* sp. gây bệnh thối gốc lúa.

Kết quả so sánh hiệu quả phòng trừ bệnh thối gốc lúa giữa các chủng xạ khuẩn và thuốc hóa học (Starner 20WP) đã ghi nhận chủng AC.CT-274 có hiệu quả phòng trừ cao hơn so với 2 chủng xạ khuẩn còn lại gồm AC.CT-154 và AC.CT-260 và hiệu quả tương đương so với thuốc Starner 20WP.



**Hình 2. Hiệu quả phòng trừ bệnh thối gốc lúa (*Erwinia* sp.) của ba chủng xạ khuẩn AC.CT-274, AC.CT-260 và AC.CT-154 trong điều kiện nhà lưới trên giống lúa Jasmine85 - thời điểm 4 ngày sau khi lây bệnh**

## 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1. Kết luận

Đã tuyển chọn được 5 chủng xạ khuẩn AC.CT-274, AC.CT-260, AC.CT-154, AC.CT-72 và AC.CT-61 trong 20 chủng có khả năng đối kháng cao với vi khuẩn *Erwinia* sp. (chủng E.AG-02) trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Ba chủng xạ khuẩn được chọn: AC.CT-274, AC.CT-260, AC.CT-154 để tiến hành đánh giá trong điều kiện nhà lưới đều thể hiện khả năng phòng trừ bệnh thối gốc lúa do vi khuẩn *Erwinia* sp. gây hại. Trong đó chủng AC.CT-274 có hiệu quả phòng trừ bệnh cao nhất, thể hiện qua hiệu quả giảm tỷ lệ lá nhiễm bệnh và chồi nhiễm bệnh qua từng giai đoạn quan sát từ 4 - 13 NSCB.

### 4.2. Đề nghị

Cần đẩy mạnh hơn nữa việc nghiên cứu và áp dụng các vi sinh vật đối kháng như xạ khuẩn *Actinomyces* trong phòng trừ bệnh hại cây trồng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Adegboye, M.F., O.O. Babalola and L.A.I. Ngoma, 2012. Analysis of *Streptomyces* spp. Native to Mahikeng Soils in South Africa. *Journal of pure and applied microbiology* 6 (3):1001 - 1010.
2. Ahmad F., Ahmad I., Khan M.S, 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research* 163(2):173 - 181.
3. Ahmed, N.A. and E.B. Zahran, 2006. Inhibition of soil borne *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* in cotton by *Bacillus* spp. proceedings of the 1st International symposium on Biological Control of Bacterial Plant disease.:86 - 92.
4. Almoneafy, A. A., et al., 2014. "Characterization and evaluation of *Bacillus* isolates for their potential plant growth and biocontrol activities against tomato bacterial wilt." *African Journal of Biotechnology* 11(28): 7193 - 7201.
5. Atlas R.M., 2004. *Handbook of microbiological media* CRC Press, New York.
6. Bhattacharya A., Chanda S., Barik S., 2009. Lipase and protease producing microbes from the environment of sugar beet field. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry* 22:26 - 30.
7. Doumbou C.L., M.K. Hamby Salove, D.L. Crawford and C. Beaulieu, 2001. *Actinomyces*, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection* 82:85 - 102.
8. Goto M., Matsumoto K., 1987. *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae* subsp. nov. Isolated from Diseased Rhizomes and Fibrous Roots of Japanese Horseradish (*Eutrema wasabi* Maxim.). *International Journal of systematic bacteriology*:130 - 135.
9. Karkouri A.E., Hassani F.Z.E., Mzibri M.E., Benlemlih M., Hassouni M.E., 2010. Isolation and identification of an *actinomyces* strain with a biocontrol effect on the phytopathogenic *Erwinia chrysanthemi* 3937VIII responsible for soft rot disease. *Ann Microbiol (Paris)* 60:263 - 268.
10. Phạm Văn Kim, 2015. Các bệnh hại lúa quan trọng ở đồng bằng sông Cửu Long. Trang 77 - 80, NXB Nông nghiệp.
11. Phùng Thị Thanh Thảo, 2014. Hiệu quả của vi khuẩn vùng rễ trong phòng trừ bệnh thối gốc lúa do vi khuẩn *Erwinia* sp. trong điều kiện nhà lưới. Luận văn cao học, Trường Đại học Cần Thơ.
12. Shahidi Bonjar G.H., Zamanian S., Aghighi S., Rashid Farrokhi P., Mahdavi M.J., Saadoun I., 2006. Antibacterial activity of Iranian *Streptomyces coralus* strain 63 against *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Biological Sciences* 6 (1):127 - 129.

13. Sahilah A.M., S.Y. Tang, M.N. Zaimawati, H. Rosnah, M.S. Umi Kalsum, R. Son, 2010. Identification and characterization of *actinomycetes* for biological control of bacterial wilt of *Ralstonia solanacearum* isolated from tomato. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.* 38:103 - 114.
14. Waksman S.A., 1961. The Actinomycetes. Vol II Classification, Identification and Descriptions of Genera and Species.
15. Williams, W. and D. Kuster, 1964. "Selection of media for isolation of *Streptomyces*." *Nature* (London) 202: 928 - 929.
16. Zamanian S., Shahidi Bonjar G.H., Saadoun I., 2005. First report of antibacterial properties of a new strain of *Streptomyces plicatus* (Strain 101) against *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* from Iran. *Biotechnology* 4(2):114 - 120.

### ABSTRACT

#### **Evaluation of using actinomycetes in the biocontrol of bacterial foot rot of rice caused by *Erwinia* sp. under the greenhouse conditions**

*The biocontrol instead of using chemical disease control is better method to manage the bacterial foot rot of rice that is efficiency in inhibition of increasing resistance of *Erwinia* sp. to chemical, reducing environmental impacts and maintaining stability of agriculture. Twenty strains of Actinomycetes were evaluated for their antagonistic potential against *Erwinia* sp., causal agent of bacterial food rot of rice, by dual culture assay and in greenhouse testing. All the twenty strains inhibited *Erwinia* sp. in dual culture assay but five of them (AC.CT-274, AC.CT-260, AC.CT-154, AC.CT-72 and AC.CT-61) were notable. When these selected three strains were tested for their antibacterial activity in greenhouse on foot rot of rice, AC.CT-274, AC.CT-260 and AC.CT-154 were high efficient and the AC.CT-274 strain significantly reduced the disease. This study indicates that the selected Actinomycetes strains, AC.CT-274, AC.CT-260 and AC.CT-154, have the potential to control foot rot disease in rice in Mekong Delta. Thus, those three strains of Actinomycetes could be considered as the potential materials for studying biocontrol.*

**Key words:** *Actinomycetes, Biocontrol, Bacterial foot rot of rice and *Erwinia* sp.*

# THÀNH PHẦN NẤM GÂY BỆNH MỤC RUỘT KEO TAI TƯỢNG TẠI VIỆT NAM

La Ánh Dương<sup>1</sup>, Phí Hồng Hải<sup>2</sup>, Nguyễn Hoài Thu<sup>3</sup>,  
Nguyễn Minh Chí\*, Đặng Như Quỳnh<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp

<sup>2</sup> Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

<sup>3</sup> Trung tâm Nghiên cứu Bảo vệ rừng

\* Tác giả liên hệ: chibvr@gmail.com; 0989. 124. 656

## TÓM TẮT

Bệnh mục ruột là trong những bệnh gây nguy hiểm cho hầu hết các diện tích rừng trồng keo trên thế giới đặc biệt là ở khu vực Đông Nam Á, nơi có khí hậu nhiệt đới là một môi trường tuyệt vời cho nấm bệnh phát triển. Bệnh mục ruột rất khó phát hiện ở giai đoạn đầu vì chúng gây hại ở trong thân, chỉ khi cây gãy đổ thì mới phát hiện ra bệnh do thân bị mục rỗng bên trong. Bài báo là kết quả của việc phân lập và xác định thành phần nấm gây bệnh mục ruột keo tai tượng ở một số vùng trọng điểm của Việt Nam. Việc phân loại triệu chứng mục dựa trên cơ sở sử dụng phương pháp enzyme test và kết quả giám định bằng kỹ thuật phân tử đã xác định được 27 mẫu nấm thuộc 8 chi và là 12 loài khác nhau.

**Từ khóa:** Bệnh mục ruột, keo tai tượng, enzyme test, rừng trồng.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các loài keo được du nhập từ Australia và Papua New Guinea đến Việt Nam vào những năm 1960 (Nambiar *et al.*, 2015). Đến năm 2013, Việt Nam có khoảng 1,3 triệu ha rừng trồng keo, trong đó có 600.000ha keo tai tượng, 90.000ha keo lá tràm và hơn 400.000ha keo lai (Nambiar & Harwood, 2014). Trong đó, ở các nước Đông Nam Á nói chung hơn 2,6 triệu ha đã được trồng các loài keo (Harwood & Nambiar, 2014b). Việc trồng keo đang gia tăng để đáp ứng nhu

cầu đối với các sản phẩm gỗ, tăng doanh thu xuất khẩu quốc gia, hỗ trợ kinh tế nông thôn và xóa đói giảm nghèo (Nambiar *et al.*, 2015).

Tuy nhiên, Đông Nam Á, cũng là nơi có điều kiện khí hậu thuận lợi cho các loại bệnh hại phát triển. Các bệnh phổ biến thường gặp trên keo như mục ruột, thối rễ, gỉ sắt, phấn hồng, chết héo, thán thư (Old *et al.*, 2000; Thu *et al.*, 2010). Trong những năm qua, bệnh chết héo do *Ceratocystis manginecans* đã lây lan trên diện rộng, gây chết hàng nghìn ha rừng keo, đặc biệt là *A. mangium* ở Indonesia, Malaysia và Việt Nam (Tarigan *et al.*,

---

Người phân biên: PGS.TS. Trịnh Xuân Hoạt

2011a; Thu *et al.*, 2012; Brawner *et al.*, 2015; Fourie *et al.*, 2016). Một vấn đề khác luôn nổi cộm là bệnh mục ruột, bệnh này đã được ghi nhận ở rất nhiều quốc gia như Malaysia (Mahmud *et al.*, 1993; Zakaria *et al.*, 1994; Ito và Nanis, 1994; Ito, 2002), Thái Lan, Việt Nam, Papua New Guinea, Bangladesh (Basak, 1997), Ấn Độ (Mehrotra, *et al.*, 1996) và Indonesia (Old *et al.*, 2000). Thông thường bệnh mục ruột xuất hiện trên cây lâu năm, tuy nhiên với keo tai tượng, cây hai năm tuổi trở lên đã bị bệnh (Lee, 2002). Bệnh làm giảm đáng kể sản lượng và chất lượng gỗ (Lee, 2002). Ở Malaysia, sản lượng gỗ keo tai tượng giảm 17,5% do bệnh mục ruột (Lee *et al.*, 1988; Zakaria *et al.*, 1994). Ở Sabah, tỷ lệ bị mục ruột lên tới 18,1% (Mahmud *et al.*, 1993). Tỷ lệ mắc bệnh mục ruột của keo tai tượng ở Malaysia từ 57 đến 98%, tương ứng ở cây 2 và 8 năm tuổi (Zakaria *et al.*, 1994). Ở Sabah, tỷ lệ mắc bệnh này trung bình là 35,5% từ 6 đến 9 năm (Mahmud *et al.*, 1993) và cao nhất là 50% trong một nghiên cứu khác về cây keo ở tuổi 9 (Ito và Nanis, 1994). Ở Bangladesh, tỷ lệ bị bệnh dao động từ 49 đến 58% (Basak, 1997). Harwood & Nambiar (2014a) cho rằng do cây chết, tốc độ tăng trưởng của *A. mangium* ở Sumatra và ở những khu vực bị ảnh hưởng bởi nấm bệnh (*Ganoderma* và *Ceratocystis*) đã giảm xuống dưới 15m<sup>3</sup>/ha/năm, trong khi các khu vực không bị ảnh hưởng có tốc độ tăng trưởng trong khoảng từ 22 đến 35m<sup>3</sup>/ha/năm.

Ở Việt Nam bệnh mục ruột đã được báo cáo ở các rừng trồng keo, đặc biệt là rừng trồng gỗ lớn với luân kỳ kinh doanh 10 - 15 năm (Thu, 2009; Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2015) nhưng tỷ lệ bệnh không cao

như ở Indonesia và Malaysia. Tỷ lệ bệnh mục ruột ở rừng trồng keo tai tượng 12 năm tuổi ở Sông Mây, tỉnh Đồng Nai là 14,2% và ở rừng trồng keo tai tượng 15 năm tuổi ở Hàm Yên, tỉnh Tuyên Quang là 23,6% (Thu, 2009). Các tác nhân gây bệnh mục ruột chính được cho là do nấm *Ganoderma tropicum* và *G. australe* nhưng chưa có nghiên cứu giải trình tự gen (Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2015). Do vậy, nghiên cứu này nhằm mục đích phân lập nấm mục gây hại bằng cách xác định loại mục và sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong việc giám định loài mục hại. Góp phần trong việc quản lý sâu bệnh hại nhằm bảo vệ và tăng năng suất rừng trồng.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Mẫu bệnh thu tại các khảo nghiệm hậu thế keo tai tượng tại Ba vì, Tuyên Quang, Nghệ An và Bình Dương.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phương pháp phân lập nấm

Sử dụng môi trường MAT để phân lập, cụ thể gồm: Malt extract 20g, agar 18g, cho vào bình chứa 950ml nước đầy nắp, hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút sau đó để nguội đến 50 - 55°C bổ sung (50mg penicillin, 50mg streptomycin, 25mg polymycin, cho vào 50ml nước cất hòa tan, sau đó cho từ từ 1µl Thiabendazole vào lắc đều).

Các mẫu riêng rẽ khi thu về được đánh dấu ký hiệu cẩn thận để trong túi nilon miết mép. Mỗi mẫu lựa chọn những phần tiếp giáp giữa gỗ biến màu là phần

bị bệnh và phần gỗ sáng màu là phần khỏe mạnh để phân lập nấm bệnh.

Quá trình phân lập như sau: Mẫu gỗ được cắt nhỏ thành những mẫu có kích thước 0,5 x 0,5 x 0,2mm. Sau đó được khử trùng bằng cách ngâm trong etanol 95% trong một phút, sau đó ngâm trong natri hypoclorit 2,5% trong hai phút và sau đó rửa lại 3 lần trong nước cất đã khử trùng trong một phút làm khô bằng giấy thấm vô trùng sau đó đặt lên môi trường MAT có kháng sinh, ở nhiệt độ phòng (20 - 25°C) trong 1 - 2 tuần (hình 1). Kiểm tra thường xuyên, khi các hệ sợi nấm xuất hiện tiến hành cấy tách đỉnh sinh trưởng và làm thuần trên ra môi trường PDA.

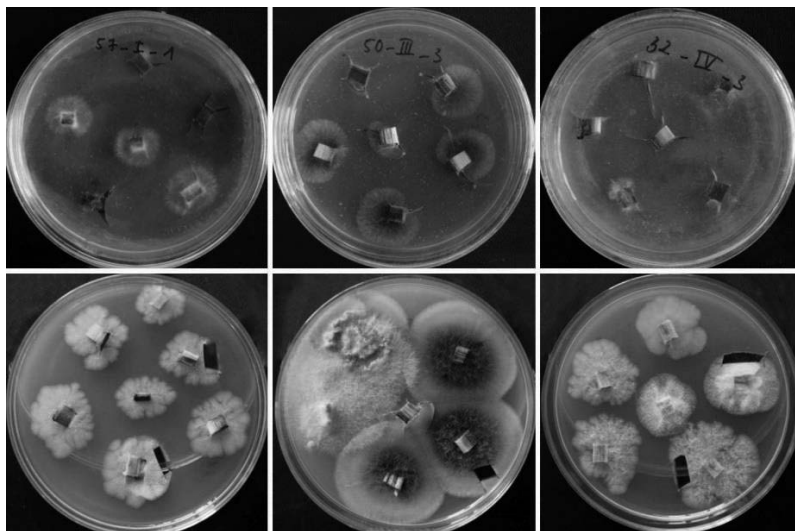
Chuẩn bị môi trường PDA để cấy truyền, làm thuần nấm và thử enzyme test (khoai tây 200g; đường glucose 20g; agar 18g. Khoai tây rửa sạch cắt thành từng miếng nhỏ đun sôi 30 phút, lọc lấy nước, sau đó thêm nước cho đủ 1000ml,

đem môi trường PDA hấp khử trùng ở 121°C trong thời gian 20 phút. Để môi trường nguội 50 - 60°C đổ môi trường ra các đĩa petri vô trùng một lớp dày khoảng 2 - 3mm).

### 2.2.2. Xác định các loài nấm chính gây bệnh mục ruột bằng enzyme test

Mẫu nấm sau khi được làm thuần tiến hành cấy truyền và làm thí nghiệm enzyme test để phân loại mục trắng và mục nâu.

Theo phản ứng hóa học giữa hóa chất và sợi nấm sau khi nhỏ Alpha Naphthol vào sợi nấm chuyển sang màu tím nấm đó thuộc nhóm mục nâu. Nhỏ P-cresol vào sợi nấm chuyển sang màu cam, hoặc sợi nấm có cả hai phản ứng trên đều thuộc nhóm nấm gây mục trắng. Còn với nhóm nấm không có phản ứng với cả hai nhóm hợp chất trên có khả năng sẽ là nấm nội sinh hoặc nấm gây bệnh.



Hình 1. Phân lập nấm mục ruột từ các mẫu gỗ

#### Xác định tính gây bệnh mục ruột:

Xác định khả năng gây mục ruột bằng trong phòng thí nghiệm bằng

phương pháp định lượng về khả năng phân giải cellulose của các mẫu nấm trong phòng thí nghiệm.

Sử dụng môi trường CMC (Carboxymethylcellulose agar) 1% có chứa 0.65% (w/v)  $\text{NaNO}_3$ , 0.65% (w/v)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.03% (w/v) Yeast extract, 0.65% (w/v) KCl, 0.3% (w/v)  $\text{MgSO}_4$ , 0.065% (w/v) glucose, 1.7% (w/v) agar and 0.1% (v/v) triton X-100 (Onsori, 2005), và công gô đờ (1% công gô đờ trong pha trong nước cất) và lắ ở tốc độ 50 vòng/phút trong 15 phút. Cấy mẫu nấm và để ở tủ định ôn  $28^\circ\text{C}$  sau 5 ngày. Tiến hành đo đường kính vòng phân giải cellulose (D cm) để xác định khả năng phân giải cellulose của các mẫu nấm (Sari, 2017)

Căn cứ vào đường kính vòng phân giải (D) để xác định khả năng phân giải cellulose của các mẫu nấm bước đầu xác định tính gây bệnh trong phòng thí nghiệm, cách tính như sau:

D = 0cm: Không phân giải (-).

D < 1cm: Phân giải yếu (+).

1cm  $\leq$  D < 3 cm: Phân giải trung bình (++).

3cm  $\leq$  D < 5 cm: Phân giải mạnh (+++).

D  $\geq$  5cm: Phân giải rất mạnh (++++).

### Xác định các loài nấm bằng giải trình tự DNA

Sử dụng phương pháp Glassmilk để tách DNA của các mẫu nấm (Glen *et al.*, 2002). Bộ đệm phiên mã bên trong DNA của ribosome (rDNA ITS) 1 và 2, bao gồm vị trí 5,8S và một phần của vùng 18S và 28S của rDNA nhân được khuếch đại bằng cách sử dụng cặp mồi ITS1 - F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (Gardes & Bruns, 1993) và ITS4 - R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Hỗn hợp chạy PCR bao gồm 12,5 $\mu\text{L}$  GoTaq@Green Master

Mix 2X (Công ty Promega, Madison, Wisconsin, Hoa Kỳ), 0,5 $\mu\text{L}$  mỗi mồi, 9,5 $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  PCR và 2 $\mu\text{L}$  DNA, trên thiết bị C1000 Touch<sup>TM</sup> Thermal Cycler (Bio-Rad, Mỹ). Các thông số khuếch đại là biến tính ban đầu ở  $95^\circ\text{C}$  trong 3 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ biến tính ở  $94^\circ\text{C}$  trong 30 giây, ủ ở  $55^\circ\text{C}$  trong 30 giây và kéo dài ở  $72^\circ\text{C}$  trong 30 giây, với thời gian kéo dài cuối cùng ở  $72^\circ\text{C}$  trong 7 phút trên PTC 225 Peltier Thermal Cycler. Mỗi bộ phản ứng PCR bao gồm đối chứng dương tính (DNA phân lập từ nấm) và âm tính (không có DNA khuôn mẫu), sự khuếch đại được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose. Sau đó sản phẩm PCR được gửi sang Viện công nghệ sinh học Việt Nam để giải trình tự. Kết quả được so sánh với cơ sở dữ liệu của GenBank thông qua giao diện tìm kiếm giao diện tìm kiếm BLAST nucleotide-nucleotide đặt tại National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)). Các chuỗi liên quan được chuyển tải về sau đó xử lý, dựng cây bằng phần mềm Geneious 7.0 (Kearse *et al.*, 2012).

## 3. KẾT QUẢ

### 3.1. Kết quả phân lập

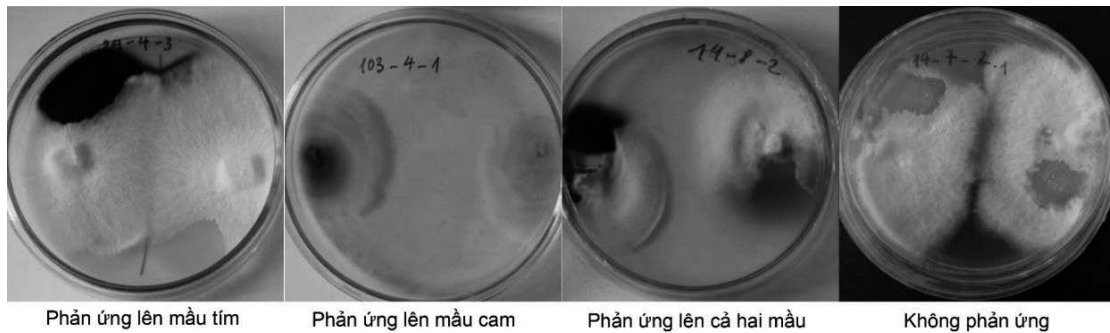
Từ các mẫu gỗ keo tai tượng thuộc 145 gia đình tại các khu khảo nghiệm ở Ba Vì, Tuyên Quang, Nghệ An, Bình Dương phân lập được 1006 mẫu nấm, tiến hành làm thí nghiệm enzyme test để phân loại mục trắng và mục nâu (hình 2) kết quả thu được như sau: 301 mẫu có phản ứng màu tím (thuộc nhóm nấm gây mục nâu), 106 mẫu có phản ứng màu cam và 251 mẫu lên cả hai màu (thuộc nhóm nấm gây mục trắng), còn lại 348 mẫu không có phản ứng (bảng 1).

**Bảng 1. Kết quả kiểm tra loại mục của các mẫu ở các khu vực nghiên cứu**

| Địa điểm    | Thí nghiệm Enzyme |            |            |               | Tổng        |
|-------------|-------------------|------------|------------|---------------|-------------|
|             | Tím               | Cam        | Cả hai     | Không lên màu |             |
| Ba Vì       | 89                | 30         | 73         | 100           | 292         |
| Tuyên Quang | 67                | 23         | 52         | 95            | 237         |
| Nghệ An     | 66                | 25         | 64         | 52            | 207         |
| Bình Dương  | 79                | 28         | 62         | 101           | 270         |
| <b>Tổng</b> | <b>301</b>        | <b>106</b> | <b>251</b> | <b>348</b>    | <b>1006</b> |

Thông thường một số loài nấm gây thối nâu tấn công vào các loại gỗ mềm, làm phá vỡ tế bào và sử dụng các polysaccharide của thành tế bào (xenluloza và hemixenluloza), khiến lignin ít nhiều bị ảnh hưởng. Điều này thường dẫn đến việc gỗ mục nát có màu nâu, có các vết nứt hình khối và kết cấu vụn. Với các loài nấm gây nấm mục trắng, việc phân hủy lignin và hemixenlulo

diễn ra trước sau đó đến xenlulo hoặc phân hủy đồng thời tất cả các thành phần của gỗ, trong cả hai trường hợp đều biến gỗ thành một khối xốp màu sáng (thối trắng) (Agrios, 2012). Từ kết quả ở bảng 1 cho thấy phần lớn mẫu nấm thu được thuộc nhóm mục trắng là nhóm mục hại phổ biến và gây nguy hiểm nhiều hơn mục nâu.

**Hình 2. Kiểm tra nấm mục bằng Alpha Naphtol và P-cresol**

### 3.2. Kết quả đánh giá tính gây bệnh mục ruột của các mẫu nấm

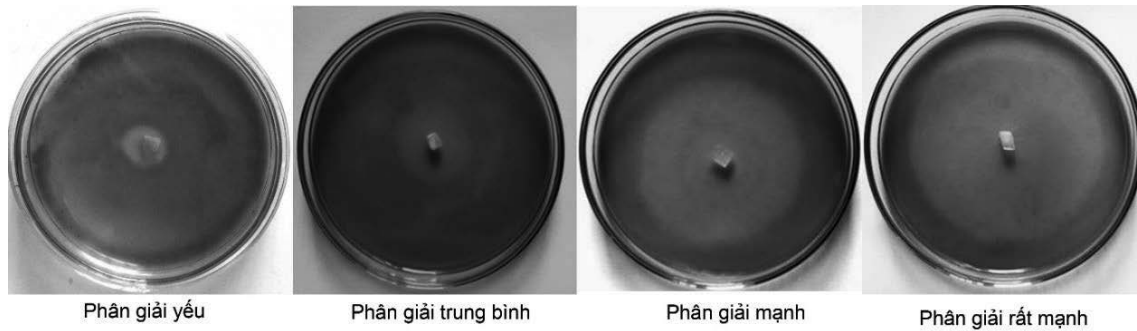
Trong 658 mẫu nấm có phản ứng với Alpha Naphtol và P-cresol đã được xác định loại mục trắng và mục nâu. Tiến hành thử nghiệm khả năng phân giải cellulose của các mẫu nấm trên môi

trường có chứa công gỗ đỏ 1% (hình 3). Từ kết quả kiểm tra loại nấm mục tiến hành kiểm tra khả năng phân giải cellulose của 658 mẫu nấm đã được kiểm tra enzyme nêu trên. Kết quả kiểm tra được tổng hợp trong bảng 2.

**Bảng 2. Đánh giá khả năng gây bệnh dựa vào khả năng phân giải cellulose của nấm**

| S<br>TT | Tên mẫu | Địa<br>điểm | ĐK phân<br>giải (cm) | Tình<br>gây bệnh | Đánh giá | S<br>TT | Tên mẫu | Địa<br>điểm | ĐK phân<br>giải (cm) | Tình<br>gây bệnh | Đánh<br>giá | S<br>TT | Tên mẫu  | Địa<br>điểm | ĐK phân<br>giải<br>(cm) | Tình<br>gây bệnh | Đánh<br>giá |
|---------|---------|-------------|----------------------|------------------|----------|---------|---------|-------------|----------------------|------------------|-------------|---------|----------|-------------|-------------------------|------------------|-------------|
| 1       | 28.3.1  | TQ          | 4.8                  | +++              | M        | 36      | 64.1.4  | NA          | 3.6                  | +++              | M           | 71      | 3.123.1  | BD          | 1.4                     | ++               | TB          |
| 2       | 35.3.1  | TQ          | 2.8                  | ++               | TB       | 37      | 45.2.4  | NA          | 5.6                  | ++++             | RM          | 72      | 3.23.2   | BD          | 2.6                     | ++               | TB          |
| 3       | 69.2.2  | TQ          | 7.6                  | ++++             | RM       | 38      | 59.2.4  | NA          | 1.1                  | ++               | TB          | 73      | 3.44.3   | BD          | 4.1                     | +++              | M           |
| 4       | 12.2.2  | TQ          | 1.1                  | ++               | TB       | 39      | 51.2.4  | NA          | 1.9                  | ++               | TB          | 74      | 10.35.1  | BD          | 1.6                     | ++               | TB          |
| 5       | 28.3.2  | TQ          | 1.6                  | ++               | TB       | 40      | 3.2.6   | NA          | 1                    | ++               | TB          | 75      | 10.1.1   | BD          | 1.8                     | ++               | TB          |
| 6       | 40.2.2  | TQ          | 4.6                  | +++              | M        | 41      | 60.1.6  | NA          | 1.2                  | ++               | TB          | 76      | 10.10.2  | BD          | 1.2                     | ++               | TB          |
| 7       | 59.0.3  | TQ          | 7                    | ++++             | RM       | 42      | 55.2.6  | NA          | 1.6                  | ++               | TB          | 77      | 4.88.1   | BD          | 5.3                     | ++++             | RM          |
| 8       | 48.0.3  | TQ          | 6.8                  | ++++             | RM       | 43      | 62.1.5  | NA          | 7                    | ++++             | RM          | 78      | 4.5.3    | BD          | 5.5                     | ++++             | RM          |
| 9       | 36.0.3  | TQ          | 1.7                  | ++               | TB       | 44      | 57.1.5  | NA          | 3.3                  | +++              | M           | 79      | 4.48.1   | BD          | 6.2                     | ++++             | RM          |
| 10      | 19.1.4  | TQ          | 2.6                  | ++               | TB       | 45      | 19.2.5  | NA          | 3.5                  | +++              | M           | 80      | 4.53.1   | BD          | 7                       | ++++             | RM          |
| 11      | 69.3.4  | TQ          | 6.6                  | ++++             | RM       | 46      | 48.2.5  | NA          | 1                    | ++               | TB          | 81      | 4.13.3   | BD          | 7.6                     | ++++             | RM          |
| 12      | 40.3.4  | TQ          | 1                    | ++               | TB       | 47      | 12.2.5  | NA          | 1.4                  | ++               | TB          | 82      | 5.48.1   | BD          | 1                       | ++               | TB          |
| 13      | 13.1.4  | TQ          | 3.4                  | +++              | M        | 48      | 25.1.5  | NA          | 1.3                  | ++               | TB          | 83      | 5.111.1  | BD          | 5.6                     | ++++             | RM          |
| 14      | 17.2.4  | TQ          | 1.2                  | ++               | TB       | 49      | 63.2.5  | NA          | 5.6                  | ++++             | RM          | 84      | 5.85.3   | BD          | 7.1                     | ++++             | RM          |
| 15      | 33.2.4  | TQ          | 1.1                  | ++               | TB       | 50      | 28.2.2  | NA          | 2                    | ++               | TB          | 85      | 5.23.1   | BD          | 1                       | ++               | TB          |
| 16      | 18.3.4  | TQ          | 3.8                  | +++              | M        | 51      | 35.1.2  | NA          | 2.4                  | ++               | TB          | 86      | 5.123.3  | BD          | 1.5                     | ++               | TB          |
| 17      | 2.3.4   | TQ          | 5.8                  | ++++             | RM       | 52      | 64.1.2  | NA          | 1.5                  | ++               | TB          | 87      | 5.50.2   | BD          | 1.1                     | ++               | TB          |
| 18      | 4.4.3   | TQ          | 6.5                  | ++++             | RM       | 53      | 10.1.2  | NA          | 1.7                  | ++               | TB          | 88      | 5.13.3   | BD          | 1.6                     | ++               | TB          |
| 19      | 54.1.5  | TQ          | 2                    | ++               | TB       | 54      | 63.1.2  | NA          | 2.1                  | ++               | TB          | 89      | 27.3.3   | BV          | 2                       | ++               | TB          |
| 20      | 12.3.5  | TQ          | 4.1                  | +++              | M        | 55      | 45.1.2  | NA          | 1.5                  | ++               | TB          | 90      | 106.4.3  | BV          | 1                       | ++               | TB          |
| 21      | 63.2.6  | TQ          | 2.7                  | ++               | TB       | 56      | 62.1.2  | NA          | 6.1                  | ++++             | RM          | 91      | 112.7.2  | BV          | 7.4                     | ++++             | RM          |
| 22      | 3.3.6   | TQ          | 3.8                  | +++              | M        | 57      | 1.30.2  | BD          | 1.6                  | ++               | TB          | 92      | 117.7.3  | BV          | 2.4                     | ++               | TB          |
| 23      | 51.1.1  | NA          | 4.3                  | +++              | M        | 58      | 1.52.3  | BD          | 2.6                  | ++               | TB          | 93      | 12.4.2   | BV          | 3.1                     | +++              | M           |
| 24      | 13.1.1  | NA          | 6.6                  | ++++             | RM       | 59      | 1.44.1  | BD          | 1.1                  | ++               | TB          | 94      | 130.4.3  | BV          | 2.6                     | ++               | TB          |
| 25      | 45.2.1  | NA          | 1.5                  | ++               | TB       | 60      | 1.28.1  | BD          | 2.6                  | ++               | TB          | 95      | 24.3.3   | BV          | 6.1                     | ++++             | RM          |
| 26      | 47.1.1  | NA          | 6                    | ++++             | RM       | 61      | 1.22.3  | BD          | 1.4                  | ++               | TB          | 96      | 28.1.2   | BV          | 1.6                     | ++               | TB          |
| 27      | 63.1.1  | NA          | 2.2                  | ++               | TB       | 62      | 1.35.1  | BD          | 5.4                  | ++++             | RM          | 97      | 33.7.1   | BV          | 2                       | ++               | TB          |
| 28      | 65.2.1  | NA          | 6.3                  | ++++             | RM       | 63      | 2.144.3 | BD          | 6.7                  | ++++             | RM          | 98      | 33.8.1   | BV          | 3                       | +++              | M           |
| 29      | 69.1.1  | NA          | 1.3                  | ++               | TB       | 64      | 2.107.2 | BD          | 2.5                  | ++               | TB          | 99      | 33.8.1.1 | BV          | 3.3                     | +++              | M           |
| 30      | 4.1.1   | NA          | 3.3                  | +++              | M        | 65      | 2.129.2 | BD          | 3.2                  | +++              | M           | 100     | 34.8.3   | BV          | 1.7                     | ++               | TB          |
| 31      | 64.2.1  | NA          | 2.2                  | ++               | TB       | 66      | 2.5.3   | BD          | 3.3                  | +++              | M           | 101     | 3.22.3   | BV          | 1                       | ++               | TB          |
| 32      | 18.2.1  | NA          | 1.3                  | ++++             | RM       | 67      | 35.7.2  | BD          | 7.1                  | ++++             | RM          | 102     | 57.7.1   | BV          | 2.1                     | ++               | TB          |
| 33      | 57.2.1  | NA          | 1.3                  | ++               | TB       | 68      | 3.62.1  | BD          | 1.7                  | ++               | TB          | 103     | 69.1.3   | BV          | 1.2                     | ++               | TB          |
| 34      | 62.2.1  | NA          | 1.5                  | ++               | TB       | 69      | 3.146.2 | BD          | 2.1                  | ++               | TB          | 104     | 74.8.3   | BV          | 7.6                     | ++++             | RM          |
| 35      | 10.2.4  | NA          | 3.3                  | +++              | M        | 70      | 3.151.2 | BD          | 1.4                  | ++               | TB          |         |          |             |                         |                  |             |

*Ghi chú:* TT: Thứ tự; ĐK: Đường kính; TQ: Tuyên Quang; NA: Nghệ An; BD: Bình Dương; BV: Ba Vì; TB: Trung bình; M: Mạnh; RM: Rất mạnh.



**Hình 3. Mức độ phân giải xenlulo của các mẫu nấm**

Kết quả tổng hợp trong bảng 1 cho thấy có 59 mẫu phân giải trung bình; 19 mẫu phân giải mạnh và 27 mẫu phân giải rất mạnh, số lượng các mẫu nấm phân

giải yếu chiếm số lượng lớn 554 mẫu. Chi tiết số lượng các mẫu có khả năng phân giải cellulose ở các khu vực được thống kê ở bảng 3.

**Bảng 3. Thống kê số lượng các mẫu thí nghiệm theo các địa điểm nghiên cứu**

| Địa điểm    | Tính gây bệnh |            |           |           | Tổng       |
|-------------|---------------|------------|-----------|-----------|------------|
|             | Yếu           | Trung bình | Mạnh      | Rất mạnh  |            |
| Ba Vì       | 176           | 10         | 3         | 3         | 192        |
| Tuyên Quang | 120           | 10         | 6         | 6         | 142        |
| Nghệ An     | 121           | 20         | 6         | 8         | 155        |
| Bình Dương  | 137           | 19         | 3         | 10        | 169        |
| <b>Tổng</b> | <b>554</b>    | <b>59</b>  | <b>18</b> | <b>27</b> | <b>658</b> |

Hiện nay, cách đánh giá khả năng gây mục thông qua khả năng phân giải cellulose vẫn là phương pháp dễ làm và có giá thành rẻ hơn so với việc đánh giá khả năng phân giải các hợp chất khác. Việc đánh giá khả năng phân giải cellulose giúp lựa chọn những mẫu có khả năng gây bệnh mạnh để thử nghiệm khả năng gây bệnh ở vườn ươm. Giúp xác

định đúng loài gây hại để có biện pháp quản lý phù hợp.

Lựa chọn 27 mẫu phân giải mạnh nhất đại diện ở các địa điểm điều tra để định loại bằng phương pháp sinh học phân tử.

### 3.3. Kết quả định loại nấm gây bệnh mục ruột keo tai tượng

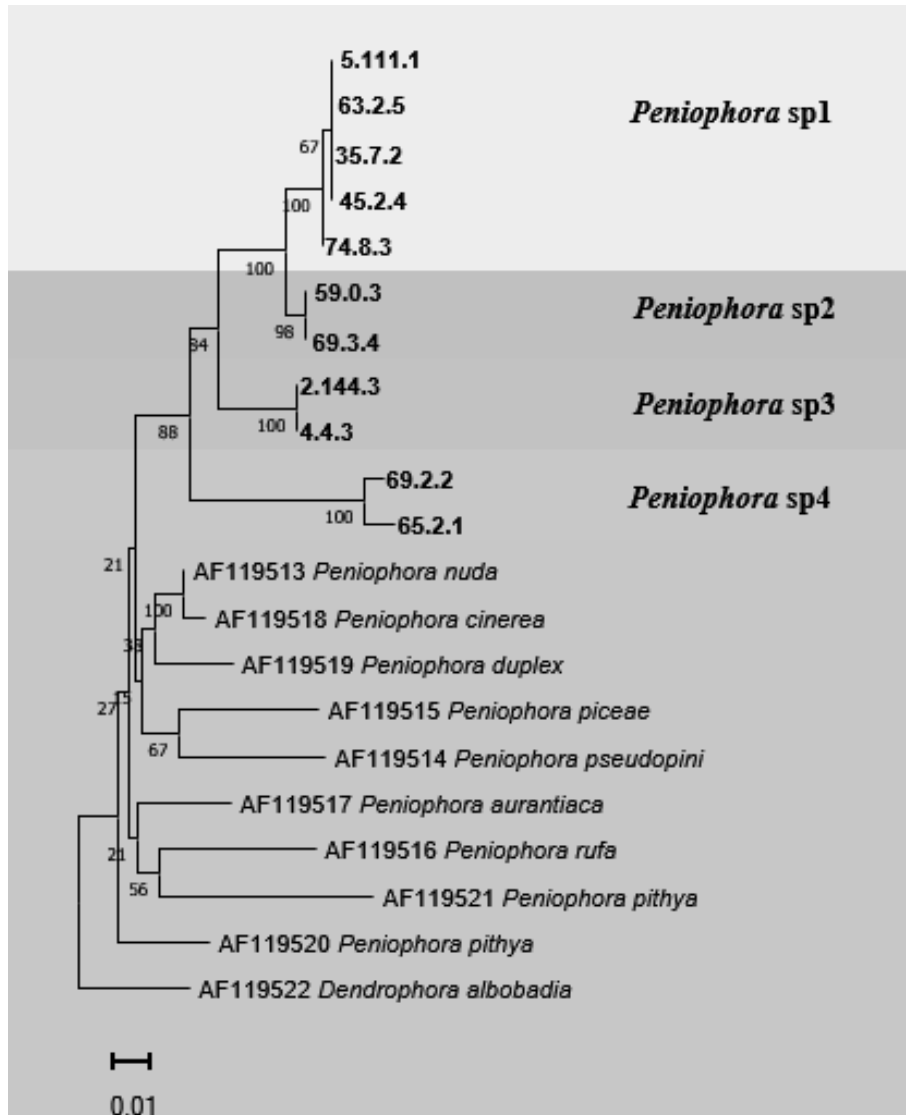
Kết quả định loại 27 mẫu ở kết quả bảng sau:

**Bảng 4. Kết quả định loại loài nấm gây mục ruột**

| STT | Tên loài                                   | Ký hiệu mẫu | Xuất xứ | Trình tự tham chiếu |
|-----|--|-------------|---------|---------------------|
| 1   | <i>Coriopsis aspera</i>                    | 4.13.3      | BD      | MK589269            |
| 2   | <i>Grammothele lineata</i>                 | 62.1.5      | NA      | JN411115            |
| 3   | <i>Lentinus squarrosulus</i>               | 4.48.1      | BD      | MN856300            |
| 4   | <i>Peniophora</i> sp1.                     | 5.111.1     | BD      |                     |
| 5   | <i>Peniophora</i> sp1.                     | 63.2.5      | NA      |                     |
| 6   | <i>Peniophora</i> sp1.                     | 35.7.2      | BD      |                     |
| 7   | <i>Peniophora</i> sp1.                     | 45.2.4      | NA      |                     |
| 8   | <i>Peniophora</i> sp1.                     | 74.8.3      | BV      |                     |
| 9   | <i>Peniophora</i> sp2.                     | 59.0.3      | TQ      |                     |
| 10  | <i>Peniophora</i> sp2.                     | 69.3.4      | TQ      |                     |
| 11  | <i>Peniophora</i> sp3.                     | 2.144.3     | TQ      |                     |
| 12  | <i>Peniophora</i> sp3.                     | 4.4.3       | TQ      |                     |
| 13  | <i>Peniophora</i> sp4.                     | 69.2.2      | TQ      |                     |
| 14  | <i>Peniophora</i> sp4.                     | 65.2.1      | NA      |                     |
| 15  | <i>Perenniporia tephropora</i>             | 2.3.4       | BD      | MW077095            |
| 16  | <i>Perenniporia tephropora</i>             | 4.53.1      | BD      | MN341836            |
| 17  | <i>Perenniporia tephropora</i>             | 4.88.1      | BD      | MN341836            |
| 18  | <i>Perenniporia tephropora</i>             | 48.0.3      | TQ      | MN341836            |
| 19  | <i>Perenniporia tephropora</i>             | 18.2.1      | NA      | MN341836            |
| 20  | <i>Perenniporia tephropora</i>             | 62.1.2      | NA      | MN341836            |
| 21  | <i>Perenniporia tephropora</i>             | 4.5.3       | BD      | MN341836            |
| 22  | <i>Perenniporia tephropora</i> KoRLI047383 | 1.35.1      | BD      | MN341836            |
| 23  | <i>Pseudolagarobasidium acaciicola</i>     | 24.3.3      | BV      | DQ517882            |
| 24  | <i>Pseudolagarobasidium acaciicola</i>     | 47.1.1      | NA      | DQ517882            |
| 25  | <i>Pseudolagarobasidium acaciicola</i>     | 112.7.2     | BV      | DQ517882            |
| 26  | <i>Ganoderma</i> sp. E7113                 | 5.85.3      | BD      | AJ536664            |
| 27  | <i>Clitopilus hobsonii</i> ZD16061809      | 13.1.1      | NA      | MN523234            |

Trong 27 mẫu nấm thuộc 8 chi có 12 loài khác nhau trong đó có 20 mẫu chỉ xác định được đến chi và có thể thuộc 9 loài mới, đáng chú ý là bốn loài trong

chi *Peniophora* đều có giải trình tự khác nhau được dựng thành cây phân loại cụ thể ở hình 4.



Hình 4. Mười một mẫu được xác định thuộc chi *Peniophora*

Ngoài trừ *Grammothele lineata*, *Lentinus squarrosulus* và *Clitopilus* chưa có nghiên cứu nào về khả năng gây mục ruột của các loài này. Còn các loài còn lại đều là những loài thuộc nhóm nấm gây mục ruột cho các loài cây trên thế giới. Cụ thể, theo Lee & Maziah (1993), bệnh thối trắng phần lớn được tìm thấy gây rỗng ruột trên keo tai tượng, thường chỉ phát hiện khi chặt hạ các loài nấm gây ra hiện tượng là *Phellinus noxius*,

*Tinctoporellus epimiltinus*, và *Rigidoporus hypobrunneus* gây rỗng ruột keo tai tượng ở Malaysia và Đông Kalimantan, Indonesia (Lee & Sikin, 1999). *Phellinus kawakamii* cũng được biết đến gây mục ruột cho phi lao và keo ở Hawaii (Larsen *et al.*, 1985). Ngoài ra *Phellinus* cũng là loài gây mục rỗ và gây chết keo ở Malaysia (Hosagoudaff & Manojkumar, 2007). Ngoài ra chi *Phellinus* vẫn được biết đến là loài gây

thối rữa trên hầu hết các loài cây lá kim và nhiều cây gỗ cứng (Agrios, 2012). Trong chi *Fomes* loài *Fomes nigrolaccatus* và *Fomes setulosus* cũng được tìm thấy trên các loài keo nói chung ở Australia (Yuan, 1997). Loài *Pseudolagarobasidium acaciicola* sp. nov. được biết đến là nguyên nhân gây chết cây keo *Acacia cyclops* ở Nam Phi (Wood & Ginns, 2011). Đặc biệt là loài *Peniophora* được biết đến là loài gây mục ruột cho gỗ cây lá kim và gỗ làm nguyên liệu giấy (Agrios, 2012). Trong nghiên cứu này, các mẫu thuộc loài *Perenniporia tephropora* đã được ghi nhận gây mục ruột trên cây Keo tai tượng rất mạnh.

#### 4. KẾT LUẬN

Từ các mẫu gỗ keo tai tượng bị bệnh mục ruột đã phân lập được 301 mẫu nấm mục nâu, 106 mẫu có phản ứng màu cam và 251 mẫu nấm mục trắng, trong đó có 27 mẫu phân giải cellulose rất mạnh.

27 mẫu nấm có khả năng phân giải rất mạnh bao gồm 12 loài, 8 chi thuộc bộ nấm đảm, trong đó có 9 loài chưa xác định. Tuy nhiên, cần có những nghiên cứu sâu hơn ở trên các phân đoạn gen khác nhau để nghiên cứu cụ thể hơn nữa về các loài này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agrios, G., 2012. *Plant pathology*: Elsevier (5th ed).
2. Sari, S., 2017. Isolation and screening of cellulolytic fungi from *Salacca edulis* leaf litter. *Biodiversitas, Journal of Biological Diversity*, 18.
3. Yuan, Z. Q., 1997. *Diseases of Tropical Acacias in Northern Queensland*. Paper presented at the Diseases of Tropical Acacias: Proceedings of an International Workshop Held at Subanjeriji (South Sumatra), 28 April-3 May 1996.
4. Wood, A., & Ginns, J., 2011. A new dieback disease of *Acacia cyclops* in South Africa caused by *Pseudolagarobasidium acaciicola* sp. nov. *Canadian Journal of Botany*, 84, 750 - 758.
5. Larsen, M., Lombard, F., & Hodges, C., 1985. Hawaiian Forest Fungi V. a New Species of *Phellinus* (Hymenochaetaceae) Causing Decay of *Casuarina* and *Acacia*. *Mycologia*, 77.
6. Hosagoudaff, V. B., & Manojkumar, A., 2007. Diseases on Wattles (*Acacia* spp.)-A Review. *Mycopathol.*, 45(2), 218 - 223.
7. Glen, M., Tommerup, I., Bougher, N., & O'Brien, P., 2002. Are Sebacinaceae common and widespread ectomycorrhizal associates of Eucalyptus species in Australian forests? *Mycorrhiza*, 12(5), 243 - 247.
8. White, T., Bruns, T. D., Lee, S. O., Taylor, J. W., Innis, M., Gelfand, D., & Sninsky, J., 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics* (Vol. 31): Academic Press.
9. Harwood, C. E. & Nambiar, E. K. S., 2014a. Productivity of acacia and eucalypt plantations in South-east Asia. 2. trends and variations. *International Forestry Review*, 16, 249 - 260.
10. Harwood, C. E. & Nambiar, E. K. S., 2014b. Sustainable plantation forestry in South East Asia. Client Report EP 14685. CSIRO Ecosystem Sciences, Canberra, Australia, 95 pp.
11. Nambiar, E. K. S. & Harwood, C. E., 2014. Productivity of acacia and eucalypt plantations in South-east Asia. 1. Bio-physical determinants of production: opportunities and challenges. *International Forestry Review*, 16, 225 - 248.
12. Nambiar, E. K. S., Harwood, C. E. & Kien, N. D., 2015. *Acacia* plantations in Vietnam: research and knowledge application to secure a sustainable future. *Southern Forests*, 77, 1 - 10

13. Old, K. M., Lee, S. S., Sharma, J. K. & Yuan, Z. Q., 2000. A Manual of Diseases of Tropical Acacias in Australia, South-East Asia and India. Center for International Forestry Research, Bogor, Indonesia, 104 pp. ISBN 979 - 8764 - 44 - 7.
14. Thu, P. Q., Griffiths, M. W., Pegg, G. S., McDonald, J. M., Wylle, F. R., King, J. & Lawson, S. A., 2010. Healthy plantations: a field guide to pests and pathogens of *Acacia*, *Eucalyptus* and *Pinus* in Vietnam. Department of Employment, Economic Development and Innovation, Queensland, Australia, 124 pp. [http://era.daf.qld.gov.au/id/eprint/2049/1/Field\\_guide\\_to\\_pest\\_and\\_diseases\\_Engl.pdf](http://era.daf.qld.gov.au/id/eprint/2049/1/Field_guide_to_pest_and_diseases_Engl.pdf). Accessed date 10 June 2013.
15. Thu, P. Q., Quynh, D. N. & Dell, B., 2012. *Ceratocystis* sp. causes crown wilt of *Acacia* spp. planted in some ecological zones of Vietnam. *Journal of Plant Protection*, 5, 24 - 30.
16. Tarigan, M., Roux, J., Van Wyk, M., Tjahjono, B. & Wingfield, M. J., 2011a. A new wilt and die-back disease of *Acacia mangium* associated with *Ceratocystis manginecans* and *C. acaciivora* sp. nov. in Indonesia. *South African Journal of Botany*, 77, 292 - 304.
17. Brawner, J., Japarudin, Y., Lapammu, M., Rauf, R., Boden, D. & Wingfield, M. J., 2015. Evaluating the inheritance of *Ceratocystis acaciivora* symptom expression in a diverse *Acacia mangium* breeding population. *Southern Forests*, 77, 83 - 90.
18. Fourie, A., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D., Thu, P. Q. & Barnes, I., 2016. A possible centre of diversity in South East Asia for the tree pathogen, *Ceratocystis manginecans*. *Infection, Genetics and Evolution*, 41, 73 - 83.
19. Mahmud, S., Lee, S. S. & Ahmad, H. H., 1993. A survey of heart rot in some plantations of *Acacia mangium* in Sabah. *Journal of Tropical Forest Science*, 6, 37 - 47.
20. Zakaria, I., Wan Razali, W. M., Hashim, M. N. & Lee, S. S., 1994. The incidence of heartrot in *Acacia mangium* plantations in Peninsular Malaysia. In: Sawn timber from *Acacia mangium* affected by heartrot. Forest Research Institute Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia, No. 114, 15 pp.
21. Ito, S. & Nanis, L. H., 1994. Heartrot in *Acacia mangium* in SAFODA plantation. Study report of Sabah Re-afforestation Technical Development and Training Project, SAFODA and JICA, 52 pp.
22. Ito, S., 2002. The infection of heartrot and disease severity on several *Acacia* species in SAFODA plantations. Study Report of SAFODA-JICA Project, 16 pp.
23. Mehrotra, M. D., Pandey, P. C., Chakrabarti, K., Sharma, S. K. & Hazra, K., 1996. Root and heartrots in *Acacia mangium* plantations in India. *Indian Forester*, 122, 155 - 160.
24. Lee, S. S., 2002. Overview of the heartrot problem in *Acacia* - Gap analysis and research opportunities. In: Heartrots in plantation hardwoods in Indonesia and Australia. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR) Technical Reports No. 51e, 26 - 34 pp.
25. Lee, S. S., Teng, S. Y., Lim, M. T. & Kader, R. A., 1988. Discoloration and heart rot of *Acacia mangium* Willd. - some preliminary results. *Journal of Tropical Forest Science*, 1, 170 - 177.
26. Mahmud, S., Lee, S. S. & Ahmad, H. H., 1993. A survey of heart rot in some plantations of *Acacia mangium* in Sabah. *Journal of Tropical Forest Science*, 6, 37 - 47.
27. Basak, A. C., 1997. Heart rot of *Acacia mangium* in Bangladesh. *Indian Journal of Forestry*, 20(1), 61 - 66.
28. Thu, P. Q., 2009. Chuyên đề bệnh rỗng ruột Keo tai tượng. Trong dự án: Nghiên cứu chọn các dòng keo và bạch đàn chống chịu bệnh có năng suất cao phục vụ trồng rừng kinh tế (Giai đoạn 2005 - 2010). Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam, 20.
29. Nghĩa, N. H., 2015. Báo cáo tổng kết đề tài: Nghiên cứu chọn các dòng keo và bạch đàn chống chịu bệnh có năng suất cao phục vụ trồng rừng kinh tế (Giai đoạn 2011 - 2015) Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam, 138.

30. Onsoni, H., 2005. Identification of over producer strain of endo-1,4glucanase in *Aspergillus* Species: Characterization of crude carboxymethyl cellulase. *African Journal of Biotechnology*, 4(1), 26 - 30.
31. Sari, S., 2017. Isolation and screening of cellulolytic fungi from *Salacca edulis* leaf litter. *Biodiversitas, Journal of Biological Diversity*, 18.
32. Gardes, M. & Bruns, T. D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113 - 118.
33. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, T., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Eds by Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J., Academic Press, San Diego, USA, 315 - 322 pp.
34. Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S. & Li, W., 2012. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28, 3150 - 3152.
35. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403 - 410.
36. Lee, S. S. & Maziah, Z., 1993. Fungi associated with heart rot of *Acacia mangium* in Peninsular Malaysia. *Journal of Tropical Forest Science*, 5, 479 - 484.
37. Lee, S. S. & Noraini Sikin, Y., 1999. Fungi associated with heart rot of *Acacia mangium* trees in Peninsular Malaysia and east Kalimantan. *Journal of Tropical Forest Science*, 11, 240 - 254.
38. Hosagoudaff, V. B., & Manojkumar, A., 2007. Diseases on Wattles (*Acacia* spp.)-A Review. *Mycopathol.*, 45(2), 218 - 223.
39. Yuan, Z. Q., 1997. *Diseases of Tropical Acacias in Northern Queensland*. Paper presented at the Diseases of Tropical Acacias: Proceedings of an International Workshop Held at Subanjeriji (South Sumatra).

## ABSTRACT

### Heartrot disease in *Acacia mangium* in Vietnam

*One of the most deadly diseases in Acacia plantations is heart rot, particularly in Southeast Asia, where the tropical temperature is ideal for the growth of fungi. Early heart rot disease cannot be visible because breakdowns are concerted inside is a symptom of the disease. The symptoms will become apparent when the trees are broken and the stems are hollow inside. This study demonstrated the outcome of isolating and characterising the fungus that causes heart rot disease in Acacia mangium in certain significant ecological regions of Vietnam. Twenty-seven fungal strains from 8 genera and 12 species have been identified through the classification of things based on the use of the enzyme test method and the outcomes of identification by the molecular technique.*

**Keywords:** *Acacia mangium, enzyme test, heart rot, plantation.*

# BƯỚC ĐẦU XÁC ĐỊNH NGUYÊN NHÂN GÂY BỆNH KHÔ ĐẦU LÁ CÂY KIM GIAO

Trần Xuân Hưng<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Minh Hằng<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Trung tâm Nghiên cứu Bảo vệ rừng

\* Tác giả liên hệ: hung.tran@vafs.gov.vn

## TÓM TẮT

Cây Kim giao (*Podocarpus fleuryi*) là loài cây thường xanh bố tự nhiên rải rác trên đất tích vôi ở các tỉnh miền núi phía Bắc và miền Trung Việt Nam, có giá trị kinh tế cao trong sản xuất các đồ thủ công mỹ nghệ và được trồng nhiều trong kiến trúc cảnh quan. Tuy nhiên, hiện nay cây Kim giao đang bị bệnh khô đầu lá, gây ảnh hưởng không nhỏ sinh trưởng và thẩm mỹ của cây. Nghiên cứu này nhằm xác định triệu chứng, đánh giá tính gây bệnh và định danh loài nấm gây bệnh khô đầu lá. Kết quả phân lập đã thu được 13 mẫu nấm từ các mẫu lá bị bệnh tại Hà Nội và Vườn Quốc gia Cúc Phương. Tính gây bệnh của các mẫu nấm trên lá được chia thành các nhóm gồm: gây bệnh rất mạnh (3 mẫu), gây bệnh mạnh (3 mẫu), gây bệnh yếu (4 mẫu) và không gây bệnh (3 mẫu). Trong đó các mẫu nấm KG1.3, KG2.2 và KG3.3 gây bệnh mạnh nhất, mẫu KG1.2, KG2.3 và KG3.2 gây bệnh mạnh. Triệu chứng bệnh sau khi gây bệnh nhân tạo có đặc điểm tương tự như mẫu lá được thu ngoài hiện trường. Kết quả định danh thông qua các đặc điểm hình thái học đã xác định nấm gây bệnh khô đầu lá là hai loài nấm *Lasiodiplodia* sp. và *Pestalotiopsis* sp. Nghiên cứu này lần đầu ghi nhận nguyên nhân gây bệnh khô đầu lá trên cây Kim giao và cần tiếp tục nghiên cứu để có giải pháp quản lý bệnh này hiệu quả.

**Từ khóa:** Bệnh khô đầu lá, Kim giao, *Lasiodiplodia* sp., *Pestalotiopsis* sp.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kim giao (*Podocarpus fleuryi* (Hickel) de Laub) là loài cây gỗ nhỏ, cao 20 - 25m, đường kính 40 - 50cm, thân thẳng, tán hình tháp. Ngoài ra, cây Kim giao có lá đẹp, thường xanh quanh năm nên được dùng phổ biến cho kiến trúc cảnh quan, trồng ven đường, các công trình tôn giáo và các công trình mang lối

kiến trúc cổ. Gỗ Kim giao có thớ thẳng, mịn, màu vàng nhạt có nhiều vân rất đẹp và bền, dùng làm các đồ mỹ nghệ, làm đũa cao cấp.

Kim giao phát triển mạnh trên đất tích vôi, tầng đất dày, thoát nước tốt, thường phân bố ở các rừng mưa nhiệt đới và á nhiệt đới thường xanh, có độ cao từ 200 - 1000m như ở miền Nam Trung Quốc, Myanmar, Lào và Việt Nam. Tại Việt Nam, cây Kim giao phân bố rải rác ở các

Người phân biệt: TS. Nguyễn Minh Chí

tỉnh miền núi phía Bắc và miền Trung như Lạng Sơn, Tuyên Quang, Hải Phòng, Ninh Bình, Thanh Hóa, Nghệ An, Quảng Bình và Thừa Thiên Huế, trong đó hai quần thể tự nhiên tại Vườn Quốc gia Cát Bà và Vườn Quốc gia Cúc Phương được bảo vệ nghiêm ngặt (Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2007). Do sự phân bố hẹp nên loài cây này đang ở tình trạng sắp nguy cấp (Sách Đỏ Việt Nam, 2007) và được xếp là loài gần bị đe dọa (Near Threatened) theo Danh lục Đỏ Thế giới IUCN (Thomas, 2013).

Trong những năm gần đây, cây Kim giao thường xuất hiện một số bệnh phổ biến như bệnh khô đầu lá, bệnh đốm than, bệnh đốm xám, bệnh khô cành, bệnh thảm nhung. Trong đó có bệnh khô đầu lá là bệnh gây hại nhiều nhất, làm cho lá mất diệp lục, ảnh hưởng đáng kể đến khả năng quang hợp của cây, và đặc biệt ảnh hưởng đến mỹ quan trong khu vực trồng Kim giao. Tuy nhiên đến nay chưa có bất cứ công trình nghiên cứu nào xác định nguyên nhân gây bệnh khô đầu lá cây Kim giao tại Việt Nam. Bài báo này sẽ tiến hành xác định nguyên nhân gây ra bệnh khô đầu lá và tính gây bệnh của chúng trên cây Kim giao làm cơ sở để xây dựng các biện pháp phòng trừ bệnh hại, phục vụ công tác bảo tồn và phát triển loài cây này tại Việt Nam.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu lá bị bệnh thu tại Hà Nội (Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam, Bộ Nông nghiệp và PTNT) và Ninh Bình (Vườn Quốc gia Cúc Phương).

- Các mẫu nấm gây bệnh khô đầu lá phân lập từ lá cây Kim giao.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- *Phương pháp điều tra xác định triệu chứng*: Mô tả triệu chứng bệnh trên cây Kim giao, quan sát và mô tả vết bệnh trên lá, mô tả màu sắc vết bệnh, các biểu hiện trên vết bệnh...

- *Thu mẫu lá bị bệnh*: Các mẫu lá bị bệnh được thu mẫu riêng rẽ, tại mỗi địa điểm tiến hành thu mẫu bệnh mỗi cây với 10 mẫu lá.

- *Phương pháp phân lập nấm*: Phân lập nấm gây bệnh trực tiếp từ các mẫu lá bị bệnh. Trước khi phân lập, tiến hành khử trùng bề mặt lá bị bệnh, ngâm trong cồn 70% 1 phút, sau đó ngâm vào dung dịch Sodium hypochlorite 2,5% 1 phút và cuối cùng ngâm trong nước cất 1 phút, thấm khô. Sau đó tiến hành cắt phần giáp ranh giữa mô bị bệnh (màu nâu) và mô chưa bị chuyển màu (màu xanh) trên lá bị bệnh và đặt trên môi trường PDA có bổ sung các loại kháng sinh (Ampicilin 0,5% và Streptomycin 0,5%). Trong vòng 24 - 36 giờ sau khi phân lập, tiến hành theo dõi tách đỉnh sinh trưởng và làm thuần nấm sang môi trường PDA.

- *Phương pháp nghiên cứu tính gây bệnh*: Đánh giá tính gây bệnh thông qua gây bệnh nhân tạo trên lá, cụ thể như sau: Tạo vết thương nhỏ trên bề mặt lá Kim giao khỏe, sạch bệnh, cuống lá được quấn bằng bông có thấm nước nhằm giữ cho lá được tươi lâu. Cắt miếng thạch PDA có chứa sợi nấm gây bệnh diện tích 0,5cm<sup>2</sup> đặt lên trên lá, đặt bông ẩm lên trên mặt thạch. Công thức đối chứng cũng được tiến hành tương tự nhưng sử dụng PDA không chứa sợi nấm. Thí nghiệm với 10 lá/lặp cho mỗi chủng nấm bệnh và được lặp lại 3 lần. Mẫu sau khi được gây bệnh đặt trong hộp nhựa có nắp để tránh cho lá bị mất nước. Theo dõi hàng ngày để xác định thời gian ủ bệnh,

sau 15 và 30 ngày tiến hành đo diện tích vết bệnh trên lá bằng phần mềm ImageJ. Phân cấp khả năng gây bệnh dựa trên các tiêu chí cụ thể như sau: (0): Không có vết bệnh trên lá còn tươi; (1): Diện tích vết bệnh  $< 0,5\text{cm}^2$ ; (2): Diện tích vết bệnh  $\geq 0,5$  đến  $< 1\text{cm}^2$ ; (3): Diện tích vết bệnh  $\geq 1$  đến  $< 2\text{cm}^2$ ; (4): Diện tích vết bệnh  $\geq 2\text{cm}^2$  hoặc toàn bộ lá bị bệnh.

+ Cấp bệnh trung bình (DI) được xác định theo công thức:  $DI = \sum ni.vi/N$

Trong đó: ni là số lá bị bệnh với cấp hại i (i từ cấp 0 đến cấp 4); vi là trị số của cấp bị hại thứ i; N là tổng số cây điều tra.

- *Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hình thái:* Cây đĩnh sợi nấm trên môi trường PDA mới và đặt ở nhiệt độ  $24^\circ\text{C}$  để theo dõi hệ sợi nấm phát triển. Mô tả đặc điểm hình thái các giai đoạn phát triển của nấm, chụp ảnh hệ sợi nấm bằng máy ảnh kỹ thuật số, đo kích thước và chụp ảnh các dạng bào tử trên kính hiển vi quang học BX50.

- Xử lý số liệu bằng phần mềm R (version 4.2) để phân tích các chỉ tiêu thống kê theo Tukey's test.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Triệu chứng của bệnh hại lá trên cây Kim giao

Bệnh khô đầu lá cây Kim giao thường xuất hiện ở cây trên 5 tuổi, những cây tuổi nhỏ có tỷ lệ bị bệnh thấp hơn. Ban đầu bệnh thường xâm nhiễm tại vị trí mép lá và ngọn lá (hình 1b), sau đó vết bệnh lan vào giữa lá (hình 1c). Ở giai đoạn đầu khi nấm bệnh xâm nhiễm, trên lá xuất hiện những chấm nhỏ có màu nâu vàng, lan rộng ra vùng xung quanh thành đốm nâu hoặc nâu sẫm, sau đó mở rộng dần ra. Vết bệnh màu nâu lan dần, sau đó chuyển thành màu nâu xám hoặc trắng xám, khi vết bệnh lan ra cả phiến lá gây ra lá bị khô nứt và rụng dần. Sau khi bị nấm xâm nhiễm, trên vết bệnh hình thành các khối bào tử màu nâu đen, đôi khi mọc thành các vòng tròn đồng tâm đan xen nhau trên phần lá bị khô (hình 1c). Phần mô giáp ranh giữa vết bệnh và phần lá chưa bị bệnh thường có màu nâu sẫm phân tách rất rõ rệt.



**Hình 1. Bệnh khô đầu lá trên cây Kim giao**

a. Tán lá bị bệnh; b. Lá bị bệnh từ đầu lá; c. Lá bị bệnh lan rộng cả phiến lá

Bệnh khô đầu lá trên cây Kim giao thường bắt đầu xuất hiện vào mùa xuân khi thời tiết có độ ẩm cao, thuận lợi cho nấm bệnh xâm nhiễm. Sang đến mùa hè nấm bệnh xuất hiện các triệu chứng rõ rệt ở đầu lá hoặc mép lá.

Trong quá trình điều tra thực tế đã ghi nhận tỷ lệ bị bệnh khô đầu lá từ 10 - 15% tại các địa điểm thu mẫu, đồng thời chúng đang có xu hướng phát tán rộng. Bệnh thường xuất hiện và gây bệnh nặng nhất vào mùa xuân do có độ ẩm cao,

bào tử qua đông trên cành, lá bị bệnh gặp điều kiện thuận lợi nảy mầm phát triển. Ngoài ra từ tháng 7 đến tháng 8 bệnh cũng xuất hiện khá phổ biến do điều kiện thời tiết nóng và có mưa nhiều.

### 3.2. Tính gây bệnh của các mẫu nấm

Kết quả phân lập đã thu được 13 mẫu nấm từ các mẫu lá Kim giao bị bệnh, đã tiến hành gây bệnh nhân tạo để xác định các mẫu nấm có khả năng gây bệnh.

**Bảng 1. Tính gây bệnh của các mẫu nấm gây bệnh trên lá Kim giao**

| STT        | Ký hiệu mẫu | Địa điểm thu mẫu       | Diện tích vết bệnh trên lá (cm <sup>2</sup> ) | Tính gây bệnh  |
|------------|-------------|------------------------|---|----------------|
| 1          | KG1.1       | Viện KHLN - Hà Nội     | 0,21 <sup>a</sup>                             | Yếu            |
| 2          | KG1.2       | Viện KHLN - Hà Nội     | 1,88 <sup>b</sup>                             | Mạnh           |
| 3          | KG1.3       | Viện KHLN - Hà Nội     | 5,67 <sup>c</sup>                             | Rất mạnh       |
| 4          | KG1.4       | Viện KHLN - Hà Nội     | 0,35 <sup>ab</sup>                            | Yếu            |
| 5          | KG1.5       | Viện KHLN - Hà Nội     | 0 <sup>a</sup>                                | Không gây bệnh |
| 6          | KG2.1       | Bộ NNPTNT - Hà Nội     | 0,24 <sup>a</sup>                             | Yếu            |
| 7          | KG2.2       | Bộ NNPTNT - Hà Nội     | 5,54 <sup>c</sup>                             | Rất mạnh       |
| 8          | KG2.3       | Bộ NNPTNT - Hà Nội     | 1,18 <sup>b</sup>                             | Mạnh           |
| 9          | KG3.1       | Cúc Phương - Ninh Bình | 0,14 <sup>a</sup>                             | Yếu            |
| 10         | KG3.2       | Cúc Phương - Ninh Bình | 1,35 <sup>b</sup>                             | Mạnh           |
| 11         | KG3.3       | Cúc Phương - Ninh Bình | 4,87 <sup>c</sup>                             | Rất mạnh       |
| 12         | KG3.4       | Cúc Phương - Ninh Bình | 0 <sup>a</sup>                                | Không gây bệnh |
| 13         | KG3.5       | Cúc Phương - Ninh Bình | 0 <sup>a</sup>                                | Không gây bệnh |
| 14         | Đối chứng   |                        | 0 <sup>a</sup>                                | Không gây bệnh |
| <i>LSD</i> |             |                        | 0,84  |                |
| <i>Fpr</i> |             |                        | < 0,001                                       |                |

*Ghi chú:* LSD (Lowest Significant Difference): Sự khác biệt có ý nghĩa; Fpr: Mức ý nghĩa; Các giá trị trong cùng cột với các ký tự giống nhau không có sai khác thống kê với P = 0,05 khi phân tích ANOVA phép kiểm định Turkey.

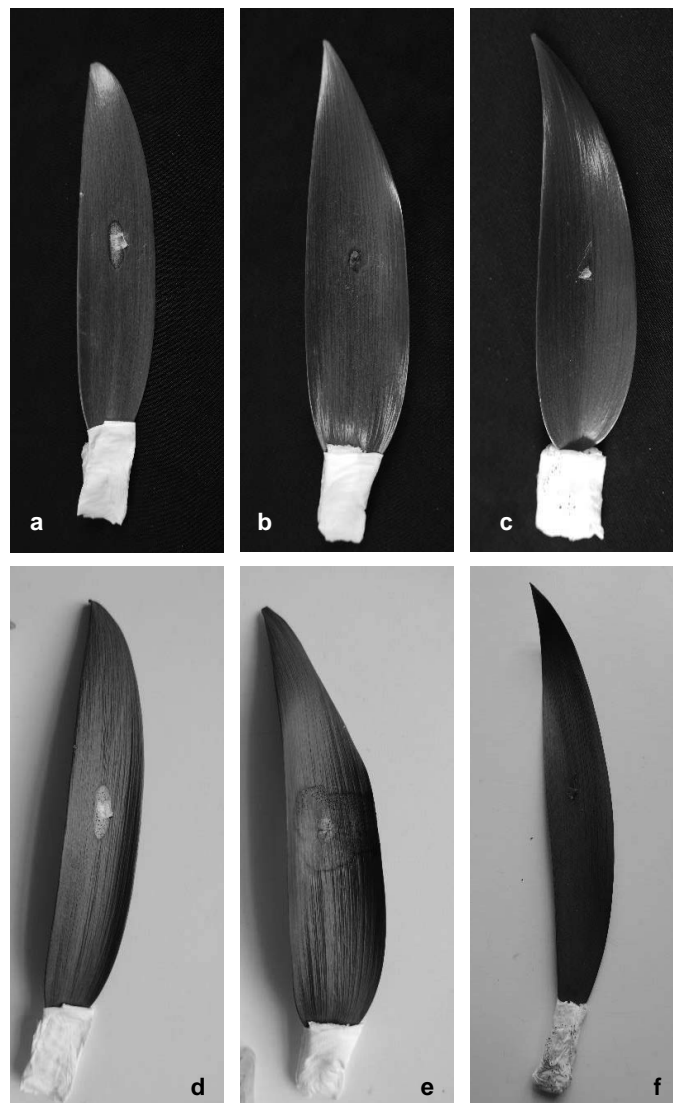
Kết quả gây bệnh nhân tạo đã xác định được 3 mẫu gây bệnh rất mạnh, 3 mẫu gây bệnh mạnh, 4 mẫu gây bệnh yếu và 3 mẫu không gây bệnh.

Mẫu KG1.3, KG2.2 và KG3.3 là ba mẫu nấm gây bệnh rất mạnh có diện tích vết bệnh khoảng 4,8 - 5,6cm<sup>2</sup> sau 30 ngày theo dõi. Ba mẫu nấm có tính gây bệnh

manh (KG1.2, KG2.3 và KG3.2) có diện tích vết bệnh từ 1,1 - 1,8cm<sup>2</sup>.

Vết bệnh trên lá sau khi gây bệnh của các mẫu nấm gây bệnh rất manh và gây bệnh manh có các triệu chứng tương tự với lá bị bệnh tại hiện trường. Trên vết bệnh, lá đã chuyển thành màu nâu và nâu xám, trên bề mặt xuất hiện các hạch nấm đen nằm rải rác trên vết bệnh. Ở các mẫu nấm gây bệnh rất manh là KG1.3, KG2.2

và KG3.3 vết bệnh lan rộng ra cả phần mép lá, phần lá bị bệnh khô và có vết nứt li ti. Phần giáp ranh giữa vết bệnh và lá chưa bị bệnh có màu nâu sẫm khá rõ rệt (hình 2d và 2e). Như vậy có thể thấy thời gian ủ bệnh của các mẫu nấm này sẽ thường dài hơn so với các mẫu nấm khác, nhưng khi phát bệnh chúng có tốc độ lây lan nhanh khiến cho toàn bộ phiến lá bị bệnh trong thời gian ngắn.



**Hình 2. Tính gây bệnh của các mẫu nấm trên lá Kim giao**  
a-d. Mẫu KG2.3; b-e. Mẫu KG2.2; c-f. Mẫu đối chứng  
a-c. Mẫu gây bệnh sau 15 ngày; d-f. Mẫu gây bệnh sau 30 ngày

### 3.3. Kết quả giám định các loài nấm

Sáu mẫu nấm gây bệnh mạnh và rất mạnh được định danh dựa trên đặc điểm hình thái hệ sợi, hạch nấm và bào tử.

• **Đặc điểm hình thái của ba mẫu nấm KG1.3, KG2.2 và KG3.3:**

Hệ sợi nấm có màu nâu xám hoặc đen với các sợi nấm dày mọc vươn thẳng lên khỏi bề mặt môi trường (hình 3d). Mặt dưới môi trường có màu đen xám đến đen sẫm sau 7 ngày. Trên bề mặt hệ sợi hình thành các hạch nấm trên môi trường PDA sau 4 - 5 tuần (hình 3f). Bào tử vô tính có hình trứng hoặc hình bầu dục với đỉnh tròn hoặc hơi thuôn nhọn, có vách ngăn dày. Bào tử khi còn non thường có màu trong suốt sau chuyển thành màu nâu đậm khi bào tử trưởng thành (hình 3e). Đặc điểm nổi bật của bào tử có đường kẻ dọc và có một vách ngăn rõ rệt khi bào tử trưởng thành. Kích thước của bào tử từ 18,7 - 23,1 × 12,7 - 14,1 μm.

• **Đặc điểm loài của ba mẫu nấm KG1.2, KG2.3 và KG3.2:**

Hệ sợi nấm có màu trắng hoặc trắng sữa, mọc dày, bông tạo thành các vòng trên bề mặt môi trường (hình 3d). Mặt dưới môi trường có màu vàng nhạt đến vàng nâu sau 7 ngày. Trên bề mặt hệ sợi hình thành các chấm nhỏ màu đen là hạch nấm sau 3 - 4 tuần. Bên trong hạch nấm có chứa các bào tử vô tính có dạng hình thoi hoặc hình bầu dục, có kích thước 20 - 24,5 × 4 - 6 μm. Bào tử có thành mỏng có 4 vách ngăn ngang, chia tế bào thành 5 phần, phần đầu và phần cuối có màu trong suốt. Trên đỉnh bào tử có 3 - 4 lông roi không màu có kích thước bằng với kích thước của bào tử.

Kết quả so sánh đối chiếu đặc điểm hình thái, bào tử với các tài liệu đã được công bố đã xác định hai loài nấm gây ra bệnh khô đầu lá cây Kim giao. Trong đó ba mẫu nấm KG1.3, KG2.2 và KG3.3 gây bệnh rất mạnh được xác định là loài *Lasiodiplodia* sp. thuộc họ Botryosphaeriaceae, bộ Botryosphaerales, lớp Dothideomycetes, ngành nấm túi Ascomycota và ba mẫu nấm gây bệnh mạnh KG1.2, KG2.3 và KG3.2 được xác định là loài *Pestalotiopsis* sp. thuộc họ nấm đĩa Melanconiaceae, bộ nấm đĩa Melanconiales, ngành phụ nấm bất toàn Deuteromycotina.

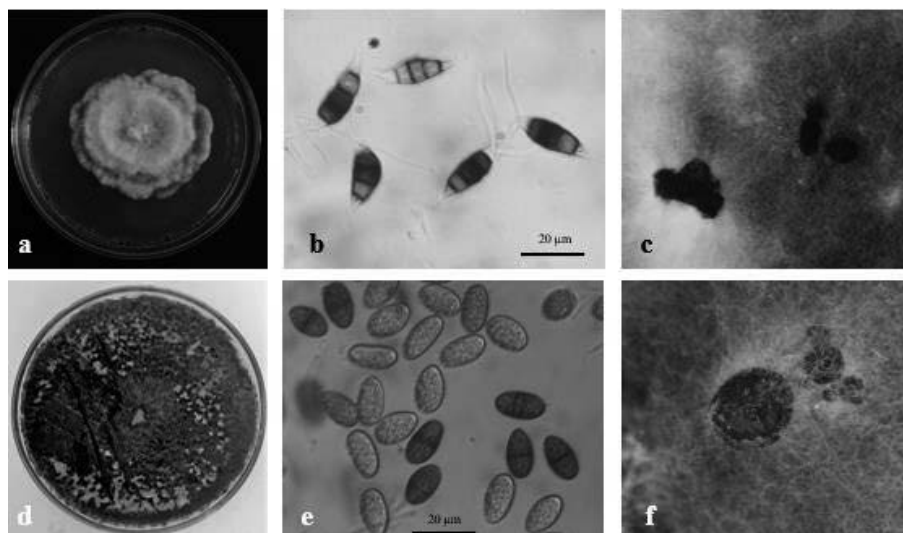
Đây là hai loài nấm gây bệnh hại lá khá phổ biến ở các loài cây chủ khác nhau, chủ yếu gây ra các bệnh như đốm lá, cháy lá và loét thân cành. Một loài nấm khác thuộc chi *Pestalotiopsis* là *P. trachicarpicola* cũng đã được xác định là nguyên nhân gây ra bệnh khô đầu lá trên cây Thông tre (*Podocarpus macrophyllus*) tại Trung Quốc với các đặc điểm triệu chứng khá tương tự như trên cây Kim giao tại Việt Nam (Maharachchikumbura *et al.*, 2014). Tại Việt Nam, loài nấm *P. funerea* được xác định là nguyên nhân gây ra một số bệnh hại lá khá phổ biến đó là bệnh khô xám lá Thông và bệnh khô lá Quế và bệnh cháy lá cây Tràm (Hà Công Tuấn *et al.*, 2006). Ngoài ra, hai loài nấm là *P. vismiae* và *Pestalotiopsis* sp. là nguyên nhân gây ra bệnh khô lá rất phổ biến trên cây Sa mộc (*Cunninghamia lanceolata*) tại một số tỉnh miền Bắc (Nguyễn Hoài Thu *et al.*, 2021).

Đối với loài nấm *Lasiodiplodia* sp. có khả năng gây bệnh với phổ cây chủ khá rộng, với khoảng trên 500 bệnh ở các cây chủ khác nhau như bệnh thối quả, thối rễ, thối cổ rễ, loét đầu cành, cháy lá, đốm lá

(Huda-Shakirah *et al.*, 2022). Trên thế giới đã ghi nhận một số loài nấm khác thuộc chi này như *L. theobromae* xuất hiện rất phổ biến và gây ra một số bệnh hại nguy hiểm như cháy lá, loét thân cành và thối quả ở nhiều vùng trồng Ca cao trên thế giới như ở Trung Phi, Nam Mỹ, Trung Mỹ và Đông Nam Á (Mbenoun *et al.*, 2008; Alvindia *et al.*, 2017; Huda-Shakirah *et al.*, 2022). Ngoài ra các loài nấm *L. theobromae* và *L. pseudotheobromae* còn gây ra bệnh loét thân cây Keo tại trạng tại tỉnh Sabah, Malaysia (Maide *et al.*, 2018). Đây cũng là nguyên nhân gây ra bệnh loét thân cành cây Keo tại nhiều vùng trồng trong cả nước, trong đó tỉnh Kon Tum với hơn 1000ha bị nhiễm bệnh với tỷ lệ cây chết ngọn khoảng 10% (Phạm Quang Thu, 2011). Theo nghiên cứu của Phạm Quang Thu (2003) đã xác định nguyên nhân gây bệnh khô đầu lá cây Re gừng (*Cinnamomum obtusifolium*) do loài nấm *Colletotrichum coffeanum* gây ra, tuy nhiên triệu chứng của bệnh khô đầu lá

trên cây Re gừng thường hình thành các đốm tròn nhỏ có màu nâu đỏ trên lá. Ngoài ra một số cây ăn quả ở nước ta cũng bị loài nấm *Lasiodiplodia* spp. gây hại như thối quả chôm chôm, đốm đen xoài, chảy mủ thân cành trên cây điều (Bùi Chí Bửu, 2015; Thạch Thị Ngọc Yến và Nguyễn Văn Phong, 2016; Nguyễn Thị Dung *et al.*, 2020).

Trong nghiên cứu này mới chỉ bước đầu xác định hai loài nấm gây bệnh dựa trên đặc điểm hình thái học. Tuy nhiên đối với nhóm loài *Pestalotiopsis* spp. có rất nhiều các loài thuộc cùng chi có đặc điểm hình thái tương tự nhau và đặc điểm hệ sợi nấm rất dễ thay đổi sau mỗi lần cấy truyền và chỉ phân biệt được thông qua kỹ thuật phân tử, so sánh các chuỗi DNA giữa các chủng nấm để tìm ra sự sai khác (Solarte, *et al.*, 2018). Chính vì vậy trong phạm vi nghiên cứu này chỉ dừng lại xác định hai loài nấm gây bệnh khô đầu lá cây Kim giao là *Lasiodiplodia* sp. và *Pestalotiopsis* sp. dựa trên các đặc điểm hình thái hệ sợi và bào tử của mẫu nấm.



**Hình 3. Đặc điểm bào tử và hệ sợi nấm *Lasiodiplodia* sp. và *Pestalotiopsis* sp.**  
a, d. Hệ sợi nấm; b, e. Bào tử vô tính; c, f. Đĩa bào tử hình thành trên trên PDA sau 4 tuần

#### 4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã xác định và mô tả các triệu chứng của bệnh khô đầu lá cây Kim giao đồng thời ghi nhận tỷ lệ bị bệnh khô đầu lá từ 10 - 15% tại các địa điểm thu mẫu.

Qua đánh giá tính gây bệnh của các mẫu nấm xác định mẫu nấm 3 mẫu nấm có tính gây bệnh rất mạnh và 3 mẫu nấm gây bệnh mạnh đều có triệu chứng tương tự trên lá bị bệnh được thu ngoài hiện trường. Nghiên cứu đã xác định được 3 mẫu nấm gây bệnh mạnh là *Lasiodiplodia* sp. và ba mẫu nấm gây bệnh mạnh là *Pestalotiopsis* sp.

Từ kết quả nghiên cứu này rất cần tiếp tục nghiên cứu bằng kỹ thuật sinh học phân tử nhằm xác định chính xác tên khoa học hai loài nấm đồng thời đề xuất giải pháp quản lý hiệu quả bệnh khô đầu lá cây Kim giao.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alvindia, D. G. & Gallema, F. L. M., 2017. *Lasiodiplodia theobromae* causes vascular streak dieback (VSD)-like symptoms of cacao in Davao Region, Philippines. *Australasian Plant Disease Notes* 12, 1 - 4.
2. Bùi Chí Bửu, 2015. Nghiên cứu di truyền tính kháng bệnh trên cây Điều. <http://iasvn.org/chuyen-muc/Nghien-cuu-di-truyen-tinh-khang-benh-dieu-7276.html>. Truy cập 15/6/2022.
3. Nguyễn Thị Dung, Nguyễn Thanh Vũ, Đỗ Ngọc Anh Huy, Đoàn Thị Tám, Nguyễn Đăng Quân, Lê Quang Luân, 2020. Hoạt tính kháng nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* gây bệnh đốm đen trên xoài cát Hòa Lộc của chitosan cắt mạch bức xạ. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc 2020.
4. Huda-Shakirah, A. R., Mohamed Nor, N. M. I., Zakaria, L., Leong, Y. H., & Mohd, M. H., 2022. *Lasiodiplodia theobromae* as a causal pathogen of leaf blight, stem canker, and pod rot of *Theobroma cacao* in Malaysia. *Scientific Reports*, 12(1), 1 - 14.
5. Maharachchikumbura, S. S., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P. W., 2014. *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79(1), 121 - 186.
6. Maid, M., Azmah, L., Edmund G., Najjah S., Crispin K., Colin, M., Wickneswari, R., 2018. First report of stem canker disease on *Acacia mangium* induced by *Lasiodiplodia theobromae* and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* species in Sabah, Malaysia. *Malaysian Applied Biology*. 47, 147 - 151.
7. Mbenoun, M., Momo Zeutsa, E. H., Samuels, G., Nsougou Amougou, F. & Nyasse, S., 2008. Dieback due to *Lasiodiplodia theobromae*, a new constraint to cocoa production in Cameroon. *Plant Pathology*. 57, 381.
8. Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2007. Atlas cây rừng Việt Nam. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, tập 1, 249tr.
9. Thomas, P., 2013. *Nageia fleuryi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T39606A2930266. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013.1.RLTS.T39606A2930266.en>. Truy cập 15/06/2022.
10. Hà Công Tuấn, Đỗ Thị Kha, Đoàn Hoài Nam, Đỗ Quang Tùng, 2006. Cẩm nang quản lý sâu bệnh hại rừng trồng. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Hà Nội, 118tr.
11. Nguyễn Hoài Thu, Đặng Như Quỳnh, Trần Nhật Tân, Trang A Tổng, Nguyễn Thị Minh Hằng, 2021. Thành phần bệnh hại cây Sa mộc (*Cunninghamia lanceolata* Lamb.) tại một số tỉnh miền Bắc. Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp, số 6, 166 - 173.
12. Phạm Quang Thu, 2011. Sâu bệnh hại rừng trồng. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội, 200tr.

13. Phạm Quang Thu, 2003. Bệnh khô đầu lá cây Re gừng. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, số 6, trang 796 - 797.
14. Thạch Thị Ngọc Yến và Nguyễn Văn Phong, 2016. Nghiên cứu tác nhân gây bệnh thối quả Chôm chôm sau thu hoạch ở đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp, tập 14, số 12, 1868 - 1873.
15. Solarte, F., Muñoz, C. G., Maharachchikumbura, S. S., & Álvarez, E., 2018. Diversity of *Neopestalotiopsis* and *Pestalotiopsis* spp., causal agents of guava scab in Colombia. *Plant disease*, 102(1), 49 - 59.

## ABSTRACT

### Initial identification of the cause of leaf-tip blight disease on *Podocarpus fleuryi*

*Kimgiao (Podocarpus fleuryi)* is an evergreen, scattered and naturally distributed on limestone soils in the northern and central mountainous provinces. The tree has a high value in the production of handicrafts and is widely planted in landscape architecture. However, the leaf-tip blight disease has infected the tree, which significantly affects the growth and aesthetic value of the *Kimgiao* tree. This study aims to identify disease symptoms, assessing the pathogenicity, and identifying the disease fungi. There were 13 isolates from infected leaves collected in Hanoi and Cuc Phuong National Park, which were examined for pathogenicity. The pathogenicity test showed the four levels of leaf-tip blight disease including very high (3 isolates), high (3 isolates), low (4 isolates) and nil (3 isolates). The isolates KG1.3, KG2.2, and KG3.3 have the strongest severity while the isolates KG1.2, KG2.3 and KG3.2 have a strong severity. The symptoms of inoculated leaves are same with those of infected leaves collected in the field. Based on morphological characteristics, *Lasiodiplodia* sp. and *Pestalotiopsis* sp. were identified as the cause of leaf-tip blight disease on the *Kimgiao* tree. This study is the first report of cause to leaf-tip blight disease on the *Kimgiao* tree in Vietnam and need further research to effectively manage the disease.

**Keywords:** Leaf-tip blight disease, *Podocarpus fleuryi*, *Lasiodiplodia* sp., *Pestalotiopsis* sp.

# KHẢ NĂNG KÝ SINH TRÊN TUYẾN TRÙNG *Meloidogyne* GÂY BƯỚU RỄ HỒ TIÊU VÀ PHÂN HỦY CHITIN CỦA NẤM *Paecilomyces*

Huỳnh Minh Châu<sup>1\*</sup>, Nguyễn Vương Tuấn<sup>2</sup>,  
Lương Thị Hoàng Dung<sup>2</sup>, Dương Thị Nguyễn Quyên<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Phòng Nghiên cứu và Phát triển - Tập đoàn Lộc Trời

<sup>2</sup> Trung tâm Nghiên cứu & Sản xuất Sản phẩm Sinh học - Tập đoàn Lộc Trời

\* Tác giả liên hệ: [chau.m.huynh@loctroi.vn](mailto:chau.m.huynh@loctroi.vn)

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phòng trị tuyến trùng bằng các tác nhân sinh học là bước tiếp cận quan trọng nhất trong quản lý tuyến trùng hướng đến một nền nông nghiệp bền vững. Một số loại nấm sống trong đất có khả năng kiểm soát tuyến trùng như *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* và *Paecilomyces lilacinus*. Trong đó, *Paecilomyces lilacinus* là loài quan trọng nhất ký sinh trên trứng của *Meloidogyne incognita* (Mahmoud *et al.*, 2020). Trong quá trình sinh trưởng và phát triển, *Paecilomyces* có thể ký sinh lên trứng tuyến trùng, tuyến trùng và tiết ra các enzyme, độc tố... gây chết, kìm hãm sự phát triển quần thể của tuyến trùng (Morton *et al.*, 2004). Đề tài được thực hiện nhằm xác định khả năng ký sinh của nấm *Paecilomyces* lên tuyến trùng, mức độ gây độc từ dịch trích của nấm lên tuyến trùng và khả năng phân hủy chitin thành phần cấu tạo vỏ trứng tuyến trùng làm cơ sở khoa học cho những nghiên cứu ứng dụng tiếp theo.

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

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Phân lập tuyến trùng từ mẫu rễ và đất ở tỉnh Đắk Lắk theo QCVN 01-180: 2014/BNNPTNT. Nấm *Paecilomyces* được thu thập tại Đắk Lắk, Gia Lai và Lâm Đồng, phân lập tại Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất Sản phẩm Sinh học - Tập đoàn Lộc Trời. Môi trường nuôi cấy: PDA, Water Agar, môi trường cảm ứng có bổ sung chitin. Thuốc thử Lugol (Iod 2.5g; KI 5g; H<sub>2</sub>O 1000ml).

### 2.1. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Thời gian và địa điểm

Nghiên cứu được thực hiện tháng 5/2017 đến 5/2018 tại Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất Sản phẩm Sinh học, Tập đoàn Lộc Trời.

#### 2.2.2. Bố trí thí nghiệm

**Thí nghiệm 1:** Đánh giá khả năng ký sinh của các chủng nấm *Paecilomyces spp.* trên trứng tuyến trùng *Meloidogyne sp.* gây hại rễ tiêu trong điều kiện phòng thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 7 chủng nấm *Paecilomyces* (Pae 1 - Pae 7) và đối chứng, 3 lặp lại, mỗi lặp lại là 1 đĩa petri. Các chủng *Paecilomyces* được nuôi cấy trên môi trường PDA 7 ngày trước khi bố trí thí nghiệm. Đục lấy khoanh khuẩn ty đường kính 5mm đặt úp vào đĩa petri chứa 10ml môi trường, mỗi đĩa petri đặt 3 khoanh nấm với khoảng cách đều nhau. Đối chứng đặt khoanh môi trường PDA. Rút 30 $\mu$ l dung dịch trứng tuyến trùng (30 trứng) nhỏ lên khoanh nấm. Theo dõi quá trình xâm nhiễm của nấm trong điều kiện nhiệt độ phòng.

Ghi nhận số trứng tuyến trùng bị ký sinh dưới kính hiển vi ở 1, 2, 3 và 4 ngày sau lây nhiễm (NSLN). Tỷ lệ trứng bị ký sinh =  $[(\text{Số trứng bị nấm ký sinh}) \div (\text{Tổng số trứng})] \times 100$

**Thí nghiệm 2:** Đánh giá khả năng ký sinh của các chủng *Paecilomyces* spp. trên tuyến trùng cái *Meloidogyne* sp. gây hại tiêu ở điều kiện phòng thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí như thí nghiệm 1. Bốn ngày sau nuôi cấy *Paecilomyces* trên môi trường WA, tiến hành cấy tuyến trùng cái (10 con/đĩa) phân bố đều theo vòng tròn xung quanh mép tản nấm, đĩa đối chứng đặt khoanh agar không chứa nấm. Các đĩa petri được đặt trong điều kiện nhiệt độ phòng.

Ghi nhận số tuyến trùng bị ký sinh ở 1, 2, 3 và 4 ngày sau khi đặt tuyến trùng vào đĩa (sau khi lây nhiễm). Tuyến trùng được cho là ký sinh (hoặc chết) khi bị thay đổi hình dạng hoặc bị đông tụ (khi cắt tuyến trùng không có dịch chảy ra).

**Thí nghiệm 3:** Đánh giá hiệu lực gây chết tuyến trùng của dịch lọc nuôi cấy

*các chủng Paecilomyces* spp. trong điều kiện phòng thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 8 nghiệm thức, 3 lặp lại, mỗi lặp lại là một bình tam giác (V = 250ml). Các chủng *Paecilomyces* spp. được nuôi tăng sinh trong môi trường PDB lỏng trong 5 ngày, lọc qua giấy lọc Newstar, ly tâm dung dịch sau lọc 5000 vòng/phút trong 5 phút. Ở các nghiệm thức chứa dịch trích *Paecilomyces* gồm 50ml dịch trích *Paecilomyces* và 50ml dịch tuyến trùng/bình tam giác. Đối chứng gồm 50ml nước cất và 50ml dịch tuyến trùng. Mật số tuyến trùng trung bình 26 con/ml.

Ghi nhận số tuyến trùng sống ở các thời điểm 1, 2, 3 và 4 NSLN bằng cách hút 2ml dung dịch ở mỗi nghiệm thức cho vào đĩa petri đường kính 6cm, quan sát dưới kính soi nổi Olympus 4.5X, mỗi lặp lại đếm 3 lần.

Độ hữu hiệu từ dịch trích nuôi cấy được tính theo công thức Abbott. ĐHH (%) =  $[(C - T) \div C] \times 100$

Trong đó: C: Số lượng cá thể tuyến trùng sống ở nghiệm thức đối chứng; T: Số lượng cá thể tuyến trùng sống ở nghiệm thức có xử lý nấm.

**Thí nghiệm 4:** Khả năng sinh enzyme ngoại bào (chitinase) phân hủy chitin của *Paecilomyces* trong điều kiện phòng thí nghiệm

Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 7 chủng nấm, 4 lặp lại, mỗi lặp lại 1 đĩa petri. Các chủng *Paecilomyces* spp. được nuôi cấy trên môi trường PDA 7 ngày trước khi bố trí thí nghiệm. Rút 200 $\mu$ l huyền phù bào tử ( $10^6$  bào tử/ml)

cho vào ống Facol chứa 20ml môi trường lỏng có bổ sung chitin, đặt trên máy lắc với tốc độ 100 vòng/phút trong 4 ngày. Sau đó lọc qua giấy lọc để loại bỏ sinh khối nấm, ly tâm dịch lọc với tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ bào tử nấm thu phần dịch phía trên.

Phương pháp khuếch tán giếng thạch đã được sử dụng để đánh giá khả năng phân giải các chất (Balouiri *et al.*, 2016). Dùng dụng cụ đục để tạo các giếng trên đĩa petri có chứa môi trường cảm ứng, mỗi đĩa khoan 3 giếng, đường kính giếng là 5mm. Lấy 30ml dịch trích nhỏ vào mỗi giếng. Ủ các đĩa petri ở 30°C trong 2 ngày. Để thấy rõ sự xuất hiện của vòng halo, tiến hành nhuộm màu đĩa thạch với dung dịch Lugol's (Iod 2.5g; KI 5g; H<sub>2</sub>O 1000ml). Ghi nhận đường kính vòng phân giải chitin. Vòng phân giải = (D - d) mm. Trong đó: D: Đường kính vòng phân giải. d: Đường kính đường kính giếng khoan.

**2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu:** Xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS 22.0.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Khả năng xâm nhiễm của các chủng nấm *Paecilomyces* spp. trên trứng tuyến trùng *Meloidogyne* sp. gây hại tiêu trong điều kiện phòng thí nghiệm

Kết quả bảng 1 ghi nhận, tất cả 7 chủng *Paecilomyces* đều thể hiện khả năng kí sinh trứng tuyến trùng với mức độ khác nhau. Ở 1, 2 và 3 ngày sau lây nhiễm (NSLN) cho thấy chủng *Pae 2* có tỉ lệ xâm nhiễm và ký sinh trứng thấp nhất. Đến 4 NSLN, cả 7 chủng đều có tỉ lệ ký sinh tương đương nhau (72,61 - 84,0%). Điều này cho thấy chủng *Pae 2* xâm nhiễm và phát triển chậm hơn so với các chủng còn lại. Aminuzzaman, (2013) và Trương Thị Ngọc Hân, (2020) cũng có kết quả tương tự; tỉ lệ ký sinh trứng của *Paecilomyces* sp. lần lượt là 75% và 95,7%. Các nghiên cứu của Cayrol *et al.* (1989); Goswami (2004) đều ghi nhận *P. lilacinus* ký sinh trên trứng cho hiệu quả cao nhất và có khả năng kiểm soát thành công tuyến trùng bọ rầy của *M. javanica* và *M. incognita*, trên cà chua, cà tím, khoai tây và các cây rau khác.

**Bảng 1. Tỷ lệ ký sinh của các chủng *Paecilomyces* spp. trên trứng tuyến trùng**

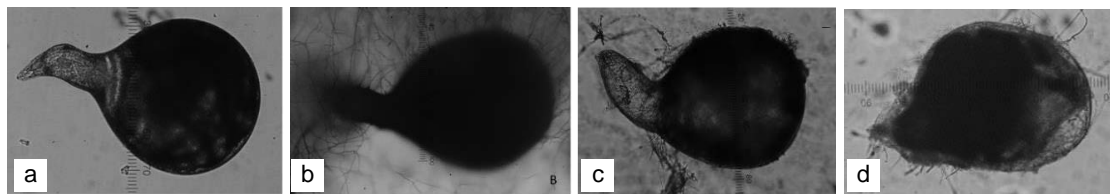
| Thí nghiệm | Tỉ lệ ký sinh trên trứng (%) |                     |                      |                    |
|------------|------------------------------|---------------------|----------------------|--------------------|
|            | 1 NSLN                       | 2 NSLN              | 3 NSLN               | 4 NSLN             |
| Pae 1      | 22,70 <sup>ab</sup>          | 51,95 <sup>ab</sup> | 74,05 <sup>abc</sup> | 82,32 <sup>a</sup> |
| Pae 2      | 05,38 <sup>c</sup>           | 39,60 <sup>b</sup>  | 63,09 <sup>c</sup>   | 72,61 <sup>a</sup> |
| Pae 3      | 14,97 <sup>b</sup>           | 70,36 <sup>a</sup>  | 84,13 <sup>ab</sup>  | 84,13 <sup>a</sup> |
| Pae 4      | 18,25 <sup>ab</sup>          | 70,18 <sup>a</sup>  | 85,85 <sup>a</sup>   | 84,40 <sup>a</sup> |
| Pae 5      | 30,99 <sup>a</sup>           | 59,65 <sup>ab</sup> | 68,74 <sup>bc</sup>  | 77,83 <sup>a</sup> |
| Pae 6      | 17,49 <sup>ab</sup>          | 57,33 <sup>ab</sup> | 80,05 <sup>ab</sup>  | 83,75 <sup>a</sup> |
| Pae 7      | 24,23 <sup>ab</sup>          | 71,07 <sup>a</sup>  | 78,69 <sup>ab</sup>  | 78,69 <sup>a</sup> |
| Đối chứng  | 0,00 <sup>d</sup>            | 00,00 <sup>c</sup>  | 00,00 <sup>d</sup>   | 00,00 <sup>b</sup> |
| CV (%)     | 21,13                        | 11,45               | 6,06                 | 5,86               |
| F          | *                            | *                   | *                    | *                  |

Ghi chú: Ở cùng một cột các chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức  $\alpha = 0,05$ ; Số liệu được chuyển đổi sang  $\sqrt{(X+0,5)}$ .

### 3.2. Khả năng ký sinh của các chủng nấm *Paecilomyces* spp. trên tuyến trùng cái *Meloidogyne* sp. gây hại tiêu trong điều kiện phòng thí nghiệm

Ghi nhận về đặc điểm xâm nhiễm và ký sinh của các chủng *Paecilomyces* trên tuyến trùng cái, sau khi tiếp cận và xâm nhiễm thành công, sợi nấm sẽ tấn công sâu vào bên trong làm cho tuyến trùng bị biến dạng, bị khuyết, tan hoặc

căng tròn, đông tụ. Theo Zaki và Irshad (1996), sợi nấm có thể xâm nhập qua lớp biểu bì hoặc lỗ mở của vật chủ bằng cách phá hủy lớp lipid, chitin bằng hệ enzyme phân giải protease, lipase và chitinase. Chính vì thế khi tuyến trùng chết thường thấy các biểu hiện như đã mô tả. Kết quả quan sát trong thí nghiệm, dạng thường thấy nhất là dạng đông tụ khi bị ký sinh.



**Hình 1. Nấm *Paecilomyces* ký sinh trên tuyến trùng cái**

a. Tuyến trùng cái sống, b. Tuyến trùng cái bị nấm tấn công, c. Tuyến trùng chết dạng đông tụ, d. Dạng khuyết

Kết quả ghi nhận tỉ lệ ký sinh trên tuyến trùng cái cho thấy chủng Pae 3 có tỉ lệ xâm nhiễm (50%), thấp hơn và khác biệt so với các chủng Pae 4 (76,6%), Pae

5 (88,0%) và Pae 6 (76,6%) ở 1 NSLN. Tỉ lệ xâm nhiễm và ký sinh của các chủng nấm tăng dần trong những ngày sau đó và đạt 90 - 100% ở 4 NSLN.

**Bảng 2. Tỉ lệ tuyến trùng cái chết do nấm *Paecilomyces* ký sinh theo thời gian**

| Nghiệm thức | Tỉ lệ tuyến trùng cái chết do nấm ký sinh qua các thời điểm (%) |                    |                    |                     |
|-------------|---|--------------------|--------------------|---------------------|
|             | 1 NSLN  | 2 NSLN             | 3 NSLN             | 4 NSLN              |
| Pae 1       | 60,00 <sup>ab</sup>   | 73,30 <sup>a</sup> | 80,00 <sup>a</sup> | 96,60 <sup>a</sup>  |
| Pae 2       | 66,60 <sup>ab</sup>   | 76,60 <sup>a</sup> | 83,30 <sup>a</sup> | 90,00 <sup>a</sup>  |
| Pae 3       | 50,00 <sup>b</sup>  | 63,30 <sup>a</sup> | 83,30 <sup>a</sup> | 93,30 <sup>a</sup>  |
| Pae 4       | 76,60 <sup>a</sup>  | 83,00 <sup>a</sup> | 90,00 <sup>a</sup> | 96,60 <sup>a</sup>  |
| Pae 5       | 88,00 <sup>a</sup>  | 83,00 <sup>a</sup> | 93,30 <sup>a</sup> | 100,00 <sup>a</sup> |
| Pae 6       | 76,60 <sup>a</sup>  | 83,00 <sup>a</sup> | 90,00 <sup>a</sup> | 90,00 <sup>a</sup>  |
| Pae 7       | 70,00 <sup>ab</sup>   | 80,00 <sup>a</sup> | 86,60 <sup>a</sup> | 90,00 <sup>a</sup>  |
| Đối chứng   | 30,00 <sup>c</sup>  | 36,60 <sup>b</sup> | 43,30 <sup>b</sup> | 53,30 <sup>b</sup>  |
| CV (%)      | 17,90   | 16,34              | 12,98              | 7,16                |
| Mức ý nghĩa | *   | *                  | *                  | *                   |

*Ghi chú:* Ở cùng một cột các chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức  $\alpha = 0,05$ . NSLN: Ngày sau lây nhiễm.

### 3.3. Khả năng gây chết tuyến trùng của dịch trích nuôi cấy nấm *Paecilomyces* cho hiệu quả gây chết tuyến trùng trên 90% và đạt 100% sau 4 ngày xử lý.

Kết quả bảng 3 cho thấy dịch trích nuôi cấy của 7 chủng *Paecilomyces* đều

**Bảng 3. Độ hữu hiệu (%) của dịch trích nuôi cấy các chủng *Paecilomyces* spp. trên tuyến trùng**

| Nghiệm thức | Độ hữu hiệu của dịch trích (%) |                     |                     |         |
|-------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|---------|
|             | 1 NSKXL                        | 2 NSKXL             | 3 NSKXL             | 4 NSKXL |
| Pae 1       | 55,64 <sup>a</sup>             | 90,19 <sup>bc</sup> | 95,86 <sup>de</sup> | 100     |
| Pae 2       | 59,96 <sup>a</sup>             | 96,71 <sup>a</sup>  | 99,38 <sup>ab</sup> | 100     |
| Pae 3       | 59,49 <sup>a</sup>             | 89,68 <sup>c</sup>  | 95,31 <sup>e</sup>  | 100     |
| Pae 4       | 45,96 <sup>b</sup>             | 90,05 <sup>bc</sup> | 97,37 <sup>cd</sup> | 100     |
| Pae 5       | 45,07 <sup>b</sup>             | 94,68 <sup>ab</sup> | 97,37 <sup>cd</sup> | 100     |
| Pae 6       | 43,86 <sup>b</sup>             | 91,78 <sup>bc</sup> | 98,01 <sup>bc</sup> | 100     |
| Pae 7       | 51,62 <sup>ab</sup>            | 96,53 <sup>a</sup>  | 100,0 <sup>a</sup>  | 100     |
| CV (%)      | 9,79                           | 2,66                | 0,89                | 0,00    |
| F           | *                              | *                   | *                   | ns      |

*Ghi chú:* Ở cùng một cột các chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức  $\alpha = 0,05$ . ns: Không khác biệt ý nghĩa thống kê. NSKXL: Ngày sau khi xử lý.

Kết quả nghiên cứu của Mahmoud *et al.*, (2020) cũng cho tỉ lệ tuyến trùng giảm 84,5% khi xử lý tuyến trùng *M. incognita* gây hại đậu que trong nhà lưới.

### 3.4. Khả năng sinh enzyme ngoại bào (chitinase) phân hủy chitin của *Paecilomyces* trong điều kiện phòng thí nghiệm

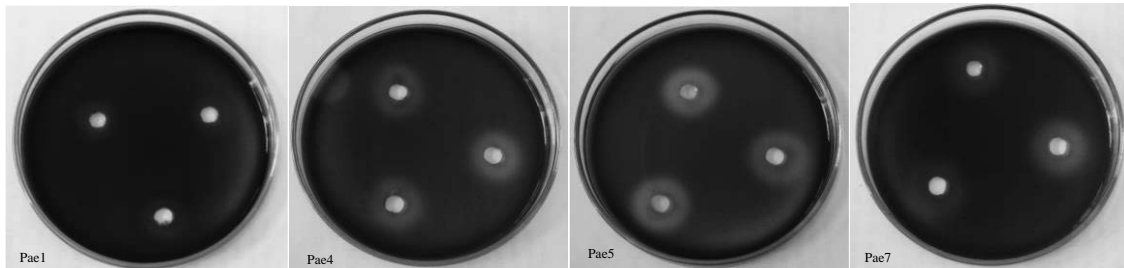
**Bảng 4. Khả năng phân giải chitin của dịch trích nuôi cấy *Paecilomyces* spp.**

| Chủng nấm | Đường kính vòng phân giải chitin (mm) |
|-----------|---------------------------------------|
| Pae 1     | 09,67 <sup>abc</sup>                  |
| Pae 2     | 06,67 <sup>d</sup>                    |
| Pae 3     | 08,33 <sup>cd</sup>                   |
| Pae 4     | 07,67 <sup>cd</sup>                   |
| Pae 5     | 12,00 <sup>a</sup>                    |
| Pae 6     | 09,00 <sup>bcd</sup>                  |
| Pae 7     | 11,33 <sup>ab</sup>                   |
| CV (%)    | 15,24                                 |
| F         | *                                     |

*Ghi chú:* Ở cùng một cột các chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức  $\alpha = 0,05$ .

Kết quả thí nghiệm cho thấy chủng Pae 5 có vòng phân giải chitin cao nhất (12,00mm). Chu Thanh Bình và ctv., 2017 cũng ghi nhận kết quả tương tự trên *P. variotii* NV01 phân lập từ đất trồng tiêu tại Đắk Lắk, đường kính phân

giải chitin 15,00mm. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Ngọc Trúc và ctv., 2020 cũng ghi nhận *P. parvisporus* phân lập từ vùng đất trồng khóm tại Tiền Giang có đường kính phân hủy chitin (vỏ tôm) là 23,68mm.



Hình 2. Sự phân giải chitin từ dịch trích nuôi cấy các chủng *Paecilomyces* spp.

## 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1. Kết luận

- Các chủng *Paecilomyces* spp. có khả năng ký sinh trên trứng và tuyến trùng cái cao. Tỷ lệ ký sinh trứng từ 72,61 - 85,85% ở 3 NSLN và trên tuyến trùng cái trên 90% ở 4 NSLN.

- Hiệu quả gây chết tuyến trùng của dịch trích *Paecilomyces* spp. trên 90% ở 2 NSXL và 100% ở 4 ngày sau khi xử lý.

- Chủng Pae 5 sinh enzyme chitinase phân hủy chitin cao nhất.

### 4.2. Đề nghị

Chọn những chủng có nhiều ưu thế như Pae 5, Pae 7 tiếp tục nghiên cứu ứng dụng phòng trừ *Meloidogyne* sp. trong điều kiện nhà lưới và thực tế sản xuất.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aminuzzaman, F. M., Xie, H. Y., Duan, W. J., Sun, B. D., and Liu, X. Z., 2013. Isolation of nematophagous fungi from eggs and females of *Meloidogyne* spp. and evaluation of their biological control potential. *Biocontrol Sci. Technol.*, 23: 170 - 182.
- Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibsouda, S. K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2): 71 - 79.
- Cayrol, J. C., Dijan, C., and Pijarowski, L., 1989. Study of the nematocidal properties of the culture filtrate of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Rev Nematol* 12(4):331 - 336.
- Chu Thanh Bình<sup>1</sup>, Bùi Thị Việt Hà, Hồ Tuyên, và Nguyễn Phương Huệ, 2017. Đặc điểm sinh học của chủng *Paecilomyces variotii* NV01 phân lập từ đất trồng hồ tiêu khu vực Đắk Lắk, <sup>(1)</sup> Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQGHN, Viện Công nghệ Sinh học, Viện HLKH&CNVN.
- Goswami., B. K., and Mittal., A., 2004. Management of root-knot nematode infecting tomato by *Trichoderma viride* and *Paecilomyces lilacinus*. *Ind Phytopathol* 57(2):235 - 236.
- Mahmoud., M. A. Y., Wafaa., M. A. E., and Dalia., E. M. L., 2020. Evaluation of the fungal activity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* as biocontrol agents against root-knot

- nematode, *Meloidogyne incognita* on cowpea, *Bull Natl Res Cent* 44, 112. <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00367-z>.
7. Morton, O., Hirsch, P., and Kerry, B., 2004. Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi - a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control, *Nematology*, 6(2), 161-170. doi. <https://doi.org/10.1163/1568541041218004>
  8. Nguyễn Thị Ngọc Trúc, Nguyễn Duy Khiêm, Trần Ngọc Phú Tịnh, Phan Thị Mỹ Dung và Trương Thanh Xuân Liên, 2020. Phân lập và đánh giá hoạt tính enzyme ngoại bào các chủng nấm ký sinh rệp sáp dưa, Viện Cây ăn quả miền Nam, Sở Nông Nghiệp và PTNT Tiền Giang.
  9. Trương Thị Ngọc Han và ctv., 2020. Sự ký sinh của nấm *Trichoderma*, *Paecilomyces* trên tuyến trùng gây bướu rễ cây tiêu. Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam - Số 1 (110)/2020.
  10. Zaki., A. S. and Irshad., M., 1996. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: A review. *Bioresource Technology* 58: 229 - 239.

## ABSTRACT

### **Parasitic ability on *Meloidogyne* causing root-knot in black pepper and chitin degradation of *Paecilomyces***

*Evaluation of the ability to parasitize and degrade chitin of 7 strains of Paecilomyces on the Meloidogyne causing root-knot in black pepper was carried out at the laboratory of the Biological Products Research & Production Center, Loc Troi Group. Experiments to evaluate the infecting ability of Paecilomyces strains on: (1) eggs and female Meloidogyne sp., (2) efficacy of Paecilomyces strains extracts against Meloidogyne sp., (3) extracellular enzyme activity. The results showed that strains of Paecilomyces spp. infected eggs with the rate from 72,61% to 85,85% at 3 days after infection (it depended on each strain). Infect and parasitizing on female with the rate over 90% at 4 days after infection. The efficiency of killing Meloidogyne sp. from culture extracts of Paecilomyces strains was over 90% at 2 days after processing and 100% at 4 days after processing. Paecilomyces 7 had the highest chitin degradation activity in the 7 strains observed (12,00mm). Research shows that Paecilomyces strains has good potential for nematode management.*

**Keywords:** Black pepper, chitin degradation, *Meloidogyne* sp., *Paecilomyces* spp., parasitic fungus.

# TUYỂN CHỌN CÁC DÒNG NẤM KÝ SINH TUYẾN TRÙNG TRONG PHÒNG TRỪ BỆNH BƯỚU RỄ TRÊN CÂY CÀ CHUA

Nguyễn Văn Tuấn<sup>1</sup>, Nguyễn Thanh Hào<sup>1</sup>, Lương Hoàng Minh Triết<sup>1</sup>,  
Đoàn Thị Kiều Tiên<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thu Nga<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Bộ môn Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp, Đại học Cần Thơ

\* Tác giả liên hệ: nttnga@ctu.edu.vn

## 1. GIỚI THIỆU

Tuyến trùng *Meloidogyne* spp. ký sinh và gây hại nặng (Ngô Thị Xuyên và Nguyễn Văn Đĩnh, 2003) với triệu chứng sưng rễ, làm cho rễ phát triển và hấp thụ dinh dưỡng kém dẫn đến giảm năng suất khi thu hoạch cũng như chất lượng nông sản. Bên cạnh gây hại trực tiếp, tuyến trùng còn tạo điều kiện thuận lợi cho sự xâm nhiễm các mầm bệnh khác trong đất trên cây trồng, đồng thời làm giảm sức đề kháng của cây trồng chống lại các loài nấm gây bệnh (Awasthi, 2015). Hiện nay, việc quản lý tuyến trùng ở Việt Nam cũng là một vấn đề khó khăn trong sản xuất nông nghiệp, biện pháp phòng trừ chủ yếu dựa vào sử dụng thuốc hóa học, tuy nhiên biện pháp này thường hiệu quả tức thời và không bền vững dẫn đến gây hậu quả xấu đối với môi trường và sức khỏe cộng đồng. Đặc biệt, thuốc hóa học làm cho tuyến trùng trở nên ngày càng kháng thuốc và khó phòng trị (Nguyễn Ngọc Châu, 2003).

Để hướng tới một nền nông nghiệp bền vững và an toàn cho sức khỏe cộng đồng, các nhà khoa học trong nước cũng

như trên thế giới đã và đang tích cực nghiên cứu những sản phẩm sinh học nhằm mang đến hiệu quả phòng trừ và những sản phẩm nông nghiệp an toàn cho người tiêu dùng. Do đó, nấm ký sinh tuyến trùng là một trong những tác nhân phòng trừ triển vọng vì được ghi nhận có khả năng ký sinh trứng của tuyến trùng *Meloidogyne* spp. và tuyến trùng con cái làm giảm khả năng sinh sản (Nguyễn Ngọc Châu, 2003). Ngoài ra, nấm có thể nhân nuôi với mật số cao trong *in vitro* (Nguyễn Ngọc Châu, 2003).

Theo Kiewnick *et al.* (2006) đã nghiên cứu nấm *Paecilomyces lilacinus* (tên mới là *Purpureocillium lilacinum*) chủng PL251 có khả năng ức chế sự phát triển của tuyến trùng *Meloidogyne incognita* trong đất trên cây cà chua, làm giảm mật độ bấu rễ, giảm số lượng trứng và tuyến trùng so với mẫu đối chứng. Tại Việt Nam, qua kết quả đánh giá của Phan Thị Diệp và *ctv.*, (2019) nấm *P. lilacinus* và *Trichoderma harzianum* có khả năng ký sinh tuyến trùng *M. javanica*. Do vậy, mục đích của đề tài nhằm tuyển chọn và đánh giá các dòng nấm triển vọng có khả năng phòng trị bệnh bấu rễ do tuyến trùng *Meloidogyne* spp. gây ra trên cây cà chua.

Người phân biên: TS. Lê Thanh Toàn

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Địa điểm nghiên cứu

Tất cả các thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm và nhà lưới Bộ môn Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

### 2.2. Nguồn vật liệu

- Nguồn nấm được phân lập từ mẫu trứng tuyến trùng bao gồm: 7 dòng nấm thuộc chi nấm *Trichoderma*, 4 dòng nấm thuộc chi *Plectosphaerella*, 3 dòng nấm thuộc chi *Paecilomyces*, 3 dòng nấm thuộc chi *Penicillium* và 2 dòng nấm chưa xác định (được cung cấp từ Bộ môn Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ).

- Giống cà chua Trang An Nông TN748 được sử dụng trong thí nghiệm.

### 2.3. Thí nghiệm 1: Tuyển chọn các dòng nấm cho khả năng ký sinh trứng tuyến trùng *Meloidogyne spp.* trong phòng thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố gồm: các nghiệm thức xử lý nấm và nghiệm thức đối chứng không xử lý nấm với 3 lần lặp lại.

#### **Phương pháp thực hiện:**

- Ly trích trứng và nhân nuôi nguồn tuyến trùng: Mẫu rễ có chứa bấu được cắt nhỏ và ngâm trong dung dịch có chứa 1% sodium hypochlorite trong 15 phút, sau đó được xoay nhỏ bằng máy xoay sinh tố. Tiếp theo cho lọc qua ba rây lọc

có đường kính lỗ lọc 1mm, 0,5µm và 0,02µm và được đặt 1mm > 0,5µm > 0,02µm theo thứ tự từ trên xuống. Phần trên rây 0,02µm được rửa nhiều lần để loại bỏ sodium hypochlorite. Sau đó, cho vào ống ficol 15ml đem ly tâm 2 lần ở 750rpm trong 5 phút: lần đầu thu phần dung dịch ở trên có chứa trứng tuyến trùng; lần 2 ly tâm với dung dịch đường 35% và thu phần dung dịch ở trên có chứa trứng tuyến trùng (Golzarı, 2011 có chỉnh sửa).

- Nhân nuôi nấm: Các dòng nấm đã phân lập được nhân nuôi trên môi trường PDA và được ủ ở 25°C từ 5 - 7 ngày, tiến hành thu bào tử và bào tử được đếm trên lam đếm hồng cầu. Sau đó, suy ra mật số ban đầu và đưa về mật số cần xử lý (Golzarı, 2011).

- **Bố trí thí nghiệm:** Trứng tuyến trùng (2000 trứng) và 100µl nấm (mật số bào tử 10<sup>7</sup> cfu/ml) được trải đều trên đĩa thạch (water agar) 1,5% bằng que hình tam giác, sau đó được ủ ở 25°C trong tối. Sau 72 giờ sẽ tiến hành ghi nhận chỉ tiêu (Đỗ Thị Kiều An và ctv., 2017; Lopez-Llorca, 2002 có chỉnh sửa).

**Ghi nhận chỉ tiêu:** Xác định tỷ lệ trứng bị ký sinh ở thời điểm 72 giờ sau khi bố trí thí nghiệm bằng cách thu trứng tuyến trùng, rút phần trứng đã thu cho vào lam đếm tuyến trùng và quan sát dưới kính hiển vi để đếm số trứng bị ký sinh (bị nấm quấn quanh) và trứng không bị ký sinh. Tỷ lệ trứng bị ký sinh được xác định theo công thức (Đỗ Thị Kiều An và ctv., 2017; Lopez-Llorca, 2002 có chỉnh sửa).

$$\text{Phần trăm trứng bị ký sinh} = \frac{\text{Tổng số trứng tuyến trùng bị ký sinh}}{\text{Tổng số trứng tuyến trùng}} \times 100$$

**2.4. Thí nghiệm 2: Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh bươu rế do tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trên cây cà chua của một số chủng nấm triển vọng trong điều kiện nhà lưới**

**Mục tiêu:** Xác định các dòng nấm mang lại hiệu quả phòng trừ bệnh bươu rế do *Meloidogyne* spp. cao ở điều kiện nhà lưới.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố với 3 lần lặp lại gồm 7 nghiệm thức (5 nghiệm thức tương ứng xử lý với 5 dòng nấm tuyển chọn từ thí nghiệm, nghiệm thức xử lý hóa học hoạt chất Abamectin và nghiệm thức đối chứng xử lý nước).

**Chuẩn bị đất trồng và cây cà chua:** Đất (4,5 kg/chậu) được trộn với tro trấu với tỷ lệ 1:1 và được thanh trùng trước khi trồng cây. Cây cà chua được giống nhau trong mỗi chậu (3 cây/chậu) từ hạt cà chua sau khi ươm. Cây sau khi ươm 3 tuần tiến hành chủng bệnh.

**Phương pháp chủng tuyến trùng gây bệnh và tác nhân phòng trị:** Cây cà chua được trồng sau 3 tuần tiến hành chủng 10.000 trứng *Meloidogyne*/800cm<sup>3</sup> đất, nấm được xử lý (10<sup>4</sup> bào tử/gram đất) ở các nghiệm thức xử lý nấm và thuốc hóa học hoạt chất Abamectin (nồng độ theo khuyến cáo) ở nghiệm thức hóa học cùng lúc với chủng bệnh; nghiệm thức đối chứng chỉ xử lý nước. Các chỉ tiêu được ghi nhận vào thời điểm 15, 30 và 45 ngày sau khi chủng bệnh. (Dube & Smart, 1987; Golzari, 2011 có hiệu chỉnh).

**Ghi nhận chỉ tiêu:** Số lượng bươu rế; mật số tuyến trùng trong đất và rế; chiều dài và khối lượng rế vào các thời điểm

15, 30 và 45 ngày sau khi chủng bệnh (Hadi Golzari, 2011).

**2.5. Định danh các dòng nấm có triển vọng trong phòng trị bệnh bươu rế do tuyến trùng *Meloidogyne* spp. bằng kỹ thuật sinh học phân tử**

**Mục tiêu:** Định danh các dòng nấm kí sinh triển vọng đến mức độ loài.

**Vật liệu:** Ba dòng nấm triển vọng được chọn từ thí nghiệm 2.

**Phương pháp thực hiện:** Ly trích DNA của các dòng nấm của được thực hiện dựa trên kỹ thuật của Doyle và Doyle (1987). Phản ứng PCR 50µl sử dụng cặp môi ITS1/ITS4 gồm gồm: 2µl DNA mẫu, 1µl ITS1, 1µl ITS4, 25µl Master Mix 2X và 21µl PCR Water. Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt: khởi đầu biến tính ở 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu trình (95°C trong 30 giây (biến tính); 58°C trong 30 giây (bắt cặp); 72°C trong 30 giây (kéo dài)), cuối cùng là 10°C trong 20 phút và sản phẩm PCR được giữ trong 4°C. Sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel agarose 1,5% trong TAE buffer ở hiệu điện thế 60V trong 60 phút, sau đó Gel được nhuộm ethidium bromide (1 mg/ml) và đọc kết quả bằng máy chụp gel Alphamager MINI. Sản phẩm PCR được gửi đi giải trình tự tại công ty First BASE Laboratories. Trình tự các mẫu được so sánh với ngân hàng gen bằng phần mềm trực tuyến (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**2.6. Xử lý số liệu**

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

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả tuyển chọn các dòng nấm cho khả năng ký sinh trứng tuyến trùng *Meloidogyne* spp. trong phòng thí nghiệm

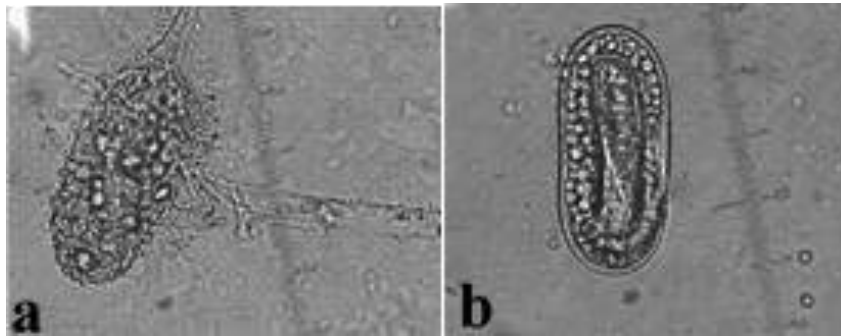
Kết quả ghi nhận về khả năng ký sinh của 20 chủng nấm đối với trứng tuyến trùng *Meloidogyne* spp. thông qua tỷ lệ ký sinh được trình bày ở bảng 1. Tại thời điểm 72 giờ sau khi bố trí thí nghiệm, cho thấy tất cả các dòng nấm có khả năng ký sinh trứng tuyến trùng ở nhiều mức độ khác nhau. Trong đó, 5

dòng nấm CTMT1, CTMT5, CTDL3, STMT4 và DTMT ký sinh trứng tuyến trùng *Meloidogyne* spp. cao trên 65% trong điều kiện phòng thí nghiệm với tỷ lệ ký sinh tương ứng 75,5%, 73,3%, 65,8%, 77,0% và 73,9% và khác biệt hoàn toàn so với nghiệm thức đối chứng và các dòng nấm khác. Kế đến là 3 dòng nấm STMT5 với tỷ lệ ký sinh 65,6%, CTMT2 và CTDL6 tương ứng 64,7% và 55,1%. Những dòng nấm còn lại cho khả năng ký sinh trứng tuyến trùng *Meloidogyne* spp. thấp dưới 50%.

**Bảng 1. Khả năng ký sinh trứng tuyến trùng *Meloidogyne* spp. trong điều kiện phòng thí nghiệm**

| STT         | Tỷ lệ (%) nấm ký sinh trứng tuyến trùng <i>Meloidogyne</i> spp. |                     |
|-------------|---|---------------------|
|             | Nghiệm thức   | Tỷ lệ ký sinh (%)   |
| 1           | TT ót 1   | 29,6 <sup>hij</sup> |
| 2           | CMSL  | 37,3 <sup>fgh</sup> |
| 3           | BTMT  | 26,8 <sup>ij</sup>  |
| 4           | BTRM  | 34,5 <sup>ghi</sup> |
| 5           | STMT1   | 39,6 <sup>fg</sup>  |
| 6           | STMT2   | 21,7 <sup>jk</sup>  |
| 7           | STMT3   | 38,1 <sup>fgh</sup> |
| 8           | STMT4   | 77,0 <sup>a</sup>   |
| 9           | STMT5   | 65,6 <sup>bc</sup>  |
| 10          | STMT6   | 17,2 <sup>kl</sup>  |
| 11          | DTMT  | 73,9 <sup>ab</sup>  |
| 12          | CTMT1   | 75,5 <sup>a</sup>   |
| 13          | CTMT2   | 64,7 <sup>cd</sup>  |
| 14          | CTMT3   | 36,7 <sup>fgh</sup> |
| 15          | CTMT5   | 73,3 <sup>abc</sup> |
| 16          | CTDL1   | 24,7 <sup>jk</sup>  |
| 17          | CTDL2   | 45,9 <sup>ef</sup>  |
| 18          | CTDL3   | 65,8 <sup>bc</sup>  |
| 19          | CTDL5   | 26,7 <sup>ij</sup>  |
| 20          | CTDL6   | 55,1 <sup>de</sup>  |
| 21          | Đối chứng   | 13,5 <sup>l</sup>   |
| Mức ý nghĩa |   | **                  |
| CV (%)      |   | 9,66                |

*Ghi chú:* Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa qua phép thử Duncan. \*\*: Mức ý nghĩa 1. Số liệu được chuyển sang arcsin $\sqrt{x}$  trước khi phân tích phương sai.



**Hình 1. Trứng tuyến trùng *Meloidogyne* spp. sau khi chùng nấm 72 giờ**  
 a. Trứng bị ký sinh ở nghiệm thức xử lý nấm;  
 b. Trứng ở nghiệm thức đối chứng không xử lý nấm

Từ kết quả đánh giá đã chọn được 5 dòng nấm CTMT1, CTMT5, CTDL3, STMT4 và DTMT có tỷ lệ ký sinh trứng tuyến trùng cao để tiến hành thí nghiệm đánh giá khả năng phòng trừ bệnh bươu rễ do tuyến trùng *Meloidogyne* spp. trên cây cà chua ở điều kiện nhà lưới.

### **3.2. Hiệu quả phòng trừ bệnh bươu rễ do tuyến trùng *Meloidogyne* spp. trên cây cà chua của một số chủng nấm triển vọng trong điều kiện nhà lưới**

#### **❖ Về số lượng bươu rễ hình thành:**

Khả năng phòng trị bệnh bươu rễ trên cây cà chua do tuyến trùng *Meloidogyne* spp. thông qua làm giảm số lượng bươu rễ được trình bày tại bảng 2. Vào thời điểm 15 ngày sau khi chùng bệnh, các nghiệm thức xử lý đều có số lượng bươu rễ (biến động từ 8 đến 20 bươu rễ) thấp hơn và khác biệt hoàn toàn so với đối chứng không xử lý (58 bươu rễ/5 gram rễ). Vào thời điểm 30 ngày sau khi chùng bệnh, nghiệm thức hóa học (5 bươu rễ/5 gram rễ) và CTMT5 (5 bươu rễ/5 gram rễ) có số lượng bươu rễ thấp và

khác biệt hoàn toàn so với đối chứng (24 bươu rễ/5 gram rễ) và các nghiệm thức xử lý còn lại. Kế đến, nghiệm thức DTMT và CTDL3 có hiệu quả giảm số lượng bươu rễ hơn nghiệm thức đối chứng và 2 nghiệm thức xử lý còn lại (STMT4: 15 bươu rễ/5 gram rễ; CTMT1: 17 bươu rễ/5 gram rễ). Vào thời điểm 45 ngày sau khi chùng bệnh, tất cả các nghiệm thức xử lý (có số lượng bươu rễ giao động từ 25 - 85 bươu rễ/5 gram rễ) đều làm giảm số lượng bươu rễ hơn so với nghiệm thức đối chứng (183 bươu rễ/5 gram rễ). Hầu hết các nghiệm thức đều mang lại hiệu quả làm giảm số lượng bươu rễ, trong đó nghiệm thức xử lý thuốc hóa học, nghiệm thức DTMT, CTDL3 và CTMT5 có khả năng làm giảm số lượng bươu rễ cao và ổn định qua các thời điểm 15, 30 và 45 ngày sau khi chùng bệnh. Bên cạnh đó, nghiệm thức STMT4 và CTMT1 cũng mang lại hiệu quả giảm số lượng bươu rễ so với nghiệm thức đối chứng vào thời điểm 15 và 45 ngày sau khi chùng bệnh, nhưng lại không có sự khác biệt so với nghiệm thức đối chứng vào thời điểm 30 ngày sau khi chùng bệnh.

**Bảng 2. Số lượng bướu rết hình thành ở các nghiệm thức vào các thời sau khi chủng bệnh**

| Nghiệm thức     | Số lượng bướu rết trên 5 gram rết |                   |                  |
|-----------------|-----------------------------------|-------------------|------------------|
|                 | 15 NSKCB                          | 30 NSKCB          | 45 NSKCB         |
| Dòng nấm STMT4  | 10 <sup>b</sup>                   | 15 <sup>abc</sup> | 72 <sup>b</sup>  |
| Dòng nấm DTMT   | 12 <sup>b</sup>                   | 8 <sup>bc</sup>   | 62 <sup>b</sup>  |
| Dòng nấm CTDL3  | 11 <sup>b</sup>                   | 7 <sup>bc</sup>   | 60 <sup>b</sup>  |
| Dòng nấm CTMT1  | 10 <sup>b</sup>                   | 17 <sup>ab</sup>  | 83 <sup>b</sup>  |
| Dòng nấm CTMT5  | 19 <sup>b</sup>                   | 5 <sup>c</sup>    | 60 <sup>b</sup>  |
| Thuốc Abamectin | 8 <sup>b</sup>                    | 5 <sup>c</sup>    | 25 <sup>b</sup>  |
| Đối chứng       | 58 <sup>a</sup>                   | 24 <sup>a</sup>   | 183 <sup>a</sup> |
| Mức ý nghĩa     | **                                | **                | **               |
| CV(%)           | 59,85                             | 51,4              | 39,92            |

Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa qua phép thử Duncan. \*\*: Mức ý nghĩa 1%; NSKCB: Ngày sau khi chủng bệnh.

❖ **Về mật số tuyến trùng trong đất:**

Khả năng làm giảm mật số tuyến trùng được thể hiện ở bảng 3. Vào thời điểm 15 ngày sau khi chủng bệnh mật số tuyến trùng trong đất giữa các của nghiệm thức xử lý đối chứng chưa thể hiện sự khác biệt. Thời điểm 30 ngày sau khi chủng bệnh, nghiệm thức DTMT có số lượng tuyến trùng trong 1 kg đất (16 con) thấp hơn, khác biệt so với nghiệm thức đối chứng (179 con) và các nghiệm thức có xử lý còn lại. Trong đó, các nghiệm thức còn lại như CTDL3 (35 con), CTMT1 (32 con), CTMT5 (25 con)

và hóa học (28 con) có mật số tuyến trùng thấp hơn và khác biệt hoàn toàn so với nghiệm thức đối chứng. Đến thời điểm 45 ngày sau khi chủng bệnh, tất cả các xử lý ngoại trừ nghiệm thức xử lý dòng nấm CTMT5 đều có mật số tuyến trùng trong khoảng 26 - 191 con/kg đất, thấp hơn và khác biệt ý so với nghiệm thức đối chứng (494 con). Như vậy, qua các thời điểm khảo sát, nghiệm thức xử lý với dòng nấm DTMT, CTDL3, CTMT1 và nghiệm thức hóa học có số lượng tuyến trùng thấp, ổn định qua các thời điểm ghi nhận chỉ tiêu.

**Bảng 3. Mật số tuyến trùng trong đất ở các nghiệm thức qua các thời điểm sau khi chủng bệnh**

| Nghiệm thức     | Mật số tuyến trùng trong đất (con/1kg đất) |          |          |
|-----------------|--|----------|----------|
|                 | 15 NSKCB                                   | 30 NSKCB | 45 NSKCB |
| Dòng nấm STMT4  | 13   | 62 ab    | 191 bc   |
| Dòng nấm DTMT   | 9  | 16 c     | 83 c     |
| Dòng nấm CTDL3  | 5  | 35 bc    | 26 d     |
| Dòng nấm CTMT1  | 8  | 32 bc    | 107 c    |
| Dòng nấm CTMT5  | 14   | 25 bc    | 419 ab   |
| Thuốc Abamectin | 6  | 28 bc    | 77 c     |
| Đối chứng       | 20   | 179 a    | 494 a    |
| Mức ý nghĩa     | ns   | *        | **       |
| CV (%)          | 38,41                                      | 18,76    | 10,02    |

Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa qua phép thử Duncan. \*\*: Mức ý nghĩa 1%; \*: Mức ý nghĩa 5%; ns: Không khác biệt. Số liệu được chuyển sang log(x+1) trước khi phân tích phương sai. NSKCB: Ngày sau khi chủng bệnh.

❖ **Mật số tuyến trùng trong rễ:**

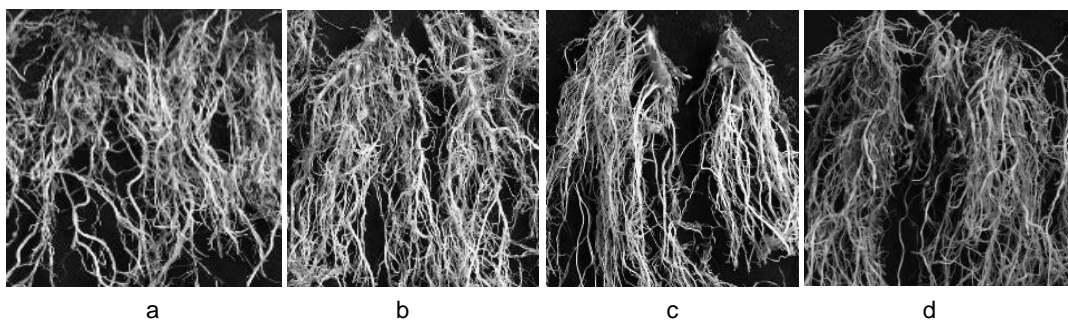
Kết quả ghi nhận tuyến trùng trong rễ được trình bày tại bảng 4. Vào thời điểm 15 ngày sau khi chủng bệnh, ba nghiệm thức xử lý các dòng nấm DTMT, CTDL3, CTMT1 và nghiệm thức hóa học có số lượng tuyến trùng dao động 0 - 4 con/chậu, thấp hơn khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng (39 con/chậu). Vào thời điểm 30 ngày sau khi chủng bệnh, ba nghiệm thức STMT4, DTMT và nghiệm thức hóa học có mật số tuyến

trùng trong khoảng 33 - 45 con/chậu, thấp hơn và khác biệt hoàn toàn so với nghiệm thức đối chứng (98 con). Đến thời điểm 45 ngày sau khi chủng bệnh, tất cả các nghiệm thức đều có số lượng tuyến trùng thấp và khác biệt thống kê so với nghiệm thức đối chứng. Trong đó, nghiệm thức DTMT (85 con), CTDL3 (85 con), CTMT1 (82 con) có mật số thấp nhất khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức xử lý hai dòng nấm STMT4 (255con) và dòng nấm CTMT5 (163 con) và hiệu quả tương đương nghiệm thức hóa học (72 con).

**Bảng 4. Mật số tuyến trùng trong rễ sau 15, 30 và 45 ngày sau khi chủng bệnh**

| Nghiệm thức     | Mật số tuyến trùng trong đất (con/5 gram rễ) |                  |                  |
|-----------------|--|------------------|------------------|
|                 | 15 NSKCB                                     | 30 NSKCB         | 45 NSKCB         |
| Dòng nấm STMT4  | 6 <sup>ab</sup>                              | 33 <sup>b</sup>  | 255 <sup>b</sup> |
| Dòng nấm DTMT   | 0 <sup>b</sup>                               | 38 <sup>b</sup>  | 85 <sup>c</sup>  |
| Dòng nấm CTDL3  | 4 <sup>b</sup>                               | 112 <sup>a</sup> | 85 <sup>c</sup>  |
| Dòng nấm CTMT1  | 0 <sup>b</sup>                               | 58 <sup>ab</sup> | 82 <sup>c</sup>  |
| Dòng nấm CTMT5  | 8 <sup>ab</sup>                              | 95 <sup>a</sup>  | 163 <sup>b</sup> |
| Thuốc Abamectin | 3 <sup>b</sup>                               | 45 <sup>b</sup>  | 72 <sup>c</sup>  |
| Đối chứng       | 39 <sup>a</sup>                              | 98 <sup>a</sup>  | 668 <sup>a</sup> |
| Mức ý nghĩa     | *  | **               | **               |
| CV (%)          | 100,6  | 9,06             | 6,33             |

*Ghi chú:* Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa qua phép thử Duncan.\*\*: Mức ý nghĩa 1%; \*: Mức ý nghĩa 5%; Số liệu được chuyển sang log(x+1) trước khi phân tích phương sai. NSKCB: Ngày sau khi chủng bệnh.



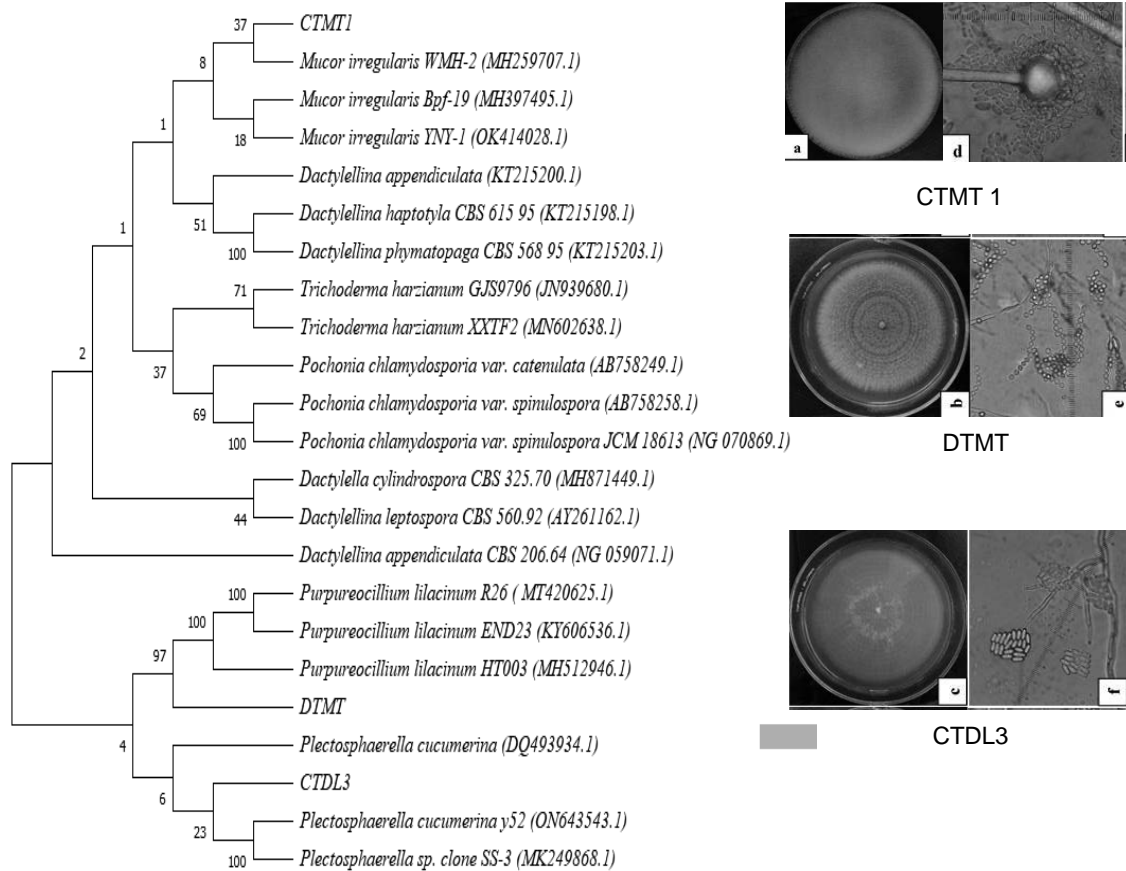
**Hình 2. Mức độ nhiễm bọ rệp do tuyến trùng *Meloidogyne* spp. vào 45 ngày sau khi chủng bệnh**

a. Nghiệm thức DTMT; b. Nghiệm thức CTDL3;  
c. Nghiệm thức CTMT1; d. Nghiệm thức đối chứng

### 3.3. Kết quả định danh các dòng nấm có triển vọng trong phòng trị bệnh bướu rễ do tuyến trùng *Meloidogyne* spp.

Kết quả định danh 3 dòng nấm triển vọng dựa trên giải trình tự vùng ITS qua phản ứng PCR sử dụng cặp mồi ITS1 - ITS4, kết quả giải trình tự sản phẩm PCR được tra cứu trên NCBI bằng công cụ BLAST của 3 chủng nấm CTMT1, CTDL3 và DTMT có hiệu quả phòng trừ

bệnh bướu rễ do tuyến trùng *Meloidogyne* spp. cao trong điều kiện nhà lưới. Kết quả cho thấy dòng nấm CTDL3 tương đồng cao với loài *Plectosphaerella cucumerina* với độ tương đồng 98,37%; dòng nấm DTMT có độ tương đồng cao 91,71% với loài *Purpureocillium lilacinum*; dòng nấm CTMT1 có mức tương đồng trình tự cao 99,06% với chủng *Mucor irregularis* và được trình bày trên cây phả hệ (hình 3).



**Hình 3. Cây phả hệ và hình thái của 3 dòng nấm CTMT1, DTMT và CTDL3 có hiệu quả phòng trừ tuyến trùng *Meloidogyne* spp. được xây dựng bằng phương pháp Maximum-likelihood của phần mềm MEGA X dựa trên trình tự vùng ITS**

Từ kết quả tuyển chọn các dòng nấm kí sinh trứng tuyến trùng bướu rễ *Meloidogyne* trong phòng thí nghiệm và đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh bướu rễ

trên cây cà chua trong điều kiện nhà lưới đã xác định được các dòng nấm thuộc các chi như khác nhau *Mucor*, *Plectosphaerella*, *Purpureocillium* (tên trước đây là

*Paecilomyces*) có khả năng kí sinh trứng tuyến trùng *Meloidogyne*. Kết quả đánh giá cho thấy tương tự kết quả của Van *et al.* (2021); Karakas (2015); Eapen *et al.* (2005) khi phân lập các dòng nấm thuộc các chi *Paecilomyces*, *Plectosphaerella*, *Trichoderma* và *Penicillium* từ trứng và con cái của *Meloidogyne incognita*. Theo Atkin *et al.* (2003) ghi nhận nấm *Plectosphaerella cucumerina* là nấm ký sinh triển vọng trong phòng trừ tuyến trùng nang trên khoai tây. Tương tự, Diệp và ctv. (2019), cũng ghi nhận nấm *Paecilomyces* mang lại hiệu quả phòng tuyến trùng *Meloidogyne javanica* trên cây hồ tiêu. Vì vậy, kết quả nghiên cứu này góp phần đã khẳng định được vai trò của nấm kí sinh trong phòng trừ tuyến trùng bươu rễ *Meloidogyne* trên cây cà chua.

#### 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

##### 4.1. Kết luận

Năm dòng nấm CTMT1, CTMT5, CTDL3, STMT4 và DTMT có khả năng ký sinh trứng tuyến trùng trên 65% được tuyển chọn từ 20 dòng nấm phân lập từ mẫu trứng tuyến trùng bị kí sinh. Trong đó, 3 dòng nấm CTMT1, DTMT và CTDL3 mang hiệu quả phòng trừ bệnh bươu rễ do *Meloidogyne* tốt trên cây cà chua trong điều kiện nhà lưới. Kết quả định danh dựa vào giải trình tự vùng ITS, xác định được dòng nấm CTMT1 là loài *Mucor irregularis*, DTMT là loài *Purpureocillium lilacinum* và dòng nấm CTDL3 là loài *Plectosphaerella cucumerina*.

##### 4.2. Đề nghị

Tiếp tục khảo sát thêm về đặc điểm sinh học, tính an toàn và hiệu quả phòng

trị bệnh bươu rễ trên cây trồng của hai dòng nấm *Purpureocillium lilacinum* DTMT và *Plectosphaerella cucumerina* CTDL3 ở điều kiện ngoài đồng.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. An, D. T. K., Duyên. H. N. và Nam. N. V., 2017. 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. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm Hồ Chí Minh*. Tập 1, trang 33 - 41.
2. Atkins, S. D., Clark, I. M., Sosnowska, D., Hirsch, P. R. and Kerry, B. R., 2003. Detection and quantification of *Plectosphaerella cucumerina*, a potential biological control agent of potato cyst nematodes, by using conventional PCR, real-time PCR, selective media, and baiting. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, pp. 4788 - 4793.
3. Awasthi, L. P. (Ed.), 2015. *Recent advances in the diagnosis and management of plant diseases*. Springer.
4. Châu, N. N., 2003. Tuyến trùng thực vật và cơ sở phòng trừ. *Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật Hà Nội*. 302.
5. Diệp, P. T., Phong, N. T. và Phong, N. V., 2019. Đánh giá khả năng kiểm soát tuyến trùng *Meloidogyne javanica* ký sinh hồ tiêu của nấm *Paecilomyces lilacinus* và *Trichoderma harzianum*. Trong: Hội thảo Quốc gia Bệnh hại Thực vật Việt Nam lần thứ 18.
6. Dube, B., & Smart Jr, G. C., 1987. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology*, 19(2), 222.
7. Eapen, S. J., Beena, B., & Ramana, K. V., 2005. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88(3), 218 - 225.
8. Golzary H., Panjehkeh N., Ahmadzadeh M., Salari M., & Sedaghati-Khoravi E., 2011. Elucidating the parasitic capabilities of *Trichoderma* against *Meloidogyne javanica* on tomato. *Insight Plant Disease*, 1(1), 12 - 19.

9. Karakas, M., 2015. Fungi associated with egg masses and females of plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Nematoda: Heteroderidae). *Bangladesh Journal of Botany*, 44(3), 373 - 378.
10. Kiewnick S, Sikora RA, 2006. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biol Cont* 38:179 - 187.
11. Lopez-Llorca, L. V., Olivares-Bernabeu, C., Salinas, J., Jansson, H. B., & Kolattukudy, P. E., 2002. Pre-penetration events in fungal parasitism of nematode eggs. *Mycological Research*, 106(4), 499 - 506.
12. Xuyên, N. T., & Đĩnh, N. V., 2003. Nghiên cứu tình hình bệnh hại cà chua trong nhà lưới và ngoài đồng ruộng năm 2003 - 2005 tại Hà Nội. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*.

## ABSTRACT

### Selection of parasitic fungi of nematode in prevention knot-root disease on tomato

*The purpose of the study was to find fungal isolates expressing potential ability to parasitize the eggs of the nematode *Meloidogyne* spp. in laboratory conditions and the ability to prevent root-knot disease on tomato plants under greenhouse conditions. Experiment for testing parasitic ability on nematode eggs was followed a completely randomized design with 21 treatments and 3 replicates in the laboratory. The results showed that after 72 hours of after fungal inoculation, 5 fungal isolates CTMT1, CTMT5, CTDL3, M3.1, ST2 had a high rate of nematode parasited eggs over 65%. Subsequently experiment for testing ability of these promising fungal isolates to prevent root rot caused by *Meloidogyne* spp. was conducted under greenhouse conditions; the experiment including 7 treatments and 3 replicates. Result found that five treatments corresponding applied 5 fungal isolates at  $3.1 \times 10^4$  fungal spores per gram of soil and chemical treatment (active ingredient Abamectin) were expressed reduction of number of root-knot, the number of nematodes in the soil and roots, in which 3 fungal isolates CTMT1, CTDL3 and M3.1 expressed better efficacy in controlling root-knot nematode equal chemical Abamectin. Identification of these fungal isolates based on morphologicals and their sequence of ITS regions, 3 fungal isolates CTMT1, CTDL3 and M3.1 were *Mucor irregularis*, *Purpureocillium lilacinum* and *Plectosphaerella cucumerina*, respectively.*

**Keywords:** *Meloidogyne* spp., root-knot nematodes, nematode parasitic fungus, tomato.

# NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN PHÁT SINH VÀ GÂY HẠI CỦA BỆNH Đốm nâu (*Alternaria sesami*) CHANH LEO TẠI TỈNH NGHỆ AN

Võ Thị Dung<sup>1</sup>, Vũ Triệu Mân<sup>2</sup>, Hà Minh Thanh<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Kinh tế Nghệ An

<sup>2</sup> Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam

<sup>3</sup> Viện Bảo vệ thực vật

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, chanh leo là cây trồng mới phát triển có giá trị kinh tế và xuất khẩu, tính đến năm 2019 chanh leo được trồng ở 36 tỉnh, thành phố trong cả nước, tổng diện tích trồng chanh leo đạt khoảng 10,5 nghìn ha, tổng sản lượng quả tươi ước đạt 222,3 nghìn tấn, năng suất bình quân cả nước đạt 20,3 tấn/ha, có những vùng đạt 26,1 tấn/ha.

Những năm gần đây, tỉnh Nghệ An đã đưa cây chanh leo vào danh sách cơ cấu cây trồng, nhưng hiện nay người trồng chanh leo ở Nghệ An đang phải đối mặt với vấn đề dịch hại trong đó các bệnh hại phổ biến trên cây chanh leo như thán thư (*Colletotrichum gloeosporioides*), đốm nâu (*Alternaria* sp.), phình thân (*Fusarium solani*), thối rễ thối thân (*Phytophthora* spp., *Fusarium oxysporum*), (*Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp.), virus Papaya leaf curl Guangdong virus (PaLCuGDV), Euphorbia leaf curl virus (EAPV). Theo điều tra của Chi cục BVTV tỉnh Nghệ An và Trung tâm

BVTV vùng khu 4 tại Nghệ An, tỷ lệ cây chanh leo bị bệnh do tập đoàn nấm gây ra trung bình khoảng 5 - 10%, có vườn bị bệnh tới 40 - 50% ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng và chất lượng quả, trong đó bệnh đốm nâu do nấm *Alternaria* sp. gây ra được xem là bệnh phổ biến nguy hiểm trên cây chanh leo, tác hại của bệnh rất nghiêm trọng, làm giảm năng suất và chất lượng quả thương phẩm, giảm tuổi thọ nhiều vườn chanh leo.

Đối với cây chanh leo khoảng cách trồng, lượng phân bón trồng có liên quan đến khả năng nhiễm bệnh của cây, trồng với mật độ vừa phải kết hợp cắt tỉa hợp lý tạo độ thông thoáng cho vườn chanh leo làm giảm khả năng nhiễm bệnh rất lớn. Một thử nghiệm 3 năm gần đây của cây chanh leo trồng với khoảng cách 1,5 - 2m giữa các hàng, với việc cắt tỉa nhẹ ở năm thứ 2 và năm thứ 3, đã cho năng suất cao nhất (50% thu hoạch ở năm đầu tiên). Nhưng họ đã công nhận rằng trồng quá dày dẫn đến cây bị bệnh hàng loạt và phải trồng lại sau năm thứ 2 hoặc năm thứ 3 (Morton, J. 1987). Do vậy trong sản xuất phải áp dụng các biện pháp kỹ thuật phù

Người phân biện: TS. Lê Mai Nhật

hợp với điều kiện khí hậu, mật độ trồng, phân bón..., điều kiện canh tác của địa phương và kết hợp hài hòa giữa các biện pháp với nhau từ khâu làm đất, kỹ thuật chăm sóc, quản lý sinh vật hại cho đến khâu thu hoạch.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Phương pháp điều tra

Điều tra bệnh hại 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 NN&PTNT năm 2010 (Bộ NN&P TNT, 2010).

Chọn vùng điều tra bổ sung: Ngoài các vùng điều tra chính theo tuyến, chọn các vùng phụ để điều tra bổ sung theo thời kỳ sinh trưởng của cây (kiến thiết cơ bản, kinh doanh); theo mùa vụ trong năm (mùa khô, mùa mưa).

Ở mỗi huyện, điều tra 10 vườn đại diện cho vùng, độ dốc, thời vụ trồng, mật độ trồng. Vườn chanh leo được chọn điều tra phải có diện tích từ 0,5 - 1ha. Điều tra vào thời gian bệnh phát triển ổn định nhất (tháng 6 - 10 trong năm) và xác định số cây nhiễm bệnh (A%):

$$A(\%) = \frac{\text{Số cây bị bệnh}}{\text{Tổng cây điều tra}} \times 100$$

Điều tra diễn biến tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh: Chọn vườn chanh leo 1 năm tuổi, điều tra 5 vườn đại diện cho các vùng (huyện Quế Phong, Tương Dương) trồng chanh leo ở Nghệ An, diện tích mỗi vườn 0,5 - 1ha, cố định vườn điều tra. Mỗi

vườn điều tra 10 điểm cố định, điểm điều tra cách bờ 2 hàng cây chanh leo, mỗi điểm điều tra là 1 cây, mỗi cây điều tra 4 hướng, mỗi hướng điều tra 1 cành cố định ở tầng giữa giàn tán cây, điều tra định kỳ 7 ngày/lần; đếm toàn bộ số lá, quả ở cành điều tra; tính tỷ lệ và chỉ số (%) trên cành, lá, quả bị bệnh; phân cấp bệnh theo thang cấp 9 theo QC 01 - 38 đối với nhóm cây ăn quả.

Cấp 0: Không có bệnh.

Cấp 1: > 0 - 5% diện tích lá, quả bị bệnh.

Cấp 3: > 5 - 10% diện tích lá, quả bị bệnh.

Cấp 5: > 10 - 15% diện tích lá, quả bị bệnh.

Cấp 7: > 15 - 20% diện tích lá, quả bị bệnh.

Cấp 9: > 20% diện tích lá, quả bị bệnh.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu về ảnh hưởng của mật độ trồng đến bệnh đốm nâu trên cây chanh leo

Thí nghiệm gồm các công thức:

CT1: Khoảng cách 3m × 3m;

CT2 (Đôi chứng): Khoảng cách 3 × 4m;

CT3: Khoảng cách 4m × 4m;

CT4: Khoảng cách 4m × 5m.

Thí nghiệm diện hẹp, được bố trí theo khối ngẫu nhiên hoàn toàn, 3 lần nhắc lại. Mỗi công thức trồng 30 cây, tổng số cây thí nghiệm là 360. Các biện pháp áp dụng đều như nhau trong tất cả các công thức.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ bệnh (%) và chỉ số bệnh (%) trên cây chanh leo sau trồng 6 tháng tuổi, 1 năm tuổi, 2 năm tuổi ở các công thức về mật độ.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu về ảnh hưởng của phân bón đến bệnh đốm nâu trên cây chanh leo

Thí nghiệm gồm 4 công thức:

CT1: Bón phân theo khuyến cáo;

CT2: Bón phân theo khuyến cáo + bổ sung kali (0,1 - 0,2 kg/cây/lần);

CT3: Bón phân theo khuyến cáo + bổ sung phân Đầu Trâu (0,1 - 0,2kg NPK 13 - 13 - 13+TE/cây/lần);

CT4: Bón theo vườn nông dân (Đ/C).

Thí nghiệm diện hẹp, các thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên hoàn toàn, 3 lần nhắc lại, 30 cây/lần nhắc. Tổng số cây thí nghiệm là 360. Các biện pháp áp dụng đều như nhau trong tất cả các công thức trên nền mật độ 4m × 4m.

Bón theo khuyến cáo:

\* Lượng phân bón cho 1 ha ở giai đoạn kiến thiết cơ bản (< 6 tháng tuổi tuổi).

Phân chuồng ủ hoai: 15 - 20 tấn, vôi bột: 1000kg, ure: 370kg, supe lân: 1060kg, KCl: 240kg.

\* Lượng phân bón cho 1ha ở giai đoạn kinh doanh ure: 850kg, supe lân: 1250kg, KCl: 1350kg.

Bón theo tập quán của nông dân:

\* Lượng phân bón cho 1 ha ở giai đoạn kiến thiết cơ bản (< 6 tháng tuổi tuổi).

Phân chuồng ủ hoai: 8 - 10 tấn, NPK (15 - 15 - 15): 720kg.

\* Lượng phân bón cho 1ha ở giai đoạn kinh doanh ure: 500kg, NPK (15 - 15 - 15): 1000kg.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ bệnh (%) và chỉ số bệnh (%) trên cây chanh leo sau

15; 30 ngày sau bón phân; hiệu quả của phân bón (%).

### 2.4. Phương pháp tính toán và xử lý số liệu

$$\text{Tỷ lệ bệnh (\%)} = \frac{\text{Số lá, quả bị bệnh}}{\text{Tổng số lá, quả điều tra}} \times 100$$

$$\text{Chỉ số bệnh (\%)} = \frac{\sum (n_i \times v_i)}{(N \times k)} \times 100$$

Trong đó:  $\sum (n_i \times v_i)$  là tổng tích số lá, quả bị bệnh với trị số cấp bệnh tương ứng, k là trị số cấp bệnh cao nhất. N là tổng số lá điều tra.

Cấp bệnh của bệnh đốm nâu chanh leo: Theo QCVN 01-38:2010/BNNPTNT đối với nhóm cây ăn quả.

Đánh giá hiệu quả phân bón, mật độ trồng sử dụng công thức Abbott:

$$\text{HQ (\%)} = \frac{C-T}{C} \times 100$$

Trong đó: HQ (%): Hiệu quả;

C: CSB (%) ở các công thức đối chứng;

T: CSB (%) ở các công thức thí nghiệm.

Số liệu điều tra được xử lý trong Microsoft Office Excel. Số liệu thí nghiệm được tính toán, xử lý thống kê theo phương pháp phân tích phương sai bằng chương trình IRRISTAT 4.0.

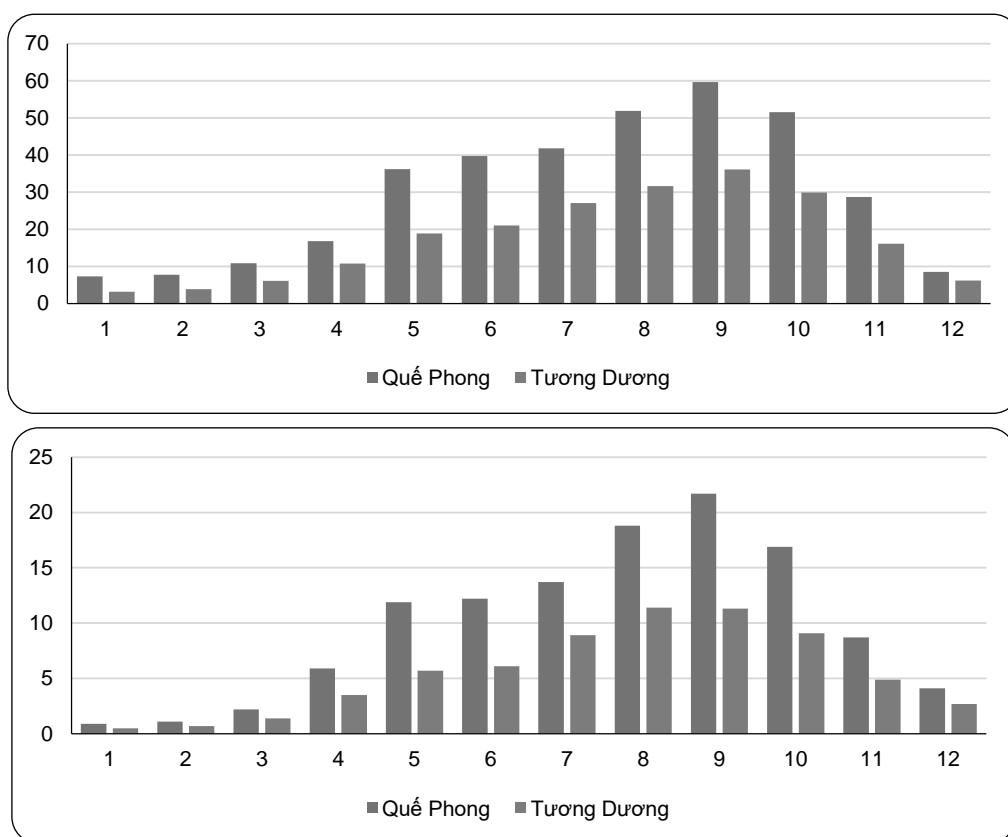
## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Diễn biến của bệnh đốm nâu (*Alternaria sesami*) hại chanh leo tại Nghệ An

Cuối tháng 12, đa số vườn chanh leo từ 6 tháng tuổi trở lên đều được cắt

tia, đối với vườn chanh leo 1 năm, 2 năm tuổi khi cắt tia vào thời điểm này chỉ để lại thân chính và một số cành cấp 1 nên phần nào loại bỏ được nguồn bệnh trên cây, vào tháng 1; 2 có nhiệt độ thấp nhất trong năm, là yếu tố không thuận lợi cho sự phát triển của nấm gây bệnh. Theo dõi diễn biến của bệnh trong năm nhận thấy ở tháng 1, 2 bệnh đốm

nâu xuất hiện trên chanh leo ở tất cả các huyện với mức độ rất thấp. Tỷ lệ bệnh đốm nâu ở huyện Quế Phong, Tương Dương lần lượt là 7,3 - 8,8%, 3,2 - 3,9%, ghi nhận bệnh đốm nâu xuất hiện và gây hại ở các tháng trong năm hoàn toàn khác nhau và mức độ gây hại cũng khác nhau ở các vùng trên địa bàn tỉnh Nghệ An (hình 1).



**Hình 1. Diễn biến bệnh đốm nâu trên chanh leo tại Nghệ An (2020 - 2021)**

Từ tháng 4 trở đi nhiệt độ tăng dần, bắt đầu có mưa dông, cây sinh trưởng phát triển tốt, mức độ bệnh đốm nâu cũng tăng dần. Vào mùa mưa (tháng 7, 8, 9, 10) số lượng quả chanh leo trên giàn tương đối nhiều, chuẩn bị cho vụ thu hoạch nên bệnh xuất hiện và gây hại trên

chanh leo với mức độ cao, tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh trong tháng 8 đến tháng 10 cao nhất trong năm, ở huyện Quế Phong TLB ghi nhận từ 51,5 đến 59,6%, CSB từ 16,9 đến 21,7%, huyện Tương Dương lần lượt là 31,6 - 36,1% và 9,1 - 11,4%. Mùa dông (tháng 11, 12) nhiệt độ giảm mạnh,

ảm độ không khí thấp nên mức độ gây hại của bệnh cũng giảm. Tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh ghi nhận ở Quế Phong dao động từ 8,5% đến 28,7% và từ 4,1 đến 8,7%. Tương tự, TLB và CSB ghi nhận ở Tương Dương dao động từ 6,2% đến 16,1% và từ 2,7% đến 4,9%.

Ở Nghệ An mùa mưa thường bắt đầu từ tháng 7 và kết thúc vào cuối tháng 10 hàng năm. Lượng mưa thường tập trung chủ yếu vào giữa tháng 8, 9, 10. Lượng mưa của tháng 9, tháng 10 có thể bằng tổng lượng mưa của các tháng còn lại trong năm. Mùa khô bắt đầu từ tháng 11 đến đầu tháng 3 năm sau. Chính sự phân bố không đều về chế độ mưa đã ảnh hưởng đến tiểu vùng khí hậu ở những nơi sản xuất chanh leo nên ảnh hưởng đến khả năng phát sinh phát triển và gây hại của bệnh trên cây chanh leo.

### 3.2. Ảnh hưởng của mật độ trồng đến bệnh đốm nâu (*Alternaria sesami*) trên chanh leo tại Nghệ An

Mật độ trồng đã ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng, phát triển của cây chanh leo, ảnh hưởng đến khả năng phát sinh

phát triển bệnh hại trên cây. Khi cây leo giàn các cấp cành đều phủ kín trên bề mặt của giàn, một số cành vươn dài ra và buông xuống dưới của giàn. Chanh leo là cây ưa sáng trồng với mật độ quá dày dễ tạo điều kiện thuận lợi cho bệnh xuất hiện và gây hại trên cây, ảnh hưởng đến sản lượng chanh leo. Ngược lại trồng mật độ quá thưa sẽ bị phí về không gian và không đảm bảo sản lượng trên đơn vị diện tích. Để đảm bảo năng suất của chanh leo và hạn chế khả năng gây hại của bệnh đốm nâu trên cây cần xác định được mật độ trồng hợp lý để hạn sự xuất hiện và gây hại của bệnh.

Theo dõi mật độ trồng ảnh hưởng đến phát sinh phát triển của bệnh đốm nâu giai đoạn từ vườn mới trồng đến 6 tháng tuổi, theo dõi mức độ gây hại của bệnh khi cây đã leo giàn và cây bắt đầu ra hoa. Giai đoạn cây 1 năm, 2 năm tuổi tiến hành điều tra trước 1 tuần khi thu hoạch quả lần 1, lần 2 và lần cuối.

Kết quả điều tra theo dõi ảnh hưởng của mật độ trồng đến sự phát sinh phát triển của bệnh đốm nâu trên cây chanh leo tại huyện Quế Phong (bảng 2).

**Bảng 2. Ảnh hưởng của mật độ trồng đến sự phát sinh phát triển của bệnh đốm nâu (*A. sesami*) trên cây chanh leo tại huyện Quế Phong**

| STT   | Công thức | 6 tháng tuổi |                   | 1 năm   |                   | 2 năm   |                    |
|-------|-----------|--------------|-------------------|---------|-------------------|---------|--------------------|
|       |           | TLB (%)      | CSB (%)           | TLB (%) | CSB (%)           | TLB (%) | CSB (%)            |
| 1     | CT1       | 13,9         | 1,9 <sup>ab</sup> | 58,2    | 23,8 <sup>e</sup> | 69,3    | 28,7 <sup>l</sup>  |
| 2     | CT2 (Đ/C) | 12,1         | 2,0 <sup>b</sup>  | 49,7    | 18,5 <sup>b</sup> | 57,7    | 24,6 <sup>eg</sup> |
| 3     | CT3       | 12,1         | 1,8 <sup>a</sup>  | 42,8    | 15,7 <sup>a</sup> | 45,8    | 20,9 <sup>b</sup>  |
| 4     | CT4       | 11,7         | 1,8 <sup>a</sup>  | 37,6    | 15,2 <sup>a</sup> | 44,6    | 19,1 <sup>a</sup>  |
| LSD5% |           |              | 0,14              |         | 2,03              |         | 1,10               |

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

CT1: K/C 3m × 3m, CT2 (Đ/C): K/C 3m × 4m, CT3: K/C 4m × 4m, CT4: K/C 4m × 5m.

Bệnh đốm nâu xuất hiện và gây hại trên cây chanh leo tăng dần theo thời gian

sinh trưởng của cây, bệnh gây hại nhiều vào thời kỳ cây cho quả ở tất cả các công thức thí nghiệm.

Thời kỳ cây dưới 6 tháng tuổi là thời kỳ đầu của quá trình sinh trưởng hình thành cành lá, phân bón đầy đủ, cây chưa tiến hành cắt tỉa nhiều, trên bề mặt của giàn, cành và lá chưa phủ kín, nên tần suất xuất hiện bệnh đốm nâu trong thời kỳ này tương đối ít, TLB ở CT1; CT2; CT3; CT4 lần lượt là 13,9; 12,1; 12,1; 11,7% và CSB là 1,9; 2,0; 1,8; 1,8% và không có sự sai khác về ý nghĩa thống kê.

Thời kỳ cây 1 năm tuổi trở đi TLB và CSB cao hơn nhiều so với thời kỳ cây 6 tháng tuổi, TLB và CSB giữa các công thức đã có sự sai khác có ý nghĩa: ở công thức 1 (khoảng cách 3m x 3m) sau trồng 1 năm tuổi cành lá phát triển nhanh, giàn chanh leo được che phủ kín bởi các tầng lớp của cành lá và quả, trong thời gian này đúng vào mùa mưa khả năng lan truyền và tái xâm nhiễm, gây hại của nấm *A. sesami* rất cao, TLB lên tới 58,2% và CSB là 23,8%. Sau lần thu hái quả cuối cùng của năm thứ nhất đến tháng 12, tiến hành cắt tỉa chỉ để lại trên bề mặt của giàn cành cấp 1, cành cấp 2, nhưng trên cây nguồn bệnh tồn tại của năm trước tiếp tục nảy mầm tái xâm nhiễm và gây hại tiếp cây nên khi cây 2 năm tuổi các thời điểm thu hoạch quả TLB lên tới 69,3% và CSB là 28,7%.

Ở công thức 2 (khoảng cách 3m x 4m) mật độ trồng thưa hơn so với công thức 1 nhưng vườn 1 năm TLB là 49,7% và CSB là 18,5% và đối với vườn 2 năm TLB lên tới 57,7% và CSB là 24,6%.

Ở công thức 3 (khoảng cách 4m x 4m), và công thức 4 (khoảng cách 4m x 5m), mật độ trồng thưa, sau trồng 1 năm tuổi trên bề mặt giàn ở phía ngoài của tán cành lá vẫn có khoảng trống giữa các cây, các hàng có độ thông thoáng trên bề mặt của giàn. Tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh của CT3, CT4 lần lượt là 37,6 và 15,2%; 42,8 và 15,7% thấp hơn ở mức có ý nghĩa đối với của công thức 1 và 2. Khi vườn chanh leo 2 năm tuổi cây sinh trưởng phát triển mạnh bề mặt của giàn phủ kín cành và lá nguồn bệnh tích lũy trên cây của năm thứ nhất nên khả năng tái xâm nhiễm tiếp tục gây hại trên cây lại xảy ra nhiều vào các lần hình thành và thu hoạch quả rất cao, TLB và CSB ở công thức 3 là 45,8% và 20,9%, công thức 4 là 44,6% và 19,1%.

Theo kết quả điều tra theo dõi, mật độ trồng khác nhau tại huyện Tương Dương ảnh hưởng đến sự phát sinh và gây hại của bệnh đốm nâu, mật độ trồng dày bệnh gây hại mạnh hơn so với trồng thưa. Trên vườn cây dưới 6 tháng tuổi, bề mặt giàn thông thoáng, số lượng cành thấp, bộ lá đang phát triển nên TLB và CSB ở các công thức tuy có khác nhau nhưng không có ý nghĩa về mặt thống kê (CSB ở các công thức 1, 2, 3 và 4 lần lượt là 1,7%; 1,8%; 1,7%; 1,6%). Giai đoạn cây từ 6 tháng đến 1 năm tuổi, lúc này cây đã phát triển thành thực, tán lá dày mức độ bị bệnh tăng lên TLB và CSB giữa các công thức có sự sai khác. Tỷ lệ bệnh thấp nhất ghi nhận được ở công thức 4 và cao nhất ở công thức 1, lần lượt là 32,6% và 39,9%. Cây 1 năm tuổi cho kết quả tương tự, tỷ lệ bệnh cao nhất ở công thức 1 (49,7%) và thấp nhất ở công thức 4 (40,5%) (bảng 3).

**Bảng 3. Ảnh hưởng của mật độ trồng đến sự phát sinh phát triển của bệnh đốm nâu (*A. sesami*) trên cây chanh leo tại huyện Tương Dương**

| STT   | Công thức | 6 tháng tuổi |                   | 1 năm   |                   | 2 năm   |                   |
|-------|-----------|--------------|-------------------|---------|-------------------|---------|-------------------|
|       |           | TLB (%)      | CSB (%)           | TLB (%) | CSB (%)           | TLB (%) | CSB (%)           |
| 1     | CT1       | 12,1         | 1,7 <sup>ab</sup> | 39,9    | 16,4 <sup>d</sup> | 49,7    | 20,3 <sup>e</sup> |
| 2     | CT2 (Đ/C) | 10,7         | 1,8 <sup>b</sup>  | 35,2    | 15,8 <sup>d</sup> | 47,4    | 18,7 <sup>d</sup> |
| 3     | CT3       | 9,5          | 1,7 <sup>ab</sup> | 32,9    | 9,1 <sup>a</sup>  | 40,8    | 15,2 <sup>b</sup> |
| 4     | CT4       | 9,4          | 1,6 <sup>a</sup>  | 32,6    | 8,9 <sup>a</sup>  | 40,5    | 12,0 <sup>a</sup> |
| LSD5% |           |              | 0,12              |         | 1,95              |         | 2,01              |

*Ghi chú:* Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

CT1: K/C 3m × 3m, CT2 (Đ/C): K/C 3m × 4m, CT3: K/C 4m × 4m, CT4: K/C 4m × 5m.

### 3.3. Ảnh hưởng của phân bón đến bệnh đốm nâu (*A. sesami*) trên chanh leo tại Nghệ An

Ngoài việc cung cấp các chất cần thiết cho cây, phân bón còn tác động đến toàn bộ hệ sinh thái vườn trồng chanh leo, thúc đẩy các quá trình như phân hủy, chuyển hóa các chất... tăng khả năng hấp thu các chất dinh dưỡng, phân giải các chất khó hấp thu thành các chất dễ hấp thu, tạo điều kiện thuận lợi cho cây sinh trưởng phát triển tốt, chống chịu được bệnh và các điều kiện ngoại cảnh bất lợi. Việc cung cấp đầy đủ, cân đối và kịp thời về phân bón sẽ góp phần tăng năng suất, chất lượng hạn chế bệnh và tăng hiệu quả kinh tế. Phân bón ảnh hưởng rất lớn đến năng suất, chất lượng và mẫu mã quả chanh leo. Sử dụng phân bón vào giai đoạn trước ra hoa quyết định đến số lượng và chất lượng ra hoa, tăng tỷ lệ đậu quả. Giai đoạn phát triển quả, bón phân cung cấp

đủ các chất dinh dưỡng cần thiết sẽ thúc đẩy quá trình tích lũy các chất hữu cơ giúp quả to đồng đều, dịch quả nhiều, mã quả đẹp. Thiếu hụt phân bón chanh leo phát triển kém, ra hoa ít, tỷ lệ đậu quả thấp, bộ rễ kém phát triển, chanh leo dễ bị bệnh, khả năng chống chịu kém với điều kiện ngoại cảnh bất lợi. Chanh leo trong giai đoạn hình thành quả, quả lớn cho đến khi thu hoạch là giai đoạn nấm bệnh *A. sesami* xuất hiện và gây hại nhiều so với các giai đoạn khác, bón bổ sung các loại phân vào giai đoạn này để nuôi quả, tăng khả năng chống chịu cho cây hạn chế tác hại của bệnh gây ra trên quả chanh leo.

Để đánh giá ảnh hưởng của bón phân đến mức độ bị bệnh trên chanh leo ở Nghệ An, tiến hành bố trí các công thức mức độ phân bón khác nhau trên vườn chanh leo thời kỳ kinh doanh 1 năm tuổi và vườn chanh leo thời kỳ kinh doanh 2 năm tuổi (bảng 4 và bảng 5).

**Bảng 4. Ảnh hưởng của phân bón đến mức độ bệnh đốm nâu (*A. sesami*) vườn chanh leo 1 năm tuổi**

| STT                    | 15 ngày sau xử lý |                   |        | 30 ngày sau xử lý |                   |                     | Năng suất (tấn/ha) | Năng suất tăng so với Đ/C (%) |
|------------------------|-------------------|-------------------|--------|-------------------|-------------------|---------------------|--------------------|-------------------------------|
|                        | TLB (%)           | CSB (%)           | HQ (%) | TLB (%)           | CSB (%)           | HQ <sup>1</sup> (%) |                    |                               |
| CT1 <sup>2</sup>       | 40,3              | 13,7 <sup>b</sup> | 8,05   | 45,8              | 15,7 <sup>b</sup> | 8,72                | 20,03 <sup>e</sup> | 23,06                         |
| CT2 <sup>3</sup>       | 35,4              | 11,8 <sup>a</sup> | 20,80  | 46,6              | 15,2 <sup>b</sup> | 11,63               | 21,18 <sup>g</sup> | 27,20                         |
| CT3 <sup>4</sup>       | 39,8              | 12,9 <sup>a</sup> | 13,42  | 42,8              | 12,8 <sup>a</sup> | 12,58               | 21,01 <sup>g</sup> | 26,70                         |
| CT4 <sup>5</sup> (Đ/C) | 45,6              | 14,9 <sup>b</sup> | -      | 59,3              | 17,2 <sup>d</sup> | -                   | 15,41 <sup>a</sup> | -                             |
| LSD5%                  |                   | 1,72              |        |                   | 1,29              |                     | 1,09               |                               |

*Ghi chú:* Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê;

(<sup>1</sup>): Hiệu quả so với công thức 4 (đối chứng);

(<sup>2</sup>): Công thức 1: Bón phân theo khuyến cáo;

(<sup>3</sup>): Công thức 2: bón phân theo khuyến cáo + kali;

(<sup>4</sup>): Công thức 3: Bón phân theo khuyến cáo + bổ sung phân Đầu Trâu;

(<sup>5</sup>): Công thức 4: Bón theo vườn nông dân.

Sau 15 ngày xử lý CSB ở các công thức đã có sự sai khác, CSB ở công thức bón phân theo tập quán của nông dân là 14,9% trong khi đó bón phân theo khuyến cáo là 13,7%, còn bón theo khuyến cáo có bổ sung kali và phân Đầu Trâu CSB là 11,8 - 12,9%. Hiệu quả sau 15 xử lý phân bón so với công thức đối chứng của CT1, CT2, CT3 lần lượt là 8,05%; 13,42%; 20,08%. Bón phân theo khuyến cáo có bổ sung phân Đầu Trâu khả năng chống chịu bệnh đốm nâu đối với cây ở thời gian đầu là cao nhất so với các mức bón khác.

Sau 30 ngày xử lý hiệu quả của phân bón trong việc hạn chế sự phát triển và gây hại của bệnh đốm nâu cao nhất là ở CT3 (12,58% so với đối chứng), tiếp đến CT2 (11,63%) và thấp nhất là CT1 (8,72%). Do thời gian này đối với CT2, khi có bổ sung kali, cây hầu như đã hấp thụ hết lượng kali được bổ sung, do vậy làm tăng độ cứng của tế bào cây nên hạn

chế sự phát triển vết bệnh trên lá và quả chanh leo.

Thời kỳ chanh leo 1 năm tuổi bón phân theo khuyến cáo và bón theo khuyến cáo có bổ sung kali, phân Đầu Trâu bệnh phát triển và gây hại nhẹ hơn và năng suất tăng từ 23,06 - 27,20% so với công thức bón phân của người dân.

Vườn chanh leo 2 năm tuổi nguồn bệnh trên cây của năm đầu tồn tại trên cây nhiều, bệnh tiếp tục lan truyền tái xâm nhiễm và gây hại trên cây. So với vườn chanh leo 1 năm tuổi vườn chanh leo từ năm thứ 2 trở đi mức độ bị bệnh ở các công thức bón đều tăng lên, sau 15 ngày xử lý phân bón CSB ở CT1 (13,9%), CT2 (13,0%) và CT3 (12,7%) đều thấp hơn so với công thức đối chứng (15,1%), tuy nhiên giữa các công thức bón phân chưa có sự sai khác có ý nghĩa tổng kê về CSB. Hiệu quả của các công thức bón phân so với công thức đối chứng chỉ đạt 7,94 - 15,89%.

**Bảng 5. Ảnh hưởng của phân bón đến mức độ bệnh đốm nâu (*A. sesami*) vườn chanh leo 2 năm tuổi**

| STT                    | 15 ngày sau xử lý |                   |           | 30 ngày sau xử lý |                    |                     | Năng suất (tấn/ha) | Năng suất tăng so với Đ/C (%) |
|------------------------|-------------------|-------------------|-----------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------------------------------|
|                        | TLB (%)           | CSB (%)           | HQ so đ/c | TLB (%)           | CSB (%)            | HQ <sup>1</sup> (%) |                    |                               |
| CT1 <sup>2</sup>       | 51,3              | 13,9 <sup>a</sup> | 7,94      | 58,2              | 16,9 <sup>ab</sup> | 7,56                | 15,21 <sup>e</sup> | 39,77                         |
| CT2 <sup>3</sup>       | 54,7              | 13,0 <sup>a</sup> | 13,90     | 59,0              | 17,3 <sup>b</sup>  | 8,48                | 15,93 <sup>g</sup> | 42,49                         |
| CT3 <sup>4</sup>       | 58,6              | 12,7 <sup>a</sup> | 15,89     | 60,3              | 16,0 <sup>a</sup>  | 13,51               | 16,02 <sup>g</sup> | 42,81                         |
| CT4 <sup>5</sup> (Đ/C) | 60,1              | 15,1 <sup>b</sup> | -         | 68,7              | 18,5 <sup>c</sup>  | -                   | 9,16 <sup>a</sup>  | -                             |
| LSD5%                  |                   | 1,94              |           |                   | 1,06               |                     | 1,28               |                               |

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê;

(<sup>1</sup>): Hiệu quả so với công thức 4 (đối chứng);

(<sup>2</sup>): Công thức 1: Bón phân theo khuyến cáo;

(<sup>3</sup>): Công thức 2: bón phân theo khuyến cáo + kali;

(<sup>4</sup>): Công thức 3: Bón phân theo khuyến cáo + bổ sung phân Đầu Trâu;

(<sup>5</sup>): Công thức 4: Bón theo vườn nông dân.

Sau 30 ngày xử lý phân bón, CSB ở CT1 (16,9%) so với CT2 (17,3%) và CT3 (16,0%) giữa các công thức bón đã có sự sai khác có ý nghĩa. Hiệu quả của phân bón so với công thức đối chứng ở CT3 cao nhất (13,51%) so CT1 và CT2. Như vậy bón phân theo khuyến cáo có bổ sung kali thêm phân Đầu Trâu làm tăng tính chống chịu của cây cao.

Vườn chanh leo 2 năm tuổi, thời kỳ này cây sinh trưởng phát triển chậm hơn so với thời kỳ đầu, hơn nữa bệnh trên cây phổ biến hơn nên năng suất ở các công thức đạt 15,21; 15,93; 16,02; 9,16 tấn/ha/năm, giảm so với thời kỳ cây 1 năm tuổi, nhưng năng suất ở CT1, CT2 và CT3 tăng so với công thức đối chứng, từ 39,77 - 42,81%.

## 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1. Kết luận

- Mật độ trồng 4m × 4m và 4m × 5m có TLB (%) và CSB (%) đốm nâu *A. sesami* xuất hiện và gây hại trên cây

cây chanh leo thấp hơn nhiều so với mật độ trồng 3m × 3m.

- Bón phân theo quy trình và bổ sung kali (0,1 - 0,2 kg/cây/lần), phân Đầu Trâu (0,1 - 0,2 kg NPK 13-13- 3 + TE/cây/lần) có tác dụng hạn chế bệnh đốm nâu chanh leo, tăng năng suất 26,70 - 27,20% (năm thứ nhất), 42,49 - 42,81% (năm thứ 2) so với đối chứng.

### 4.2. Đề nghị

Tiếp tục nghiên cứu các biện pháp kỹ thuật ảnh hưởng đến phát sinh gây hại của bệnh đốm nâu *A. sesami* trên cây chanh leo.

## 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. Cục Trồng trọt, 2016. Đề án về quy hoạch vùng trồng cây chanh leo toàn quốc đến năm 2020, định hướng đến năm 2030.

3. Cục Trồng trọt, 2016. Dự thảo quy trình trồng và chăm sóc cây chanh leo. Trang thông tin điện tử cục trồng trọt
4. Phan Thị Thu Hiền, Đặng Thị Hạnh, Huỳnh Tiến Đông, Lê Đình Đôn, 2015. “Nghiên cứu nấm *Alternaria passiflorae* gây bệnh đốm nâu trên chanh leo tại Đắk Nông và Lâm Đồng”, Tạp chí Bảo vệ thực vật số 6/2015, trang 17 - 23.
5. Nguyễn Văn Hòa, Bùi Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thành Hiếu, 2010. Bệnh hại trên cây chanh leo và biện pháp phòng trừ tổng hợp, Viện Cây ăn quả miền Nam.
6. Alves JL, Woudenberg JHC, Duarte LL, Crous PW, Barreto RW, 2013. Reappraisal of the genus *Alternaria*. *Persoonia* 31: 77 - 85.
7. Aragaki M, Nakata S, Long C, 1969. The etiology, including nutritional considerations, of passion fruit Brown spot in Hawaii. *Plant Disease Reporter* 53, 789 - 792.
8. Baigent NL, Starr MP, 1963. Bacterial grease spot disease of passion fruit. *New Zealand Journal of Agriculture Research* 6, 24 - 38.
9. Bhan V., Sushilkumar and M.S. Raghuwanshi, 1997. Future strategies for effective Parthenium management. *Proceedings of the 1st International Conference on Parthenium Management, October 6 - 8, 1997, University of Agricultural Sciences, Dharwad, India, pp:90 - 95.*
10. Carolyn W. Wangungu, Maina Mwangi, Ruth Gathu and Reuben Muasya, 2014. Good Orchard Maintenance and Agronomic Practices as Working Components in Management of Dieback Disease on Passion Fruit (*Passiflora* sp.) in Kenya. *Annual Research & Review in Biology* 4(9): 1397 - 1405.
11. Dipak T. Nagrale, Lalan Sharma, Sunil Kumar, Shailesh P., 2016. Recent Diagnostics and Detection Tools: Implications for Plant Pathogenic *Alternaria* and Their Disease Management. *GawandeBiology* 2016.

## ABSTRACT

### **Factors affecting the generating and harmfulness of Brown spot (*Alternaria sesami*) disease in Nghe An Province**

*For passion fruit, the planting distance is related to the possibility of infection on the plant; moderate density, reasonable fertilization, combining with reasonable pruning create ventilation for the passion fruit, which can help reduce the possibility of Brown spot disease. With a distance of 3m × 4m; 3m × 4m, fertilizing according to the recommendations of adding potassium (0.1 - 0.2kg/plant/time) and buffalo head manure (0.1 - 0.2kg NPK 13 - 13 - 13+TE)/plant/time) have restricted the Brown spot disease on passion fruit, and have increased the yield by 26.70 - 27.20% (first year), 42.49 - 42.81% (second year) compared with control samples.*

**Keywords:** *Alternaria sesami, field, Nghe An, passion fruit.*

# ĐA DẠNG DI TRUYỀN THEO CHỈ THỊ SRAP CỦA MỘT SỐ MẪU NẤM *Colletotrichum* spp. GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN ỚT

Huỳnh Nguyễn Quỳnh Như<sup>1</sup>, Nguyễn Mai Nghiệp<sup>4</sup>,  
Trần Thuỳ Trang<sup>3</sup>, Nguyễn Ngọc Bảo Châu<sup>2</sup>, Nguyễn Bảo Quốc<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup> Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

<sup>2</sup> Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Mở TP. Hồ Chí Minh

<sup>3</sup> Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh

<sup>4</sup> Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường,  
Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

\* Tác giả liên hệ: baoquoc@hcmuaf.edu.vn

## TÓM TẮT

Nấm *Colletotrichum* spp. là tác nhân gây bệnh thán thư trên ớt và nhiều loại cây trồng khác gây ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng sản phẩm. Nghiên cứu này đánh giá đa dạng di truyền bằng 18 chỉ thị SRAP 24 mẫu nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên ớt bằng phương pháp PCR. Kết quả PCR-SRAP khuếch đại đạt tỷ lệ trung bình 44,26% (158/357) alen đa hình, hệ số tương đồng di truyền của các mẫu nấm đạt từ 0,68 đến 0,85. Các phân tích đánh giá đa dạng cho thấy sự ổn định di truyền của mẫu nghiên cứu. Đồng thời, cho thấy ảnh hưởng của khoảng cách địa lý đến di truyền khi phân tích PCoA chia các mẫu nghiên cứu thành 4 nhóm theo nguồn gốc địa lý và loài. Kết quả xây dựng cây phân nhóm di truyền chia 24 mẫu nấm thành 7 nhóm với hệ số tương đồng là 0,74. Nghiên cứu đã cung cấp thêm thông tin về đa dạng di truyền của một số mẫu nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên ớt và khẳng định tính hiệu quả của chỉ thị SRAP.

**Từ khóa:** Thán thư, cây ớt, *Colletotrichum* spp., đa dạng di truyền, SRAP.

## 1. MỞ ĐẦU

Bệnh thán thư hay còn gọi là anthracnose disease chủ yếu do nấm *Colletotrichum* gây ra (Than và cs., 2008) trên cây ớt và nhiều loại cây trồng, đặc biệt là các loại cây trồng nhiệt đới. Ớt là loại cây trồng đem giá trị kinh tế cao nhưng là đối tượng hàng đầu bị nấm

*Colletotrichum* gây suy giảm nghiêm trọng về sản lượng cũng như chất lượng sản phẩm (Kambar và cs., 2014). Tỷ lệ bệnh này có thể ảnh hưởng đến 80% sản lượng ớt ở một số nước trên thế giới trong đó có Việt Nam (Mahasuk và cs., 2009).

Cây ớt (*Capsium annuum*) là cây trồng có giá trị kinh tế cao, được trồng rộng rãi ở nhiều nước trong đó có Việt

Người phân biên: TS. Nguyễn Anh Nghĩa

Nam, nhưng là loại cây trồng dễ bị nhiều bệnh hại (Minh và Nhã, 2018). Một trong những bệnh hại nghiêm trọng trên ớt là bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* gây ra, bệnh diễn biến nhanh, bùng phát theo mùa và không đồng đều ở mỗi vùng (Than và cs., 2008). Yếu tố độ ẩm và nhiệt độ mang tính chất quyết định đến khả năng bùng phát bệnh, bên cạnh các yếu tố về dinh dưỡng, mật độ trồng và quản lý côn trùng gây hại (Minh và Nhã, 2018). Công tác phòng trừ bệnh này còn nhiều hạn chế do hiểu biết về bệnh còn hạn chế. Việc gieo trồng các giống ớt liên tục nhiều năm đã tạo điều kiện thuận lợi cho bệnh thán thư bùng phát mạnh gây khó khăn cho việc phòng trừ (Trần Thanh Tùng, 2002).

Ngoài ra, nấm *Colletotrichum* cũng gây bệnh trên nhiều loại cây trồng khác gây thiệt hại về kinh tế. Việc nghiên cứu về nguồn gen đa dạng của các vi sinh vật gây bệnh cũng như vi sinh vật có lợi là rất quan trọng trong công tác phát triển các công cụ chẩn đoán và các biện pháp kiểm soát sinh học. Tuy nhiên, các nghiên cứu về di truyền của nấm *Colletotrichum* ở Việt Nam còn chưa nhiều. Do đó, nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên ớt bằng chỉ thị SRAP giúp cung cấp thêm thông tin về hệ gen của nấm. Ngày nay, các chỉ thị đa dạng di truyền dựa trên kỹ thuật PCR như SRAP, SSR, ISSR, RAPD, AFLP được sử dụng rất phổ biến. Trong đó, SRAP là một công cụ đơn giản và phổ biến để phân tích đa dạng di truyền nguồn gen trên nhiều đối tượng, giúp tạo ra một lượng lớn các alen đồng trội với tần suất cao dễ dàng cho quan sát

cũng như phân tích kết quả. Do đó, nghiên cứu khảo sát đa dạng di truyền của 24 mẫu nấm *Colletotrichum* spp. bằng 18 chỉ thị SRAP nhằm tạo cơ sở xây dựng các chỉ thị phân tử chẩn đoán và phát triển các biện pháp phòng trừ nấm hiệu quả, an toàn với môi trường làm giảm thiểu thiệt hại do nấm gây ra.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguồn vật liệu nghiên cứu gồm 24 mẫu nấm *Colletotrichum* spp. đã phân lập và định danh được thể hiện trong bảng 1. Danh sách mẫu bao gồm 4 loài *Colletotrichum* spp. được thu thập tại 3 khu vực là tỉnh Tiền Giang, tỉnh Lâm Đồng và Thành phố Hồ Chí Minh. Các mẫu nấm được phân lập và định danh tại Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

### 2.2. Ly trích DNA tổng số của nấm *Colletotrichum* spp.

24 mẫu nấm *Colletotrichum* spp. đã phân lập và định danh được cấy tăng sinh khối trên môi trường PDA (Himedia) từ 7 - 14 ngày. DNA nấm *Colletotrichum* spp. sau 14 ngày nuôi cấy được ly trích theo phương pháp Phenol:Chloroform (Sambrook và cs., 1989) đã điều chỉnh cho phù hợp với mẫu.

Chất lượng DNA tổng số các mẫu sau ly trích được đánh giá bằng phương pháp điện di trên nền gel agarose 1% ở hiệu điện thế 110V trong 30 phút và đo độ hấp thụ (OD) ở bước sóng 260nm, nồng độ DNA các mẫu ly trích được trình bày ở

bảng 1. DNA các mẫu nấm được đồng nhất về cùng một nồng độ là 10 ng/ $\mu$ L và thực hiện phản ứng PCR khuếch đại vùng ITS (Internal transcribed spacer) với cặp primer ITS1 - ITS4 (bảng 2) nhằm xác định độ tinh sạch. Thành phần phản ứng PCR được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm 5 $\mu$ l 5X MyTaq buffer (Bioline); 0,25 $\mu$ l MyTaq DNA polymerase (Bioline); 1  $\mu$ l/mỗi (IDT) 10nM; 2 $\mu$ l DNA khuôn và Nuclease-Free Water (Thermo) được thêm cho đủ 25 $\mu$ l. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose 1% ở hiệu điện thế 110V trong 30 phút.

DNA của các mẫu nấm sử dụng trong nghiên cứu sau khi ly trích được kiểm tra độ tinh sạch và định lượng thông qua điện di tổng số và đo OD. Căn cứ kết quả đo OD, nồng độ DNA các mẫu (bảng 1) được ghi nhận và tiến hành pha loãng đồng nhất về 10 ng/ $\mu$ L. Kết quả PCR khuếch đại vùng ITS giúp sàng lọc những mẫu pha loãng không phù hợp cho ứng dụng tiếp theo. Nếu mẫu DNA pha loãng không khuếch đại được vùng ITS thì tiến hành thực hiện lại ly trích.

**Bảng 1. Danh sách mẫu nấm *Colletotrichum* spp. và nồng độ DNA ly trích**

| STT | Tên mẫu | Địa điểm thu mẫu | Tên loài đã định danh | Mã số NCBI | Nồng độ DNA (ng/ $\mu$ L) |
|-----|---------|------------------|-----------------------|------------|---------------------------|
| 1   | HCM451  | Hồ Chí Minh      | <i>C. scovillei</i>   | LC488847   | 22,65                     |
| 2   | HCM411  | Hồ Chí Minh      | <i>C. scovillei</i>   | LC488843   | 72,84                     |
| 3   | HCM441  | Hồ Chí Minh      | <i>C. scovillei</i>   | LC488845   | 52,60                     |
| 4   | HCM142  | Hồ Chí Minh      | <i>C. siamense</i>    | LC545461   | 56,80                     |
| 5   | HCM123  | Hồ Chí Minh      | <i>C. scovillei</i>   | LC488834   | 50,26                     |
| 6   | HCM121  | Hồ Chí Minh      | <i>C. truncatum</i>   | LC488833   | 35,26                     |
| 7   | HCM421  | Hồ Chí Minh      | <i>C. scovillei</i>   | LC488844   | 193,83                    |
| 8   | LD251   | Lâm Đồng         | <i>C. scovillei</i>   | LC488853   | 198,43                    |
| 9   | LD351   | Lâm Đồng         | <i>C. scovillei</i>   | LC488857   | 84,89                     |
| 10  | LD111   | Lâm Đồng         | <i>C. scovillei</i>   | LC488848   | 28,19                     |
| 11  | LD321   | Lâm Đồng         | <i>C. siamense</i>    | LC488854   | 62,64                     |
| 12  | LD231   | Lâm Đồng         | <i>C. scovillei</i>   | LC488851   | 42,87                     |
| 13  | LD431   | Lâm Đồng         | <i>C. karstii</i>     | LC488858   | 162,73                    |
| 14  | LD341   | Lâm Đồng         | <i>C. scovillei</i>   | LC488855   | 247,10                    |
| 15  | TG322   | Tiền Giang       | <i>C. scovillei</i>   | LC488870   | 68,68                     |
| 16  | TG353   | Tiền Giang       | <i>C. scovillei</i>   | LC488871   | 19,08                     |
| 17  | TG233   | Tiền Giang       | <i>C. scovillei</i>   | LC488867   | 41,67                     |
| 18  | TG152   | Tiền Giang       | <i>C. scovillei</i>   | LC488864   | 58,66                     |
| 19  | TG227   | Tiền Giang       | <i>C. scovillei</i>   | LC488866   | 152,80                    |
| 20  | TG315   | Tiền Giang       | <i>C. scovillei</i>   | LC488869   | 113,40                    |
| 21  | TG441   | Tiền Giang       | <i>C. scovillei</i>   | LC488874   | 182,50                    |
| 22  | TG144   | Tiền Giang       | <i>C. scovillei</i>   | LC488862   | 113,67                    |
| 23  | TG151   | Tiền Giang       | <i>C. scovillei</i>   | LC488863   | 104,90                    |
| 24  | TG234   | Tiền Giang       | <i>C. scovillei</i>   | LC488868   | 122,13                    |

### 2.3. Khảo sát đa dạng di truyền các mẫu nấm *Colletotrichum* spp. bằng chỉ thị SRAP

Đa dạng di truyền của 24 mẫu nấm *Colletotrichum* spp. được đánh giá bằng

SRAP thông qua phản ứng PCR với 18 chỉ thị tổ hợp của 5 môi xuôi và 6 môi ngược (bảng 2).

**Bảng 2. Các primer sử dụng trong nghiên cứu**

| Tên primer | Trình tự             | Nguồn tham khảo    |
|------------|----------------------|--------------------|
| ITS1       | TCCGTAGGTGAACCTGCGG  | White và cs., 1990 |
| ITS4       | TCCTCCGCTTATTGATATGC |                    |
| Me1        | TGAGTCCAAACCGGATA    | Li và Quiros, 2001 |
| Me2        | TGAGTCCAAACCGGAGC    |                    |
| Me3        | TGAGTCCAAACCGGAAT    |                    |
| Me4        | TGAGTCCAAACCGGACC    |                    |
| Me5        | TGAGTCCAAACCGGAAG    |                    |
| Em1        | GACTGCGTACGAATTAAT   |                    |
| Em2        | GACTGCGTACGAATTTGC   |                    |
| Em3        | GACTGCGTACGAATTGAC   |                    |
| Em4        | GACTGCGTACGAATTTGA   |                    |
| Em5        | GACTGCGTACGAATTAAC   |                    |
| Em6        | GACTGCGTACGAATTGCA   |                    |

Phản ứng PCR-SRAP được thực hiện với 2 vòng chu trình nhiệt như sau: 1 chu kỳ với nhiệt độ 95°C trong 1 phút; vòng khuếch đại đầu với 6 chu kỳ ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, 35°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút; vòng khuếch đại thứ 2 với 32 chu kỳ tiếp theo ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, 46°C trong 30 giây, 72°C trong 2 phút; 1 chu kỳ 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được trộn với GelRed và điện di trên gel agarose 2% ở hiệu điện thế 50V trong 60 phút.

### 2.4. Phân tích số liệu

Kết quả PCR-SRAP được xử lý bằng phần mềm Gel Analyzer phiên bản 19.1 giúp tính toán kích thước các alen dựa vào thông số của thang chuẩn (Istvan và

Istvan, 2019). Các alen được mã hoá bằng số tự nhiên là 0 và 1, những alen nào xuất hiện thì ký hiệu là 1, còn không xuất hiện thì ký hiệu là 0. Các số liệu nhị phân này được xử lý cho phù hợp với từng phần mềm phân tích đa dạng di truyền.

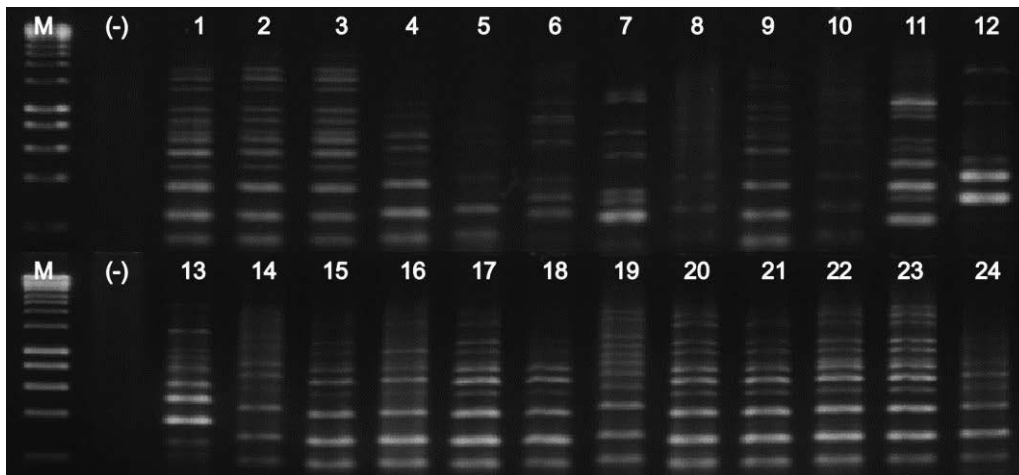
Phần mềm POPGENE 32 giúp tính toán hệ số tương đồng di truyền theo Nei, Na (số alen quan sát được), Ne (số alen hiệu quả), H (hệ số đa dạng di truyền), I (hệ số đa dạng di truyền theo Shannon) của các mẫu nghiên cứu và tần suất các alen xuất hiện ở 18 chỉ thị SRAP ở các mẫu. Hệ số tương đồng di truyền theo Nei của các mẫu nghiên cứu là nền tảng xây dựng cây phân nhóm di truyền các mẫu nấm *Colletotrichum* spp. bằng phần mềm NTSYSpc phiên bản 2.2 theo phương pháp UPGMA (Rohlf, 2005).

Các phân tích PCoA (Principal Coordinate Analysis) và kiểm định Mantel giúp đánh giá sự khác biệt di truyền và nguồn gốc của các mẫu nghiên cứu thông qua phần mềm GenAlEx phiên bản 6.5 (Peakall và cs., 2012). Đồng thời tính hiệu quả trong xác định đa hình của các chỉ thị được đánh giá dựa vào giá trị của hệ số PIC (Polymorphism information content). Hệ số PIC được tính theo công thức:  $PIC = 1 - \sum p_i^2$ . Trong đó  $p_i$  là xác suất bắt gặp của alen thứ  $i$ .

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Mức độ đa hình nhận biết bằng chỉ thị SRAP

Đa dạng di truyền của 24 mẫu nấm *Colletotrichum* spp. được đánh giá bằng 18 chỉ thị SRAP thông qua phản ứng PCR từ DNA đã ly trích. Sản phẩm PCR được quan sát và đánh giá dựa trên kết quả điện di gel agarose 2% ở hiệu điện thế 50V trong 60 phút. Sự đa dạng di truyền phân tử được biểu thị bởi sự khác biệt của các band DNA ở các giếng.



**Hình 1. Sản phẩm PCR-SRAP các mẫu nấm *Colletotrichum* spp. với chỉ thị Me2 - Em6**  
M: Ladder 1Kb, (1): HCM451, (2): HCM411, (3): HCM441, (4): LD251, (5): LD351, (6): LD111, (7): LD321, (8): LD231, (9): TG322, (10): TG353, (11): TG233, (12): HCM142, (13): HCM123, (14): HCM121, (15): TG152, (16): TG227, (17): LD431, (18): TG315, (19): TG441, (20): TG144, (21): TG151, (22): LD341, (23): TG234, (24): HCM421.

Hình 1 thể hiện kết quả điện di của chỉ thị Me2 - Em6 khuếch đại được 25 alen, kích thước từ 100bp - 1700bp. Trong đó, có 12 alen đa hình và 13 alen đơn hình thể hiện mức độ bảo tồn cao về di truyền của các mẫu nấm thông qua các vùng mã hoá. Kết quả ở bảng 2 cho thấy 2 chỉ thị là Me1 - Em2 với hệ số PIC là 0,34 và chỉ thị Me1 - Em4 với hệ số PIC là 0,4 đạt tỷ lệ alen đa hình đạt cao nhất là 54%, tỷ lệ alen đa

hình thấp nhất là 25% ở chỉ thị Me2 - Em5 với hệ số PIC đạt 0,5.

Các chỉ thị SRAP được sử dụng trong nghiên cứu đều cho alen đa hình với các mẫu nấm *Colletotrichum* spp từ từ 4 đến 14 band. Trong đó, chỉ thị Me1 - Em2 và Me1 - Em6 cho kết quả khuếch đại được nhiều alen đa hình nhất (14 alen) và thấp nhất ở chỉ thị Me2 - Em3 và Me3 - Em2

(4 alen). Tổ hợp của 18 chỉ thị SRAP khuếch đại một lượng lớn các alen (357 alen) của các mẫu nấm nghiên cứu, trong đó có 158 alen đa hình chiếm trung bình 44,26% (158/357) (bảng 2) và tỷ lệ đa hình trung bình đạt 42,83%. Kết quả

nghiên cứu của Ren và cs. (2012) về đa dạng của nấm rễ cộng sinh sử dụng chỉ thị SRAP cho tỷ lệ alen đa hình đạt 76,4% và Kumar và cs. (2020) báo cáo khuếch đại được 82,41% alen đa hình ở nấm *C. capsici* khi dùng 15 chỉ thị SRAP.

**Bảng 2. Phần trăm đa hình và hệ số PIC của chỉ thị SRAP**

| STT               | Chỉ thị SRAP | Hệ số đa dạng |                 |                   | PIC         |
|-------------------|--------------|---------------|-----------------|-------------------|-------------|
|                   |              | Tổng số alen  | Số alen đa hình | Tỉ lệ đa hình (%) |             |
| 1                 | Me1 - Em1    | 18            | 6               | 33                | 0,47        |
| 2                 | Me1 - Em2    | 26            | 14              | 54                | 0,34        |
| 3                 | Me1 - Em3    | 20            | 10              | 50                | 0,41        |
| 4                 | Me1 - Em4    | 24            | 13              | 54                | 0,4         |
| 5                 | Me1 - Em5    | 15            | 6               | 40                | 0,5         |
| 6                 | Me1 - Em6    | 29            | 14              | 48                | 0,44        |
| 7                 | Me2 - Em1    | 20            | 9               | 45                | 0,5         |
| 8                 | Me2 - Em2    | 13            | 5               | 38                | 0,47        |
| 9                 | Me2 - Em3    | 10            | 4               | 40                | 0,48        |
| 10                | Me2 - Em4    | 23            | 7               | 30                | 0,49        |
| 11                | Me2 - Em5    | 16            | 4               | 25                | 0,5         |
| 12                | Me2 - Em6    | 25            | 12              | 48                | 0,34        |
| 13                | Me3 - Em2    | 11            | 4               | 36                | 0,48        |
| 14                | Me3 - Em3    | 18            | 8               | 44                | 0,44        |
| 15                | Me3 - Em6    | 23            | 9               | 39                | 0,46        |
| 16                | Me4 - Em3    | 20            | 9               | 45                | 0,48        |
| 17                | Me4 - Em6    | 24            | 12              | 50                | 0,4         |
| 18                | Me5 - Em6    | 23            | 12              | 52                | 0,4         |
| <b>Tổng số</b>    |              | <b>357</b>    | <b>158</b>      |                   |             |
| <b>Trung bình</b> |              |               |                 | <b>42,83</b>      | <b>0,47</b> |

Kết quả khuếch đại được lượng alen đa hình thấp hơn so với nghiên cứu của Moges và ctv (2016) khi sử dụng 23 chỉ thị SSR khảo sát đa dạng di truyền của 163 mẫu nấm *C. gloeosporioides* đạt tỷ lệ 50%. Đồng thời, tỷ lệ này thấp hơn nghiên cứu khảo sát đa dạng di truyền một số nấm nội sinh bằng chỉ thị SRAP khi đạt 76,4% (Ren và cs., 2012). Tuy nhiên, một số chỉ thị cho thấy sự khác biệt về loài và nguồn gốc rõ ràng trên các alen khuếch đại được, tương tự như các

mẫu thể hiện trên hình 1 với chỉ thị Me2-Em6. Bên cạnh đó, hệ số PIC của các chỉ thị SRAP sử dụng trong nghiên cứu có giá trị cao hơn so với nghiên cứu của Moges và cs. (2016).

Tuy lượng alen đa hình của 18 chỉ thị SRAP của các mẫu nghiên cứu là tương đối thấp chỉ 44,26% nhưng tần suất xuất hiện của các alen này là rất thường xuyên. Hệ số PIC của 18 chỉ thị đạt trung bình bằng 0,47; điều này cho thấy tính ổn định của chỉ thị SRAP. Kumar và cs. (2020)

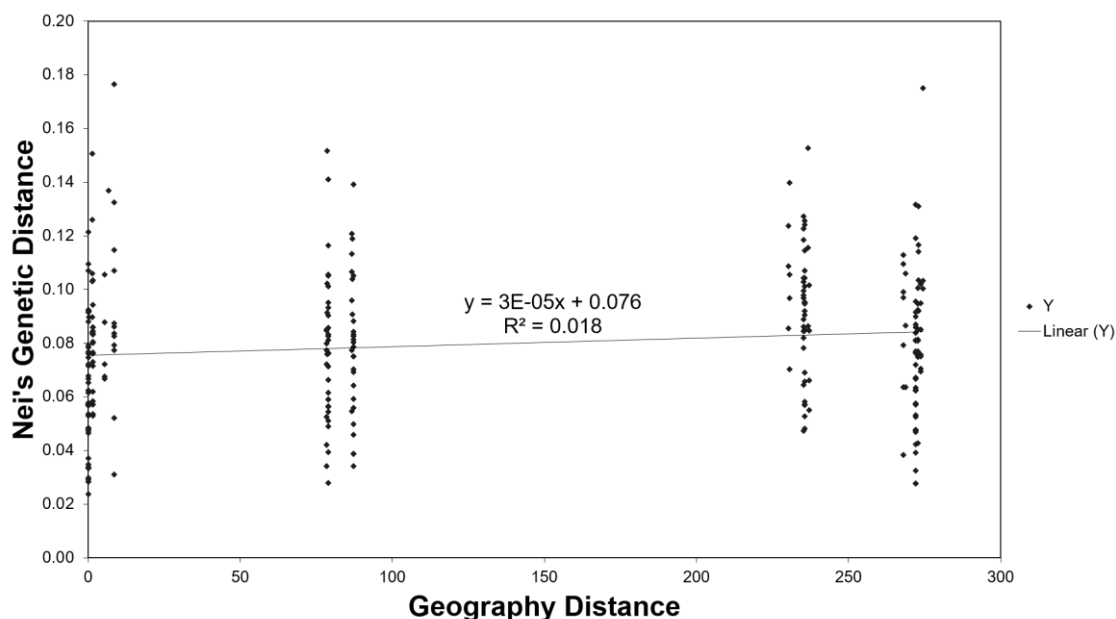
báo cáo tỷ lệ trung bình hệ số PIC của 15 chỉ thị SRAP nghiên cứu đạt 0,27 và nghiên cứu của Moges và cs. (2016) đạt trung bình 0,37 khi sử dụng 23 chỉ thị SSR khảo sát đa dạng di truyền của nấm *C. gloeosporioides*. Kết quả cho thấy giá trị trung bình của hệ số PIC của nghiên cứu cao hơn các nghiên cứu của Kumar và cs. (2020) và Moges và cs. (2016), nhưng thấp hơn nghiên cứu của Machenahalli và cs. (2021) khi sử dụng 20 chỉ thị SRAP đánh giá đa dạng di truyền của *Colletotrichum* spp. gây bệnh trên cây cà phê với hệ số PIC đạt trung bình là 0,52.

### 3.2. Đánh giá đa dạng di truyền các mẫu nấm *Colletotrichum* spp.

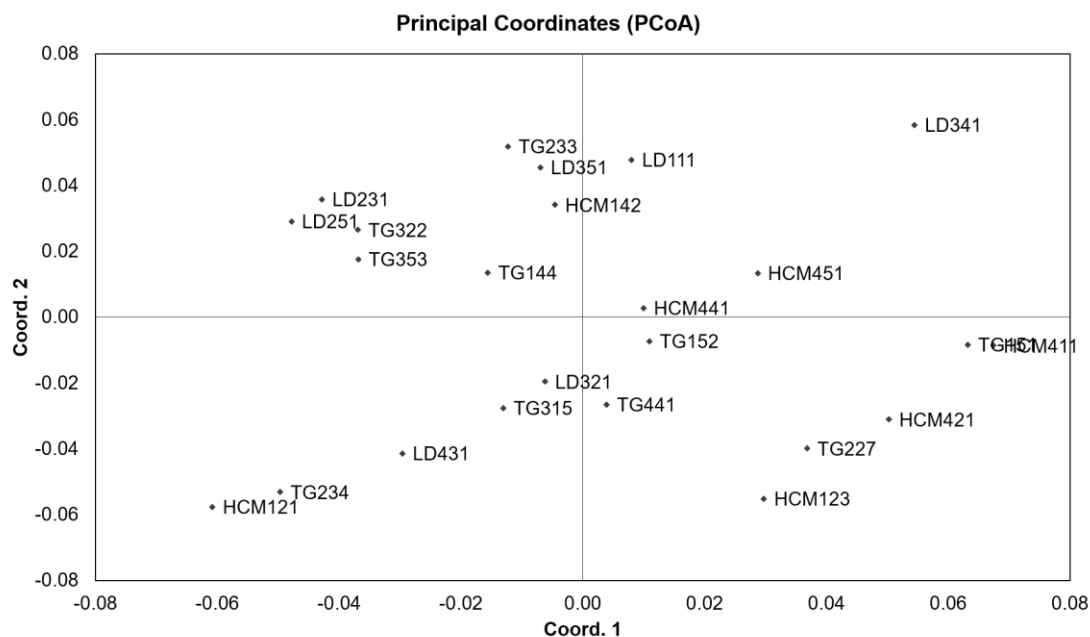
Các hệ số đánh giá đa dạng di truyền các mẫu nghiên cứu thông qua 18 chỉ thị SRAP được tính toán và so sánh. Hệ số PIC thể hiện mức độ đa hình của các mẫu với chỉ thị nghiên cứu và kết quả cho thấy tần suất xuất hiện của các alen đa hình đạt từ 0,34 - 0,5. Tương ứng với hệ số đa dạng di truyền theo Shannon (I) của 24 mẫu nấm đạt từ 0,39 - 0,58 và trung bình là 0,49. Điều này cho thấy chỉ thị SRAP có độ ổn định cao nhưng vẫn xác định được tính đa dạng di truyền của các mẫu có tương quan gần dựa vào các alen đồng trội.

**Bảng 3. Các thông số đánh giá đa dạng di truyền theo các mẫu nghiên cứu**

| STT               | Mẫu    | Na          | Ne          | H           | I           |
|-------------------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1                 | HCM451 | 2,00        | 1,58        | 0,37        | 0,55        |
| 2                 | HCM411 | 2,00        | 1,54        | 0,35        | 0,53        |
| 3                 | HCM441 | 2,00        | 1,50        | 0,33        | 0,52        |
| 4                 | LD251  | 2,00        | 1,33        | 0,25        | 0,41        |
| 5                 | LD351  | 2,00        | 1,35        | 0,26        | 0,43        |
| 6                 | LD111  | 2,00        | 1,35        | 0,26        | 0,43        |
| 7                 | LD321  | 2,00        | 1,41        | 0,29        | 0,47        |
| 8                 | LD231  | 2,00        | 1,35        | 0,26        | 0,43        |
| 9                 | TG322  | 2,00        | 1,51        | 0,34        | 0,52        |
| 10                | TG353  | 2,00        | 1,45        | 0,31        | 0,49        |
| 11                | TG233  | 2,00        | 1,48        | 0,32        | 0,51        |
| 12                | HCM142 | 2,00        | 1,65        | 0,39        | 0,58        |
| 13                | HCM123 | 2,00        | 1,59        | 0,37        | 0,56        |
| 14                | HCM121 | 2,00        | 1,43        | 0,30        | 0,48        |
| 15                | TG152  | 2,00        | 1,47        | 0,32        | 0,50        |
| 16                | TG227  | 2,00        | 1,41        | 0,29        | 0,47        |
| 17                | LD431  | 2,00        | 1,42        | 0,30        | 0,47        |
| 18                | TG315  | 2,00        | 1,41        | 0,29        | 0,47        |
| 19                | TG441  | 2,00        | 1,41        | 0,29        | 0,47        |
| 20                | TG144  | 2,00        | 1,48        | 0,32        | 0,51        |
| 21                | TG151  | 2,00        | 1,39        | 0,28        | 0,45        |
| 22                | LD341  | 2,00        | 1,54        | 0,35        | 0,54        |
| 23                | TG234  | 2,00        | 1,51        | 0,34        | 0,52        |
| 24                | HCM421 | 2,00        | 1,30        | 0,23        | 0,39        |
| <b>Trung bình</b> |        | <b>2,00</b> | <b>1,45</b> | <b>0,31</b> | <b>0,49</b> |



**Hình 2. Kết quả kiểm định Mantel giữa khác biệt di truyền và khác biệt địa lý mẫu nấm *Colletotrichum* spp.**



**Hình 3. Phân tích PCoA của 24 mẫu nấm *Colletotrichum* spp. với 18 chỉ thị SRAP**

Các chỉ số di truyền gồm số alen quan sát được (Observed number of alleles:  $N_a$ ) là 2, số alen hiệu quả (Effective number of alleles:  $N_e$ ) (Kimura

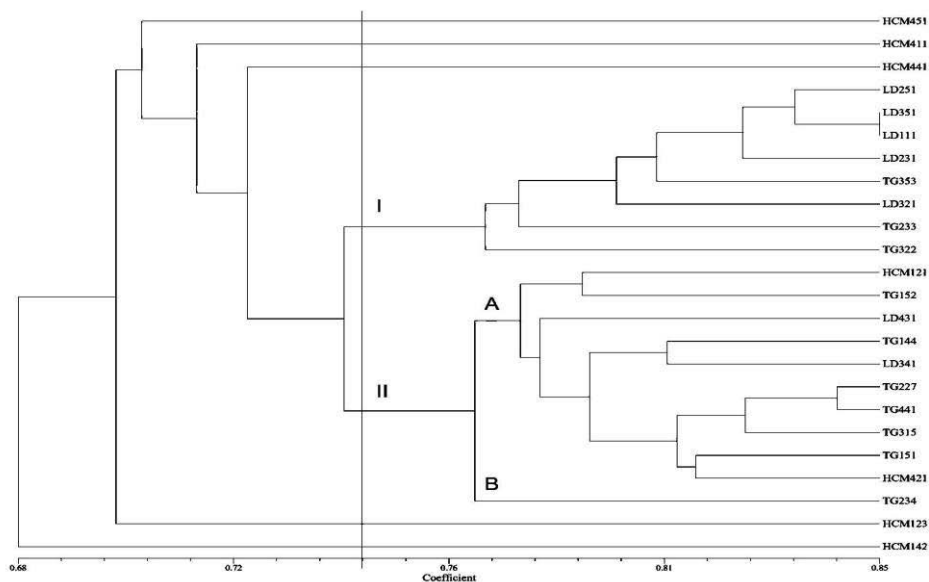
và Crow, 1964) trung bình đạt 1,45; hệ số đa dạng di truyền ( $H$ ) (Nei, 1973) đạt trung bình là 0,31; hệ số đa dạng di truyền theo Shannon (Shannon's

information index: I) (Lewontin và cs., 1972) của 24 mẫu nấm có giá trị trung bình là 0,49. Trong đó, chỉ số đa dạng di truyền theo Shannon (I) của các mẫu có giá trị trung bình là 0,49 với khoảng dao động từ 0,39 (HCM421) đến 0,58 (HCM142).

Dựa trên kết quả phân tích mức độ đa dạng di truyền theo Shannon của 24 mẫu nấm nghiên cứu có mức độ đa dạng ở mức khá cao đạt trung bình 0,49. Trong đó, mẫu HCM142 có mức độ đa dạng cao nhất ( $I = 0,58$ ) và có mức độ đa dạng thấp nhất là mẫu HCM421 ( $I = 0,12$ ). Chỉ số đa dạng theo Shannon cũng phù hợp với giá trị của hệ số đa dạng di truyền (H) khi (H) dao động từ 0,23 - 0,39. Trong đó, mẫu HCM142 có hệ số di truyền cao nhất là 0,39 và mẫu HCM421 là 0,23 thấp nhất so với các mẫu nghiên cứu; đồng thời, thấp hơn so với hệ số di truyền trung bình

là 0,31. Kết quả phân tích cho thấy mẫu HCM421 sự khác biệt về di truyền rất lớn so với các mẫu cùng loài và các mẫu cùng khu vực địa lý.

Kết quả kiểm định Mantel cho thấy sự tác động về khoảng cách địa lý đến di truyền của 24 mẫu nấm nghiên cứu là rất rõ ràng (hình 2) với  $p > 0.05$  và giá trị R đạt 0,14. Kiểm định Mantel cho thấy rằng khác biệt về địa lý có tác động đến di truyền giữa các mẫu có ý nghĩa thống kê. Và kết quả kiểm định Mantel tương đồng với kết quả phân tích PcoA (hình 3) khi khác biệt di truyền theo Nei của các mẫu nghiên cứu được phân thành 4 nhóm dựa vào vị trí địa lý và loài. Hơn nữa, khác biệt di truyền giữa các mẫu nghiên cứu. Điều này cho thấy việc sử dụng các alen đa hình của chỉ thị SRAP để phát triển các chỉ thị xác định loài hoặc nguồn gốc các mẫu nghiên cứu là rất tiềm năng.



Hình 4. Cây phân nhóm di truyền của các mẫu nấm *Colletotrichum* spp. trên 18 chỉ thị SRAP theo phương pháp UPGMA

Quan hệ tương đồng di truyền giữa các mẫu nấm *Colletotrichum* spp. được phân tích bằng phần mềm NTSYSpc 2.01 hình 4. Hệ số tương đồng di truyền của 28 mẫu nấm dao động từ 0,68 - 0,85, đạt trung bình 0,75. Hệ số tương đồng di truyền này thấp hơn hệ số của nghiên cứu đa dạng di truyền một số nấm nội sinh bằng chỉ thị SRAP khi đạt 0,53 đến 0,99 (Ren và cs., 2012). Tuy nhiên, kết quả cây phân nhóm di truyền xây dựng theo phương pháp UPGMA có nhiều nhánh cho thấy sự đa dạng tương đối cao giữa các mẫu nấm nghiên cứu trên 18 chỉ thị SRAP.

Với hệ số tương đồng di truyền 0,74 (hình 4) cho thấy 24 mẫu nấm *Colletotrichum* spp. được chia thành 7 nhóm (hình 4). Trong đó, 2 nhóm I và II chủ yếu là các mẫu được thu thập tại Tiền Giang và Lâm Đồng; có 2 mẫu được thu thập tại Tp HCM (HCM121 và HCM421). 5 nhóm còn lại mỗi nhóm chỉ có 1 mẫu là các mẫu nấm được thu thập tại Tp HCM (HCM451, HCM411, HCM441, HCM123, HCM142). Nhóm I bao gồm các mẫu nấm được thu thập tại Lâm Đồng và Tiền Giang đều thuộc loài *Colletotrichum scovillei*. Nhóm II được chia thành 2 phân nhóm với độ tương đồng di truyền 0,77 bao gồm phân nhóm A và B. Phân nhóm B chỉ có mẫu TG234 thuộc loài *C. scovillei* và nhóm A bao gồm các mẫu được thu thập tại cả 3 khu vực địa lý nhưng chủ yếu thuộc loài *C. scovillei*. Tuy nhiên, trong phân nhóm A có mẫu HCM121 thuộc loài *C. truncatum* cho thấy nấm *Colletotrichum* spp. có độ bảo tồn về di truyền rất cao. Đặc biệt, mẫu HCM142 thuộc loài *C. siamense* cho

thấy sự khác biệt lớn về di truyền so với mẫu LD321 cùng loài và các mẫu khác loài khác.

#### 4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu sử dụng 18 chỉ thị SRAP khảo sát đa dạng di truyền của 24 mẫu nấm *Colletotrichum* spp. khuếch đại được 158 alen đa hình đạt trung bình 44,26% tổng số alen, với hệ số PIC đạt từ 0,34 đến 0,5 cho thấy nguồn gen của các mẫu nghiên cứu có độ ổn định và đa dạng cao. Các hệ số tương đồng di truyền và hệ số đa dạng di truyền theo Shannon của các mẫu nấm nghiên cứu lần lượt đạt từ 0,68 đến 0,85 và từ 0,39 đến 0,58 minh chứng thêm về tính ổn định của chỉ thị SRAP cũng như sự đa dạng di truyền nấm *Colletotrichum* spp.

Bên cạnh đó, kiểm định Mantel và phân tích PCoA xác định kết quả phân tích đa dạng di truyền có ý nghĩa thống kê và đồng thời chia các mẫu nghiên cứu thành 4 nhóm dựa vào nguồn gốc địa lý và loài. Kết quả này củng cố cho việc bổ sung các phân tích và kiểm định thống kê dựa vào các hệ số tương đồng (hoặc khác biệt) di truyền với nguồn gốc địa lý của mẫu nghiên cứu giúp làm rõ hơn về ảnh hưởng của địa lý đến đa dạng di truyền của các quần thể sinh vật.

Kết quả xây dựng cây phân nhóm di truyền theo phương pháp UPGMA cho thấy các mẫu nấm nghiên cứu có độ bảo tồn cao về mặt di truyền giữa các cá thể cùng loài *C. scovillei*. Đồng thời, kiểm định Mantel và phân tích PCoA đã giúp xác định rõ ràng ảnh hưởng của cách biệt địa lý đến đa dạng di truyền của các mẫu

*C. scovillei* thuộc nhóm I. Hơn nữa, mẫu HCM142 thuộc loài *C. siamense* cho thấy tính khả thi khi dựa vào chỉ thị SRAP nhằm phát triển các chỉ thị định danh với khả năng truy suất nguồn gốc khác nhanh hơn.

Nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền của 24 mẫu nấm *Colletotrichum* spp. sử dụng 18 chỉ thị SRAP cho thấy sự tương quan gần về di truyền của nấm *Colletotrichum* spp. Đồng thời, cách biệt địa lý có thể dẫn đến sai khác về di truyền giữa những cá thể cùng loài. Điều này góp phần cung cấp thêm thông tin về tính ứng dụng rộng của chỉ thị SRAP trên nhiều đối tượng cũng như tính khả quan cho việc phát triển các chỉ thị phân tử giúp định danh nhanh các loài *Colletotrichum* spp.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Istvan L.Jr.P. and Istvan L.Sr.PhD., 2019. GelAnalyzer (Version 19.1). Retrieved from: <http://www.gelanalyzer.com/index.html>.
- Kambar Y., Vivek M.N., Manasa M., and *et al.*, 2014. Inhibitory effect of cow urine against *Colletotrichum capsici* isolated from anthracnose of chilli (*Capsicum annum* L.). *Science, Technology and Arts Research Journal*, 2(4): 91 - 93.
- Kimura M., and Crow J.K., 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* (49): 725 - 738.
- Kumar P., Dubey S., Akhtar J. and *et al.*, 2020. Genetic diversity and population structure analysis of *Colletotrichum capsici* isolates using SRAP and URP markers. *Indian Journal of Plant Protection*, (48): 64 - 73.
- Lewontin R.C., Dobzhansky T., Hecht M.K., and Steere W.C., 1972. The Apportionment of Human Diversity. *Evolutionary Biology*, New York: Springer, (6): 381 - 398.
- Li G. and Quiros C.F., 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics*, (107): 168 - 180.
- Machenahalli S., Jingade P., Giri M.S., and *et al.*, 2021. Cross infection and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. infecting coffee and black pepper. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 113: 101600.
- Mahasuk P., Humpeng N., Wasee S., Taylor P.Q.J., Mongkolporn O., 2009. Inheritance of resistance to anthracnose (*Colletotrichum capsici*) at seedling and fruiting stages in chili pepper (*Capsicum* sp.). *Plant Breeding*, (128):701 - 706.
- Minh T.D. and Nhã N.T., 2018. Đặc điểm sinh học của nấm thán thư *Colletotrichum* hại cây ớt tại Củ Chi, thành phố Hồ Chí Minh. *Journal of Science and Technology - NTTU*, (4): 50 - 56.
- Moges A.D., Admassu B., Belew D. and *et al.*, 2016. Development of Microsatellite markers and analysis of genetic diversity and population structure of *Colletotrichum gloeosporioides* from Ethiopia. *PLOS One* 11(3): e0151257.
- Nei M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70:3321 - 3323.
- Peakall R. and Smouse P.E., 2012. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Bioinformatics*: 2537 - 2539.
- Ren N., Liu J., Yang D. and *et al.*, 2012. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) marker as a new method for identification of endophytic fungi from Taxus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (28): 215 - 221.
- Rohlf F.J., 2005. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.2. *Applied Biostatistics*, New York.

15. Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
16. Than P.P., Jeewon R., Hyde K.D., Pongsupasamit S., Mongkolporn O. and Taylor P.W.J., 2008. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand, *Plant pathology*, 57: 562 - 572.
17. Trần Thanh Tùng, 2002. Nghiên cứu xây dựng quy trình phòng trừ tổng hợp bệnh thán thư trên ớt cay tại thành phố Hồ Chí Minh. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, (10): 897.
18. White T.J., Bruns T., Lee S. and Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols, a guide to methods and applications* (Innis M.A. Gelfand D.H. Sninsky J.J. White T.J., Eds.). Academic Press, New York: 315 - 322.

## ABSTRACT

### **Genetic diversity of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose disease in chili fruit using SRAP approach**

*Fungi Colletotrichum spp. is the causative agent of anthracnose disease in chili and many different crops, affecting the yield and quality of products. In this study, the genetic diversity of 24 samples of Colletotrichum spp. has been evaluated through 18 SRAP markers by PCR approach. The result of PCR-SRAP amplified with the average ratio is 44.26% (158/357) polymorphic alleles, the genetic similarity value reached from 0,68 to 0,85. The diversity analysis evaluation revealed the genetic stability of 24 fungi study samples. At the same time, the influence of geographical distance on genetics was proved through the PCoA analysis when divided the study samples into 4 groups according to geographical origin and species. The Phylogenetic Tree of 24 fungi samples contributed into 7 groups with coefficient value is 0,74. This study has provided more information on the genetic diversity of fungi Colletotrichum spp. causing anthracnose on chili and proved the efficiency of SRAP markers.*

**Keywords:** Anthracnose, chili, *Colletotrichum* spp., genetic diversity, SRAP.

# NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH NẤM GÂY BỆNH HÉO RŨ GỐC MỐC TRẮNG HẠI CÂY LẠC TẠI QUẢNG TRỊ

Nguyễn Xuân Hiếu<sup>2,3</sup>, Nguyễn Đức Huy<sup>2</sup>, Cao Thị Thuyết<sup>1</sup>,  
Nguyễn Quang Cơ<sup>2</sup>, Nguyễn Tiến Long<sup>2</sup>,  
Nguyễn Thị Minh Nga<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Thu Thủy<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

<sup>2</sup> Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế

<sup>3</sup> Sở Giáo dục và Đào tạo tỉnh Quảng Trị

\* Tác giả liên hệ: nguyenthithuthuy@huaf.edu.vn

## TÓM TẮT

Bệnh héo rũ gốc mốc trắng được xem là một trong những bệnh gây hại nghiêm trọng cho các vùng trồng lạc ở tỉnh Quảng Trị. Kết quả nghiên cứu mười hai mẫu nấm được phân lập từ các cây lạc nhiễm bệnh trồng tại năm huyện của tỉnh Quảng Trị cho thấy các mẫu nấm phát triển tốt trên môi trường PGA trong điều kiện nhiệt độ và ánh sáng phòng thí nghiệm. Sợi nấm của các chủng phân lập có màu trắng. Sau 3 - 5 ngày nuôi cấy, sợi nấm đan kết với nhau tạo thành một khối nhỏ gọi là hạch nấm. Khi mới xuất hiện hạch nấm có màu trắng, sau đó nhanh chóng chuyển thành màu nâu sẫm, đặc trưng của nấm *Sclectorium sp.* Phân tích trình tự vùng ITS chỉ ra rằng mẫu nấm phân lập trên chính là nấm *Sclectorium rolsii*. Khả năng gây bệnh của các chủng này được đánh giá qua lây bệnh nhân tạo trên giống lạc L14 trồng phổ biến tại tỉnh Quảng Trị. Kết quả cho thấy nấm *Sclectorium rolsii* chính là tác nhân gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng trên cây lạc tại Quảng Trị.

**Từ khóa:** Cây lạc, bệnh héo rũ gốc mốc trắng, *Sclectorium rolsii*, Quảng Trị.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lạc (*Arachis hypogaea* L.) là cây công nghiệp ngắn ngày có giá trị dinh dưỡng cao. Trên thế giới, trong số các loại cây công nghiệp ngắn ngày, lạc xếp thứ 2 sau đậu tương về diện tích và sản lượng, xếp thứ 13 trong các loại cây thực phẩm (Nguyễn Minh Hiếu, 2003). Ở Việt Nam, lạc là được trồng phổ biến ở hầu hết

các tỉnh trong cả nước vì cây lạc đem lại hiệu quả kinh tế cao nhờ khả năng cải tạo và nâng độ phì của đất, tăng năng suất cây trồng khác. Bên cạnh đó, lạc là nguồn bổ sung đạm, chất béo cho con người, là thức ăn giàu dinh dưỡng cho chăn nuôi và nguồn nguyên liệu có giá trị cao cho công nghiệp chế biến thực phẩm. Hiện nay, lạc được mở rộng sản xuất ở miền Trung để đáp ứng cho nhu cầu sử dụng của người dân và còn cung cấp nguyên liệu cho sản

Người phân biên: PGS.TS. Nguyễn Vinh Trường

xuất dầu lạc để xuất khẩu ra thị trường nước ngoài (Nguyễn Văn Bình, 1996).

Theo thống kê của tỉnh Quảng Trị năm 2021, diện tích trồng lạc đạt hơn 3.289ha, sản lượng 7.730 tấn (Chi cục TT&BVTV Quảng Trị, 2021). Hiện nay, cùng với sự gia tăng về quy mô sản xuất, sâu bệnh gây hại trên cây lạc ngày càng nghiêm trọng, nhất là trên các ruộng lạc đã trồng lâu năm. Cây lạc bị khá nhiều đối tượng sâu bệnh gây hại, trong đó bệnh héo rũ gốc mốc trắng gây thiệt đáng kể đến năng suất lạc. Năm 2022, có hơn 30 ha lạc bị nhiễm bệnh héo gốc mốc trắng tại Quảng Trị, với tỷ lệ bệnh từ 3 - 5%, một số nơi tỷ lệ nhiễm hơn 20% (Chi cục TT&BVTV Quảng Trị). Vì vậy, việc xác định chính xác tác nhân gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng trên cây lạc mang ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu phòng trừ và quản lý loài nấm gây hại này, góp phần thúc đẩy canh tác lạc tại tỉnh Quảng Trị được phát triển bền vững hơn.

Phương pháp truyền thống để xác định loài nấm gây bệnh là dựa vào các đặc điểm hình thái. Tuy nhiên, các đặc điểm hình thái không luôn ổn định và có những hạn chế nhất định trong việc xác định loài. Hiện nay, các kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên trình tự của một số vùng DNA mang thông tin nhất định đã và đang được áp dụng như một công cụ để nhận biết các loài nấm gây bệnh nhanh hơn, hiệu quả hơn so với phương pháp truyền thống (Hawaladar *et al.*, 2022). Mục đích của nghiên cứu này là định danh chính xác loài nấm gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng trên cây lạc ở Quảng Trị, sử dụng các đặc điểm hình thái, lây nhiễm nhân tạo kết hợp với phân tích đối

chiếu các trình tự vùng rDNA-ITS với các trình tự gen đã đăng kí trên Ngân hàng Gen.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Thu thập mẫu cây bệnh, phân lập nấm và xác định loài theo đặc điểm hình thái

Mẫu bệnh héo rũ gốc mốc trắng có triệu chứng điển hình được thu thập ở các ruộng lạc tại Quảng Trị. Thời điểm thu mẫu cây bệnh thích hợp nhất là ở giai đoạn đầu hoặc giữa của bệnh, khi vi sinh vật hại vẫn đang ở trạng thái hoạt động mạnh. Cây bệnh được thu ngẫu nhiên theo đường zigzag trên ruộng. Mỗi ruộng thu 5 cây có triệu chứng bệnh mới và điển hình, cho vào bao giấy và ghi nhãn mẫu bệnh.

Mẫu bệnh tiến hành rửa sạch bằng nước cất vô trùng và dùng giấy thấm vô trùng để thấm khô mẫu bệnh. Tiến hành phân ly nuôi cấy nấm bệnh héo rũ gốc mốc trắng trên môi trường nhân tạo (PDA, PGA, WA) và ở nhiệt độ phòng, sau đó cấy truyền để nhận được các isolate (mẫu phân lập) nấm thuần (Burgess *và cs.*, 2009). Nghiên cứu đặc điểm hình thái của nấm gây bệnh: tản nấm, sợi nấm và khả năng hình thành hạch nấm.

### 2.2. Kiểm chứng tác nhân gây bệnh sau phân lập theo quy tắc Koch

Nguồn nấm thuần phân lập trên cây lạc, tiến hành lây nhiễm nhân tạo trên cây lạc ở trong chậu trên nền đất phù sa đã được khử trùng. Thời điểm tiến hành lây

nhằm là giai đoạn cây con, mỗi chủng nấm được lây nhiễm nhân tạo nhắc lại 3 lần, mỗi lần nhắc lại 15 cây. Kiểm tra triệu chứng và giám định lại nấm gây bệnh héo rũ gốc mồi trắng trên cây lạc. (Burgess và cs., 2009). Chỉ tiêu theo dõi: Số cây nhiễm bệnh ở từng công thức, tính tỷ lệ bệnh (%).

### 2.3. Xác định loài gây bệnh héo rũ gốc mồi trắng lạc dựa vào trình tự vùng rDNA-ITS

DNA tổng số của các chủng nấm bệnh được tách chiết theo phương pháp sử dụng phenol-chloroform (Xie *et al.*, 2010). Cặp mồi ITS1 - F (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') và ITS4 - R (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')

được sử dụng để khuếch đại vùng trình tự ITS của DNA tổng số (Manter and Vivanco, 2007). Các sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự tại công ty Firstbase (Malaysia). So sánh các trình tự này với dữ liệu của GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) để xác định loài.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả giám định hình thái bệnh héo rũ gốc mồi trắng lạc ở Quảng Trị

Để xác định chính xác nguyên nhân gây bệnh héo rũ gốc mồi trắng trên cây lạc ở Quảng Trị, chúng tôi đã tiến hành thu mẫu, phân lập và giám định các mẫu bệnh đã thu thập, kết quả được trình bày ở bảng 1.

**Bảng 1. Mẫu nấm gây bệnh héo rũ gốc mồi trắng tại Quảng Trị**

| STT | Nơi thu mẫu             | Kí hiệu mẫu | Mẫu bệnh             |
|-----|-------------------------|-------------|----------------------|
| 1   | Triệu Phong, Quảng Trị  | QT4         | Héo rũ gốc mồi trắng |
| 2   | Hải Lăng, Quảng Trị     | QT12        | Héo rũ gốc mồi trắng |
| 3   | Triệu Phong, Quảng Trị  | QT13        | Héo rũ gốc mồi trắng |
| 4   | TX Quảng Trị, Quảng Trị | QT14        | Héo rũ gốc mồi trắng |
| 5   | Triệu Phong, Quảng Trị  | QT15        | Héo rũ gốc mồi trắng |
| 6   | Đông Hà, Quảng Trị      | QT17        | Héo rũ gốc mồi trắng |
| 7   | Cam Lộ, Quảng Trị       | QT16        | Héo rũ gốc mồi trắng |
| 8   | TX Quảng Trị, Quảng Trị | QT19        | Héo rũ gốc mồi trắng |
| 9   | TX Quảng Trị, Quảng Trị | QT20        | Héo rũ gốc mồi trắng |
| 10  | Cam Lộ, Quảng Trị       | QT27        | Héo rũ gốc mồi trắng |
| 11  | Cam Lộ, Quảng Trị       | QT25        | Héo rũ gốc mồi trắng |
| 12  | Hải Lăng, Quảng Trị     | QT22        | Héo rũ gốc mồi trắng |

Từ 12 mẫu bệnh thu thập ở các vùng trồng lạc tại các huyện Triệu Phong, thị xã Quảng Trị, huyện Hải Lăng, huyện Cam Lộ và thành phố Đông Hà, tỉnh Quảng Trị đã phân lập được 12 chủng nấm héo rũ gốc mồi trắng. Kết quả đã

phân ly, nuôi cấy được 12 isolate nấm *Sclerotium rolfsii*. Từ các mẫu nấm trên môi trường nhân tạo, kết quả nghiên cứu một số đặc điểm hình thái của nấm *Sclerotium rolfsii* được thể hiện ở bảng 2 và hình 1.

**Bảng 2. Một số đặc điểm hình thái của nấm *Sclerotium rolfsii* phân lập ở Quảng Trị**

| Tảo nấm   | Sợi nấm   | Hạch nấm   |
|---|---|--|
| <p>Tảo nấm màu trắng xốp, đâm tia phát triển thuận lợi, nhanh trên bề mặt mô bệnh và trên môi trường nhân tạo PGA.</p> <p>- Tảo nấm phát triển không làm biến đổi màu môi trường nuôi cấy.</p> <p>- Sau cấy 3 - 5 ngày thì hạch nấm được hình thành nhiều (hạch non - hạch già)</p> | <p>- Sợi nấm đa bào màu trắng, có xu hướng tập hợp lại thành hình rễ cây.</p> <p>- Ở phần vách ngăn của sợi nấm có mấu lồi ôm lấy 2 ngăn của sợi nấm.</p> | <p>- Các sợi nấm đan kết với nhau, biến thái hình thành hạch nấm.</p> <p>- Hạch nấm ban đầu khi hình thành có màu trắng, về sau chuyển sang màu vàng, màu nâu đen khi hạch già. Hạch nấm có dạng hình cầu, nhỏ như hạt cải.</p> <p>- Cát ngang hạch nấm thấy phần bên ngoài hạch các sợi nấm xếp sát nhau tạo thành vỏ, bên trong là các sợi nấm quấn tròn như hạt xốp xếp lại với nhau.</p> |



**Hình 1. Triệu chứng cây bệnh và hình thái sợi nấm *Sclerotium rolfsii***

### 3.2. Kết quả giám định bệnh héo rũ lạc ở Quảng Trị theo quy tắc Koch

Để giám định chính xác hơn chủng nấm gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng hại lạc tại Quảng Trị chúng tôi tiến hành lây nhiễm nhân tạo các chủng nấm đã phân

lập và giám định bằng hình thái lên cây lạc khỏe, 7 ngày sau lây nhiễm quan sát triệu chứng biểu hiện trên cây và phân lập lại các mẫu cây bệnh trên môi trường đặc hiệu. Kết quả giám định theo quy tắc Koch được trình bày ở bảng 3.

**Bảng 3. Kết quả lây nhiễm bệnh nhân tạo trên cây khỏe**

| STT | Nguồn nấm <i>S. rolfsii</i> | Thời kì tiềm dục (ngày) | Tỷ lệ bệnh (%) |
|-----|-----------------------------|-------------------------|----------------|
| 1   | QT4                         | 3 - 5                   | 100,0          |
| 2   | QT12                        | 3 - 5                   | 97,3           |
| 3   | QT13                        | 4 - 6                   | 97,3           |
| 4   | QT14                        | 4 - 6                   | 95,3           |
| 5   | QT15                        | 3 - 5                   | 90,0           |
| 6   | QT17                        | 3 - 5                   | 93,3           |
| 7   | QT16                        | 4 - 6                   | 95,7           |
| 8   | QT19                        | 5 - 7                   | 97,3           |
| 9   | QT20                        | 3 - 5                   | 87,3           |
| 10  | QT27                        | 3 - 5                   | 97,3           |
| 11  | QT25                        | 4 - 6                   | 100,0          |
| 12  | QT22                        | 4 - 6                   | 95,7           |

Thời kỳ tiềm dục trên cây ký chủ của các chủng nấm dao động từ 3 - 7 ngày. Các chủng nấm khác nhau có tỷ lệ bệnh trên cây ký chủ cũng khác nhau. Tỷ lệ bệnh giao động từ 87,3 - 100%, tỷ lệ bệnh cao nhất khi lây nhiễm chủng nấm QT4 được phân lập từ vùng trồng lạc ở huyện Triệu Phong và chủng QT25 phân lập tại huyện Cam Lộ. Các chủng nấm *S. rolfsii* phân lập ở các vùng khác nhau cho tỷ lệ nhiễm bệnh khác nhau, điều này thể hiện tính độc của các chủng nấm được phân lập từ các vùng khác nhau.

Sau 7 ngày lây nhiễm nhân tạo 12 chủng nấm lên cây lạc, tiến hành tái phân

lập tác nhân từ triệu chứng bệnh đều ghi nhận có sự hiện diện của nấm *Sclerotium rolfsii* (100% mẫu lây nhiễm).

Như vậy, từ kết quả kiểm chứng tác nhân gây bệnh theo quy tắc Koch cho thấy nấm *Sclerotium rolfsii* chính là tác nhân gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng trên lạc cây lạc ở Quảng Trị (hình 2).

Một nghiên cứu của Pamela Paparu và cs., 2020 về giám định nguyên nhân gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng trên lạc ở Uganda dựa trên đặc điểm hình thái và lây nhiễm nhân tạo, cũng cho thấy nấm *Sclerotium rolfsii* là tác nhân gây ra bệnh này.

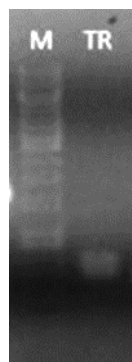


Hình 2. Lây nhiễm nấm *Sclerotium rolfsii* trên cây khỏe theo quy tắc Koch

### 3.3. Kết quả giám định bệnh héo rũ gốc mốc trắng hại lạc ở Quảng Trị bằng sinh học phân tử

12 mẫu bệnh phân lập đã được định danh là nấm *Sclerotium rolfsii* dựa vào hình thái và quy tắc Koch. Chủng nấm QT4 đại diện cho 12 nhóm nấm được chọn để xác định loài dựa trên dữ liệu

phân tử nhằm phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả kiểm tra tách chiết DNA tổng số cho thấy chủng nấm QT4 có DNA tổng số hiển thị vệt sáng trên thạch agarose 1% nhuộm ethidium bromide. Khuếch đại vùng rDNA-ITS của chủng nấm với cặp primer ITS1 và ITS4 thu được một đoạn DNA có chiều dài khoảng 650bp (hình 3).



**Hình 3. Hình điện di sản phẩm PCR vùng rDNA- ITS (M: 1kb DNA ladder)**

Trình tự nucleotide vùng ITS1 - 4 sau khi được hiệu chỉnh loại bỏ các đoạn chất lượng

```
CCTGATTTGAGGTCAATGGTCAATATATGCACTTATATGCTAGATATATGCGCATGATTTTAT
AAGTAGTACATACAAGCTAGAATCCCCTTCCGGTATAGGCGTAGACATATTATCACACCAAC
CGTAGGCATTTCTACATGTCCTACTAATAGTTTTAAAGAGAGCCAGTCAGAATATACTCTAA
CCAGCAACTCTCACATCCAAGCCTTGACAAATACAAAAATTTGTAAGGTTGAGAATTTAATG
ACTCTCAAACAGGCATGCCCCTCGGAATACCAAAGGGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGA
TGATTCACTGGATTCTGCAATTCACACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCA
AGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTATATTTTTAATTAAGAAAACTTGTCAGAAAA
CAAAGTTTCAATATGAGATCGTTCTATGTAACATAAATAAGAGTTATATAGGGTAATCATA
GTTAGGATTTCTCCTGACTACAGTTGGTTCACAGGTGTATATATTATATAGCTCCAGAGTGTG
CACATGCAATATTCATTACCAGCACAACCTCCTTCGCATA
```

**Hình 4. Trình tự vùng ITS của chủng nấm gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng hại lạc**

Đã có các nghiên cứu về tác nhân gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng trên cây lạc ở các nước trong khu vực cũng như trên thế giới. Nghiên cứu của Hawaladar *et al.*, 2022 đã xác định nấm gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng trên cây lạc tại năm huyện trồng lạc vùng Karnataka, Ấn Độ bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo và định danh phân tử. Lây nhiễm 10 chủng phân lập trên ba giống lạc, kết quả kiểm chứng tương tự như loài *S. rolfsii*. So sánh trình tự nucleotide với cơ sở dữ liệu NCBI cho thấy độ tương đồng với loài *S. rolfsii* đạt 97,8%.

thấp có chiều dài 599 nucleotide (hình 4). Trình tự nucleotide này sau đó được sử dụng để truy cập Ngân hàng Gen (BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Trên cơ sở kết quả tương đồng với các trình tự có sẵn trong Ngân hàng Gene, loài của mẫu khảo sát được xác định. Kết quả cho thấy chủng nấm QT4 có độ tương đồng 99,83% với chủng *Sclerotium rolfsii* SPL15001 (mã số: KY446394). Như vậy, với độ tương cao với loài *Fusarium oxysporum*, có thể kết luận rằng chủng QT4 được xếp vào chi *Sclerotium*, loài *Sclerotium rolfsii*.

#### 4. KẾT LUẬN

Dựa vào đặc điểm hình thái, khả năng gây bệnh kết hợp với phân tích trình tự nucleotide của vùng rDNA-ITS, tác nhân gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng tại Quảng Trị là loài nấm *Sclerotium rolfsii*.

**Lời cảm ơn:** Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Bộ giáo dục và đào tạo đã cung cấp kinh thực hiện nghiên cứu này thông qua đề tài “Nghiên cứu và phát triển chế phẩm vi sinh có hoạt tính enzyme cao phòng chống bệnh héo rũ trên cây lạc trồng ở khu vực miền Trung” mã số: CT-2022.09.DHH.04.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật Quảng Trị, 2021. Báo cáo tổng kết sản xuất trồng trọt và bảo vệ thực vật năm 2021 và triển khai sản xuất vụ đông xuân 2021 - 2022. Chi cục TT&BVTV Quảng Trị.
2. Nguyễn Văn Bình, 1996. Giáo trình cây lạc. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
3. Burgess L.W., Knight T.E., Tesoriero L., Hien T.P, 2008. Diagnostic manual for plant disease in Vietnam, Australia Center for International Agricultural Research.
4. Nguyễn Minh Hiếu, 2003. Giáo trình cây công nghiệp, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
5. Manter DK, Vivanco JM., 2007. Use of ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. J Microbiol Methods, 71: 7 - 14.
6. Muthulekshmi Lajapathy Jeeva, Kamal Sharma, Ajay Kumar Mishra, Raj Shekhar Misra, 2008. Rapid extraction of genomic DNA from *Sclerotium rolfsii* causing collar rot of amorphophallus. Genes, Genomes and Genomics: 2(1) 60 - 62 ©2008 Global Scien.
7. Pamela Paparu, Amos Acur, Fred Kato, Catherine Acam, Justine Nakibuule, Allan Nkuboye, Stephen Musoke, and Clare Mukankusi, 2020. Morphological and pathogenic characterization of *Sclerotium rolfsii*, the causal agent of Southern blight disease on common bean in Uganda. Plant disease 2020 104:2130 - 2137.
8. Hawaladar S., M. Nandan, H. D. Vinaykumar, Rajanna H. Hadimani, Shridhar Hiremath, V. Venkataravanappa, C. R. Jahir Basha & C. N. Lakshminarayana Reddy, 2022. Morphological and molecular characterization of *Sclerotium rolfsii* associated with stem rot disease of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Indian Phytopathology volume 75, pages25 - 36 (2022).

## ABSTRACT

### Identification of the fungus causing southern blight disease of groundnut in Quang Tri province

*Southern blight disease has been considered as one of serious diseases in groundnut growing areas in Quang Tri province. The result indicated that twelve fungal isolates were collected from infected groundnut at five districts of Quang Tri province grew well on PGA media under laboratory temperature and light conditions. The hyphal of these isolates is white. Sclerotia begin to develop after 3 - 5 days of growth when hyphae cluster together as a compact mass. After an initial white appearance, the sclerotia quickly become dark brown, predominantly characteristic of *Sclerotium* sp. Sequence analysis of the ITS region indicated that fungal isolate was *Sclerotium rolfsii*. The pathogenicity of above fungal isolates was conducted through the inoculation of fungal conidia on L14 groundnut variety. The results showed that *Sclerotium rolfsii* is the causal agent of Southern blight disease in groundnut in Quang Tri.*

**Keywords:** *Arachis hypogaea*, Southern blight disease, *Sclerotium rolfsii*, Quang Tri.

# NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ ĐỊNH DANH NẤM MĐT6 PHÂN LẬP TỪ LÁ ĐẬU TƯƠNG NHIỄM BỆNH PHẤN TRẮNG

Trần Thị Hoa<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hồng Hà<sup>1</sup>,  
Bùi Phương Thảo<sup>1</sup>, Trần Thị Trường<sup>3</sup>,  
Phạm Bích Ngọc<sup>1,2</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>1,2</sup>, Đỗ Tiến Phát<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Viện Công nghệ Sinh học,  
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup> Học viện Khoa học và Công nghệ,  
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup> Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Cây đậu đỗ,  
Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

## TÓM TẮT

Nấm phấn trắng là loại bệnh nguy hiểm trên đậu tương và có thể làm giảm năng suất hạt lên đến 60%. Sự xâm nhiễm của nấm phấn trắng còn tạo cơ hội cho các nấm bệnh cơ hội khác phát triển và gây hại đến sinh trưởng, năng suất của đậu tương. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã định danh và phân tích đặc điểm sinh học của chủng nấm MĐT6 được phân lập từ lá đậu tương bị bệnh phấn trắng thu thập tại Việt Nam. Các kết quả về đặc điểm hình thái và vi học cùng với trình tự vùng gen ITS cho thấy chủng MĐT6 thuộc loài nấm *Cladosporium sp.* và được đặt tên là *Cladosporium sp. MĐT6*. Nhiệt độ thích hợp cho sinh trưởng của chủng nấm này là 22 - 32°C. Nấm *Cladosporium sp. MĐT6* bị ức chế sinh trưởng hoàn toàn ở nhiệt độ 37°C. Chủng *Cladosporium sp. MĐT6* có khả năng đồng hóa đa dạng các nguồn carbon như sucrose, D-glucose, D-maltose, D-sorbitol, mannitol, CMC và tinh bột nhưng không hoặc đồng hóa rất kém đường myo-inositol. Các nồng độ muối NaCl từ 0 - 11% không ảnh hưởng tới sinh trưởng và phát triển của chủng *Cladosporium sp. MĐT6*. Đây là nguồn thông tin hữu ích cho các nghiên cứu tiếp theo trong việc phòng trừ bệnh hại trên cây đậu tương.

**Từ khóa:** Nấm phấn trắng, đặc điểm sinh học, MĐT6, cây đậu tương.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu tương được coi là cây trồng có giá trị cải tạo đất tốt, là nguồn nguyên

liệu trong công nghiệp chế biến thức ăn gia súc và cung cấp nguồn thực phẩm quan trọng cho con người. Thêm vào đó, cây mầm đậu tương còn là một loại rau quan trọng được tiêu thụ ở nhiều nước

Người phân biên: Phan Thị Hồng Thảo

châu Á như Hàn Quốc, Trung Quốc và Nhật Bản. Ở Hàn Quốc, hơn 500.000 tấn mầm đậu nành được tiêu thụ hàng năm như một loại rau trong súp, salad và các món ăn phụ (Hwang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010).

Ở Việt Nam nhu cầu tiêu thụ đậu tương ngày một tăng trong những năm gần đây. Tuy nhiên, năng suất đậu tương của Việt Nam còn thấp so với nhiều quốc gia trên thế giới. Theo thống kê của Tổng cục Thống kê, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, mặc dù cây đậu tương có thị trường tiêu thụ lớn, song từ năm 2011 đến nay, diện tích đậu tương trong nước có xu hướng giảm dần, từ 181.000ha xuống còn chưa đầy 120.000ha. Bên cạnh đó, trong khi năng suất đậu tương bình quân của thế giới đạt 25 tạ/ha thì nước ta vẫn chỉ khoảng 14,3 tạ/ha. Điều này có thể do nhiều nguyên nhân khác nhau, nhưng trở ngại lớn nhất đối với canh tác đậu tương ở nước ta vẫn là tác động của sâu bệnh hại. Việt Nam có khí hậu nhiệt đới gió mùa với nền nhiệt ẩm cao, đây là điều kiện khí hậu thuận lợi cho các loại bệnh hại nguy hiểm trong đó có bệnh nấm phấn trắng. Bệnh phấn trắng xuất hiện và gây hại ngay từ thời kỳ cây con với các triệu chứng lá khô cháy và dễ rụng. Lớp phấn trắng có thể lan rộng và bao phủ trên cả thân, cành và hoa khi cây nhiễm bệnh nặng (Trần Thị Trường và cộng sự, 2015; 2017). Trong nghiên cứu của Trần Thị Hoa và cộng sự (2020) tại Việt Nam đã phân lập được 4 loại nấm phấn trắng khác nhau là MĐT2, MĐT4, MĐT5 và

MĐT6. Các chủng nấm này đều có độc tính cao khi lây nhiễm trên lá đậu tương trong điều kiện *in vitro* và trên cây đậu tương ở giai đoạn 14 ngày tuổi. Đặc biệt chủng MĐT6 có độc tính mạnh nhất và gây chết toàn bộ các cây đậu tương lây nhiễm chỉ sau một tuần. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành định danh và phân tích một số đặc điểm sinh học của chủng MĐT6 để cung cấp thêm thông tin về loài nấm bệnh này.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu

- Chủng nấm MĐT6 được phân lập từ lá đậu tương nhiễm 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 (hình 1). Hiện nay, chủng được lưu giữ tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học.

### 2.2. Phương pháp

#### 2.2.1. Nhận diện chủng nấm thông qua đặc điểm hình thái và đặc điểm vi học cần thiết

- Quan sát đặc điểm hình thái khuẩn lạc: Sau khi phân lập, mẫu nấm được quan sát bằng mắt thường và kính hiển vi theo phương pháp của Klich (Klich, 2002). 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 PDA.



Mặt trước



Mặt sau

**Hình 1. Mặt trước và mặt sau lá đậu tương nhiễm bệnh phân trắng**

- Quan sát các đặc điểm vi học dưới kính hiển vi quang học: Quan sát cấu tạo sợi nấm (có hay không có vách ngăn, hình dạng và màu sắc) và bào tử nấm (hình dạng, kích thước và màu sắc).

### **2.2.2. Định danh nấm bằng phương pháp sinh học phân tử**

- Tách chiết DNA tổng số của nấm: Nấm được nuôi cấy trên môi trường PDA (Potato Glucose Agar), pH (6 - 7) trong 3 ngày ở điều kiện nhiệt độ 25 - 28°C. Thu sợi nấm và tách chiết DNA theo phương pháp CTAB (Trần Nhân Dũng, 2011).

- Vùng ITS - rDNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi ITS1 (forward): 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' và ITS4 (reverse): 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'. Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự theo phương pháp Sanger. Trình tự vùng ITS được phân tích với nguồn dữ liệu trên

ngân hàng gene NCBI để xác định loài của mẫu nấm khảo sát.

### **2.2.3. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh hóa của chủng nấm**

- Hoạt tính các enzyme cellulase, amylase và protease của chủng nấm nghiên cứu được xác định dựa trên khả năng tạo vòng phân giải thông qua phương pháp nhuộm màu bằng dung dịch lugol trên đĩa thạch chứa các cơ chất tương ứng là CMC, tinh bột và casein với nồng độ 0,2% (William, 1983). Khả năng đồng hoá nguồn cacbon của chủng nấm được quan sát trên môi trường có bổ sung 1% các nguồn carbon khác nhau.

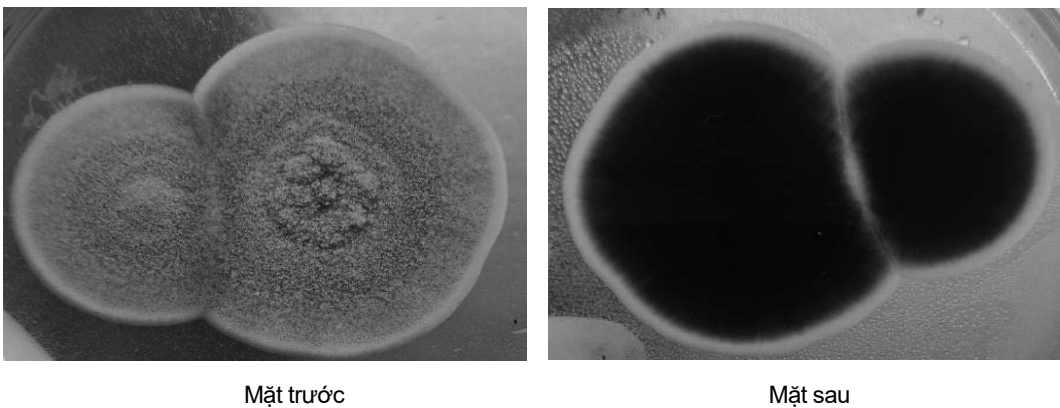
- Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng của nấm được đánh giá trên môi trường cơ sở PDA với các thông số điều chỉnh: nhiệt độ (22°C, 25°C, 29°C, 32°C, 35°C và 37°C), pH môi trường (4 - 11) bước nhảy 1,0 và muối NaCl (0, 1, 3, 5, 7, 10, 11%), khả năng chịu axit (Stanley and Holt, 1989).

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

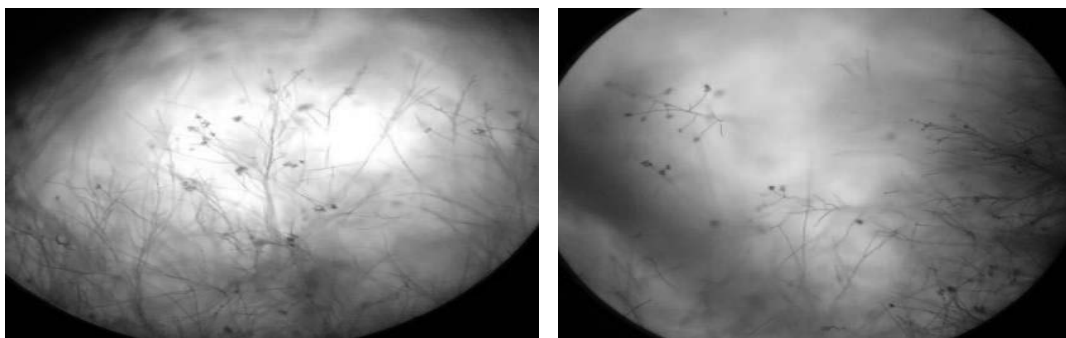
#### 3.1. Hình thái và đặc điểm vi học của nấm MĐT6

Trên môi trường thạch PDA, đường kính khuẩn lạc nấm đạt 25 - 30mm sau 5 - 7 ngày nuôi cấy ở 25° C. Khuẩn lạc nấm có màu xanh rêu đậm, mặt khuẩn lạc hơi nhô lên, sợi khuẩn ty khí sinh ngắn mịn, mép khuẩn lạc có viền trắng ngà. Mặt dưới, khuẩn ty cơ chất màu xanh đen (hình 2). Quan sát dưới kính hiển vi quang học độ phóng đại 400 lần cho thấy sợi nấm phân nhánh, chuỗi bào tử dài phân nhánh mỏng manh (hình 3). Trong nghiên cứu của Deshmukh và đồng tác giả,

*Cladosporium* là một chi nấm có khuẩn lạc màu xanh ô liu đến nâu hoặc đen và có các bào tử sắc tố sẫm được hình thành trong chuỗi đơn giản hoặc phân nhánh (Deshmukh *et al.*, 2005). Theo mô tả của Barron, hầu hết các loài *Cladosporium* đều có chuỗi bào tử rất mỏng manh, nên việc quan sát bằng kính hiển vi là cực kỳ khó khăn để các chuỗi bào tử được bảo tồn nguyên vẹn (George L, Barron, 1968). Với các đặc điểm hình thái thu được chúng tôi nhận định, chủng nấm MĐT6 mang các đặc điểm đặc trưng của chi nấm mốc *Cladosporium*. Tiếp theo, chúng tôi sử dụng các chỉ thị phân tử để kiểm chứng và định danh loài của mẫu nấm này.



Hình 2. Mặt trước và mặt sau nấm MĐT6 trên môi trường PDA, 25°C, 7 ngày



Cường sinh bào tử

Hình 3. Cường sinh bào tử nấm MĐT6 quan sát ở vật kính 40X

### 3.2. Định danh nấm MĐT6 bằng phân tích trình tự vùng ITS

Trình tự vùng ITS của nấm MĐT6 thu được có kích thước 594 bp. Kết quả so sánh với cơ sở dữ liệu trên Genbank (NCBI) bằng công cụ BLAST cho thấy, vùng trình tự ITS của nấm MĐT6 có độ tương đồng 100% với trình tự của chủng *Cladosporium* sp. KPMB28 (MK518423.1) và có mức tương đồng (98,36 - 98,9%) với các chủng nấm khác thuộc chi *Cladosporium* (bảng 1). Kết hợp giữa kết quả quan sát các đặc điểm hình thái và phân tích trình tự vùng ITS cho thấy, chủng nấm MĐT6 thu thập trên mẫu đậu tương mắc bệnh phân trắng của Việt Nam

thuộc chi *Cladosporium* và được chúng tôi đặt tên là *Cladosporium* spp. MĐT6.

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước đây về việc phát hiện một số loài nấm có khả năng xuất hiện trên các mẫu bệnh phân trắng như *Ampelomyces* spp., *Tilletiopsis* spp., *Cephalosporium* spp., *Cladosporium* spp. hoặc *Trichothecium* spp. (Kiss *et al.*, 2003). Nhiều loài *Cladosporium* cũng được tìm thấy trên các mẫu thực vật sống và chết hay ký sinh trên các loại nấm khác (Khan M *et al.*, 2016). Một số loài *Cladosporium* cũng là mầm bệnh đốm đen trên ngũ cốc, bệnh ghẻ ở cây họ bầu bí và đốm nâu trên lá cà chua (Rafał Ogórek *et al.*, 2012).

**Bảng 1. So sánh trình tự vùng ITS của nấm MĐT6 với các chủng nấm khác trên Ngân hàng Genbank**

| STT | Loài so sánh trên Genbank                 | Độ tương đồng (%) | Mã số      |
|-----|---|-------------------|------------|
| 1   | <i>Cladosporium</i> sp. KPMB28            | 100               | MK518423.1 |
| 2   | <i>Cladosporium cladosporioides</i> 89FEB | 98,90             | MW723859.1 |
| 3   | <i>Cladosporium cladosporioides</i> 43DEC | 98,63             | ON712453.1 |
| 4   | <i>Cladosporium cladosporioides</i> 42DEC | 98,63             | ON712452.1 |
| 5   | <i>Cladosporium cladosporioides</i> 41DEC | 98,63             | ON712451.1 |

### 3.3. Một số đặc điểm sinh học của chủng nấm MĐT6

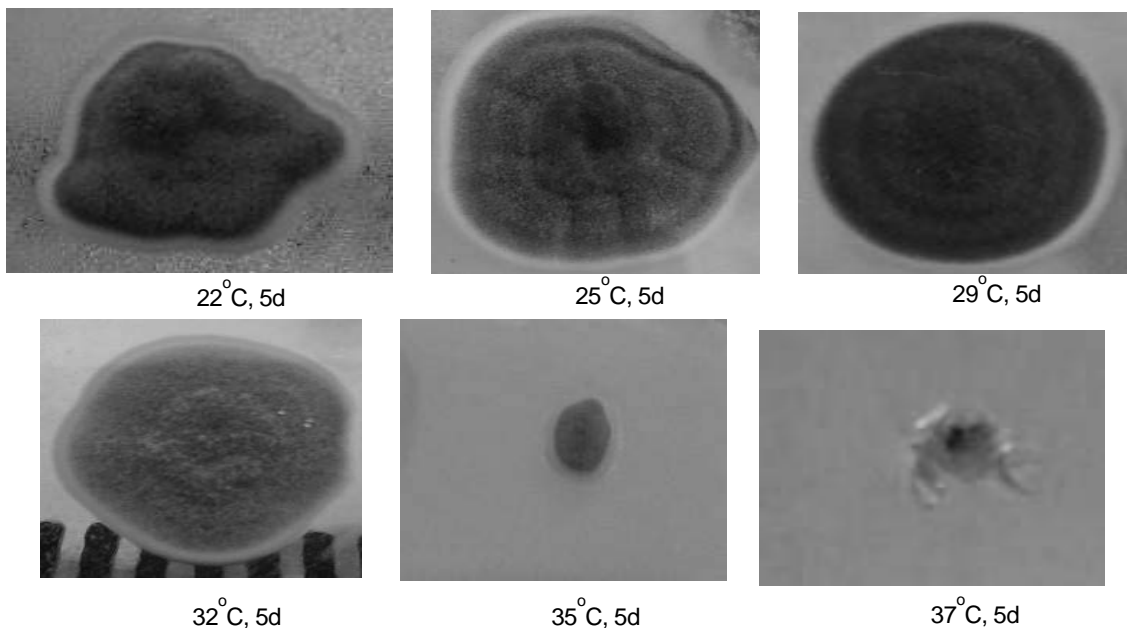
Chủng nấm *Cladosporium* sp. MĐT6 sinh trưởng tốt ở dải nhiệt độ từ 22 - 32°C sau 5 ngày nuôi cấy. Nấm phát triển yếu ở 35°C và không sinh trưởng ở 37°C (bảng 2 và hình 4). Nấm *Cladosporium* sp. MĐT6 có khả năng đồng hóa được một số carbon như: sucrose, D-glucose, D-maltose, D-sorbitol, mannitol, CMC, tinh bột nhưng không đồng hóa được Myo-inositol. Ở dải pH môi trường (4 - 11) bước nhảy 1,0 ghi nhận chủng nấm sinh trưởng tốt ở pH (6 - 11), dải pH (4

- 5) chủng sinh trưởng rất yếu. Kiểm tra khả năng sinh axit sau 5 ngày nuôi cấy, pH gần như không thay đổi.

Ở nồng độ muối NaCl từ 0 - 11% không ghi nhận ảnh hưởng tới sinh trưởng phát triển của chủng *Cladosporium* sp. MĐT6 (bảng 2). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước đây ghi nhận các loài *Cladosporium* thường chịu được áp lực thẩm thấu cao và phát triển dễ dàng trên môi trường có chứa glucose hoặc NaCl ở nồng độ cao (Deshmukh *et al.*, 2005).

**Bảng 2. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của nấm MĐT6**

| STT | Đặc điểm                       | MĐT6  |
|-----|--------------------------------|---|
| 1   | Khả năng đồng hoá              | Sucrose, D-glucose, D-maltose, D-sorbitol, mannitol, CMC, tinh bột. Không đồng hóa myo-inositol |
| 2   | Sinh axit                      | Không   |
| 3   | Nhiệt độ                       | 22 - 32 °C<br>35°C phát triển yếu<br>37°C không phát triển                                      |
| 4   | Khả năng sinh enzyme ngoại bào | Không sinh các enzyme ngoại bào: amylase, cellulase, protease                                   |
| 5   | Nồng độ muối (%NaCl)           | 0 - 11%: Phát triển tốt   |
| 6   | pH                             | Thích hợp pH (6 - 11)   |



**Hình 4. Tốc độ phát triển của nấm *Cladosporium* sp. MĐT6 ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA**

#### 4. KẾT LUẬN

Dựa vào các đặc điểm hình thái và kết quả phân tích trình tự vùng ITS, chủng nấm MĐT6 được xác định thuộc loài *Cladosporium* sp. Chủng nấm này sinh trưởng tốt ở dải nhiệt độ từ 22 - 32°C, có khả năng đồng hóa sucrose, D-glucose, D-

maltose, D-sorbitol, mannitol, CMC và tinh bột và sinh trưởng tốt ở nồng độ muối khảo sát từ 0 - 11%.

**Lời cảm ơn:** Kinh phí nghiên cứu được hỗ trợ bởi Đề tài Nhà nước NAFOSTED mã số: 106.03 - 2019.11.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barron, George L., 1968. The genera of Hyphomycetes from soil. Baltimore, MD: Williams & Wilkins. ISBN 9780882750040.
2. Deshmukh, S.K.; Rai, M.K., 2005. Biodiversity of fungi: their role in human life. Enfield, NH: Science Publishers. p. 460. ISBN 1578083680.
3. Hwang, Y. H, Jeong, Y. S., & Lee, J. D., 2004. Present status and future developmental direction of soy-related industries in Korea. *Korea Soybean Digest*, 21, 28 - 44.
4. Kiss, L., 2003. A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. *Pest Manag. Sci.* 59:475 - 483.
5. Khan M, Sohrab MH, Rony SR, Tareq FS, Hasan CM, Mazid MA, 2016. Cytotoxic and antibacterial naphthoquinones from an endophytic fungus, *Cladosporium* sp". *Toxicology Reports*. 3: 861 - 865. doi:10.1016/j.toxrep.2016.10.005. PMID 28959613.
6. Lee, J.-D, Shannon, J. G., Jeong, Y.-S., Lee, J.-M., & Hwang, Y.-H., 2007. A simple method for evaluation of sprout characters in soybean. *Euphytica*, 153, 171 - 180. 10.1007/s10681-006-9252-y.
7. Maren A Klich, 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Pulished by the Central bureau voor Schimmelcutues, Utrecht, the Nethrlands. 107 pp.
8. Rafał Ogórek, Agnieszka Lejman, Wojciech Pusz, Anna Miłuch, Paulina Miodyńska, 2012. Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. *Mikologia Lekarska* 2012, 19 (2): 80 - 85. ISSN 1232 - 986X.
9. Stanley T. Williams M. E. Sharpe, J. G. Holt, 1989. *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*, Williams & Wilkins, 4: 2452 - 2492. Bensch, K.; Groenewald, J.Z.; Dijksterhuis, J.; Starink-Willemse, M.; Andersen, B.
10. Trần Thị Hoa, Lý Khánh Linh, Tạ Thị Đông, Bùi Phương Thảo, Trần Thị Trường, Chu Hoàng Hà, Phạm Bích Ngọc, Đỗ Tiến Phát, 2020. Nghiên cứu khả năng lây nhiễm của một số chủng nấm phân lập từ lá đậu tương bị bệnh phấn trắng. Hội thảo Quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam lần thứ 19. Tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam 23 - 25/10/2020 - Nhà xuất bản Nông nghiệp: 127 - 134.
11. Trần Thị Trường, Trịnh Xuân Hoạt, Nguyễn Đạt Thuận 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.
12. Trần Thị Trường, Nguyễn Đạt Thuận và 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.
13. Trần Nhân Dũng, 2011. Sổ tay thực hành sinh học phân tử. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, 175 trang.
14. William S., 1983. Staining reaction for detection of hemicelluloses degrading. *FEMS Microbiology letters*, 20: 253 - 258.
15. Zhang, B., Chen, P., Florez-Palacios, S. L., Shi, A., Hou, A., & Ishibashi, T., 2010. Seed quality attributes of food-grade Soybeans from the U.S. and Asia. *Euphytica*, 173, 387 - 396. 10.1007/s10681-010-0126-y.

## ABSTRACT

### **Species identification and analysis of biological characteristics of fungal strain MĐT6 isolated from infected powdery mildew soybean leaves**

*Powdery mildew is a serious disease that could reduce soybean yield by up to 60%. The infection of powdery mildew fungus also provides opportunities for other harmful fungi to develop and affect host plants. In this study, we identified and analyzed the biological characteristics of the fungal strain MĐT6 isolated from powdery mildew infected soybean leaves in Vietnam. The data of morphological and microbiological characteristics along with ITS sequence showed that MĐT6 belonged to *Cladosporium* sp. and was named *Cladosporium* sp. MĐT6. The optimal temperature for growth and development of this fungal strain is from 22 to 32°C. The growth of *Cladosporium* sp. MĐT6 was completely inhibited at 37°C. The MĐT6 strain was able to assimilate various carbon sources such as Sucrose, D-glucose, D-maltose, D-sorbitol, mannitol, CMC, and starch, but poorly assimilated Myo-inositol. NaCl at concentrations from 0 to 11% showed no effect on the growth and development of *Cladosporium* sp. MĐT6. These results are valuable for further studies in disease control and management in soybean.*

**Keywords:** *Cladosporium, biological characteristics, MĐT6, powdery mildew, soybean.*

# ĐÁNH GIÁ SỰ GÂY HẠI KÉP CỦA NẤM *Pyricularia oryzae* VÀ VI KHUẨN *Erwinia* sp. TRÊN LÚA TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI

Võ Thị Thu Ngân<sup>1\*</sup>, Trần Thị Kiều<sup>1</sup>, Nguyễn Đức Cường<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Bộ môn Bảo vệ thực vật, Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long

\* Tác giả liên hệ: Nguyễn Đức Cường - cuongomon@yahoo.com  
Võ Thị Thu Ngân - nganvo1274@gmail.com

## TÓM TẮT

Cây trồng trong hệ sinh thái nông nghiệp là mục tiêu của nhiều tác nhân gây bệnh, đồng nhiễm có thể xảy ra thường xuyên và đó là vấn đề quan trọng cần xem xét. Nghiên cứu này cho thấy khi có sự nhiễm kép hai tác nhân nấm đạo ôn *P. oryzae* và vi khuẩn gây bệnh thối gốc *Erwinia* sp. thì sẽ làm tăng các triệu chứng bệnh và làm giảm sự phát triển của cây lúa so với nhiễm đơn từng tác nhân.

**Từ khóa:** Bệnh đạo ôn, nấm *P. oryzae*, bệnh thối gốc, vi khuẩn *Erwinia* sp.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, do ảnh hưởng của biến đổi khí hậu kết hợp với thâm canh cao bệnh hại lúa trở nên phức tạp và khó quản lý hơn, nhất là khi có sự nhiễm cùng lúc nhiều loại tác nhân gây bệnh. Bệnh đạo ôn do nấm *Pyricularia oryzae* gây hại được ghi nhận phân bố rộng ở hầu hết các quốc gia trồng lúa trên thế giới, hàng năm bệnh đạo ôn gây thiệt hại năng suất từ 15 - 30% (Wilson và *ctv.*, 2009; Ashkani và *ctv.*, 2015; Sakulkoo và *ctv.*, 2018) và trong điều kiện thuận lợi bệnh này có thể làm thiệt hại năng suất 100% (Musiime và *ctv.*, 2005).

Bệnh thối gốc lúa do vi khuẩn *Erwinia* sp. gây ra, được phát hiện đầu tiên ở Shizuoka Nhật Bản năm 1977 (Goto, 1979), ở Trung Quốc năm 1980 (Lui và Wang, 2004), gần đây bệnh mới xuất hiện ở đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) và gây hại nghiêm trọng trong giai đoạn phát triển đầu của cây lúa. Bệnh thối gốc lây lan nhanh khi kết hợp với bệnh đạo ôn làm cho cả ruộng bị cháy rụi (Phạm Văn Kim, 2015).

Nghiên cứu này thực hiện nhằm đánh giá mức độ thiệt hại khi có sự nhiễm kép nấm *Pyricularia oryzae* (gây bệnh đạo ôn) và vi khuẩn *Erwinia* sp. (gây bệnh thối gốc lúa) trong điều kiện nhà lưới.

Người phân biên: TS. Nguyễn Thị Ngọc Trúc

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu

- Giống lúa được sử dụng trong nghiên cứu này là giống OM7347 miễn cảm với bệnh đạo ôn và thối gốc lúa.

- Nguồn bệnh đạo ôn: Chủng nấm *P. oryzae* (Po.CT) được phân lập từ mẫu bệnh đạo ôn thu thập tại Cần Thơ.

- Nguồn bệnh thối gốc lúa: Chủng vi khuẩn *Erwinia* sp E.CT3.0 là chủng gây bệnh thối gốc mạnh nhất được chọn từ các chủng vi khuẩn *Erwinia* sp. Thu thập tại Cần Thơ.

### 2.2. Phương pháp

Thí nghiệm được thực hiện tại nhà lưới Bộ môn BVTV- Viện Lúa ĐBSCL, bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu (CRD), 6 nghiệm thức, 4 lần lặp lại.

**Bảng 1. Các nghiệm thức của thí nghiệm**

| Nghiệm thức | Giai đoạn lây nhiễm bệnh nhân tạo   |
|-------------|---|
| T1          | Lây nhiễm nấm <i>P. Oryzae</i> (Po.CT) khi cây lúa 15 ngày tuổi                                     |
| T2          | Lây nhiễm vi khuẩn <i>Erwinia</i> sp. (E.CT3.0) khi cây lúa 15 ngày tuổi                            |
| T3          | Lây nhiễm nấm Po.CT khi cây lúa 15 ngày tuổi<br>Lây nhiễm vi khuẩn E.CT3.0 khi cây lúa 22 ngày tuổi |
| T4          | Lây nhiễm vi khuẩn E.CT3.0 khi cây lúa 15 ngày tuổi<br>Lây nhiễm nấm Po.CT khi cây lúa 22 ngày tuổi |
| T5          | Lây nhiễm nấm Po.CT và vi khuẩn E.CT3.0 khi cây lúa 15 ngày tuổi                                    |
| T6          | Đối chứng – không lây nhiễm   |

#### \* Các bước thực hiện:

- Chuẩn bị cây lúa: Hạt lúa giống OM734 được ngâm 36 giờ và ủ trong 24 giờ, sau đó gieo trên khay có diện tích 25 x 35cm với mật độ 30 hạt/khay.

- Chuẩn bị đất: Đất được lấy từ nền đất ruộng trồng lúa, thanh trùng hai lần ở nhiệt độ 121°C trong 1 giờ, cho đất vào 2/3 khay.

- Nhân nguồn nấm *P. oryzae* (Po.CT) và vi khuẩn *Erwinia* sp.(E.CT3.0):

Nấm *P. oryzae* được nuôi cấy nhân tạo trên môi trường RSA ở 25°C trong 7 ngày, ủ ở 22°C trong điều kiện tối, loại bỏ

phần sợi nấm và chuyển sang điều kiện sáng liên tục trong 48 giờ, pha dịch huyền phù nấm chứa  $10^5$  bào tử/ml bào tử sử dụng lây nhiễm nhân tạo. Vi khuẩn *Erwinia* sp. được nuôi trên YP ở nhiệt độ 28°C trong 48 giờ, pha dịch huyền phù vi khuẩn chứa  $10^8$  cfu/ml sử dụng lây nhiễm nhân tạo.

- Lây nhiễm nhân tạo bệnh trên cây lúa: Cây lúa ở 15 ngày tuổi được lây nhiễm bệnh đạo ôn bằng cách phun bào tử lên tán lá (Võ Thị Thu Ngân, 2010) và lây nhiễm vi khuẩn bằng cách châm kim có nhúng dịch vi khuẩn vào phần bẹ ở sát gốc lúa (Trần Thị Nam Lý, 2016), lượng

huyền phù còn lại cho trực tiếp vào khay lúa (50 ml/khay).

Các nghiệm thức T3, T4 và T5 được lây nhiễm bệnh đạo ôn bằng cách phun lên tán lá 50ml huyền phù nấm/khay và lây nhiễm vi khuẩn với lượng huyền phù 50 ml/khay.

**\* Ghi nhận các chỉ tiêu và công thức tính:**

Đánh giá diễn biến bệnh ở 7, 14 và 21 ngày sau khi lây nhiễm tác nhân cuối.

▪ **Tỷ lệ lá bệnh đạo ôn:**

Tỷ lệ lá bệnh (%) = (Số lá bệnh/tổng số lá quan sát) x 100.

▪ **Tỷ lệ chồi bệnh thối gốc:**

Tỷ lệ chồi bệnh (%) = (Số chồi bệnh/tổng số chồi quan sát) x 100.

▪ **Tỷ lệ chồi chết:**

Tỷ lệ chồi chết (%) = (Số chồi chết/tổng số chồi quan sát) x 100.

▪ **Khả năng phục hồi:**

Tỷ lệ chồi khỏe (%) = (Số chồi khỏe/tổng số chồi quan sát) x 100.

Công thức tính AUDPC:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i) / 2] [X_{i+1} - X_i]$$

$Y_i$  = % diện tích lá bị bệnh ở  $i^{th}$  lần đánh giá

$X_i$  = số ngày ở  $i^{th}$  lần đánh giá

$n$  = tổng số lần đánh giá

**2.3. Xử lý số liệu**

Tất các số liệu thí nghiệm sẽ được xử lý bằng chương trình Excel và phân tích thống kê bằng chương trình SPSS version 20.

**3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

**3.1. Diễn biến bệnh đạo ôn khi có sự nhiễm kép của nấm *P. oryzae* và vi khuẩn *Erwinia sp.***

**Bảng 2. Tỷ lệ bệnh đạo ôn khi có sự nhiễm kép của nấm *P. oryzae* và vi khuẩn *Erwinia sp***

| Nghiệm thức   | Tỷ lệ bệnh đạo ôn (%) |                   |                   | AUDPC              |
|---|-----------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
|   | 7 NSC                 | 14 NSC            | 21 NSC            |                    |
| T1. Lây nấm <i>Po.CT</i> ở 15 ngày tuổi   | 50,0 <sup>a</sup>     | 65,0 <sup>a</sup> | 68,0 <sup>c</sup> | 868,0 <sup>b</sup> |
| T2. Lây vi khuẩn <i>E.CT3.0</i> ở 15 ngày tuổi                                    | 0,0 <sup>e</sup>      | 12,0 <sup>c</sup> | 15,0 <sup>d</sup> | 136,5 <sup>d</sup> |
| T3. Lây nấm <i>Po.CT</i> ở 15 ngày tuổi và vi khuẩn <i>E.CT3.0</i> ở 22 ngày tuổi | 47,0 <sup>b</sup>     | 65,0 <sup>a</sup> | 85,0 <sup>a</sup> | 917,0 <sup>a</sup> |
| T4. Lây vi khuẩn trước ở 15 ngày tuổi và lây nhiễm nấm ở 22 ngày tuổi             | 40,0 <sup>d</sup>     | 58,0 <sup>b</sup> | 80,0 <sup>b</sup> | 826,0 <sup>c</sup> |
| T5. Lây nấm <i>Po.CT</i> và vi khuẩn <i>E.CT3.0</i> ở 15 ngày tuổi                | 43,0 <sup>c</sup>     | 60,0 <sup>b</sup> | 85,0 <sup>a</sup> | 868,0 <sup>b</sup> |
| T6. Đối chứng (Không lây bệnh).   | 0,0 <sup>e</sup>      | 0,0 <sup>d</sup>  | 0,0 <sup>e</sup>  | 0,0 <sup>e</sup>   |
| Mức ý nghĩa   | **                    | **                | **                | **                 |
| CV (%)  | 1,7                   | 2,4               | 2,5               | 2,0                |

*Ghi chú:* Số liệu được chuyển đổi sang  $\text{Arasin } \sqrt{x}$  khi thống kê, các trung bình trong cùng một cột được theo sau bởi những ký tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5% trong phép thử Duncan; NSC: Ngày sau khi lây nhiễm bệnh.

Kết quả bảng 2 cho thấy, ở thời điểm 7 và 14 ngày sau lây tác nhân cuối (NSC) thì tỷ lệ bệnh đạo ôn xuất hiện ở các nghiệm thức bị nhiễm kép hai tác nhân nấm *Pyricularia oryzae* và vi khuẩn *Erwinia* sp. từ T3 - T5 thì sẽ thấp hơn hoặc bằng nghiệm thức T1 chỉ nhiễm nấm *Pyricularia oryzae*.

Đến thời điểm 21 ngày sau khi lây nhiễm tác nhân cuối: Tỷ lệ bệnh đạo ôn xuất hiện trên ba nghiệm thức nhiễm kép nấm và vi khuẩn: T4 (80,0%), T3 và T5 chiếm tỷ lệ (85,0%) cao hơn và khác biệt có ý nghĩa ở mức 5% so với nghiệm thức T1 (68,0%) chỉ nhiễm nấm.

AUDPC ở các nghiệm thức nhiễm 2 tác nhân nấm và vi khuẩn (T3, T4 và T5) gần bằng hoặc cao hơn so với AUDPC của nghiệm thức chỉ nhiễm nấm (T1).

Các nghiệm thức nhiễm nấm trước hoặc cùng lúc với nhiễm vi khuẩn (T3 và T5) thì sẽ có tỷ lệ bệnh đạo ôn cao hơn nghiệm thức nhiễm khuẩn trước và nhiễm nấm sau (T4).

### 3.2. Diễn biến bệnh thối gốc khi có sự nhiễm kép của nấm *P. oryzae* và vi khuẩn *Erwinia* sp.

Ở thời điểm 7 NSC: Tỷ lệ nhiễm bệnh thối gốc có sự khác biệt giữa các nghiệm thức, trong đó nghiệm thức bị nhiễm hai tác nhân nấm *Pyricularia oryzae* và vi khuẩn *Erwinia* sp. T3 thấp hơn tỷ lệ ở nghiệm thức T2 chỉ nhiễm vi khuẩn. Còn hai nghiệm thức nhiễm hai tác nhân nấm và vi khuẩn T4 và T5 thì có tỷ lệ bệnh thối gốc cao hơn nghiệm thức T2 (bảng 3).

**Bảng 3. Tỷ lệ bệnh thối gốc khi có sự nhiễm kép của nấm *P. oryzae* và vi khuẩn *Erwinia* sp.**

| Nghiệm thức   | Tỷ lệ bệnh thối gốc (%) |                   |                   | AUDPC               |
|---|-------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
|   | 7 NSC                   | 14 NSC            | 21 NSC            |                     |
| T1. Lây nấm <i>Po.CT</i> ở 15 ngày tuổi   | 0,0 <sup>d</sup>        | 5,1 <sup>e</sup>  | 4,9 <sup>d</sup>  | 52,8 <sup>e</sup>   |
| T2. Lây vi khuẩn <i>E.CT3.0</i> ở 15 ngày tuổi                                    | 30,0 <sup>b</sup>       | 42,2 <sup>d</sup> | 60,3 <sup>c</sup> | 611,4 <sup>d</sup>  |
| T3. Lây nấm <i>Po.CT</i> ở 15 ngày tuổi và vi khuẩn <i>E.CT3.0</i> ở 22 ngày tuổi | 18,6 <sup>c</sup>       | 52,3 <sup>c</sup> | 87,9 <sup>b</sup> | 738,8 <sup>c</sup>  |
| T4. Lây vi khuẩn trước ở 15 ngày tuổi và lây nhiễm nấm ở 22 ngày tuổi             | 33,9 <sup>ab</sup>      | 73,7 <sup>b</sup> | 86,1 <sup>b</sup> | 936,0 <sup>b</sup>  |
| T5. Lây nấm <i>Po.CT</i> và vi khuẩn <i>E.CT3.0</i> ở 15 ngày tuổi                | 37,5 <sup>a</sup>       | 81,9 <sup>a</sup> | 89,8 <sup>a</sup> | 1019,1 <sup>a</sup> |
| T6. Đối chứng (Không lây bệnh)  | 0,0 <sup>d</sup>        | 0,0 <sup>f</sup>  | 0,0 <sup>e</sup>  | 0,0 <sup>f</sup>    |
| Mức ý nghĩa   | **                      | **                | **                | **                  |
| CV (%)  | 13,3                    | 5,3               | 2,5               | 5,8                 |

*Ghi chú:* Số liệu được chuyển đổi sang  $\text{Arctan } \sqrt{x}$  khi thống kê, các trung bình trong cùng một cột được theo sau bởi những ký tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5% trong phép thử Duncan. NSC: Ngày sau khi lây nhiễm bệnh.

Ở các giai đoạn 14 và 21 NSC: Ba nghiệm thức có sự xâm nhiễm kép cả hai tác nhân nấm *Pyricularia oryzae* và vi khuẩn *Erwinia* sp. là T3, T4 và T5 có tỷ lệ nhiễm bệnh thối gốc cao khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức T2 chỉ chủng vi khuẩn. Tỷ lệ bệnh thối gốc thể hiện cao nhất ở các nghiệm thức nhiễm hai tác nhân chiếm tỷ lệ lần lượt là T4 (86,1%), kế đến là T3 (87,9%) và cao nhất là nghiệm thức T5 (89,8%) cao hơn tỷ lệ bệnh ở nghiệm thức chỉ chủng vi khuẩn T2 (60,3%) (bảng 3).

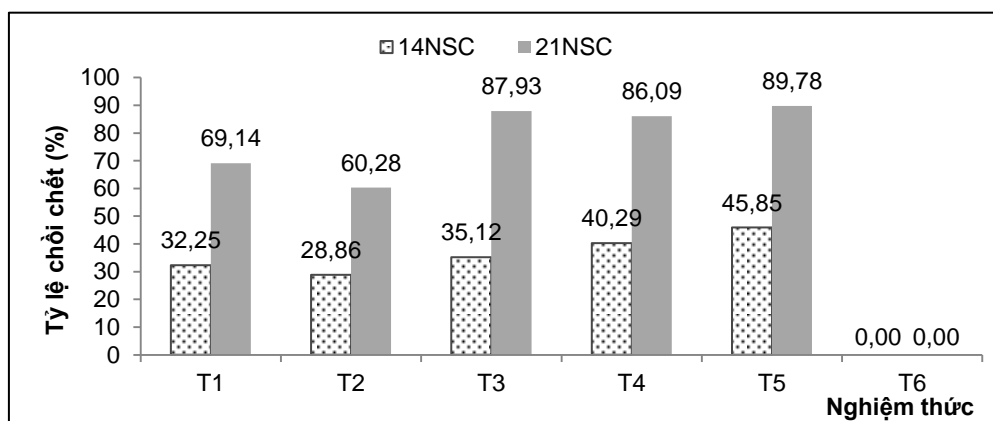
AUDPC ở các nghiệm thức nhiễm nấm và vi khuẩn (T3, T4 và T5) thì cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức chỉ nhiễm vi khuẩn (T2) (bảng 3).

Các nghiệm thức nhiễm nấm trước hoặc cùng lúc với nhiễm vi khuẩn (T3 và T5) thì sẽ có tỷ lệ bệnh thối gốc cao hơn nghiệm thức nhiễm khuẩn trước và nhiễm nấm sau (T4) ở 21NSC.

### 3.3. Tỷ lệ chồi chết gốc khi có sự nhiễm kép của nấm *P. oryzae* và vi khuẩn *Erwinia* sp.

Tỷ lệ chồi chết xuất hiện ở ba nghiệm thức có sự xâm nhiễm kép cả hai tác nhân nấm *Pyricularia oryzae* và vi khuẩn *Erwinia* sp. là T3, T4 và T5 rất cao, khác biệt so với nghiệm thức chỉ nhiễm nấm T1 hoặc chỉ nhiễm vi khuẩn T2.

Ở 14 ngày sau khi lây nhiễm bệnh thối gốc tỷ lệ chồi chết ở các nghiệm thức nhiễm hai tác nhân nấm và vi khuẩn lần lượt là T3 (35,1%), T4 (40,3%) và T5 (45,8%) cao hơn tỷ lệ chồi chết ở hai nghiệm thức chỉ chủng vi khuẩn T2 (28,9%) và nghiệm thức chỉ chủng nấm T1 (32,3%). Ở 21 ngày sau khi lây nhiễm bệnh tỷ lệ chồi chết xuất hiện ở ba nghiệm thức nhiễm 2 tác nhân thì rất cao nhất là các nghiệm thức bị nhiễm nấm đạo ôn trước với tỷ lệ lần lượt là T4 (86,1%), T3 (87,9%) và T5 (89,9%) cao hơn nghiệm thức T2 (60,3%) chỉ nhiễm vi khuẩn và nghiệm thức T1 (69,1%) chỉ nhiễm nấm (hình 1).



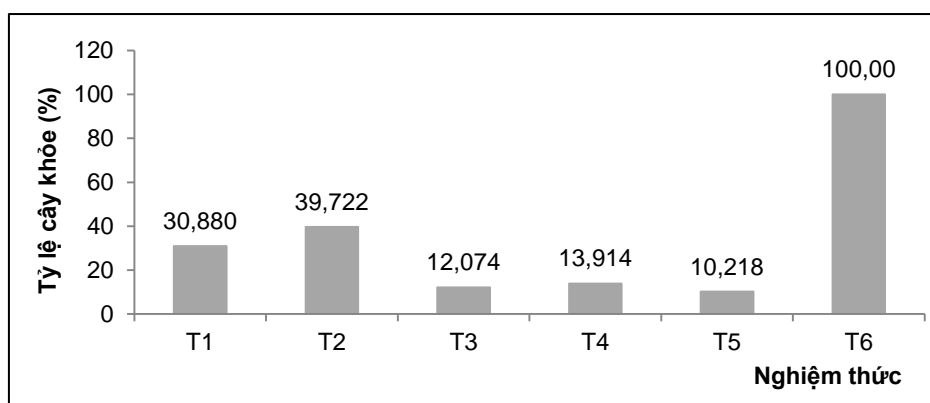
**Hình 1. Tỷ lệ chồi chết xuất hiện ở các nghiệm thức ở 14, 21 ngày sau lây nhiễm vi khuẩn *Erwinia* và 21, 28 ngày sau lây nhiễm *P. oryzae* (Po)**

Trong đó: T1. Lây nhiễm Po; T2. Lây nhiễm *Erwinia*; T3. Lây nhiễm Po trước và *Erwinia* sau; T4. Lây nhiễm *Erwinia* trước và Po sau; T5. Lây nhiễm Po và *Erwinia* cùng lúc; T6. Đối chứng (Không lây bệnh -cây khỏe)

### 3.4. Khả năng phục hồi của cây lúa khi có sự nhiễm kép của nấm *P. oryzae* và vi khuẩn *Erwinia* sp.

Ghi nhận kết quả ở ba nghiệm thức khi có sự nhiễm kép cả hai tác nhân nấm *Pyricularia oryzae* và vi khuẩn *Erwinia* sp. thì khả năng phục hồi rất thấp, nghiệm thức T5 có tỷ lệ cây khỏe thấp nhất

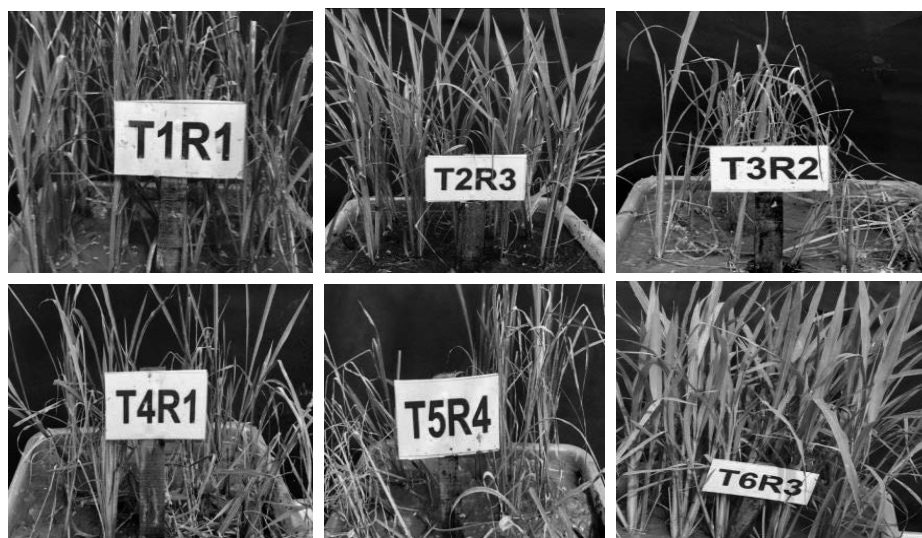
10,2%, kể đến là nghiệm thức T3 chiếm tỷ lệ 12,1% và nghiệm thức T4 có tỷ lệ cây khỏe 13,9%. Nghiệm thức T1 chỉ nhiễm nấm *Pyricularia oryzae* có tỷ lệ cây khỏe 30,9%, nghiệm thức T2 nhiễm vi khuẩn *Erwinia* sp. có tỷ lệ cây khỏe 39,7%, nghiệm thức T6 có tỷ lệ cây khỏe cao nhất 100% (hình 2).



Hình 2. Khả năng phục hồi của cây lúa khi có sự nhiễm kép của nấm *P. oryzae* và vi khuẩn *Erwinia* sp.

Khi cây lúa bị nhiễm cùng lúc hai tác nhân nấm *P. oryzae* và vi khuẩn *Erwinia* sp., bệnh đạo ôn và thối gốc sẽ thể hiện nặng hơn, tỷ lệ chồi chết cao hơn và khả

năng phục hồi thấp hơn khi nhiễm riêng từng tác nhân, đặc biệt khi cây lúa bị nhiễm bệnh đạo ôn trước.



Hình 3. Khả năng phục hồi của cây lúa ở các nghiệm thức của thí nghiệm

#### 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

- Sự nhiễm kép của nấm *Pyricularia oryzae* và vi khuẩn *Erwinia* sp. là nguyên nhân làm cho bệnh trở nên nặng hơn, tỷ lệ bệnh đạo ôn tăng 18 - 25% và tỷ lệ bệnh thối gốc tăng 43 - 49% so với nhiễm đơn.

- Khả năng phục hồi của cây thấp khoảng từ 10,2% đến 13,9%.

- Đề nghị nghiên cứu này tiếp tục thực hiện ở điều ngoài đồng.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ashkani, S.; Yusop, M.R.; Shabanmofrad, M.; Harun, A.R.; Sahebi, M.; Latif, M.A., 2015. Genetic analysis of resistance to rice blast. A study on the inheritance of resistance to the blast disease pathogen in an F3 population of rice. *J. Phytopathol* 163: 300 - 309. 45.
2. Goto, M., 1979. Bacterial foot rot of rice caused by a strain of *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathology* 69: 213 - 216.
3. Musiime, O.; Tenywa, M.M.; Majaliwa, M.J.G.; Lufafa, A.; Nanfumba, D.; Wasige, J.E.; Woome, P.L.; Kyondha, M., 2005. Constraints to rice production in Bugiri District. *Afr. Crop Sci. Conf. Proc.* 7: 1495 - 1499.
4. Phạm Văn Kim, 2015. Các bệnh hại lúa quan trọng ở đồng bằng sông Cửu Long. Trang 77 - 80, Nxb. Nông nghiệp.
5. Sakulkoo, W.; Osés-Ruiz, M.; Oliveira Garcia, E.; Soanes, D.M.; Littlejohn, G.R.; Hacker, C.; Correia, A.; Valent, B.; Talbot, N.J., 2018. A single fungal MAP kinase controls plant cell-to-cell invasion by the rice blast fungus. *Science* 359: 1399 - 1403.
6. Trần Thị Nam Lý, 2016. Đánh giá khả năng phòng trừ bệnh của xạ khuẩn *Actinomycetes* đối với vi khuẩn *Erwinia* sp. gây bệnh thối gốc lúa trong điều kiện nhà lưới. Luận văn tốt nghiệp cao học chuyên ngành Bảo vệ thực vật, Đại học Cần Thơ. Trang 21
7. Võ Thị Thu Ngân, 2010. Ảnh hưởng của gen kháng bệnh đạo ôn đến sự biến động của quần thể nấm *Pyricularia grisea* Sacc. Luận văn tốt nghiệp cao học chuyên ngành Bảo vệ thực vật, Đại học Cần Thơ. Trang 24
8. Wilson, R.A.; Talbot, N.J. 2009. Under pressure: Investigating the biology of plant infection by (*Magnaporthe oryzae*). *Nat. Rev. Microbiol* 7: 185.

#### ABSTRACT

##### **Evaluation of co-infection of *Pyricularia oryzae* and *Erwinia* sp. on rice under greenhouse conditions**

*Plants in agro-ecosystems are the target of a multitude of pathogenic microbes, co-infection could be frequent, and consequently important to consider. This study revealed that simultaneous infection of fungal rice blast *Pyricularia oryzae*-rice foot rot bacterium *Erwinia* sp pathogens leads to increasing disease symptoms and reducing the rice plant growth compared to mono-infection.*

**Keywords:** Rice blast, *Pyricularia oryzae*, rice foot rot, *Erwinia* sp.

# TÁC NHÂN GÂY BỆNH RỤNG LÁ ĐÓM TRÒN TRÊN CÂY CAO SU Ở TỈNH ĐỒNG NAI VÀ BÌNH PHƯỚC

Nguyễn Đôn Hiệu<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Kim Uyên<sup>1</sup>,  
Nguyễn Phương Vinh<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thanh Trang<sup>1</sup>,  
Nguyễn Ngọc Mai<sup>1</sup>, Đoàn Nhân Luân<sup>1</sup>, Bùi Thanh Tuấn<sup>1</sup>,  
Trần Ánh Pha<sup>1</sup>, Nguyễn Anh Nghĩa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam

\* Tác giả liên hệ: donhieurriv@gmail.com

## TÓM TẮT

Từ tháng 10 năm 2021, một loại bệnh rụng lá mới được phát hiện trên một số vườn cây cao su tại tỉnh Đồng Nai, Bình Phước, Lâm Đồng, Đắk Nông. Triệu chứng bệnh rất giống với bệnh *Pestalotiopsis* (Circular Leaf Spot Disease) tại các nước trồng cao su ở châu Á. Kết quả nghiên cứu này cho thấy rằng bệnh Rụng lá đốm tròn trên cây cao su ở Đồng Nai và Bình Phước do phức hợp nấm *Pestalotiopsis* sp., (*Neopestalotiopsis* sp.) và *Colletotrichum* sp., gây ra.

**Từ khóa:** Bệnh Rụng lá đốm tròn, Cây cao su, *Colletotrichum* sp., *Neopestalotiopsis* sp., *Pestalotiopsis* sp.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ tháng 10 năm 2021, một loại bệnh rụng lá mới được phát hiện trên một số vườn cây cao su tại tỉnh Đồng Nai, Bình Phước, Lâm Đồng, Đắk Nông. Triệu chứng bệnh dễ nhận diện nhất là dạng “đốm tròn” trên phiến lá, vết bệnh màu nâu sẫm đến đen, kích thước đốm tròn khoảng 3mm - 10mm. Bước đầu ghi nhận triệu chứng bệnh mới được phát hiện trên cây cao su ở Việt Nam rất giống

với bệnh *Pestalotiopsis* (Circular Leaf Spot) đang bùng phát thành dịch tại các nước trồng cao su ở châu Á. Cho đến nay, các nhà nghiên cứu bệnh cây trong Hiệp hội Nghiên cứu và Phát triển Cao su Quốc tế (International Rubber Research and Development Board) vẫn chưa thống nhất về tác nhân chính gây bệnh do trên cùng một vết bệnh có thể tồn tại nhiều chi nấm như: *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis*. Vì vậy, việc xác định tác nhân gây bệnh “Rụng lá đốm tròn” mới phát hiện trên cây cao su ở Việt Nam là cần thiết.

Người phân biệt: TS. Phạm Đức Toàn

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Mẫu lá bị bệnh với triệu chứng đặc trưng được thu thập trên vườn cây cao su nhiễm bệnh tại tỉnh Đồng Nai và Bình Phước. Mẫu bệnh được bảo quản trong túi giấy và để ở nhiệt độ 5°C cho đến khi sử dụng.

Môi trường nuôi cấy: WA (Water agar), PDA (Potato Dextrose Agar).

Nguồn nấm đơn bào tử được phân lập từ mẫu lá bệnh có triệu chứng bệnh đốm tròn thu thập được tại Đồng Nai (30 mẫu) và Bình Phước (10 mẫu).

Mẫu lá sạch bệnh giai đoạn từ 20 - 25 ngày tuổi của cây cao su dòng vô tính RRIV 124. Cây cao su con 3 tầng lá, dòng vô tính RRIV 124 được trồng trong nhà lưới.

Các thiết bị dụng cụ cần thiết cho thí nghiệm nuôi cấy trong phòng thí nghiệm.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Xác định tác nhân gây bệnh theo đặc điểm hình thái nấm

*Phân lập nấm bệnh:* Bộ phận nhiễm bệnh trên lá được cắt thành những mảnh nhỏ (1,5mm<sup>2</sup> - 2mm<sup>2</sup>) tại vị trí tiếp giáp giữa mô bệnh và mô khỏe, rửa 3 lần bằng nước cất vô trùng, ngâm vào dung dịch khử trùng HgCl<sub>2</sub> 0,1% hoặc NaOCl 0,1% hoặc ethanol 80% trong 1 phút, vớt ra rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng. Đặt vào đĩa petri chứa 25ml môi trường WA (Water agar) nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C. Sau khi tản nấm phát triển, tiến hành cấy

chuyển sang môi trường PDA và tách đơn bào tử để tạo nguồn nấm thuần.

*Phân lập đơn bào tử:* Các mẫu nấm được phân lập đơn bào tử bằng dung dịch chứa bào tử thu được từ tản nấm (10 ngày sau cấy), hút một lượng 0,25ml dung dịch chứa bào tử (nồng độ 100 bào tử/ml) trải đều lên bề mặt lớp agar nồng độ 1,5% được trải trên tấm lame kính vô trùng, đặt lame vào đĩa petri, nuôi cấy ở nhiệt độ 25°C trong 10 - 12 giờ, đặt tấm lame lên kính hiển vi ở vật kính 10X, phân lập đơn bào tử bằng cách dùng kim mũi mác cắt lớp agar chứa 1 bào tử khỏe và chuyển bào tử này vào đĩa petri chứa 25ml môi trường PDA ở điều kiện phòng thí nghiệm, cấy chuyển nguồn nấm thuần chủng phục vụ cho nghiên cứu.

*Các chi nấm được nhận biết dựa trên các đặc trưng hình thái:* Đặc điểm tản nấm phát triển trên môi trường PDA, màu sắc tản nấm, hình dạng và màu sắc bào tử.

#### 2.2.2. Kiểm chứng tác nhân gây bệnh

Từ các nguồn nấm thu được, chọn một MPL nấm đại diện cho mỗi chi nấm, tiến hành lây nhiễm trên lá cao su dòng vô tính RRIV 124 ở điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới để kiểm chứng tác nhân gây bệnh theo quy tắc Koch's.

Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức như sau:

- NT1: Lây bệnh bằng dung dịch bào tử *Pestalotiopsis* sp./*Neopestalotiopsis* sp. (chi nấm *Pestalotiopsis* hoặc *Neopestalotiopsis* do chưa xác định được).

- NT2: Lây bệnh bằng dung dịch bào tử *Colletotrichum* sp..

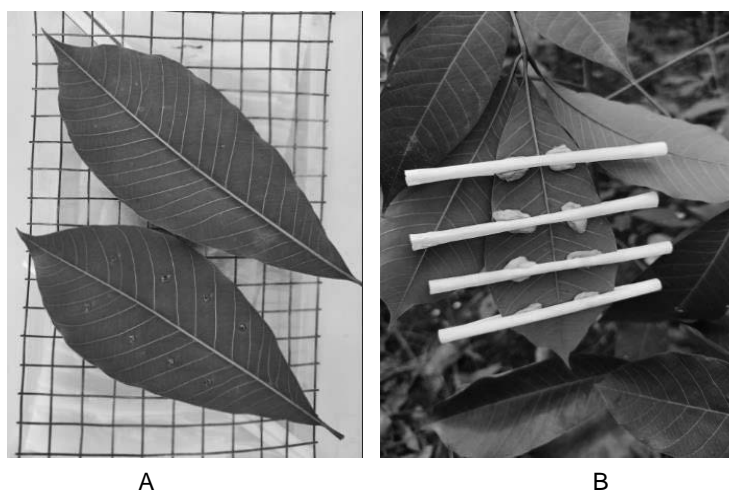
- NT3: Lây bệnh bằng hỗn hợp dung dịch bào tử *Pestalotiopsis* sp./ *Neopestalotiopsis* sp. và *Colletotrichum* sp. (pha với tỷ lệ 1:1; nồng độ bào tử mỗi loại là  $1 \times 10^3$  bào tử/ml).

- NT4 (đối chứng): Lây bệnh bằng nước cất thanh trùng.

*Phương pháp lây bệnh trong điều kiện phòng thí nghiệm:* Lá cây cao su dòng vô tính RRIV 124 không bị nhiễm bệnh, được rửa sạch với thuốc chống mốc sodium benzoate 0,2% trong 30 giây và rửa sạch 3 lần bằng nước cất vô trùng, dùng giấy vô trùng thấm ráo nước trên lá. Tạo vết thương bằng cách dùng dao mũi mác đã khử trùng cạo bỏ lớp biểu bì trên mặt sau của lá, vết xước có dạng đốm tròn (đường kính 2mm) nằm giữa 2 gân phụ của lá. Mỗi bên gân chính của lá được tạo ra 4 vết (tổng số 8 vết/lá). Đặt lá theo chiều úp vào hộp nhựa có chứa giấy thấm vô trùng thấm nước giữ ẩm được ngăn cách bằng lưới thép để lá không tiếp xúc trực tiếp với nước. Lây bệnh bằng cách nhỏ một lượng dung dịch chứa bào tử  $1 \times 10^6$  bào tử/ml tại vị trí đã tạo vết thương trên lá (8 điểm/lá). Các hộp nhựa

được đặt trong phòng ở nhiệt độ  $25^{\circ}\text{C}$  -  $28^{\circ}\text{C}$ . Theo dõi hàng ngày cho đến khi xuất hiện triệu chứng, tiến hành tái phân lập vết bệnh trên môi trường PDA.

*Phương pháp lây bệnh trong điều kiện nhà lưới:* Lây bệnh trên tầng lá ổn định, giai đoạn khoảng 25 ngày tuổi. Tạo vết thương bằng cách dùng dao mũi mác đã khử trùng cạo bỏ lớp biểu bì trên mặt sau của lá, vết xước có dạng đốm tròn (đường kính 2mm) nằm giữa 2 gân phụ của lá. Mỗi bên gân chính của lá được tạo ra 4 vết (tổng số 8 vết/lá). Lây bệnh bằng cách nhỏ một lượng dung dịch chứa bào tử  $1 \times 10^6$  bào tử/ml tại vị trí đã tạo vết thương trên lá (8 điểm/lá). Dùng bông gòn ẩm (thấm nước thanh trùng) áp lên vết chùng để giữ ẩm, cố định tại vị trí chùng. Sau khi lây nhiễm 12 giờ (qua đêm), hệ thống tưới phun sương được sử dụng để điều chỉnh nhiệt độ  $26^{\circ}\text{C}$  -  $30^{\circ}\text{C}$ , ẩm độ không khí duy trì ở mức  $> 75\%$  tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình ủ bệnh và phát triển bệnh. Theo dõi hàng ngày cho đến khi xuất hiện triệu chứng, tiến hành tái phân lập vết bệnh trên môi trường PDA.



**Hình 1. Phương pháp lây bệnh trên lá cao su**  
A. Trong điều kiện phòng thí nghiệm; B. Trong điều kiện nhà lưới

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Triệu chứng bệnh Rụng lá đốm tròn trên cây cao su ở Việt Nam

Triệu chứng bệnh dễ nhận diện nhất là dạng “đốm tròn” trên phiến lá, vết bệnh màu nâu sẫm đến đen, kích thước đốm tròn khoảng 3mm - 5mm, ban đầu là

những đốm nhỏ sau đó lan rộng đến hơn 10mm. Các vết bệnh hầu như chỉ được ghi nhận trên lá trưởng thành, không thấy xuất hiện trên lá non dưới 15 ngày tuổi. Trên một phiến lá, các đốm khác nhau về kích thước, có thể nằm riêng lẻ hoặc kết hợp với nhau tạo thành những đốm lớn hơn (hình 2).



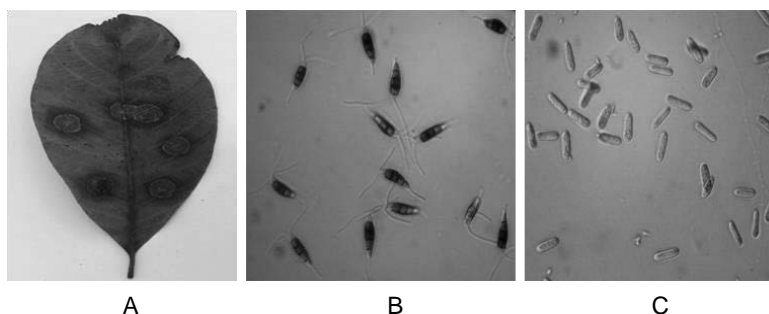
Hình 2. Triệu chứng bệnh Rụng lá đốm tròn trên lá cây cao su

#### 3.2. Xác định tác nhân gây bệnh theo đặc điểm hình thái nấm

##### 3.2.1. Quan sát trực tiếp mô bệnh bằng kính hiển vi

Kiểm tra nhanh nhiều mẫu lá bệnh bằng cách quan sát trực tiếp mô bệnh trên

kính hiển vi quang học vật kính 10X đã ghi nhận sự diện diện các dạng bào tử có đặc điểm hình thái bào tử nấm *Pestalotiopsis* sp./*Neopestalotiopsis* sp. và *Colletotrichum* sp. cùng tồn tại trên vết bệnh (hình 3).



Hình 3. Quan sát trực tiếp mô bệnh bằng kính hiển vi quang học vật kính 10X

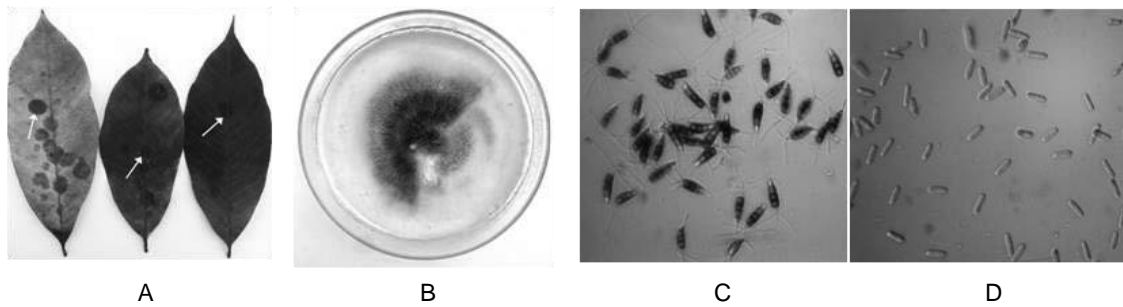
A. Triệu chứng vết bệnh; B. Bào tử nấm *Pestalotiopsis* sp./*Neopestalotiopsis* sp.;

C: Bào tử nấm *Colletotrichum* sp.

##### 3.2.2. Kết quả phân lập trên môi trường PDA

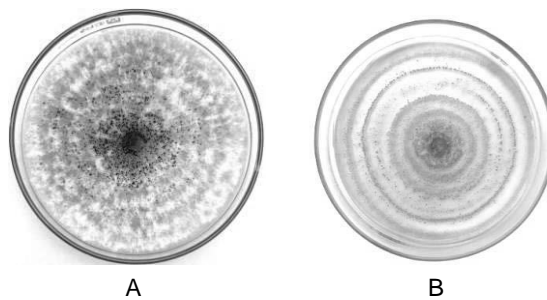
Kết quả phân lập mẫu bệnh bằng môi trường nuôi cấy PDA thu được các mẫu nấm *Pestalotiopsis* sp./*Neopestalotiopsis* sp. và *Colletotrichum* sp. tồn tại trên cùng vết bệnh (hình 4). Phân lập được bộ mẫu

nấm thuần chủng (đã tách đơn bào tử) gồm: 40 mẫu phân lập *Pestalotiopsis* sp./*Neopestalotiopsis* sp. (30 mẫu tại Đồng Nai và 10 mẫu tại Bình Phước), 40 mẫu phân lập nấm *Colletotrichum* sp. (30 mẫu tại Đồng Nai và 10 mẫu tại Bình Phước).



**Hình 4. Nuôi cấy trực tiếp trên môi trường PDA**

A. Vết bệnh đốm tròn trên phiến lá; B. Tàn nấm trên môi trường PDA;  
C. Bào tử nấm *Pestalotiopsis* sp./*Neopestalotiopsis* sp.; D. Bào tử nấm *Colletotrichum* sp.



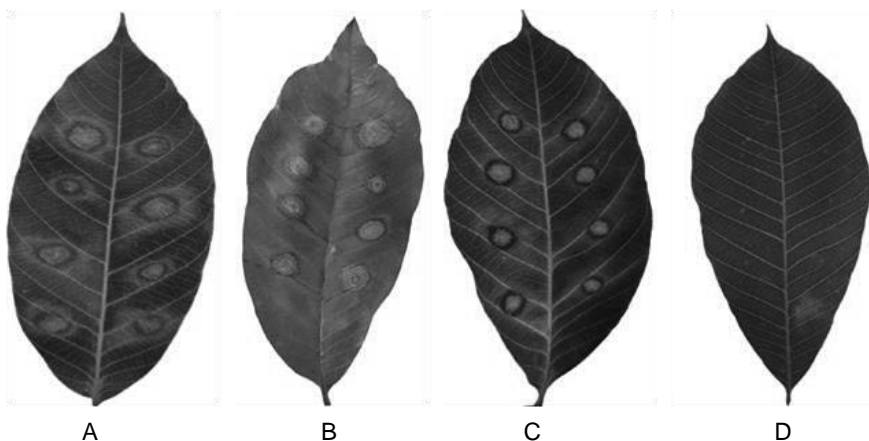
**Hình 5. Tàn nấm qua bước cấy chuyên tách đơn bào tử**

A. Tàn nấm *Pestalotiopsis* sp./*Neopestalotiopsis* sp.; B. Tàn nấm *Colletotrichum* sp.

### 3.3. Kiểm chứng tác nhân gây bệnh

Trong điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới, cả 3 nghiệm thức (lây bệnh bằng dung dịch bào tử *Pestalotiopsis* sp./*Neopestalotiopsis* sp.; lây bệnh bằng

dung bào tử *Colletotrichum* sp.; lây bệnh bằng hỗn hợp dung dịch bào tử) đều gây ra triệu chứng đốm tròn trên phiến lá cao su, tỷ lệ gây bệnh tại các nghiệm thức đều đạt 100% (hình 6 và Hình 7).

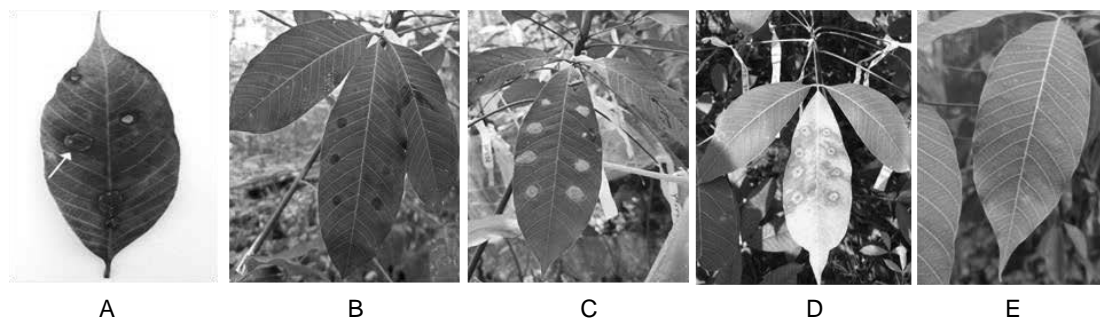


**Hình 6. Triệu chứng bệnh trên lá ở điều kiện phòng thí nghiệm**

A. Lây bệnh bằng dung dịch bào tử *Pestalotiopsis* sp./*Neopestalotiopsis* sp.;  
B. Lây bệnh bằng dung dịch bào tử *Colletotrichum* sp.; C. Lây bệnh bằng hỗn hợp dung dịch bào tử;  
D. Lây bệnh bằng nước cất thanh trùng (đối chứng)

Trong phòng thí nghiệm, triệu chứng bệnh xuất hiện ở thời điểm sau 3 ngày lây bệnh bằng dung dịch bào tử *Colletotrichum* sp. và bằng hỗn hợp dung dịch bào tử (*Pestalotiopsis* sp. và *Colletotrichum* sp.). Riêng nghiệm thức lây bệnh bằng dung dịch bào tử

*Pestalotiopsis* sp./*Neopestalotiopsis* sp. thì triệu chứng xuất hiện chậm hơn (ở thời điểm 4 - 5 ngày sau chủng). Tất cả các vết bệnh từ lây nhiễm nhân tạo đều có dạng đốm tròn tương tự như triệu chứng bệnh thu thập trên đồng ruộng.



**Hình 7. Triệu chứng bệnh trên lá ở điều kiện nhà lưới**

A. Vết bệnh ngoài đồng ruộng; B. Lây bệnh bằng dung dịch bào tử *Pestalotiopsis* sp./*Neopestalotiopsis* sp.; C. Lây bệnh bằng dung dịch bào tử *Colletotrichum* sp.; D. Lây bệnh bằng hỗn hợp dung dịch bào tử; E. Lây bệnh bằng nước cất thanh trùng (đối chứng)

Trong điều kiện nhà lưới, triệu chứng bệnh xuất hiện ở thời điểm 3 - 4 ngày sau lây nhiễm. Số vết bệnh và kích thước vết bệnh tăng dần theo thời gian, tỉ lệ nhiễm bệnh là 100%. Triệu chứng điển hình là các vết bệnh hình đốm tròn, ban đầu thâm đen, sau đó vết bệnh mở rộng ra và gây hoại tử tại vết chủng. Một số lá nhiễm bệnh nặng chuyển sang màu vàng và rụng ở thời điểm 5 - 6 ngày sau lây nhiễm. Trên cây đối chứng lá không có triệu chứng bệnh.

Nhìn chung, kết quả lây bệnh ở cả hai điều kiện (phòng thí nghiệm và nhà lưới) có xu hướng tương đồng về mức độ gây bệnh của các nghiệm thức. Trong đó, hỗn hợp dung dịch bào tử có mức độ gây bệnh mạnh nhất, kế đến là dung dịch bào tử *Colletotrichum* sp. và cuối cùng là dung dịch bào tử *Pestalotiopsis* sp./*Neopestalotiopsis* sp.. Vết bệnh từ các triệu chứng được tái phân lập cũng thu

được đúng tác nhân gây bệnh với tỷ lệ 100% ở mỗi nghiệm thức.

### 3.4. Thảo luận

Bệnh rụng lá *Pestalotiopsis* trên cây cao su được phát hiện đầu tiên vào năm 1975 trên vườn ươm cao su tại Malaysia sau đó ít thấy xuất hiện nên được xem là loại bệnh không quan trọng (Mahyudin, 2019). Tuy nhiên, từ năm 2016 bệnh đã bùng phát thành dịch trên quy mô lớn tại Indonesia, Malaysia, Thái Lan, các nước trồng cao su khác như Ấn Độ, Sri Lanka cũng đã ghi nhận sự xuất hiện của bệnh (Zambri và ctv., 2017; Tajuddin, 2019; 2020; Mahyudin, 2020; 2021; Philip và Prem, 2021; Febbiyanti, 2021; Jayasinghe, 2021). Năm 2020 - 2021, ước tính tổng diện tích nhiễm bệnh lên đến khoảng 300 - 500 ngàn ha mỗi năm. Tác hại của bệnh làm vườn cây rụng lá và giảm sản lượng,

bệnh nặng có thể gây rụng lá 50 - 90% và sản lượng giảm 15 - 50% (Zambri và ctv., 2017; Febbiyanti, 2019; 2020; Rodesuchit, 2020; Li và ctv., 2020).

Một số báo cáo tại Malaysia nghiêng về tác nhân gây bệnh là do nấm *Pestalotiopsis* sp. gây ra và cho rằng bệnh Rụng lá *Pestalotiopsis* đã trở thành loại bệnh quan trọng (Mahyudin, 2019; 2021). Trong khi đó, các nghiên cứu tại Indonesia, Thái Lan và Trung Quốc xác định có sự hiện diện của *Pestalotiopsis* sp., *Neopestalotiopsis* sp. và *Colletotrichum* sp. trên cùng một vết bệnh (Febbiyanti, 2021; Rodesuchit, 2020; Pornsuriya và ctv., 2020; Li và ctv., 2020). Một số báo cáo từ Ấn Độ cho rằng tác nhân gây bệnh là do nấm *Colletotrichum* sp., biến thể gây ra (Philip, 2021). Một số nghiên cứu tại Sri Lanka, hơn 200 mẫu bệnh đã được phân lập, kết quả cho thấy hơn 55% số mẫu nấm là *Pestalotiopsis* spp., *Neopestalotiopsis* spp., *Pseudopestalotiopsis* spp. Khoảng 35% các mẫu nấm là *Colletotrichum* spp. như *Colletotrichum siamense*, *C. fructicola*, *C. tropicale* và *C. Gigasporum*. Ngoài ra, còn ghi nhận nhiều chi nấm khác như *Fusarium* sp., *Botryodiplodia* sp., *Phyllosticta* sp., *Curvularia* sp., *Phomopsis* sp., (Fernando và ctv., 2021). Do vậy, ngoài tên gọi là bệnh Rụng lá *Pestalotiopsis* thì bệnh còn có tên gọi là Circular Leaf Spot Disease (bệnh lá đốm tròn).

Các kết quả trong nghiên cứu sơ khởi về bệnh rụng lá đốm tròn trên cây cao su ở Việt Nam được trình bày trong báo cáo này là khá tương đồng với kết quả nghiên cứu tại các nước Indonesia, Malaysia, Thái Lan, Ấn Độ,... về triệu chứng và tác

nhân gây bệnh. Như vậy, không loại trừ khả năng bệnh Rụng lá đốm tròn mới phát hiện ở Việt Nam (bệnh *Pestalotiopsis*/Circular Leaf Spot Disease tại các nước ở châu Á) do phức hợp nấm *Pestalotiopsis* sp./*Neopestalotiopsis* sp., *Colletotrichum* sp. cùng gây ra và có thể *Colletotrichum* sp. là tác nhân chính và mạnh hơn.

## 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1. Kết luận

Tác nhân gây bệnh Rụng lá đốm tròn mới phát hiện trên cây cao su tại tỉnh Đồng Nai và Bình Phước là phức hợp nấm *Pestalotiopsis* sp./*Neopestalotiopsis* sp., *Colletotrichum* sp..

### 4.2. Đề nghị

Tiếp tục nghiên cứu xác định tác nhân gây bệnh ở cấp độ loài, dưới loài, đặc điểm dịch tễ học của bệnh và biện pháp quản lý bệnh.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Febbiyanti T. R., 2019. Outbreak of *Pestalotiopsis* in Indonesia. *IRRDB Plant Pathology Expert Meeting*.
2. Febbiyanti T. R., 2020. Current condition *Pestalotiopsis* leaf fall disease in Southern Sumatra. *IRRDB Webinar Pestalotiopsis*.
3. Febbiyanti T. R., 2021. Current status of *pestalotiopsis* leaf fall disease on rubber tree in Indonesia. *IRRDB Webinar Pestalotiopsis*.
4. Fernando S., 2021. Current status of the new leaf fall disease in Sri Lanka and its management. *IRRDB Webinar Pestalotiopsis*.
5. Jayasinghe C. K., 2021. Genus *Pestalotiopsis*: A diverse pathogen with a wide host range. *IRRDB Webinar Pestalotiopsis*.

6. Mahyudin M. M., 2019. Status and incidence of leaf diseases in Malaysia. *IRRDB Plant Pathology Expert Meeting*.
7. Mahyudin M. M., 2019. Comparison of Pestalotiopsis leaf disease and Fusicoccum leaf blight outbreak between Malaysia and Indonesia. *IRRDB Plant Pathology Expert Meeting*.
8. Mahyudin M. M., 2020. Pestalotiopsis leaf fall in Malaysia: updates. *Webinar Pestalotiopsis*.
9. Mahyudin M. M., Noran A. S, Zambri A. M. A., 2021. Fungal diversity in leaves affected by Pestalotiopsis leaf fall disease. *IRRDB Webinar Pestalotiopsis*.
10. Li B., Liu X., Cal J., Feng Y. and Huang G., 2020. First report on Neopestalotiopsis aotearoa of Rubber Tree in China. *Plant Disease* 105 (4).
11. Philip S., Prem E., 2021. Status of Colletotrichum circular leaf spot disease and its management in rubber plantations of India 2020 - 2021. *IRRDB Webinar Pestalotiopsis*.
12. Pornsuriya C., Chairin T., Thaochan N., Sunpapao A., 2020. Identification and characterization of *Neopestalotiopsis* fungi associated with a novel leaf fall disease of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Thailand. *Journal of Phytopathology* 168 (1).
13. Rodesuchit Arom, 2020. The new leaf fall disease in Thailand. *IRRDB Webinar Pestalotiopsis*.
14. Tajuddin Ismail., 2019. Fusicoccum or pestalotiopsis? A planter's experience in Indonesia. *IRRDB Plant Pathology Expert Meeting*.
15. Tajuddin Ismail., 2020. Current status of fungal disease in Asia. Fusicoccum or pestalotiopsis? A planter's experience in Indonesia. *Webinar Pestalotiopsis*.
16. Zambri A.M.A., Atan S., Mahyudin M., Noran A.S. and Maiden N. A., 2017. Leaf fall disease caused by *Pestalotiopsis* sp. Malaysian Rubber Borard.
17. Zambri A. M. A, Atan S., Mahyudin M. M., Noran A. S., Maiden N. A., 2019. Leaf fall disease caused by *Pestalotiopsis* sp., *IRRDB Plant Pathology Expert Meeting*.

## ABSTRACT

### **The causative agents of Circular Leaf Spot Disease on Rubber tree in Dong Nai and Binh Phuoc provinces**

*A new Circular Leaf Spot Disease on rubber tree has been detected in October 2021 on some rubber plantations in Dong Nai, Binh Phuoc, Lam Dong, and Dak Nong provinces. The symptom of the disease is similar to that of Pestalotiopsis/Circular Leaf Spot disease which has been described in other rubber-growing countries in Asia. This study has shown that the Circular Leaf Spot Disease on rubber tree in Dong Nai and Binh Phuoc provinces was caused by Pestalotiopsis sp., (syn.: Neopestalotiopsis sp.) and Colletotrichum sp.*

**Keywords:** *Circular Leaf Spot Disease, Colletotrichum sp., Neopestalotiopsis sp., Pestalotiopsis sp., rubber tree.*

# NGHIÊN CỨU BIỆN PHÁP SINH HỌC PHÒNG TRỪ TÁC NHÂN GÂY CHẾT CÀ PHÊ SAU TÁI CANH TẠI VÙNG TÂY NGUYÊN

Nguyễn Văn Tuất<sup>1\*</sup>, Nguyễn Văn Viêt<sup>2</sup>,  
Nguyễn Xuân Hòa<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam

<sup>2</sup> Viện Nghiên cứu và Phát triển Nafoods

<sup>3</sup> Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên

\* Tác giả liên hệ: tuat2005@gmail.com

## TÓM TẮT

Diện tích cà phê trồng tái canh lại trên nền đất cũ thường bị chết, đặc biệt đến năm thứ 2 - 3 mới bị chết hàng loạt. Một trong những nguyên nhân cây cà phê bị chết là bộ rễ bị hư hại, gây ra vàng lá chết cây. Kết quả nghiên cứu đề tài tái canh cà phê đã xác định được tác nhân gây bệnh là do tuyến trùng *Pratylenchus coffeae*, *Meloidogyne incognita* và *Rotylenchus reniformis* là tác nhân chính kết hợp với nấm (*Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*) gây ra bệnh vàng lá chết cây cà phê tái canh. Một số giải pháp kỹ thuật có hiệu quả và xây dựng quy trình tái canh có hiệu quả áp dụng vào sản xuất cà phê ở vùng Tây Nguyên. Biện pháp sinh học đã được nghiên cứu và xác định được một số loại thuốc sinh học như Điền Trang-NEMA, Tervigo và Vimoca có tác dụng hạn chế được sự phát triển, xâm nhập của tuyến trùng và nấm gây hại bộ rễ cây cà phê giai đoạn cây con. Trong điều kiện vườn cà phê sau tái canh, xử lý chế phẩm sinh học Sumagrow (0,5%, 2 lít/cây) cho hiệu quả phòng trừ nấm cao nhất đạt 29,80%. Các chế phẩm sinh học cần được khuyến cáo sử dụng trong sản xuất cà phê sau tái canh để ngăn chặn bệnh vàng lá chết cây, góp phần sản xuất cà phê bền vững ở vùng Tây Nguyên.

**Từ khóa:** Cà phê, bệnh vàng lá chết cây, chế phẩm sinh học, tái canh cà phê.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ năm 1975 đến nay ngành sản xuất cà phê của Việt Nam đạt được những bước tiến đáng ghi nhận và trở thành một trong những nước sản xuất cà phê với hàng đầu của thế giới. Theo số liệu của

Cục Trồng trọt (2016), cả nước có 623.929ha cà phê, trong đó có 580.042ha cà phê kinh doanh, tập trung ở vùng Tây Nguyên.

Tuy nhiên, do nhiều diện tích cà phê đã được trồng hàng chục năm nay, già cỗi, bị nhiễm sâu, bệnh, bị giảm năng suất nên cần được tái canh. Trong thực tiễn, diện

Người phân biên: PGS.TS. Trịnh Xuân Hoạt

tích cà phê trồng tái canh lại trên nền đất cũ thường bị chết, đặc biệt đến năm thứ 2 - 3, cây bị chết hàng loạt. Kết quả nghiên cứu của Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên năm 2001 và 2012 đã xác định nguyên nhân chủ yếu làm cho tái canh cà phê không thành công là do tuyến trùng gây hại rễ, tạo vết thương cơ giới tạo điều kiện thuận lợi cho nấm *Fusarium* sp. tấn công gây hại, làm cho rễ bị thối dẫn đến cây không hấp thu được dinh dưỡng và nước, cây bị suy yếu, vàng lá, khô héo và chết (Lê Ngọc Báu và Chế Thị Đa, 2012; Chế Thị Đa, 2012). Tại 4 tỉnh Tây Nguyên, đã ghi nhận được 27 loài tuyến trùng ký sinh trên cây cà phê gồm; trong đó, *Pratylenchus coffeae* và *Meloidogyne incognita* là 2 loài gây hại quan trọng và có độ bắt gặp nhiều nhất trong rễ và trong đất trồng và có chiều hướng gia tăng. Mật độ tuyến trùng diễn biến khá phức tạp trong mùa mưa tại Cư Kuin, Đắk Lắk; Chư Sê, Gia Lai. Trong rễ mật độ tuyến trùng thường cao vào mùa khô (Lê Đức Khánh, 2015).

Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu hiệu lực của một số chế phẩm sinh học trong phòng trừ bệnh và sử dụng phối hợp với thuốc hóa học trong dập dịch bệnh vàng lá chết cây (VLCC).

## 2. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nghiên cứu xây dựng quy trình kỹ thuật sản xuất cây giống sạch bệnh giai đoạn vườn ươm

#### 2.1.1. Thí nghiệm 1: Xử lý nền đất ươm cây

- + CT1: Đối chứng (không xử lý);
- + CT2: Xử lý bằng vôi;

- + CT3: Nền lát xi-măng;
- + CT4: Xử lý nền bằng BASAMID (5kg/100m<sup>2</sup> đất).

#### 2.1.2. Thí nghiệm 2: Xử lý cây con trong vườn ươm đối với loại đất chưa được xử lý

- + CT1: Đối chứng (không xử lý);
- + CT2: Xử lý ĐIỀN TRANG-NEMA 0,5g/1 bầu đất sau 1 tháng, 3 tháng và 5 tháng;
- + CT3: Xử lý Vimoca 1g/bầu đất + Dupont Kocide 53.8DF pha 0,1% sau 1 tháng và 2 tháng;
- + CT4: Xử lý Tervigo nồng độ 0,3 - 0,5% sau 1 tháng và 3 tháng.

#### 2.1.3. Thí nghiệm 3: Nghiên cứu sử dụng cây dã quỳ (*Tithonia diversifolia*) xử lý đất bị nhiễm tuyến trùng và nấm bệnh cho sản xuất cây giống sạch bệnh

\* *Vật liệu:* Cây dã quỳ được thu thập từ một số vùng thuộc thành phố Buôn Ma Thuột. Phần thân, cành và lá cây dã quỳ được rửa sạch bằng nước giếng hoặc nước máy. Cắt nhỏ độ dài từ 3 - 5cm. Phơi khô dưới bóng râm. Dùng cối xay nhỏ thành bột.

Thí nghiệm được thực hiện gồm 4 công thức, 3 lần lặp lại, 12 cây/lần lặp và được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên:

Công thức 1: Đất bệnh + Không xử lý (đối chứng);

Công thức 2: Đất bệnh + Bột cây dã quỳ (10g/kg đất);

Công thức 3: Đất bệnh + Bột cây dã quỳ (15g/kg đất);

Công thức 4: Đất bệnh + Bột cây dã quỳ (20g/kg đất).

## 2.2. Nghiên cứu biện pháp phòng trừ tác nhân gây chết cà phê sau tái canh

### 2.2.1. Thí nghiệm 1: Nghiên cứu hiệu quả phòng trừ tác nhân gây chết cà phê sau tái canh bằng biện pháp sinh học

- + CT1: Đối chứng (không trồng xen);
- + CT2: Trồng xen cỏ Siam (cỏ Lào);
- + CT3: Trồng xen muồng hoa vàng hạt nhỏ;
- + CT4: Xử lý bột cây dã quỳ 20g/hố;
- + CT5: Xử lý bột cây dã quỳ 40g/hố.

### 2.2.2. Thí nghiệm 2: Nghiên cứu sử dụng các chế phẩm sinh học phòng trừ tác nhân gây chết cà phê sau tái canh

Công thức 1: Sumargrow (0,5%, 2 lít/cây);

Công thức 2: Tervigo 20SC (0,1%, 1 lít/cây) + Trico-VTN (0,25%, 1 lít/cây);

Công thức 3: TKS-NEMA (10 g/cây);

Công thức 4: SH-BV1 (bón vào gốc, 0,7kg/gốc);

Công thức 5: Đối chứng không xử lý thuốc.

Các công thức xử chế phẩm sinh học đều được xử lý 2 lần trong năm (khoảng cách giữa 2 lần xử lý là 60 ngày). Lần xử lý thuốc đầu tiên là vào tháng 7 hàng năm. Riêng công thức A-H NO.2 xử lý 6 lần/năm (3 lần mùa mưa và 3 lần mùa khô).

### 2.2.3. Thí nghiệm 3: Nghiên cứu sử dụng biện pháp kết hợp hóa học và sinh học phòng chống bệnh vàng lá, thối rễ cà phê tái canh

Thí nghiệm được bố trí trên nền của thí nghiệm 2, các cây bị bệnh vàng lá, thối rễ với cấp bệnh từ 1 - 3 được chọn cố định để thực hiện xử lý thuốc hóa học Map Logic 90WP (20g/gốc) trị tuyến trùng và

Ridomil Gold 68WG 0,25% (2 lít/gốc) trị nấm, 2 lần cách nhau 15 ngày trước khi áp dụng các thuốc sinh học vào tháng 5/2016 theo các công thức như ở thí nghiệm 2.

+ Công thức 1: Marshal 5G (20g/gốc) + Sumagrow 0,5% (2 lít/gốc);

+ Công thức 2: Map Logic 90WP + Tervigo 20SC + Trico-VTN;

+ Công thức 3: Vimoca 10G + TKS-NEMA;

+ Công thức 4: NoKaph 10GR + SH-BV1;

+ Công thức 5: Đối chứng không xử lý thuốc.

- Phương pháp xử lý thuốc:

+ Thuốc hóa học phòng trừ tuyến trùng (Map Logic 90WP, Vimoca 20ND, Marshal 5G) được xử lý 2 lần trong năm (khoảng cách giữa 2 lần xử lý là 30 ngày). Lần xử lý thuốc đầu tiên là vào tháng 6 sau khi trồng 15 ngày.

+ Thuốc hóa học phòng trừ nấm bệnh: Sử dụng Ridomil Gold 68WG 0,25% (2 lít/gốc) và xử lý sau xử lý thuốc hóa học lần thứ hai 30 ngày.

+ Thuốc sinh phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh (Tervigo 20SC, Trico-VTN, Sumagrow và Khuan18) được xử lý 2 lần trong năm (khoảng cách giữa 2 lần xử lý là 30 ngày) và xử lý lần đầu sau 30 ngày xử lý thuốc hóa học phòng trừ nấm bệnh Ridomil Gold 68WG.

## 2.3. Xử lý số liệu

Số liệu của thí nghiệm được tính toán xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và phân tích thống kê bằng phần mềm SAS và được kiểm định khác biệt qua phép thử Duncan.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Nghiên cứu xử lý cây con trong vườn ươm đối với loại đất chưa được xử lý

Tỷ lệ cây chết, cây xấu và cây bị thối rữa, sung rữa ở các công thức xử lý thuốc đã giảm đáng kể so với đối chứng, đặc biệt tỷ lệ cây có bộ rễ bị thối và sung giảm thấp hơn hẳn, trung bình từ 1,5 - 3,7% trong khi của đối chứng là 20,2%. Tỷ lệ cây đủ tiêu chuẩn xuất vườn của các công thức xử lý đạt cao từ 88,2 - 90,0%, tăng đáng kể so đối chứng từ 35,1 - 37,8%, trong đó tăng cao nhất là công thức Tervigo. Như vậy, sử dụng các loại chế phẩm sinh học và thuốc hóa học để phòng trừ các loại tuyến trùng, nấm gây hại cây con trong giai đoạn vườn ươm là cần thiết, làm tăng số lượng và chất lượng cây giống trước khi xuất vườn, việc sử dụng các chế phẩm sinh học vừa phòng trừ tuyến trùng vừa có khả năng kích thích bộ rễ phát triển nên hiệu quả hơn so với thuốc hóa học.

Kết quả theo dõi diễn biến tuyến trùng ở các công thức thí nghiệm cho thấy: đất trước khi vào bầu có mật độ tuyến trùng cao, với 104 con *Pratylenchus* spp. và 32 con *Meloidogyne* spp. trên 100g đất. Điều này là do đất thí nghiệm được lấy từ vườn cây cà phê già cỗi bị bệnh tuyến trùng chưa được xử lý trước khi vào bầu. Sau khi cấy cây 2 tháng, 4 tháng, số lượng tuyến trùng (sau 15 ngày mỗi đợt xử lý) giảm xuống ở tất cả các công thức, tuy nhiên công thức đối chứng luôn có số lượng tuyến trùng cao hơn so với các công thức được xử lý.

Tại thời điểm sau khi cấy cây 6 tháng, phân tích mật độ tuyến trùng trong đất và trong rễ của các công thức cho thấy: công thức xử lý Tervigo không thấy sự xuất hiện của tuyến trùng trong cả đất và rễ. Công thức Điền Trang-Nema xuất hiện tuyến trùng *Mel.* gây sung rữa nhưng với mật độ rất thấp, với mật độ 3 -16 con/5g rễ. Trong khi đó công thức đối chứng có mật độ tuyến trùng trong rễ khá cao (80 con *Pra.* và 184 con *Mel.*/5 g rễ).

Đất trước khi vào bầu có mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất tương đối cao ( $2,95 \times 10^4$  cfu/g đất). Kết quả phân tích nấm tại các thời điểm cấy con 2, 4, 6 tháng tuổi cho thấy: các công thức xử lý Điền trang-Nema, Tervigo và Vimoca có mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất và tần suất xuất hiện nấm *Fusarium* spp. trong rễ thấp hơn ở công thức đối chứng.

Như vậy, qua theo dõi sinh trưởng phát triển của cây con, sự tăng trưởng của bộ rễ, diễn biến tuyến trùng và nấm trong đất, rễ của các công thức thí nghiệm, có thể kết luận rằng: việc xử lý cây con bằng các chế phẩm Điền Trang-Nema, Tervigo và thuốc hóa học Vimoca có hiệu quả cao trong việc phòng trừ, hạn chế nguồn tuyến trùng, nấm gây bệnh, giúp cây cà phê con sinh trưởng tốt, giảm tỷ lệ cây chết, cây xấu, cây bị nhiễm bệnh vàng lá thối rữa, sung rữa cũng như tăng tỷ lệ cây con giống đạt tiêu chuẩn xuất vườn so với không xử lý thuốc.

#### 3.2. Nghiên cứu xử lý nền đất ươm cây

Tỷ lệ cây chết, cây xấu và cây bị thối rữa, sung rữa ở các công thức xử lý nền đất bầu cây giống đã giảm đáng kể so với đối

chúng, công thức xử lý nền bằng thuốc BASAMID có tỷ lệ cây bị thối hoặc sung rễ thấp nhất (5,0%) nhưng tỷ lệ cây xấu cao hơn so với công thức nền bột. Tỷ lệ cây đủ tiêu chuẩn xuất vườn của các công thức xử lý nền đạt > 80%, tăng 21,5 - 22,2% so với đối chứng.

Đất trước khi vào bầu đã được xử lý không còn tuyến trùng. Sau khi cấy cây 4 tháng, công thức đối chứng có tuyến trùng do sự xâm nhập từ nền vườn ươm. Tại thời điểm sau khi cấy cây 6 tháng, công thức đối chứng có tuyến trùng trong cả đất và rễ với mật độ 24 con *Mel.*/100g đất; 64 con *Pra.* và 83 con *Mel.*/5g rễ, đây là nguyên nhân là giảm tỷ lệ cây giống đạt tiêu chuẩn xuất vườn. Các công thức còn lại có xuất hiện tuyến trùng trong rễ nhưng với mật độ thấp hơn. Như vậy, các công thức thí nghiệm xử lý nền vườn ươm chỉ hạn chế được tuyến trùng trong thời gian đầu, để sản xuất cây giống sạch bệnh cần xử lý bổ sung bằng các loại thuốc phòng trừ tuyến trùng.

Đất trước khi vào bầu đã được hấp ở nhiệt độ cao trong nhiều giờ, không còn nấm gây hại, tuy nhiên tại các thời điểm phân tích đều xuất hiện nấm *Fusarium* spp.,

*Rhizoctonia* spp., trong đó công thức đối chứng có mật độ trong đất cao nhất và tần suất xuất hiện trong rễ nhiều nhất.

### 3.3. Nghiên cứu sử dụng cây dã quỳ (*T. diversifolia*) xử lý đất bị nhiễm tuyến trùng và nấm bệnh cho sản xuất cây giống sạch bệnh

Tuyến trùng trong rễ có xu hướng tăng dần qua các đợt theo dõi và giảm dần mật độ theo số lượng bột dã quỳ được trộn vào đất. Điều này chứng minh bột dã quỳ có khả năng kiểm soát tốt mật độ tuyến trùng trong rễ cây cà phê giống. Tính đến thời điểm sau 6 tháng trồng hiệu lực kiểm soát mật độ tuyến trùng của công thức đất bệnh + bột cây dã quỳ (20g/kg đất) đạt cao nhất với hiệu lực 50% đối với mật độ tuyến trùng trong đất và hiệu lực 78,86% đối với mật độ tuyến trùng trong rễ. Các công thức có xử lý bột dã quỳ kiểm soát tốt tỷ lệ cây bị vàng lá thối rễ. Trong đó công thức đất bệnh + bột cây dã quỳ (20g/kg đất) có hiệu lực gần tuyệt đối kiểm soát tỷ lệ cây bị vàng lá thối rễ sau 6 tháng trồng 90%, tiếp theo là công thức đất bệnh + bột cây dã quỳ (15g/kg đất) 80%, cuối cùng là công thức đất bệnh + bột cây dã quỳ (10g/kg đất) 70% (bảng 1).

**Bảng 1. Hiệu lực kiểm soát tỷ lệ cây bị vàng lá thối rễ của cây dã quỳ (Viện KHKTNLN Tây Nguyên, 2016)**

| STT | Công thức                              | Hiệu lực (%)      |                   |                   |
|-----|--|-------------------|-------------------|-------------------|
|     |  | Sau 2 tháng trồng | Sau 4 tháng trồng | Sau 6 tháng trồng |
| 1   | Đất bệnh + Bột cây dã quỳ (10g/kg đất) | 81,81             | 77,78             | 70,00             |
| 2   | Đất bệnh + Bột cây dã quỳ (15g/kg đất) | 90,90             | 88,88             | 80,00             |
| 3   | Đất bệnh + Bột cây dã quỳ (20g/kg đất) | 100,00            | 100,00            | 90,00             |

### 3.4. Nghiên cứu hiệu quả phòng trừ tác nhân gây chết cây cà phê sau tái canh bằng biện pháp sinh học

Sau 6 tháng trồng, tỷ lệ cây bị vàng lá và cây chết ở các công thức thí nghiệm < 6%, vườn cây sinh trưởng khá tốt, cây muồng hoa vàng trồng xen phát triển bình thường. Sau 12 và 18 tháng trồng, tỷ lệ cây bị vàng lá và cây chết ở công thức trồng xen muồng hoa vàng và xử lý bột cây đã quỳ (40g/hố) đều có xu hướng thấp hơn công thức đối chứng.

Kết quả phân tích đất trước thí nghiệm và sau trồng 12 tháng không có 2 loại tuyến trùng *Pratylenchus* spp. và *Meloidogyne* spp. gây hại cà phê, công thức xử lý bột cây đã quỳ (40g/hố) có 120 con *Rotylenchulus* spp./100g đất và đối chứng có 16 con *Rotylenchulus* spp./100g đất. Sau 12 tháng trồng, số lượng nấm *Fusarium* spp. trong đất biến động từ 1,10 - 2,10 x 10<sup>4</sup> cfu/g đất, công thức đối chứng cao hơn so với công thức còn lại, công thức cà phê xen muồng hoa vàng có số lượng nấm *Fusarium* spp. trong đất và tần suất xuất hiện nấm trong rễ thấp nhất. Như vậy, trồng xen muồng hoa vàng bước đầu có hiệu quả trong việc hạn chế nấm *Fusarium* spp. nhưng không nhiều. Công thức xử lý bột đã quỳ với

khối lượng quá thấp (20 - 40g/hố) chưa cho thấy hiệu quả.

### 3.5. Nghiên cứu sử dụng các chế phẩm sinh học phòng trừ tác nhân gây chết cà phê sau tái canh

#### 3.5.1. Mật độ tuyến trùng trong đất và rễ cà phê

Trước khi xử lý chế phẩm tổng số tuyến trùng ký sinh trong đất và rễ ở mức thấp, dao động từ 24 - 136 con/100g đất và 5g rễ và cao nhất ở công thức 3 (136 con). Sau khi xử lý thuốc được 3 tháng (tháng 11), mật độ tuyến trùng ký sinh trong rễ có sự khác nhau giữa các công thức. Trong các công thức xử lý, công thức 1 và 4 tăng nhẹ, đặc biệt ở công thức 4 sử dụng SH-BV1 mật độ tuyến trùng tăng mạnh cả trong đất và rễ (từ 82 con tăng lên 928 con). Riêng công thức sử dụng Tervigo 20 SC + Trico -VTN và TKS - NEMA mật độ tuyến trùng giảm nhẹ và duy trì ở mức thấp. Các chế phẩm sinh học sử dụng không cho hiệu quả phòng trừ hoặc cho hiệu quả phòng trừ thấp (< 50 %). Công thức sử dụng Tervigo 20 SC + Trico -VTN cho hiệu quả cao nhất chỉ đạt 47,37 %, tiếp đến là công thức sử dụng TKS - NEMA đạt 17,44 % (bảng 2).

**Bảng 2. Hiệu lực phòng trừ tuyến trùng của một số chế phẩm sinh học (Đắc Lắc, 2016)**

| Công thức                  | Hiệu lực sau 3 tháng xử lý (%) | Ghi chú                       |
|----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Sumagrow                   | -                              | Mật độ tuyến trùng không giảm |
| Tervigo 20 SC + Trico -VTN | 47,37 <sup>a</sup>             |                               |
| TKS - NEMA                 | 17,44 <sup>b</sup>             |                               |
| SH-BV1                     | -                              | Mật độ tuyến trùng không giảm |
| Đối chứng                  | 0 <sup>c</sup>                 |                               |
| CV (%)                     | 3,5                            |                               |
| LSD <sub>0,05</sub>        | 0,2                            |                               |

**3.5.2. Mật độ nấm bệnh trong đất cà phê**

Cùng với tuyến trùng, nấm bệnh trong đất, đặc biệt là nấm *Fusarium* spp. cũng là tác nhân quan trọng gây bệnh vàng lá thối rễ và gây chết cà phê tái canh. Trước khi xử lý chế phẩm, mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất ở mức khá cao (từ  $1,47 \times 10^4$  đến  $2,55 \times 10^4$ ) và không có sự khác biệt giữa các công thức. Do lúc này đang là mùa mưa nên thuận lợi cho nấm bệnh

phát sinh phát triển. Sau khi xử lý chế phẩm 3 tháng (tháng 11), đây là thời điểm đầu mùa khô do đó mật độ bào tử nấm *Fusarium* spp. đều có xu hướng giảm ở tất cả các công thức, trong đó công thức sử dụng Sumagrow giảm mạnh nhất xuống còn  $2,13 \times 10^3$ . Đánh giá hiệu lực phòng trừ nấm bệnh chỉ có công thức sử dụng Sumagrow cho hiệu quả đạt 29,80% và công thức sử dụng TKS - NEMA đạt 13,82% (bảng 3).

**Bảng 3. Hiệu lực phòng trừ nấm bệnh trong đất của các công thức xử lý (Đắk Lắk, 2016)**

| Công thức                  | Hiệu lực sau 3 tháng (%) | Ghi chú               |
|----------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Sumagrow                   | 29,80 <sup>a</sup>       |                       |
| Tervigo 20 SC + Trico -VTN | -                        | Mật độ nấm không giảm |
| TKS - NEMA                 | 13,82 <sup>b</sup>       |                       |
| SH-BV1                     | -                        | Mật độ nấm không giảm |
| Đối chứng                  | 0 <sup>c</sup>           |                       |
| CV (%)                     | 2,9                      |                       |
| LSD <sub>0,05</sub>        | 0,2                      |                       |

**3.5.3. Tỷ lệ rễ bị u sưng, thối**

Tuyến trùng chích hút rễ cây, tạo vết thương và u sưng cho rễ. Nấm tấn công gây hại đặc biệt từ các vết thương do tuyến trùng gây ra, do đó rễ cây bị u sưng và thối. Vì vậy đây cũng là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá hiệu quả của các chế phẩm sinh học. Trước khi xử lý thuốc cùng với thời điểm mùa mưa (tháng 8) nên tỷ lệ u sưng thối rễ khá cao trên 70% và không có sự khác biệt giữa các công thức. Tuy nhiên vào thời điểm 3 tháng sau xử lý thuốc (tháng 11), tỷ lệ u sưng thối rễ đều giảm ở tất cả các công thức kể cả công thức đối chứng không xử lý, trong đó công thức sử dụng Tervigo 20SC +

Trico-VTN và TKS-NEMA làm giảm tỷ lệ sưng thối cao nhất. Có thể do lúc này điều kiện thời tiết không thuận lợi cho nấm bệnh phát triển và một phần hiệu lực của các chế phẩm sử dụng.

Kết quả bảng trên cho thấy: Các công thức sử dụng Tervigo 20SC + Trico-VTN; TKS-NEMA và Sumagrow cho hiệu quả phòng trừ u sưng thối rễ cà phê. Tuy nhiên hiệu quả đạt thấp (< 21,28%). Riêng SH-BV1 chưa có tác dụng phòng trừ tỷ lệ u sưng và thối rễ.

**3.5.4. Tỷ lệ và chỉ số cây bị vàng lá**

Trước khi xử lý chế phẩm: Tỷ lệ cây vàng từ 19,44 đến 36,55%, lúc này đang

vào mùa mưa và vườn cây được bón phân chăm sóc tốt nên cà phê chỉ bị vàng nhẹ (Cấp 1), chỉ số bệnh từ 7,64 đến 13,66%. Tuy nhiên sau 3 tháng xử lý chế phẩm, cả tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh đều tăng lên ở tất cả các công thức (Do vào tháng 11, thời điểm đầu mùa khô nên cây sinh trưởng phát triển đứng lại). Tuy nhiên, công thức đối chứng có tỷ lệ và chỉ số vàng tăng nhiều nhất. Ghi nhận thực tế trên vườn vào lúc này, những cây bị vàng cấp 1 trước xử lý chuyển thành cây vàng cấp 2 và xuất hiện thêm một số cây cấp 1. Điều này chứng tỏ các công thức sử dụng chế phẩm có tác dụng làm giảm tỷ lệ cây vàng lá. Các chế phẩm cho hiệu quả làm giảm tỷ lệ cây vàng lá nhưng đạt mức thấp (hiệu lực dưới 20%).

### **3.6. Nghiên cứu sử dụng biện pháp kết hợp hóa học và sinh học phòng chống bệnh vàng lá, thối rễ cà phê tái canh**

#### **3.6.1. Mật độ tuyến trùng trong đất và rễ cà phê**

Tại thời điểm trước xử lý, tổng số tuyến trùng ký sinh trong đất và rễ ở mức thấp, dao động từ 21 - 208 con/100g đất và 5g rễ và cao nhất ở công thức 3 (208 con). Đây là thời điểm cuối mùa khô nên điều kiện không tốt cho tuyến trùng phát triển. Sau khi xử lý thuốc được 3 tháng, mật độ tuyến trùng ký sinh trong rễ có xu hướng tăng nhẹ ở công thức sử dụng Marshal 5G + Sumagrow và Map Logic 90WP + Tervigo 20SC + Trico-VTN đặc biệt ở công thức đối chứng (từ 28 con tăng lên 106 con). Riêng công thức sử dụng Vimoca 10 G + TKS-NEMA mật độ tuyến trùng giảm từ 208 con xuống còn 85 con

và công thức NoKaph 10 GR + SH-BV1 duy trì ở mức ban đầu.

Kết quả theo dõi sau 6 tháng xử lý mật độ tuyến trùng ký sinh trong đất và rễ cà phê có sự thay đổi giữa các công thức. Công thức sử dụng Marshal 5G + Sumagrow và công thức đối chứng không xử lý vẫn là 2 công thức có mật độ tuyến trùng cao hơn mức trước khi xử lý. Còn công thức 3 sử dụng Vimoca 10G cùng TKS-NEMA, mật độ tuyến trùng tiếp tục giảm xuống còn 66,67 con và công thức 4 xử lý NoKaph 10 GR kết hợp với SH-BV1 còn 16 con/tổng 100g đất và 5g rễ. Điều này chứng tỏ các loại thuốc sử dụng trong hai công thức 3 và 4 vẫn còn có tác dụng hạn chế sự phát triển gây hại của tuyến trùng.

Tính toán hiệu quả phòng trừ tuyến trùng của các công thức cho thấy: sau 3 tháng xử lý thuốc, cả 4 công thức sử dụng đều cho hiệu quả phòng trừ. Trong đó công thức sử dụng kết hợp Vimoca 10G (20g/cây) và chế phẩm TKS-NEMA (10g/cây) cho hiệu quả phòng trừ cao nhất đạt 89,23% và tiếp đến là công thức sử dụng NoKaph 10GR (20g/gốc) và SH-BV1 (0,7 kg/gốc). Còn công thức sử dụng Marshal 5G + Sumagrow và Map Logic 90WP + Tervigo 20SC + Trico-VTN cho hiệu quả phòng trừ thấp dưới mức trung bình (< 50%).

Kết quả đánh giá hiệu quả sau 6 tháng xử lý cho thấy công thức sử dụng Marshal 5G kết hợp Sumagrow không cho hiệu lực phòng trừ tuyến trùng. Còn 3 công thức còn lại hiệu lực vẫn duy trì ở mức sau 3 tháng xử lý (bảng 4).

**Bảng 4. Hiệu lực phòng trừ tuyến trùng của một số chế phẩm sinh học (Đắk Lắk, 2016)**

| Công thức                                 | Hiệu lực (%)        |                    | Ghi chú           |
|---|---------------------|--------------------|-------------------|
|   | Sau 3 tháng         | Sau 6 tháng        |                   |
| Marshal 5G + Sumagrow                     | 47,50 <sup>b</sup>  | -                  | Mật độ không giảm |
| Map Logic 90WP + Tervigo 20SC + Trico-VTN | 27,81 <sup>bc</sup> | 30,00 <sup>b</sup> |                   |
| Vimoca 10G + TKS-NEMA                     | 89,23 <sup>a</sup>  | 77,56 <sup>a</sup> |                   |
| NoKaph 10GR + SH-BV1                      | 75,29 <sup>ab</sup> | 75,29 <sup>a</sup> |                   |
| Đối chứng                                 | 0 <sup>d</sup>      | 0 <sup>c</sup>     |                   |
| CV (%)                                    | 7,6                 | 6,6                |                   |
| LSD <sub>0,05</sub>                       | 0,4                 | 0,5                |                   |

### 3.6.2. Mật độ nấm bệnh trong đất cà phê

Trước xử lý mật độ nấm bệnh *Fusarium* spp. trong đất khá cao và tương đối đồng đều giữa các công thức dao động từ  $7,50 \times 10^3$  đến  $1,58 \times 10^4$  cfu/g đất. Sau khi xử lý 3 tháng (tháng 9) mật độ nấm *Fusarium* spp. đều có xu hướng giảm ở tất cả các công thức và không sai khác có ý nghĩa so với công thức đối chứng không xử lý. Do vậy, có thể nói các công thức sử dụng thuốc chưa có hiệu lực phòng trừ nấm bệnh. Đây là hiệu quả của 2 lần xử lý thuốc Ridomil Gold 68WG 0,25% (2 lít/gốc) cho tất cả các công thức. Sau 6 tháng xử lý (tháng 12) mật độ nấm bệnh trong đất có sự khác nhau giữa các công thức. Ba công thức sử dụng Marshal 5G + Sumagrow; Map Logic 90WP + Tervigo 20SC + Trico-VTN và Vimoca 10G + TKS-NEMA tiếp tục làm giảm mật độ nấm. Riêng công thức sử dụng NoKaph 10GR + SH-BV1 và đối chứng làm mật độ nấm tăng nhẹ. Tính toán hiệu quả phòng trừ cho thấy 3 công thức 1, 2 và 3 cho hiệu quả phòng trừ nấm bệnh sau 6 tháng xử lý thuốc. Tuy nhiên hiệu

lực phòng trừ đạt thấp, chỉ đạt từ 31,55 đến 38,50%.

### 3.6.3. Tỷ lệ rễ bị u sưng, thối

Sau 3 tháng xử lý thuốc, tỷ lệ u sưng thối đều giảm so với trước xử lý, trong đó công thức sử dụng Vimoca 10G kết hợp với chế phẩm TKS-NEMA giảm mạnh nhất từ 65,67% xuống còn 44,50%. Sau 6 tháng xử lý, tỷ lệ u sưng thối đều có xu hướng tăng ở cả 4 công thức, trong đó công thức sử dụng Vimoca 10G kết hợp với chế phẩm TKS-NEMA vẫn là công thức làm tăng tỷ lệ u sưng thối thấp nhất. Tính toán hiệu lực cho thấy: Cả 4 công thức đều cho hiệu lực hạn chế u sưng thối rễ cà phê sau 3 tháng. Riêng công thức sử dụng Vimoca 10G + TKS-NEMA và Marshal 5G + Sumagrow cho hiệu quả phòng trừ kéo dài đến 6 tháng sau xử lý thuốc, tuy nhiên hiệu quả đạt thấp dưới mức trung bình (< 39,07%).

### 3.6.4. Tỷ lệ và chỉ số cây bị vàng lá

Trước xử lý thuốc, tỷ lệ cây vàng lá khoảng 27,43 đến 42,66% và tương đối đồng đều giữa các công thức. Sau 3 tháng

xử lý (tháng 9), đã có sự khác biệt giữa các công thức đặc biệt ở công thức sử dụng Vimoca 10G + TKS-NEMA làm giảm tỷ lệ cây vàng rõ rệt và sai khác có ý nghĩa so với đối chứng không xử lý (từ 37,59 xuống còn 23,76%). Đến thời điểm sau 6 tháng xử lý thuốc, tỷ lệ cây bị vàng ở cả 4 công thức xử lý thuốc đều tiếp tục giảm và có sự sai khác có ý nghĩa. Công thức Vimoca 10G + TKS-NEMA và NoKaph 10GR + SH-BV1 tiếp tục làm giảm tỷ lệ cây vàng lá nhiều nhất và sai khác có ý nghĩa với các công thức còn lại.

Trương tự như tỷ lệ cây vàng lá, chỉ số vàng lá sau xử lý thuốc 3 và 6 tháng đã có sự khác biệt giữa các công thức. Công thức sử dụng Vimoca 10G + TKS-NEMA và NoKaph 10GR + SH-BV1 vẫn là 2 công thức có chỉ số vàng lá thấp nhất và sai khác có ý nghĩa so với công thức đối chứng. Công thức sử dụng Vimoca 10G kết hợp TKS- NEMA cho hiệu lực cao nhất tại thời điểm 3 tháng đạt 49,03% và hiệu lực tăng sau 6 tháng xử lý đạt 69,06%. Tiếp đến là công thức Marshal 5G + Sumagrow và NoKaph 10GR + SH-BV1 cho hiệu lực đạt trên 50%. Riêng công thức Map Logic 90WP + Tervigo 20SC + Trico-VTN chưa cho hiệu lực phòng trừ.

## 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 4.1. Kết luận

- Tuyến trùng *Pratylenchus coffeae*, *Meloidogyne incognita* và *Rotylenchus reniformis* là tác nhân chính kết hợp với nấm (*Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*) gây ra bệnh vàng lá chết cây cà phê tái canh.

- Trong sản xuất cây giống cà phê, xử lý thuốc Điền Trang-NEMA, Tervigo và Vimoca có tác dụng hạn chế được sự phát triển, xâm nhập của tuyến trùng và nấm gây hại bộ rễ cây cà phê giai đoạn cây con, giúp nâng cao tỷ lệ cây đạt tiêu chuẩn xuất vườn cao 88,2 - 90,0%, tương ứng. Xử lý nền đất bầu ương cây giống bằng Basamid hoặc trải bạt hạn chế được sự xâm nhập của tuyến trùng gây hại cà phê giai đoạn đầu, tăng tỷ lệ cây đủ tiêu chuẩn xuất vườn của các công thức xử lý nền đất > 80%. Tuy nhiên, để sản xuất cây giống sạch bệnh cần xử lý bổ sung bằng các loại thuốc phòng trừ tuyến trùng khi cây con đạt trên 2 tháng tuổi. Xử lý đất làm bầu bằng bột dẽ quỳ (20g/kg đất) kiểm soát tuyến trùng và nấm *Fusarium spp.* trong rễ và đất tốt nhất.

- Trong điều kiện vườn cà phê sau tái canh, xử lý chế phẩm sinh học Sumagrow (0,5%, 2 lít/cây) cho hiệu quả phòng trừ nấm cao nhất đạt 29,80%, TKS-NEMA (10g/cây) đạt 13,82%. Sử dụng kết hợp thuốc hóa học Vimoca 10G (20g/cây) và chế phẩm sinh học TKS-NEMA (10g/cây) và NoKaph 10GR (20g/gốc) cùng với SH-BV1 (0,7kg/gốc) cho hiệu lực phòng trừ tuyến trùng cao nhất (> 70%) và kéo dài sau 6 tháng xử lý.

### 4.2. Kiến nghị

Dựa vào mức độ bệnh vàng lá thối rễ cây cà phê sau tái canh để khuyến cáo sử dụng các biện pháp phòng chống hiệu quả: mức độ bệnh cấp 3,4 cần áp dụng đồng bộ nhiều biện pháp bao gồm canh tác, sinh học, hóa học; mức độ bệnh nhẹ hơn (cấp 1, 2) khuyến khích áp dụng biện pháp canh tác, sử dụng các chế phẩm sinh học nêu trên.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Ngọc Bái, Chế Thị Đa, 2012. Hiện trạng tái canh cà phê ở Tây Nguyên và giải pháp để tái canh cà phê chu kỳ hai đạt hiệu quả. Hội nghị đánh giá chương trình tái canh cà phê đến năm 2012, phương hướng và giải pháp trong thời gian tới - Lâm Đồng, tháng 10 - 2012, trang 28 - 31.
2. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Cục Trồng trọt. Kết quả sản xuất một số cây trồng chủ lực năm 2016 - Hà Nội, tháng 11/2016. Trang 26 - 27.
3. Chế Thị Đa, 2012. Nghiên cứu xác định các giải pháp kỹ thuật để tái canh cà phê với có hiệu quả. Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam. Số 5/2012, trang 17 - 25.
4. Lê Đức Khánh, 2015. Nghiên cứu tuyến trùng hại cây hồ tiêu, cà phê và các giải pháp khoa học và công nghệ phòng trừ hiệu quả ở các vùng sản xuất trọng điểm. Báo cáo nghiệm thu đề tài cấp Bộ. Trang 40 - 45.
5. Trần Kim Loang, 1999. Sâu bệnh hại cà phê và biện pháp phòng trừ. Cây cà phê Việt Nam. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, trang 336 - 341.
6. Trần Kim Loang, Hà Thị Mão và cộng tác viên, 2001. Đánh giá hiệu lực của một số chế phẩm sinh học trong việc phòng trừ bệnh thối rễ cà phê. Kết quả Nghiên cứu Khoa học năm 2000 - 2001, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm Nghiệp Tây Nguyên, trang 105 - 112.
7. Nguyễn Thị Chúc Quỳnh, 2015. Hoàn thiện công nghệ sản xuất, ứng dụng chế phẩm sinh học phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh hại rễ hồ tiêu, cà phê. Báo cáo nghiệm thu dự án sản xuất thử nghiệm cấp Bộ Nông nghiệp và PTNT. Trang 51 - 56.
8. Phan Quốc Sùng, Hà Minh Trung, Hoàng Thanh Tiệm, Trần Kim Loang, Trịnh Đức Minh, Công Huyền Tôn Nữ Tuấn Nam, Trương Hồng, Lê Ngọc Bái, Nguyễn Trọng Chất, Nguyễn Văn Tuất, Ngô Vĩnh Viễn, Nguyễn Văn Ván, 2001. Điều tra nghiên cứu hội chứng vàng lá cà phê và biện pháp phòng trừ. Báo cáo tổng kết - Đề tài độc lập cấp Nhà nước (1997 - 2001). Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường, 169 trang.

## ABSTRACT

### Study on biological measures to prevent coffee mortality after re-planting in the Central Highlands

*The area of re-cultivated coffee on the old ground often dies, especially in the 2 - 3rd year, the mass death occurs. One of the causes of coffee tree death is damaged roots, causing yellow leaves and death of the tree. The results of the study on coffee replanting have determined that the pathogen is caused by the nematodes *Pratylenchus coffeae*, *Meloidogyne incognita*, and *Rotylenchus reniformis* which are the main agents associated with the fungus (*Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*) causing yellow leaf disease. dead replanted coffee trees. Some effective technical solutions and replanting processes are applied to coffee production in the Central Highlands. Biological measures have been studied and identified some biological pesticides such as Dien Trang-NEMA, Tervigo, and Vimoca that have the effect of limiting the growth and penetration of nematodes and fungi that damage the roots of coffee seedling stage. In the condition of the coffee plantations after re-cultivation, treatment with Sumagrow biopesticide (0.5%, 2 liters/plant) gave the highest effectiveness in preventing fungus at 29.80%. Biopesticides should be recommended for use in coffee production after replanting to prevent yellow leaves, dead coffee trees and contribute to sustainable coffee production in the Central Highlands.*

**Keywords:** Coffee, yellow leaves, dead coffee trees, biological pesticides, re-plantation.

# KHẢ NĂNG VÀ CƠ CHẾ KÍCH KHÁNG BỆNH BẠC LÁ LÚA CỦA DỊCH TRÍCH LÁ CỎ HÔI (*Chromolaena odorata*) BẰNG BIỆN PHÁP PHUN QUA LÁ

Trương Văn Xạ<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Tuyết Mai<sup>2</sup>,  
Nguyễn Đắc Khoa<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long

<sup>2</sup> Trường Đại học Cần Thơ

\* Tác giả liên hệ: ndkhoa@ctu.edu.vn

## TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu khảo sát khả năng và cơ chế kích kháng bệnh bạc lá (cháy bìa lá) do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* liên quan đến hoạt tính của 2 enzyme peroxidase (PO) và catalase (CAT) khi phun dịch trích lá cỏ hôi (*Chromolaena odorata*) lên lá lúa. Các nồng độ dịch trích được khảo sát gồm 1, 2, 3, 4 và 5% (w/v) với 3 biện pháp xử lý gồm phun qua lá ở thời điểm 14 ngày trước khi chủng bệnh (NTCB), 7 NTCB và kết hợp 2 thời điểm này. Khả năng giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới được đánh giá thông qua chiều dài vết bệnh trên lá tại các thời điểm 7, 14 và 21 ngày sau chủng bệnh (NSCB). Phun dịch trích cỏ hôi 3 và 5% tại thời điểm 14 và 7 NTCB cho thấy khả năng giảm bệnh đến 21 NSCB, trong đó nồng độ 5% có khả năng giảm bệnh tương đương với thuốc hóa học. Tất cả các nồng độ khảo sát của nghiệm thức kết hợp phun 2 thời điểm đều có khả năng giảm bệnh tốt hơn nghiệm thức đối chứng âm. Dịch trích lá cỏ hôi có khả năng kích kháng bệnh do hoạt tính của 2 enzyme PO và CAT tăng sau khi cây lúa được chủng bệnh và phun dịch trích; trong đó, enzyme PO tăng liên tục từ thời điểm 0 đến 6 NSCB nhưng giảm ở ngày thứ 7 còn enzyme CAT tăng mạnh từ 0 đến 4 NSCB và giữ ổn định đến 7 NSCB.

**Từ khóa:** Bạc lá, *Chromolaena odorata*, cỏ hôi, kích kháng, lúa, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

## 1. GIỚI THIỆU

Bệnh bạc lá (cháy bìa lá) lúa do vi khuẩn gram âm *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây ra (Swings *et al.*, 1990). Vi khuẩn Xoo xâm nhiễm và phát triển trong mạch dẫn có thể làm nghẽn mạch,

dẫn đến cây mạ chết héo hoặc bạc lá và thường gây hại nặng nhất ở giai đoạn lúa đẻ nhánh (Mew *et al.*, 1993; Niño-Liu *et al.*, 2006). Ở Việt Nam, bệnh đã gây thiệt hại lớn năng suất lúa và làm giảm chất lượng gạo (Dinh *et al.*, 2008). Bệnh thường xuất hiện vào vụ hè thu - đông xuân, nhất là khi thời tiết có mưa nhiều,

Người phân biên: PGS.TS. Trần Vũ Phấn

gió mạnh và thường gây hại nặng ở giai đoạn lúa đẻ nhánh đến làm đồng. Những năm gần đây, bệnh xuất hiện và gây hại trên tất cả các vùng trồng lúa ở khu vực đồng bằng sông Cửu Long.

Các biện pháp phòng trừ bệnh bạc lá lúa được nghiên cứu và sử dụng như thuốc hoá học, giống mang gen kháng hoặc sử dụng vi sinh vật đối kháng (Chithrashree *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2012; Suryadi *et al.*, 2013; Hop *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Khoa *et al.*, 2016). Một chiến lược khác để phòng trừ bệnh bạc lá lúa 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 ở một mức độ nào đó sau khi được xử lý bằng tác nhân kích kháng (Kloepfer *et al.*, 1992); là phương pháp quản lý bệnh hại trên cây trồng một cách bền vững và thân thiện với môi trường (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 hoạt cơ chế tự vệ có sẵn trong cây, trong đó có sự tăng tích lũy các hợp chất phenol, phytoalexin và protein liên quan đến quá trình phát sinh bệnh (PR-protein) nhằm ngăn chặn sự phát triển của mầm bệnh (van Loon *et al.*, 1998). Các enzyme peroxidase (PO), catalase (CAT), phenylalanin amino lyase (PAL), polyphenol oxidase (PPO) đã được báo cáo góp phần hạn chế sự phát triển lan rộng mầm bệnh *Xoo* khi tấn công vào cây lúa thông qua cơ chế kích kháng (Kagale *et al.*, 2004; Govindappa *et al.*, 2011; Nisha *et al.*, 2012; Khoa *et al.* 2017; Nguyễn Thị Thu Hương và ctv., 2018). Các tác nhân kích kháng mầm bệnh bạc lá

lúa đã được báo cáo, gồm acilbenzolar-S-methyl và Salicylic acid (Mohan Babu *et al.*, 2003a; 2003b), vitamin B<sub>1</sub> (Ahn *et al.*, 2005); vi khuẩn *Bacillus* spp. (Chithrashree *et al.*, 2011), *Pseudomonas fluorescens* (Lingaiah and Umesha, 2013); dịch trích 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), Sóng đời (*Kalanchoe pinnata*) (Khoa *et al.* 2017; Nguyễn Thị Thu Hương và ctv., 2018); Cỏ Cút heo (*Ageratum conyzoides*) (Trương Văn Xạ và Nguyễn Đắc Khoa, 2020).

Dịch trích Cỏ hôi đã được khảo sát có hiệu quả giảm bệnh đối với đạo ôn (*Pyricularia oryzae*) và đốm vằn (*Rhizoctonia solani*) gây hại trên lúa (Khoa *et al.*, 2011; Trần Thị Thu Thủy và Jørgensen, 2016; Cuong *et al.*, 2021). Theo Trương Văn Xạ và Nguyễn Đắc Khoa (2020), khi ngâm hạt lúa bằng dịch trích Cỏ hôi đã cho kết quả bước đầu giảm bệnh bạc lá lúa trong điều kiện nhà lưới. Tuy nhiên, dưới áp lực bệnh ngày càng cao, xử lý dịch trích thực vật bằng ngâm hạt là rất xa thời điểm cây lúa nhạy cảm nhất với bệnh làm cơ chế kích kháng của cây ít phát huy tác dụng hoặc không kích thích tính kháng kịp thời với mầm bệnh. Do đó, đề tài được thực hiện nhằm khảo sát hiệu quả giảm bệnh và cơ chế kích kháng liên quan đến enzyme PO và CAT của dịch trích lá cỏ hôi bằng biện pháp phun qua lá đối với bệnh bạc lá lúa để làm cơ sở để ứng dụng vào thực tế phòng trị bệnh một cách hiệu quả, thân thiện với môi trường, dễ sử dụng và có thể tận dụng nguồn nguyên liệu tại chỗ nên giúp giảm chi phí sản xuất.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Vi khuẩn *Xoo* được Nhóm Nghiên cứu Bệnh cây thuộc Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ cung cấp. Vi khuẩn *Xoo* được nuôi trên môi trường Wakimoto cải tiến (Karganilla *et al.*, 1973).

Giống lúa Jasmine 85 (Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long). Đất phù sa trồng lúa được xử lý với vôi (100g vôi bột cho 10kg đất) trước khi cho vào chậu 30 × 45 × 20cm.

Phân hóa học bón cho lúa theo công thức 120N - 40P - 60K theo khuyến cáo của Trung tâm Khuyến nông Cần Thơ. Lượng cụ thể cho từng chậu như sau: Bón lót ở thời điểm 2 ngày trước sạ với lượng là 2,4 g P (Super phosphate, Super Phốt phát và Hóa chất Lâm Thao) và bón thúc vào 10, 20, 40 và 70 ngày sau sạ với lượng 0,5g N (ure, đạm Phú Mỹ) và 0,12g K (Potassium chloride, Tập đoàn Vinacam).

Đối chứng dương là thuốc hóa học Starner 20WP (10g/gói, công ty Bảo vệ Thực vật 1 Trung Ương) là loại thuốc có hoạt chất oxolinic acid 20%, tác dụng kháng khuẩn phổ rộng, đặc biệt hiệu quả đối với bệnh cháy bìa lá. Sử dụng Starner 20WP để phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa đúng theo khuyến cáo trên bao bì (30g/16L/500m<sup>2</sup>). Trong thí nghiệm này, thuốc hóa học Starner 20WP được phun để phòng bệnh ở thời điểm 5 ngày trước chủng bệnh (NTCB) và phun trị bệnh thời điểm 5, 10 và 15 ngày sau chủng bệnh

(NSCB) với lượng 18,75mg trong 10mL nước cho mỗi chậu.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Chuẩn bị dịch trích lá Cỏ hôi

Lá cây Cỏ hôi được thu vào lúc 7 giờ sáng tại nhà lưới Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long và vận chuyển ngay về phòng thí nghiệm. Dịch trích được chuẩn bị ở điều kiện nhiệt độ phòng gồm các bước: Các lá trưởng thành hoàn toàn được chọn, sau đó rửa sạch bằng nước máy, để ráo nước, xay nhuyễn bằng máy xay (Toshiba BL-T60), lọc và pha đúng nồng độ (nồng độ dịch trích = khối lượng lá/thể tích nước cất dùng ly trích, w/v). Dịch trích được trữ trong ngăn mát tủ lạnh và được sử dụng trong ngày.

#### 2.2.2. Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn *Xoo* và chủng bệnh nhân tạo

Huyền phù *Xoo* mật số 10<sup>9</sup> CFU/mL dùng để chủng bệnh nhân tạo được chuẩn bị như sau: Dùng que cấy vô trùng lấy đầy 2 loop vi khuẩn đã phát triển trên môi trường Wakimoto cải tiến từ 48 - 72 giờ cho vào 10mL nước cất đã thanh trùng, kết quả đo và hiệu chỉnh về giá trị OD = 0,37 ở bước sóng 600nm bằng máy hấp thụ quang phổ (Khoa, 2005; Khoa *et al.*, 2017).

Chủng bệnh nhân tạo theo phương pháp của Kauffman *et al.* (1973) được thực hiện như sau: Dùng kéo đã thanh trùng nhúng vào huyền phù vi khuẩn, cắt 5 chóp lá trưởng thành với chiều dài từ đỉnh lá khoảng 2 - 3cm của từng cây lúa ở giai đoạn 45 ngày sau khi gieo (Khoa *et al.*, 2017; Nguyễn Thị Thu Hương và ctv., 2018).

### 2.2.3. Khảo sát khả năng giảm bệnh bạc lá của dịch trích Cỏ hôi trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, 2 nhân tố, 3 lần lặp lại. Nhân tố 1 là nồng độ dịch trích (1, 2, 3, 4 và 5%); nhân tố 2 là thời gian phun (14 NTCB, 7 NTCB, kết hợp hai lần phun 14 và 7 NTCB).

Chỉ tiêu được ghi nhận bằng cách đo chiều dài vết bệnh tính từ vị trí cắt đến vết lan cuối cùng trên lá qua các thời điểm là 7, 14 và 21 NSCB (Khoa *et al.*, 2017; Nguyễn Thị Thu Hương và ctv., 2018; Trương Văn Xạ và Nguyễn Đức Khoa, 2020; 2021).

### 2.2.4. Khảo sát hoạt tính enzyme trong mô lá lúa

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lặp lại, gồm 4 nghiệm thức: (1) phun dịch trích lá Cỏ hôi, có chủng bệnh; (2) phun dịch trích, không chủng bệnh; (3) phun nước vô trùng, có chủng bệnh và (4) phun nước vô trùng, không chủng bệnh. Nồng độ dịch trích lá Cỏ hôi được chọn từ thí nghiệm trên là 1% phun tại 14 và 7 NTCB (nồng độ thấp nhất nhưng cho hiệu quả giảm bệnh kéo dài đến 21 ngày sau chủng bệnh (NSCB)).

Mẫu lá lúa được thu ở giai đoạn 45 ngày sau khi gieo (NSKG). Mẫu lá lúa trưởng thành ở các nghiệm thức được thu ở thời điểm 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 và 7 NSCB (dùng kéo cắt ngang bẹ của lá thứ 3 từ

trên xuống), mẫu lá được cho ngay vào nitơ lỏng và giữ ổn định trong 5 phút. Sau đó, mẫu chuyển về phòng thí nghiệm để ly trích enzyme.

Ly trích enzyme được thực hiện gồm bước: lấy 0,1g mô lá lúa cho vào tuýp 2mL có chứa bi sắt đã được thanh trùng, tiếp theo ngâm trong nitơ lỏng 10 phút và được nghiền thành bột mịn bằng máy nghiền mẫu (Retsch MM 200), tiếp theo cho 5mL dung dịch đệm. Sau đó, hỗn hợp được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C. Sau khi ly tâm, phần dung dịch nổi trên mặt được chuyển sang tuýp mới và được sử dụng như nguồn dịch chiết enzyme để khảo sát hoạt tính PO, CAT ngay sau khi ly trích (Khoa *et al.*, 2017).

#### 2.2.4.1. Khảo sát hoạt tính enzyme peroxidase (PO)

Khảo sát hoạt tính PO được thực hiện theo phương pháp của Hammerschmidt *et al.*, (1982) và điều chỉnh theo Khoa *et al.* (2017). Mẫu enzyme được ly trích trong đệm 0,1M sodium phosphate (pH 6,5). Mẫu khảo sát hoạt tính PO được thực hiện phản ứng với 1,6mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,05M, 0,15mL guaiacol 0,15M và 0,15mL dịch trích enzyme. Các mẫu được đo hấp thụ quang phổ ở bước sóng 470nm và được ghi nhận từ lúc bắt đầu phản ứng đến 2 phút và mỗi 30 giây ghi nhận một lần. Hoạt tính PO được thể hiện qua sự thay đổi giá trị hấp thụ quang phổ ở 470nm ( $\Delta OD_{470nm}/\text{phút}/\text{g}$  mô lá).

#### 2.2.4.2. Khảo sát hoạt tính enzyme catalase (CAT)

Khảo sát hoạt tính CAT được thực hiện theo phương pháp của Beers and Sizer (1951) và điều chỉnh theo Khoa *et al.* (2017). Mẫu enzyme được ly trích trong dung dịch đệm 0,1M potassium phosphate (pH 7,0). Mẫu khảo sát hoạt tính CAT được thực hiện phản ứng catalase gồm 1,75mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,2M và 0,15mL dịch trích enzyme. Các mẫu được đo hấp thụ quang phổ ở bước sóng 240nm và được ghi nhận từ lúc bắt đầu phản ứng đến 2 phút và mỗi 30 giây ghi nhận một lần. Hoạt tính CAT được thể hiện qua sự khả năng phân hủy cơ chất H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> thông qua sự thay giảm giá trị hấp thụ quang phổ ở bước sóng 240nm ( $\Delta OD_{240nm}/\text{phút}/g$  mô lá).

#### 2.2.5. Xử lý số liệu

Phần mềm thống kê IBM SPSS 26 phân tích phương sai 1 chiều, kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 5% được sử dụng để so sánh các trung bình nghiệm thức khảo sát khả năng giảm bệnh bạc lá trong nhà lưới.

Giá trị OD được trình bày dưới dạng biểu đồ bằng phần mềm Microsof Excel 2016, thể hiện sự thay đổi hoạt tính enzyme của bốn nghiệm thức từ 0 đến 7 NSCB.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Hiệu quả giảm bệnh bạc lá của dịch trích trong điều kiện nhà lưới

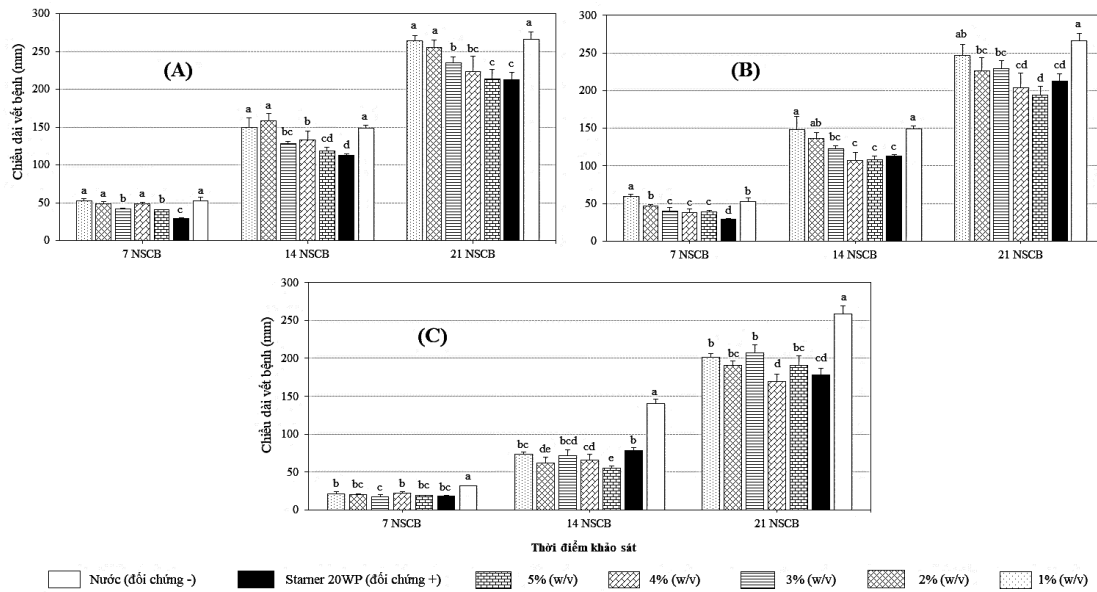
Hiệu quả giảm chiều bệnh khi được phun với các loại dịch trích thực vật được

đánh giá bằng cách so sánh chiều dài vết bệnh ở từng thời điểm 7, 14 và 21 NSCB giữa những nghiệm thức có phun dịch trích so với phun nước (đối chứng âm) và phun Starner 20WP (đối chứng dương) (hình 1).

Dịch trích cỏ hôi được phun qua lá tại thời điểm 7 NTCB, nghiệm thức 3% có hiệu quả giảm bệnh khác biệt ý nghĩa so với đối chứng âm và duy trì hiệu đến 21 NSCB (hình 1A). Trong đó, nghiệm thức 5% có hiệu quả giảm bệnh tương đương với đối chứng dương tại thời điểm 14 NSCB và 21 NSCB.

Dịch trích cỏ hôi được phun qua lá tại thời điểm 14 NTCB, nghiệm thức 3%, 4% và 5% có hiệu quả giảm bệnh khác biệt ý nghĩa so với đối chứng âm và duy trì hiệu đến 21 NSCB (hình 1B). Trong đó, nghiệm thức 4% và 5% có hiệu quả giảm bệnh tương đương với đối chứng dương tại thời điểm 14 NSCB và 21 NSCB.

Dịch trích cỏ hôi được phun qua lá tại hai thời điểm kết hợp là 14 và 7 NTCB, tất các nghiệm thức đều có hiệu quả giảm bệnh tương đương với đối chứng dương (hình 1C). Đối với nghiệm thức 5%, tại 7 NSCB có hiệu quả giảm bệnh khác biệt ý nghĩa so với đối chứng âm; 14 NSCB thì hiệu quả tương đương khác biệt không ý nghĩa so với đối chứng dương; 21 NSCB thì hiệu quả giảm bệnh cao hơn so với đối chứng dương. Như vậy, nếu cùng phương pháp xử lý thì hiệu quả giảm bệnh tăng dần theo các thời điểm khảo sát lần lượt là 7, 14 và 21 NSCB.



**Hình 1. Trung bình chiều dài vết bệnh bạc lá (mm) khi được phun qua lá bằng dịch trích cỏ hôi trong điều kiện nhà lưới**

A. Phun dịch trích Cỏ hôi vào thời điểm 7 NTCB; B. Phun dịch trích Cỏ hôi vào thời điểm 14 NTCB; C. Phun dịch trích Cỏ hôi vào hai thời điểm 14 và 7 NTCB; Các cột trong cùng một thời điểm khảo sát theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) bằng phép thử Duncan. NSCB: Ngày sau chủng bệnh. NTCB: Ngày trước chủng bệnh

Kết quả nghiên cứu đã xác định, phun dịch trích lá Cỏ hôi ở cùng nồng độ dịch trích thì thời điểm 14 NTCB cho hiệu quả giảm bệnh cao hơn so với 7NTCB (hình 1A, 1B). Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Hương và ctv. (2018), hiệu quả giảm bệnh bạc lá khi phun dịch trích sống đời ở thời điểm 14 NTCB cao hơn so với 7 NTCB. Ngoài ra, nghiên cứu đã cho thấy phun dịch trích cỏ hôi đồng thời tại hai thời điểm là 7 và 14 NTCB thì hiệu quả giảm bệnh thể hiện cao hơn so với phun từng thời điểm riêng lẻ từng thời điểm (hình 1C).

Với tiêu chí lựa chọn nghiệm thức có nồng độ dịch trích thấp nhất mà tại đó có hiệu quả giảm bệnh so với đối

chứng âm thì nghiệm thức phun dịch trích cỏ hôi 1% tại hai thời điểm 14 và 7 NTCB là nghiệm thức phù hợp nhất và áp dụng cho các thí nghiệm khảo sát enzyme PO và CAT. Việc lựa chọn nghiệm thức này hoàn toàn phù hợp so với các nghiên cứu trước đó; như so với nghiệm thức ngâm hạt bằng dịch trích lá sống đời 1,5% (Khoa *et al.*, 2017) và phun qua lá ở thời điểm 14 NTCB bằng dịch trích sống đời 1% (Nguyễn Thị Thu Hương và ctv., 2018).

### 3.2. Hoạt tính enzyme trong mô lá lúa

#### 3.2.1. Hoạt tính enzyme peroxidase (PO)

Kết quả khảo sát hoạt tính enzyme PO trong lá lúa của các nghiệm thức được

thể hiện thông qua giá trị hấp thụ quang phổ ( $\Delta OD_{470nm}$ /phút/g mô lá) của nồng độ sản phẩm tetraguaiacol trong phản ứng phân hủy guaiacol dưới sự xúc tác của enzyme PO (hình 2A).

Ở nghiệm thức phun nước, không chủng bệnh có giá trị hấp thụ quang phổ luôn ổn định, nhưng có xu hướng tăng từ 4 NSCB đến 7 NSCB. Đối với nghiệm thức phun nước, có chủng bệnh có giá trị hấp thụ quang phổ luôn giữ ở mức cao hơn so với nghiệm thức phun nước, không chủng bệnh.

Đối với nghiệm thức phun cỏ hôi, không chủng bệnh thì giá trị hấp thụ quang phổ tăng dần và tiếp tục duy trì đến 4 NSCB. Tại ngày thứ 5, giá trị hấp thụ quang phổ của nghiệm thức này giảm xuống xấp xỉ những thời điểm đầu, sau đó tăng nhẹ và ổn định tại thời điểm 6 NSCB và 7 NSCB. Trong khi đó, nghiệm thức phun Cỏ hôi, có chủng bệnh thì giá trị hấp thụ quang phổ tăng dần đến ngày khảo sát thứ 3, tăng vọt ở 4 NSCB và khả năng tăng được tiếp tục duy trì đến thời điểm 6 NSCB, sau đó giảm mạnh vào ngày thứ 7.

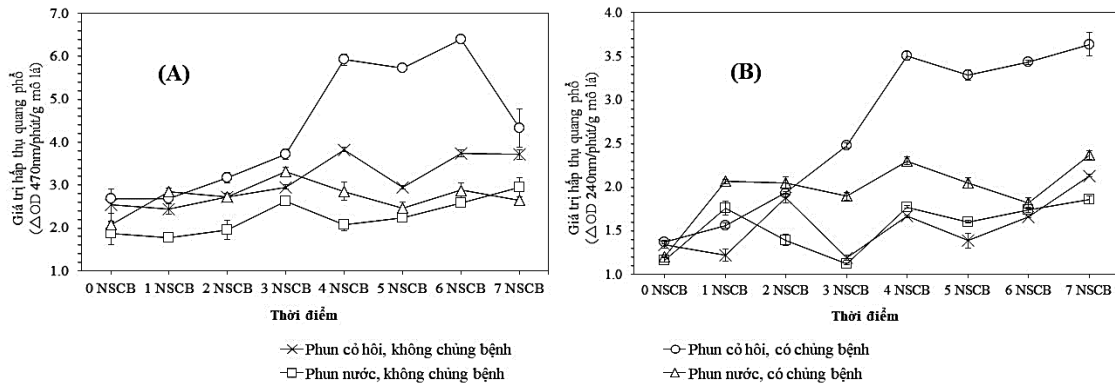
### 3.2.2. Hoạt tính enzyme catalase (CAT)

Kết quả khảo sát hoạt tính enzyme CAT trong mô lá lúa của các nghiệm thức được thể hiện qua sự thay đổi giá trị hấp thụ quang phổ ( $\Delta OD_{240nm}$ /phút/g mô lá) của cơ chất  $H_2O_2$  trong phản ứng xúc tác phân hủy  $H_2O_2$  bởi enzyme CAT (hình 2B).

Nghiệm thức phun nước, không chủng bệnh và nghiệm thức phun dịch trích cỏ hôi, không chủng bệnh thì giá trị hấp thụ quang phổ tăng từ  $1,161 \pm 0,026$  đến  $1,773 \pm 0,016$  từ thời điểm 0 NSCB đến 4 NSCB, sau đó giữ ổn định đến 6 NSCB. Kết quả tương tự như nghiên cứu của Khoa *et al.* (2017), nghiệm thức không chủng bệnh để khảo sát CAT cũng có xu hướng tăng từ thời điểm 0 NSCB đến 6 NSCB, sau đó giảm ở 7 NSCB.

Nghiệm thức phun nước, có chủng bệnh thì giá trị hấp thụ quang phổ tăng ở từ 0 NSCB đến 1 NSCB; sau đó, giữa ổn định đến 7 NSCB. Ngoài ra, giá trị hấp thụ quang phổ ở nghiệm thức này luôn duy trì ở mức cao hơn so với nghiệm thức phun nước, không chủng bệnh. Như vậy, khi bị lây nhiễm bởi mầm bệnh *Xoo* thì enzyme CAT đã được sinh tổng hợp nhiều hơn so với không có sự hiện diện của mầm bệnh.

Đối với phun dịch trích cỏ hôi, có chủng bệnh thì giá trị hấp thụ quang phổ tăng vọt từ 0 NSCB đến 4 NSCB; giảm ở 5 NSCB; tiếp tục tăng đến 7 NSCB. Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Khoa *et al.* (2017), enzyme CAT cũng tăng khi được ngâm hạt bằng dịch trích sống đời và có chủng bệnh. Như vậy, việc phun dịch trích Cỏ hôi làm tăng hoạt tính enzyme CAT cao hơn, điều này phù hợp với hiệu quả giảm bệnh đã được trình bày ở thí nghiệm trên.



**Hình 2. Hoạt tính enzyme peroxidase (A) và catalase (B) trong mô lá lúa**  
 Cây lúa được phun với dịch trích lá *Cỏ hôi* nồng độ 1% (w/v) tại hai thời điểm là 14 và 7 NTCB.  
 NSCB: Ngày sau chủng bệnh. NTCB: Ngày trước chủng bệnh

Đối với các mầm bệnh ký sinh trong mô sống thì cơ chế kích kháng thường có liên quan đến các đường truyền tín hiệu SA (Salicylic Acid) và sự tăng tích lũy các nhóm có hoạt tính oxy hóa cao ( $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $OH^-$ ) từ đó giúp cây trồng chống lại sự tấn công của các mầm bệnh ký sinh trong mô sống (Rao *et al.*, 1997; Shetty *et al.*, 2007; Shetty *et al.*, 2008). *Xoo* là mầm bệnh ký sinh trong mô sống, do đó khi bị tấn công, cây lúa có những cơ chế nhận ra sự tấn công của mầm bệnh để hoạt hóa tín hiệu SA.

Sự xuất hiện các nhóm có hoạt tính oxy hóa trong cây góp phần giới hạn sự phát triển của mầm bệnh, trong đó  $H_2O_2$  tham gia vào một phần của sự lignin, suberrin và cấu thành khác của vách tế bào, kích thích các gen có liên quan đến sự bảo vệ, kích thích tổng hợp phytoalexin gây độc cho mầm bệnh (van Loon *et al.*, 1998; Shetty *et al.*, 2008). Tuy nhiên, nếu nhóm có hoạt tính oxy hóa này sinh ra cao, có thể gây độc cho tế bào. Do vậy, để giữ được trạng thái cân bằng trong tế bào thực vật nên cơ chế giải độc được hoạt hóa cùng lúc với sự gia tăng các nhóm có

tính oxy hóa cao, trong đó hai enzyme CAT và PO tham gia tích cực vào quá trình phân giải  $H_2O_2$  trong tế bào (Govindappa *et al.*, 2011; Nisha *et al.*, 2012; Khoa *et al.*, 2017).

Kết quả, ở nghiệm thức phun nước, có chủng bệnh của hai thí nghiệm khảo sát enzyme CAT và PO đều có chiều hướng gia tăng hoạt tính từ thời điểm 1 ngày đến 7 NSCB; từ kết quả trên cho thấy chính mầm bệnh là vi khuẩn *Xoo* có khả năng kích thích tính kháng bệnh của cây lúa sau khi được chủng bệnh nhân tạo. Tuy nhiên, tính kháng bệnh tự nhiên của cây lúa là chưa đủ để ngăn cản sự phát triển của mầm bệnh do vậy cần phải có một phương pháp kích thích tính kháng của cây lúa phù hợp để khả năng kháng được hoạt hóa ở thời điểm đúng lúc và đủ mạnh để giúp cây lúa ngăn chặn sự xâm nhiễm và phát triển của mầm bệnh.

Nếu so sánh hoạt tính của CAT và PO của cùng nghiệm thức phun dịch trích thì cả hai enzyme đều bị ức chế ở thời điểm từ 4 ngày đến 5 NSCB. Tuy nhiên, điểm khác nhau là ở enzyme PO bị ức chế mạnh đến thời điểm 7 NSCB, trong khi đó hoạt

tính enzyme CAT lại có chiều hướng gia tăng trở lại ở thời điểm 5 NSCB. Tóm lại, phun qua lá với dịch trích Cỏ hôi có chủng bệnh có khả năng kích thích cây lúa hoạt hóa enzyme CAT và PO cao hơn so với nghiệm thức phun nước.

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã khảo sát được khả năng làm giảm bệnh bạc lá của dịch trích lá Cỏ hôi thông qua phương pháp phun qua lá trước chủng bệnh, trong đó tuyển chọn được nồng độ dịch trích 1% được phun tại hai thời điểm 14 và 7 NTCB là nồng độ thấp nhất nhưng vẫn thể hiện hiệu quả giảm bệnh ổn định đến 21 NSCB. Cơ chế kích kháng có liên quan đến khả năng giảm bệnh bạc lá được chứng minh thông qua khảo sát hoạt tính enzyme PO và CAT. Khi được phun dịch trích Cỏ hôi, có chủng bệnh thì enzyme PO tăng liên tục từ thời điểm 0 đến 6 NSCB, sau đó giảm ở 7 NSCB; trong khi đó, enzyme CAT tăng mạnh từ 0 đến 4 NSCB, sau đó giữ ổn định ở mức cao đến 7 NSCB.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ahn, I.P., Kim, S. and Lee, Y.H., 2005. Vitamin B<sub>1</sub> functions as an activator of plant disease resistance. *Plant Physiology*, 138: 1505 - 1515.
2. Beers, R.F. and Sizer, J.R., 1951. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 195(1): 133 - 140.
3. Chithrathree, U.S., Udayashankar, A.C., ChandraNayaka, S., Reddy, M.S. and Srinivas, C., 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.
4. Cuong, C.N., Nguyen, T.Q., Kanaori, K., Binh, T.D., Dao, X.H., Vang, L.V. and Kamei, K., 2021. Antifungal Activities of *Ageratum conyzoides* L. Extract against Rice Pathogens *Pyricularia oryzae* Cavara and *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agriculture*, 11(11): 1169.
5. Dinh, H.D., Oanh, N.K., Toan, N.D., Du, P.V. and Loan, L.C., 2008. Pathotype profile of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolated from the rice ecosystem in Cuu long river delta. *Omorice*, 16: 34 - 40.
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. Hammerschmidt, R., Nuclides, E.M. and Kuć, J., 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology*, 20(1): 73 - 82.
8. Hop, D.V., Hoa, P.T.P., Quang, N.D., Ton, P.H., Ha, T.H., Hung, N.V., Van, N.T., Hai, T.V., Quy, N.T.K., Dao, N.T.A and Thom, V.T., 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.
9. Kagale, S., Marimuthu, T., Thayumanavan, B., Nandakumar, R. and Samiyappan, R., 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.
10. Karganilla, A.D., Paris-Natural, M. and Ou, S.H., 1973. A comparative study of culture media for *Xanthomonas oryzae*. *The Philipp. Agric.*, 57: 141 - 152.
11. Khan, J.A., Siddiq, R., Arshad, H.M.A., Anwar, H.S., Saleem, K. and Jamil, F.F., 2012. Chemical control of bacterial leaf blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Pakitsan Journal of Phytopathology*, 24: 97 - 100.

12. Khoa N.Đ., Xa, T.V., 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.
13. 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.
14. Khoa, N.D., Tuan, T.Q., Giao, N.D.N., 2016. Effects of *Serratia nematodiphila* CT-78 on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control*, 103: 1 - 10.
15. Khoa, N.D., 2005. Effect of single resistance genes and their pyramid on the diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* population under field conditions as revealed by insertion sequence-polymerase chain reaction (IS - PCR). MSc Thesis. University of the Philippines Los Baños, 105 pages.
16. Khoa, N.D., Thuy, P.T.H., Thuy, T.T., Collinge, D.B. and Jørgensen, H.J.L., 2011. Disease-reducing effect of *Chromolaena odorata* extract on sheath blight and other rice diseases. *Phytopathology*, 101(2): 231 - 240.
17. Kloepper, J.W., Tuzun, S. and Kuć, J.A., 1992. Propose definitions relates to induced disease resistance. *Biocontrol Science and Technology*, 2: 349 - 351.
18. Lingaiah, S. and Umesha, S., 2013. *Pseudomonas fluorescens* inhibits the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen in rice. *Canadian Journal of Plant Protection*, 1: 147 - 153.
19. Mew, T.W., Alvarez, A.M., Leach, J.E. and Swings, J., 1993. Focus on bacterial blight of rice. *Plant disease*, 77:5 - 12.
20. Mohan Babu, R., Sajeena, A., Vijaya Samundeeswari, A., Sreedhar, A., Vidhyasekeran, P. and Reddy, M.S., 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.
21. Mohan Babu, R., Sajeena, A., Vijaya Samundeeswari, A., Sreedhar, A., Vidhyasekeran, P., Seetharaman, K. and Reddy, M.S., 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.
22. 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).
23. Nguyễn Thị Thu Hương, Lâm Tấn Hào và 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.
24. Niño-Liu, D.O., Ronald, P.C. and Bogdanove, A.J., 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogen of a model crop. *Molecular plant pathology*, 7(5): 303 - 324.
25. Nisha, S., Revathi, K., Chandrasekaran, R., Kirubakaran, S.A., Sathish-Narayanan, S., Stout, M.J. and Senthil-Nathan, S., 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.
26. Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., Murr, D.P. and Watkins, C.B., 1997. Influence of salicylic acid on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, oxidative stress, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - metabolizing enzymes (Salicylic acid-mediated oxidative damage requires H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). *Plant Physiology*, 115: 137 - 149.
27. Shetty, N.P., Jørgensen, H.J.L., Jensen, J.D., Collinge, D.B. and Shekar Shetty, H., 2008. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 267 - 280.
28. Shetty, N.P., Mehrabi, R., Lütken, H., Haldrup, A., Kema, G.H., Collinge, D.B.

- and Jørgensen, H.J.L., 2007. Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytologist*, 174: 637 - 647.
29. Suryadi, Y., Susilowati, D.N., Priyatno, T.P., Samudra, I.M., Kadir, T.S. and Mubarik, N.R., 2013. Prospect of Using Bacterial Bioformulation to Suppress Bacterial Leaf Blight of Rice: A Case Study in Cianjur, West Java. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*, 32: 83 - 90.
30. Swings, J., van Denmooter, M., Vauterin, L., Hoste, B., Gillis, M., Mew, T.W. and Kersters, K., 1990. Reclassification of the Causal Agents of Bacterial Blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and Bacterial Leaf Streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of Rice as Pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp.nov., nom.rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40: 309 - 311.
31. Trần Thị Thu Thủy và Hans Jorgen Lyng Jorgensen, 2016. Quản lý bệnh hại lúa bằng dịch trích thực vật. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 111 - 119.
32. Trương Văn Xạ và Nguyễn Đắc Khoa, 2020. Tuyển chọn dịch trích thực vật có khả năng giúp giảm bệnh bạc lá lúa (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). Kỷ yếu Hội thảo Quốc gia Bệnh hại Thực vật Việt Nam lần thứ 19 năm 2020. Trang 384 - 395.
33. Trương Văn Xạ và Nguyễn Đắc Khoa, 2021. Hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) của các loài dịch trích thực vật bản địa tại đồng bằng sông Cửu Long. Kỷ yếu Hội thảo Quốc gia Bệnh hại Thực vật Việt Nam năm 2021. Trang 407 - 418.
34. van Loon, L.C, Bakker, P.A. and Peiterse, C.M., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 453 - 483.
35. Zhang, F., Zhuo, D.L., Zhang, F., Huang, L.Y., Wang, W.S., Xu, J.L., Vera Cruz, C., Li, Z.K. and Zhou, Y.L., 2015. *Xa39*, a novel dominant gene conferring broad-spectrum resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Plant Pathology*, 64: 568 - 575.

## ABSTRACT

### Disease-reducing effects and induced resistance against rice bacterial leaf blight of aqueous leaf extracts of *Chromolaena odorata* using foliar spraying

*This study aimed at testing for the disease-reducing effects and induced resistance involving the activities of peroxidase (PO) and catalase (CAT) against rice bacterial leaf blight of aqueous leaf extracts of Chromolaena odorata using foliar spraying. Five concentrations of the extract were tested, i.e., 1, 2, 3, 4 and 5% (w/v). These extracts were sprayed at 14 days before inoculation (DBI), 7 DBI and the combination of them. The disease-reducing effects were assessed using lesion lengths measured at 7, 14 and 21 days after inoculation (DAI). Spraying the 3% and 5% extracts at either 14 or 7 DBI showed the effects until 21 DAI where the 5% extract showed similar effect compared to that of the chemical control. All concentrations tested showed stronger effects than that of the negative control when they were sprayed in the combination of 14 and 7 DBI. Induced resistance involved in the observed effects as the activities of PO continuously increased from 0 to 6 DAI but decreased at 7 DAI while that of CAT increased from 0 to 4 DAI and maintained until 7 DAI.*

**Keywords:** Bacterial leaf blight, *Chromolaena odorata*, induced resistance, rice, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

# XÁC ĐỊNH VÀ KHAI THÁC BIỂU HIỆN CỦA NHÓM GENE MÃ HÓA NHÂN TỐ PHIÊN MÃ GATA LIÊN QUAN ĐẾN BỆNH SỌC NÂU VIRUS Ở CÂY SẮN (*Manihot esculenta*) BẰNG CÔNG CỤ TIN SINH HỌC

Trần Văn Tiến<sup>1</sup>, Lê Hoàng Phương<sup>2</sup>,  
La Việt Hồng<sup>2</sup>, Lưu Thế Long<sup>3</sup>, Trịnh Thị Thu Thủy<sup>3</sup>,  
Nguyễn Quốc Trung<sup>3</sup>, Chu Đức Hà<sup>4\*</sup>, Lê Huy Hàm<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Học viện Hành chính Quốc gia

<sup>2</sup> Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

<sup>3</sup> Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>4</sup> Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội

Tác giả liên hệ: cd.ha@vnu.edu.vn

## TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, thông tin về nhóm nhân tố phiên mã (TF) GATA đã được báo cáo trên cây sắn (*Manihot esculenta*) bằng cách tiếp cận tin sinh học. Cụ thể, tổng số 36 thành viên của họ TF GATA đã được xác định trong dữ liệu genome của cây sắn. Theo đó, phân tích vùng promoter cho thấy các yếu tố điều hòa cis-đáp ứng với jasmonic acid (JA), như CGTCA-motif và TGACG-motif phân bố ở phần lớn các gene mã hóa TF GATA. Đáng chú ý, khai thác dữ liệu biểu hiện cho thấy 5 gene mã hóa TF GATA có xu hướng kìm hãm phiên mã ở mẫu lá lây nhiễm với bệnh sọc nâu virus (CBSD). Trong đó, 3 gene, bao gồm MeGATA25, 27 và 33 được xác định là đáp ứng với điều kiện lây nhiễm bệnh sọc nâu virus theo con đường tín hiệu JA. Kết quả của nghiên cứu này đã cung cấp những dẫn liệu quan trọng cho phân tích chức năng gene mã hóa TF GATA liên quan đến cơ chế phản ứng với CBSD ở cây sắn.

**Từ khóa:** GATA, nhân tố phiên mã, sắn, sọc nâu virus, tin sinh học.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, cây trồng phải đối mặt với nhiều yếu tố ngoại cảnh bất thuận và sâu bệnh hại do biến đổi khí hậu. Để thích ứng với những điều kiện này, cây trồng đã phát triển nhiều cơ chế thích nghi

thông qua sự tham gia của hàng loạt nhóm protein chức năng (functional protein) và protein điều hòa (regulatory protein). Trong đó, các họ nhân tố phiên mã (transcription factor, TF) là một trong những nhóm protein điều hòa quan trọng, tham gia vào kiểm soát phiên mã để điều hòa biểu hiện các gen chức năng. Bên cạnh các họ TF đặc trưng cho thực vật,

Người phân biện: TS. Bùi Thị Thu Hương

như Nuclear factor-Y, Ethylene responsive factor và Basic helix-loop-helix, GATA được báo cáo là họ motif ngón tay kẽm (zinc finger motif) loại IV, xuất hiện ở hầu hết các loài thực vật. Đặc trưng bởi vùng trình tự  $CX_2X_{17} - 2^{\circ}CX_2C$ , họ TF GATA liên kết đặc hiệu vào đoạn trình tự WGATAR để điều hòa biểu hiện gene, từ đó tham gia vào hàng loạt quá trình sinh lý xảy ra trong tế bào, đặc biệt là liên quan đến cơ chế kháng sâu bệnh hại (Shapira *et al.*, 2006). Do vậy, nghiên cứu về họ TF GATA có thể cung cấp những dẫn liệu quan trọng để làm rõ về tính kháng bệnh ở thực vật.

Đến nay, họ TF GATA đã được nghiên cứu trên một số loài thực vật, như *Arabidopsis thaliana* (Teakle *et al.*, 2002), lúa gạo (*Oryza sativa*) (Reyes *et al.*, 2004) và đậu gà (*Cicer arietinum*) (Niu *et al.*, 2020). Tuy nhiên, chưa có công bố đề cập đến phân tích các gen mã hóa cho nhóm TF GATA ở cây sắn (*Manihot esculenta*), một trong số cây trồng nhiệt đới quan trọng (Bredeson *et al.*, 2016). Sắn có thể được sử dụng làm lương thực, nguyên liệu cho chế biến thức ăn chăn nuôi và sản xuất nhiên liệu sinh học (Malik *et al.*, 2020). Tuy nhiên, canh tác sắn hiện nay đang chịu ảnh hưởng từ rất nhiều tác nhân gây bệnh, điển hình như bệnh sọc nâu virus (Cassava Brown Streak Disease, CBSD) gây ra bởi chi Ipomovirus thuộc họ Potyviridae (Tomlinson *et al.*, 2018). Do vậy, tìm hiểu về cơ chế đáp ứng với CBSD thông qua vai trò của nhóm TF GATA.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định nhóm TF GATA ở cây sắn bằng công cụ tin sinh học. Cụ thể, số lượng

thành viên của nhóm TF GATA đã được xác định. Sau đó, vùng promoter của các gene mã hóa TF GATA đã được phân tích nhằm khai thác yếu tố điều hòa *cis*- (*cis*-regulatory element, CRE) đáp ứng với hormone. Cuối cùng, dữ liệu biểu hiện của các gene mã hóa TF GATA đã được khai thác trong điều kiện lây nhiễm CBSD.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hệ tham chiếu, bao gồm dữ liệu genome và proteome của cây sắn mô tả trong nghiên cứu trước đây (Bredeson *et al.*, 2016) được cung cấp trên NCBI và Phytozome (Goodstein *et al.*, 2012).

Dữ liệu transcriptome ở mẫu lá sắn trong điều kiện lây nhiễm CBSD (mã thông tin: GSE56467) (Maruthi *et al.*, 2014) được khai thác trên GEO NCBI (Barrett *et al.*, 2013).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp xác định nhóm GATA: Trình tự protein đầy đủ của nhóm GATA ở cây *A. thaliana* (Teakle *et al.*, 2002), lúa gạo (Reyes *et al.*, 2004) và đậu gà (Niu *et al.*, 2020) được sử dụng để truy vấn trên genome và proteome của cây sắn (Bredeson *et al.*, 2016) bằng thuật toán BlastP dựa theo mô tả trong nghiên cứu trước đây (Niu *et al.*, 2020). Kết quả sàng lọc ( $E\text{-value} \leq 1e-10$ ) được sử dụng để khai thác thông tin định danh, bao gồm dữ liệu về mã định danh gene (GeneID), protein (ProteinID) và locus (LocusID). Trình tự gene và protein được thu thập cho phân tích *in silico* tiếp theo.

- Phương pháp phân tích vùng promoter của gene mã hóa nhóm GATA: Đoạn trình tự 1000bp trước vị trí mã mở đầu được khai thác từ dữ liệu genome của cây sắn (Bredeson *et al.*, 2016) để phân tích CRE theo mô tả trong nghiên cứu trước đây (Niu *et al.*, 2020). Cụ thể, CRE liên quan đến con đường tín hiệu jasmonic acid (JA), bao gồm CGTCA-motif và TGACG-motif được sàng lọc trên vùng promoter của gene bằng PlantCARE (Lescot *et al.*, 2002).

- Phương pháp khai thác dữ liệu biểu hiện gene mã hóa nhóm GATA: Mức độ biểu hiện của các gene mã hóa nhóm GATA được phân tích trên GEO NCBI (Barrett *et al.*, 2013). Cụ thể, dữ liệu RNA-Seq ở mẫu lá sắn trong điều kiện lây nhiễm bệnh CBSD (mã thông tin: GSE56467) (Maruthi *et al.*, 2014) được khai thác. Theo đó, mức độ biểu hiện của gene mã hóa nhóm TF GATA,

thể hiện bằng giá trị fold-change được tính toán bằng tỷ lệ giữa giá trị FPKM (fragments per kilobase of exon per million mapped fragments) của gene tương ứng ở mẫu lá lây nhiễm virus so với mẫu lá đối chứng.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Xác định nhóm nhân tố phiên mã GATA ở cây sắn

Để xác định nhóm TF GATA ở cây sắn, thuật toán BlastP đã được sử dụng để đối chiếu trình tự của nhóm GATA đã biết trên cây *A. thaliana* (Teakle *et al.*, 2002) và đậu gà (Niu *et al.*, 2020) vào proteome của cây sắn (Bredeson *et al.*, 2016). Kết quả đã xác định được tổng số 36 thành viên của nhóm TF GATA ở cây sắn. Theo đó, thông tin về các mã định danh của nhóm TF GATA được cung cấp ở bảng 1.

**Bảng 1. Thông tin về nhóm TF GATA ở cây sắn**

| STT | Tên gene        | GeneID          | ProteinID    | LocusID      | CGTCA-motif | TGACG-motif |
|-----|-----------------|-----------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| 1   | <i>MeGATA01</i> | Manes.01G224400 | XP_021629041 | LOC110627103 |             |             |
| 2   | <i>MeGATA02</i> | Manes.01G135900 | XP_021629602 | LOC110627559 |             |             |
| 3   | <i>MeGATA03</i> | Manes.01G087500 | XP_021632304 | LOC110629577 |             |             |
| 4   | <i>MeGATA04</i> | Manes.02G044400 | XP_021604406 | LOC110609260 | 1           |             |
| 5   | <i>MeGATA05</i> | Manes.02G099500 | XP_021602140 | LOC110607359 |             | 2           |
| 6   | <i>MeGATA06</i> | Manes.02G094300 | XP_043809693 | LOC110608738 |             |             |
| 7   | <i>MeGATA07</i> | Manes.03G201300 | XP_021606393 | LOC110610666 | 1           |             |
| 8   | <i>MeGATA08</i> | Manes.03G154500 | XP_021607545 | LOC110611478 |             | 1           |
| 9   | <i>MeGATA09</i> | Manes.03G059100 | XP_021608919 | LOC110612438 | 1           |             |
| 10  | <i>MeGATA10</i> | Manes.03G047800 | XP_021606819 | LOC110611028 |             |             |
| 11  | <i>MeGATA11</i> | Manes.03G033200 | XP_021606592 | LOC110610821 |             |             |
| 12  | <i>MeGATA12</i> | Manes.04G132800 | XP_021611068 | LOC110613946 |             | 1           |
| 13  | <i>MeGATA13</i> | Manes.04G084400 | XP_021611192 | LOC110614052 |             | 3           |
| 14  | <i>MeGATA14</i> | Manes.05G189600 | XP_021613255 | LOC110615597 |             |             |

| STT | Tên gene        | GeneID          | ProteinID    | LocusID      | CGTCA-motif | TGACG-motif |
|-----|-----------------|-----------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| 15  | <i>MeGATA15</i> | Manes.05G189500 | XP_021612757 | LOC110615272 |             |             |
| 16  | <i>MeGATA16</i> | Manes.05G050300 | XP_021612232 | LOC110614856 | 1           |             |
| 17  | <i>MeGATA17</i> | Manes.07G041300 | XP_021618775 | LOC110619573 | 1           | 1           |
| 18  | <i>MeGATA18</i> | Manes.07G041200 | XP_021618597 | LOC110619452 |             |             |
| 19  | <i>MeGATA19</i> | Manes.07G076400 | XP_021617953 | LOC110618997 |             |             |
| 20  | <i>MeGATA20</i> | Manes.07G099600 | XP_021619011 | LOC110619771 |             |             |
| 21  | <i>MeGATA21</i> | Manes.08G113300 | XP_043815608 | LOC110622414 | 1           | 1           |
| 22  | <i>MeGATA22</i> | Manes.08G149300 | XP_021620703 | LOC110621019 |             |             |
| 23  | <i>MeGATA23</i> | Manes.09G174900 | XP_021622601 | LOC110622414 | 2           |             |
| 24  | <i>MeGATA24</i> | Manes.09G142600 | XP_021622844 | LOC110622593 | 1           | 1           |
| 25  | <i>MeGATA25</i> | Manes.10G046800 | XP_021626300 | LOC110625083 |             | 1           |
| 26  | <i>MeGATA26</i> | Manes.10G097400 | XP_021626705 | LOC110625382 |             |             |
| 27  | <i>MeGATA27</i> | Manes.11G146600 | XP_021628794 | LOC110626916 | 1           | 1           |
| 28  | <i>MeGATA28</i> | Manes.11G034900 | XP_021628890 | LOC110626985 |             |             |
| 29  | <i>MeGATA29</i> | Manes.15G007100 | XP_021593720 | LOC110601041 | 1           |             |
| 30  | <i>MeGATA30</i> | Manes.15G103300 | XP_021595107 | LOC110601984 |             |             |
| 31  | <i>MeGATA31</i> | Manes.15G049400 | XP_021595256 | LOC110602133 |             | 1           |
| 32  | <i>MeGATA32</i> | Manes.16G080400 | XP_021596891 | LOC110603465 |             |             |
| 33  | <i>MeGATA33</i> | Manes.16G074900 | XP_021596902 | LOC110603472 | 2           |             |
| 34  | <i>MeGATA34</i> | Manes.16G102600 | XP_021596550 | LOC110603163 | 1           | 1           |
| 35  | <i>MeGATA35</i> | Manes.18G056300 | XP_021601748 | LOC110607013 | 1           | 1           |
| 36  | <i>MeGATA36</i> | Manes.18G056400 | XP_021601389 | LOC110606735 |             |             |

Trong nghiên cứu trước đây, nhóm TF GATA cũng đã được ghi nhận ở một số đối tượng thực vật. Ví dụ, tổng số 29 và 28 thành viên của nhóm TF GATA đã lần lượt được báo cáo ở cây *A. thaliana* và lúa gạo (Reyes *et al.*, 2004). Gần đây, nhóm TF GATA với 25 thành viên cũng đã được nghiên cứu trên cây đậu gà (Niu *et al.*, 2020). Trong nghiên cứu này, 36 thành viên đã được ghi nhận trong nhóm TF GATA ở cây sắn. Các so sánh này đã chứng tỏ rằng nhóm TF GATA ở thực vật là nhóm đa gen với số lượng thành viên đa dạng giữa các loài thực vật khác nhau.

### 3.2. Phân tích vùng promoter của gene mã hóa nhân tố phiên mã GATA ở cây sắn

Để phân tích vùng promoter của các gene mã hóa TF GATA ở cây sắn, 2 CRE liên quan đến con đường tín hiệu JA, bao gồm CGTCA-motif và TGACG-motif (Lescot *et al.*, 2002) đã được khai thác. Kết quả cho thấy 19 trên tổng số 36 gene mã hóa TF GATA ở cây sắn có vùng promoter chứa ít nhất 1 CRE đáp ứng với con đường tín hiệu JA (bảng 1). Cụ thể, vùng promoter của gene *MeGATA13* chứa nhiều CRE đáp ứng với JA nhất,

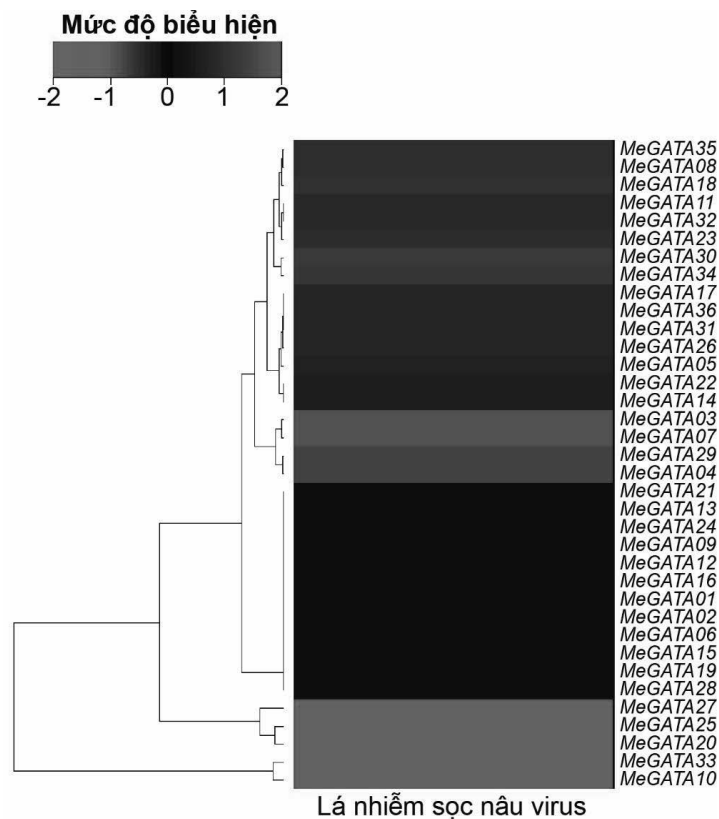
tương ứng với 3 yếu tố, trong khi 9 gene có vùng promoter chứa 2 CRE đáp ứng với JA và các gene còn lại có vùng promoter chỉ chứa 1 CRE đáp ứng với JA (bảng 1). Như vậy, sự có mặt của hai yếu tố, CGTCA-motif và TGACG-motif trên vùng promoter của 19 gene mã hóa TF GATA đã chỉ ra rằng sự biểu hiện của các gene này có thể phụ thuộc vào con đường tín hiệu JA (Jaemthaworn *et al.*, 2021).

### 3.3. Phân tích biểu hiện của gene mã hóa nhân tố phiên mã GATA ở cây sắn

Trong nghiên cứu này, mức độ biểu hiện của nhóm gene mã hóa GATA được phân tích dựa trên khai thác dữ liệu RNA-Seq ở mẫu lá sắn trong điều kiện lây nhiễm bệnh CBSD (Maruthi *et al.*, 2014).

Kết quả phân tích mức độ biểu hiện của nhóm gene mã hóa TF GATA, thể hiện bằng giá trị fold-change được thể hiện ở hình 1.

Kết quả đã xác định được 5 gene, lần lượt là *MeGATA10*, *20*, *25*, *27* và *33* bị kìm hãm biểu hiện ở mô lá lây nhiễm bệnh CBSD (hình 1). Trong đó, gene *MeGATA10* có mức độ biểu hiện bị giảm mạnh nhất, tương ứng -9,8 - fold (hình 1). Đặc biệt, 3 gene, bao gồm *MeGATA25*, *27* và *33* có mức độ biểu hiện đáp ứng ở mô lá lây nhiễm bệnh CBSD (hình 1), trong khi vùng promoter của các gene này chứa CRE đáp ứng tín hiệu JA (bảng 1), chứng tỏ rằng các gene này có thể tham gia vào cơ chế đáp ứng bệnh thông qua con đường tín hiệu JA.



Hình 1. Mức độ biểu hiện của các gene mã hóa nhân tố phiên mã GATA ở mẫu lá nhiễm CBSD ở cây sắn

Đến nay, rất ít các thông tin được ghi nhận về chức năng của các gene liên quan đến kháng CBSD ở cây sắn. Phân tích RNA-Seq cho thấy một số nhóm gene mã hóa TF và nhóm protein tham gia vào sinh tổng hợp phenylpropanoid và terpenoid được điều hòa bởi tín hiệu JA và có mức độ phiên mã đáp ứng ở các cây sắn kháng CBSD (Tomlinson *et al.*, 2018). and steroid secondary metabolites (Maruthi *et al.*, 2014). Đáng chú ý, ở các loài thực vật khác, con đường tín hiệu JA cũng được cho là liên quan đến việc kiểm soát sự biểu hiện của các gene tham gia vào cơ chế đáp ứng stress sinh học.

#### 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Đã xác định được 36 thành viên của nhóm TF GATA ở cây sắn. Trong đó, vùng promoter của 19 gene mã hóa TF GATA có chứa ít nhất một nhóm CRE đáp ứng với JA. Nghiên cứu đã xác định được 3 gene cảm ứng với JA, *MeGATA25*, 27 và 33 có mức độ biểu hiện đáp ứng ở mô lá lây nhiễm CBSD.

Nghiên cứu này sẽ được tiếp tục nhằm khai thác biểu hiện của các gene mã hóa TF GATA trong các dữ liệu microarray liên quan để xử lý stress sinh học ở cây sắn.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barrett T., Wilhite S. E., Ledoux P., Evangelista C., Kim I. F., Tomashevsky M., Marshall K. A., Phillippy K. H., Sherman P. M., Holko M., Yefanov A., Lee H., Zhang N., Robertson C. L., Serova N., Davis S. & Soboleva A., 2013. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue): D991 - 5.
2. Bredeson J. V., Lyons J. B., Prochnik S. E., Wu G. A., Ha C. M., Edsinger-Gonzales E., Grimwood J., Schmutz J., Rabbi I. Y., Egesi C., Nauluvula P., Lebot V., Ndunguru J., Mkamilo G., Bart R. S., Setter T. L., Gleadow R. M., Kulakow P., Ferguson M. E., Rounsley S. & Rokhsar D. S., 2016. Sequencing wild and cultivated cassava and related species reveals extensive interspecific hybridization and genetic diversity. *Nat Biotechnol.* 34(5): 562 - 70.
3. Goodstein D. M., Shu S., Howson R., Neupane R., Hayes R. D., Fazo J., Mitros T., Dirks W., Hellsten U., Putnam N. & Rokhsar D. S., 2012. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* 40(Database issue): D1178 - D1186.
4. Jaemthaworn T., Kalapanulak S. & Saithong T., 2021. Topological clustering of regulatory genes confers pathogenic tolerance to cassava brown streak virus (CBSV) in cassava. *Sci Rep.* 11(1): 7872.
5. Lescot M., Déhais P., Thijs G., Marchal K., Moreau Y., Van de Peer Y., Rouzé P. & Rombauts S., 2002. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 30(1): 325 - 327.
6. Malik A. I., Kongsil P., Nguyễn V. A., Ou W., Sholihin, Srean P., Sheela M. N., Becerra López-Lavalle L. A., Utsumi Y., Lu C., Kittipadukul P., Nguyễn H. H., Ceballos H., Nguyễn T. H., Selvaraj Gomez M., Aiemnaka P., Labarta R., Chen S., Amawan S., Sok S., Youabee L., Seki M., Tokunaga H., Wang W., Li K., Nguyễn H. A., Nguyễn V. Đ., Hàm L. H. & Ishitani M., 2020. Cassava breeding and agronomy in Asia: 50 years of history and future directions. *Breed Sci. advpub*(2): 145 - 166.
7. Maruthi M. N., Bouvaine S., Tufan H. A., Mohammed I. U. & Hillocks R. J., 2014. Transcriptional response of virus-infected cassava and identification of putative sources of resistance for cassava brown streak disease. *PLoS One.* 9(5): e96642.

8. Niu L., Chu H. D., Tran C. D., Nguyen K. H., Pham H. X., Le D. T., Li W., Wang W., Le T. D. & Tran L.-S. P., 2020. The GATA gene family in chickpea: Structure analysis and transcriptional responses to abscisic acid and dehydration treatments revealed potential genes involved in drought adaptation. *J Plant Growth Reg.* 39(4): 1647 - 1660.
9. Reyes J. C., Muro-Pastor M. I. & Florencio F. J., 2004. The GATA family of transcription factors in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol.* 134(4): 1718 - 32.
10. Shapira M., Hamlin B. J., Rong J., Chen K., Ronen M. & Tan M.-W., 2006. A conserved role for a GATA transcription factor in regulating epithelial innate immune responses. *Proceed Nat Acad Sci.* 103(38): 14086 - 14091.
11. Teakle G. R., Manfield I. W., Graham J. F. & Gilmartin P. M., 2002. Arabidopsis thaliana GATA factors: organisation, expression and DNA-binding characteristics. *Plant Mol Biol.* 50(1): 43 - 57.
12. Tomlinson K. R., Bailey A. M., Alicai T., Seal S. & Foster G. D., 2018. Cassava brown streak disease: historical timeline, current knowledge and future prospects. *Mol Plant Pathol.* 19(5): 1282 - 1294.

## ABSTRACT

### **Identification and expression analysis of the gata transcription factor gene family related to the cassava brown streak disease in cassava (*Manihot esculenta*) by bioinformatics approach**

*In this study, the comprehensive foundation of the GATA transcription factor (TF) has been reported in cassava (Manihot esculenta) by the bioinformatics approaches. Particularly, a total of 36 members of the GATA TF has been identified in the cassava assembly. Next, our promoter analysis indicated that two jasmonic acid (JA)-responsive cis- regulatory elements, like CGTCA-motif and TGACG-motif were localized in a large number of genes encoding GATA TF. Of our interest, our re-analysis showed that 5 genes encoding GATA TF were significantly down-regulated in cassava brown streak disease (CBSD)- treated leaf samples. Among them, three genes, including MeGATA25, 27 and 33 were recorded to be responsive to CBSD via the JA signaling pathway. Taken together, our study could provide evidence for further functional characterization of genes encoding GATA TF related to the mechanism of CBSD responsiveness in the cassava.*

**Keywords:** *GATA, transcription factor, cassava, cassava brown streak disease, bioinformatics.*

# NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG CHẤT KÍCH KHÁNG CHỐNG LẠI BỆNH KHÂM LÁ SẴN TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI

Nguyễn Kim Chi<sup>1</sup>, Trần Thanh Dũng<sup>2</sup>,  
Trần Thị Ánh Tuyết<sup>1</sup>, Nguyễn Vĩnh Trường<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

<sup>2</sup>Đại học Đông Á, Đà Nẵng

## TÓM TẮT

Bệnh khảm lá sắn (do Sri Lanka Cassava Mosaic Virus) là một bệnh hại nguy hiểm. Năm 2019, bệnh khảm lá sắn đã xuất hiện tại Thừa Thiên Huế và đã gây thiệt hại cho sản xuất địa phương. Nếu không quản lý được bệnh khảm lá sắn, cây sắn sẽ khó có thể tiếp tục phát triển ở trên địa bàn tỉnh. Nghiên cứu hạn chế sự tổng hợp virus SLCMV các chất kích kháng trong điều kiện nhà lưới ở Thừa Thiên Huế cho thấy tỷ lệ nảy mầm cao nhất khi hom giống được xử lý Cruiser Plus 312.5FS (100%) và thấp nhất ở xử lý  $\text{CuCl}_2$  (50%). Các chất kích kháng có khả năng hạn chế bệnh khảm lá sắn không cao nhưng ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây sắn nên nâng cao năng suất sinh khối. Xử lý các chất kích kháng Cruiser Plus 312.5FS và Salicylic acid cho cây sắn có thể giúp cây phát triển mạnh chống lại bệnh khảm lá.

**Từ khóa:** Cây sắn, Cruiser Plus, salicylic acid, Sri Lanka Cassava Mosaic Virus.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sắn (*Manihot esculenta* Crantz) là cây lương thực, thực phẩm, thức ăn gia súc, chế biến tinh bột, cây nguyên liệu chính để chế biến nhiên liệu sinh học có lợi thế cạnh tranh cao của nhiều nước trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Năm 2020, toàn thế giới có 100 nước trồng sắn với tổng diện tích đạt 28,24 triệu ha, năng suất củ tươi bình quân 10,71 tấn/ha, sản

lượng 302,66 triệu tấn (FAO, 2022). Ở Việt Nam, sắn là cây lương thực quan trọng có sản lượng đứng thứ ba sau lúa và ngô. Năm 2020, diện tích sắn cả nước đạt 560 ngàn ha, sản lượng 10,00 triệu tấn, đạt giá trị 1011,8 triệu USD (Tổng cục Thống kê, 2021).

Bệnh khảm lá sắn (CMD) là một bệnh hại nguy hiểm do Sri Lanka Cassava Mosaic Virus (SLCMV) gây ra (Minato *et al.*, 2019). Bệnh có khả năng phát tán và lây lan nhanh chóng qua môi giới

Người phân biện: TS. Nguyễn Thị Thu Thủy

truyền bệnh là bộ phận trắng và qua hom giống. Kể từ khi CMD lần đầu tiên được mô tả ở Tanzania vào năm 1894, bệnh hiện nay đã lan rộng và phổ biến hầu hết ở các nước trồng sắn (Rey *et al.*, 2017). Năm 2015 bệnh ghi nhận ở Campuchia và sau đó ở Tây Ninh, Việt Nam và Sri Lanka Cassava Mosaic Virus (SLCMV) được xác định là nguyên nhân gây bệnh (Minato *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2016). Năm 2019, bệnh đã gây hại nghiêm trọng ở các tỉnh thuộc Đông Nam Bộ, Duyên hải Nam Trung Bộ và Tây Nguyên, Bắc Trung Bộ với diện tích trên 32.000ha (Uke *et al.*, 2018; Viện Bảo vệ thực vật, 2019). Tại Bắc Trung Bộ, bệnh khám lá sắn đã xuất hiện tại Thừa Thiên Huế vào tháng 4/2019 (Viện Bảo vệ thực vật, 2019). Tính đến tháng 4/2021 đã có 1070ha/3557ha bị nhiễm CMD. Bệnh gây hại chủ yếu ở Phong Điền, Hương Trà và A Lưới do người dân đã sử dụng nguồn giống bị nhiễm SLCMV từ các nơi khác đem về trồng (UBND tỉnh Thừa Thiên Huế, 2021). Nếu không quản lý được bệnh khám lá sắn, cây sắn sẽ khó có thể tiếp tục phát triển ở trên địa bàn tỉnh. Tuy nhiên, nếu không trồng sắn ở các vùng đất cát bạt màu, thì đất đai ở đây chỉ có bỏ hoang vì khó có cây trồng nào có thể phát triển được ở đất cát và mang lại hiệu quả kinh tế cao như cây sắn, như vậy nông dân sẽ mất đi sinh kế, ngành công nghiệp sắn của tỉnh sẽ phải rất nhiều khó khăn. Vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu xác định các loại thuốc có thể hạn chế sự tổng hợp virus SLCMV trong nhà lưới ở Thừa Thiên Huế nhằm kịp thời phục vụ sản xuất sắn của địa phương.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Chậu nhựa, hom giống sắn KM94 và HN5, lồng lưới, túi thu mẫu, các thuốc trừ bệnh và hoạt chất END- BYE, SAT 4SL, NINGNA STAR 80SL, Cruiser Plus 312.5FS, CuCl<sub>2</sub>, SA. Cân khối lượng hom sắn và cây sắn bằng cân Nhơn Hòa có độ sai lệch 5g trước trồng để đảm bảo các hom giống có khối lượng tương đồng nhau.

### 2.2. Phương pháp

**Chuẩn bị nguồn hom giống sạch bệnh phục vụ nghiên cứu:** Nghiên cứu được tiến hành từ 24/1 đến 30/05/2022 tại nhà lưới và phòng thí nghiệm Bộ môn Bảo vệ thực vật, Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế. Hom không bị nhiễm bệnh của các giống được thu từ đồng ruộng nơi chưa bị nhiễm bệnh khám lá sắn, sau đó trồng cây trong nhà lưới và cách ly côn trùng bằng cách bao cây lại với vải màn.

**Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm gồm 8 công thức (bảng 1) được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên, 4 lần nhắc lại, mỗi ô thí nghiệm là 3 cây, trồng 1 cây/chậu. Các hom giống được ngâm chất kích kháng trong 24 giờ sau đó đem xử lý thuốc trừ nấm Antracol 70WP trong thời gian 1 giờ, để hom khô ráo trong ngày rồi tiến hành trồng. Công thức đối chứng được ngâm nước lã.

**Bảng 1. Các công thức xử lý hom giống bằng các hóa chất**

| Công thức | Nội dung thực hiện                         | Giống sản | Ghi chú    |
|-----------|--|-----------|------------|
| CT1       | Không xử lý hóa chất, hom nhiễm bệnh       | KM94      | Nhiễm bệnh |
| CT2       | Không xử lý hóa chất, hom không nhiễm bệnh | HN5       | Kháng bệnh |
| CT3       | Xử lý END- BYE                             | KM94      | Nhiễm bệnh |
| CT4       | Xử lý SAT 4SL                              | KM94      | Nhiễm bệnh |
| CT5       | Xử lý NINGNA STAR 80SL                     | KM94      | Nhiễm bệnh |
| CT6       | Xử lý Cruiser Plus 312.5FS                 | KM94      | Nhiễm bệnh |
| CT7       | Xử lý CuCl <sub>2</sub>                    | KM94      | Nhiễm bệnh |
| CT8       | Xử lý Salicylic acid (SA)                  | KM94      | Nhiễm bệnh |

**Phương pháp và chỉ tiêu theo dõi:**

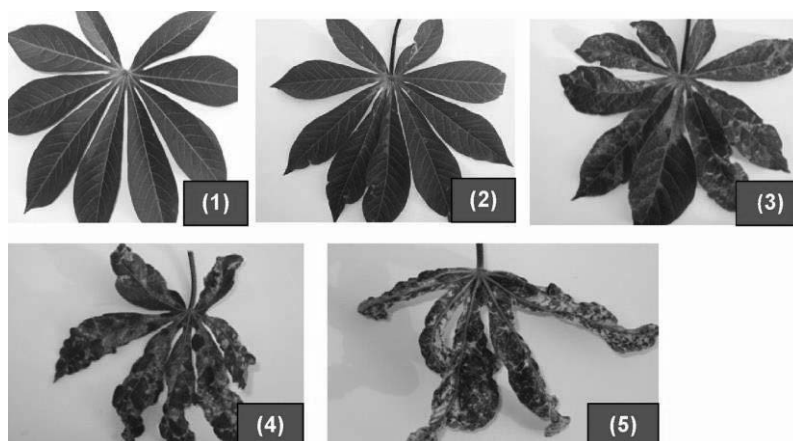
Phương pháp theo dõi thí nghiệm thực hiện theo TCVN 12561:2018 về khảo nghiệm hiệu lực sinh học của thuốc (Bộ Khoa học Công nghệ, 2018). Chỉ số bệnh được phân cấp theo Olasanmi *et al.*, (2021) (hình 1). Chỉ tiêu theo dõi: Tình hình sinh trưởng của cây trước (cân khối lượng hom trước trồng) và sau xử lý 7, 14, 21, 28 ngày, ở các giai đoạn đoạn phát triển của cây sản. Ngày xuất hiện triệu chứng bệnh, số lá nhiễm bệnh, số cây nhiễm bệnh, thời gian ủ bệnh, tỉ lệ bệnh (TLB) (%): (số cây bị bệnh/tổng số cây theo dõi) x 100, chỉ số bệnh (CSB): [(N<sub>1</sub>x1 + N<sub>2</sub>x2 +... + N<sub>5</sub>x5)/Nx5] x 100, diện tích dưới đường cong phát triển bệnh (AUDPC):

$$AUDPC = \left( \sum_{i=1}^{n-1} \left( \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) x (t_{i+1} - t_i) \right)$$

(Campbell và Madden, 1990) lá, tốc độ ra lá, chiều cao cây. Hiệu lực trừ bệnh tính theo công thức Abbott (1925):

$$H = \left( 1 - \frac{Ta}{Ca} \right) \times 100$$

(Ta: Số cây bệnh ở công thức sau khi xử lý thuốc, Ca: Số cây bệnh ở ô đối chứng sau khi xử lý thuốc). Năng suất sinh vật (tấn/ha) được tính toán bằng cân toàn bộ khối lượng thân lá của các cây thí nghiệm quy về năng suất tấn/ha.



**Hình 1. Thang phân cấp bệnh đánh giá từ 1 - 5 cho bệnh khảm lá sắn (Olasanmi *et al.*, 2021)**

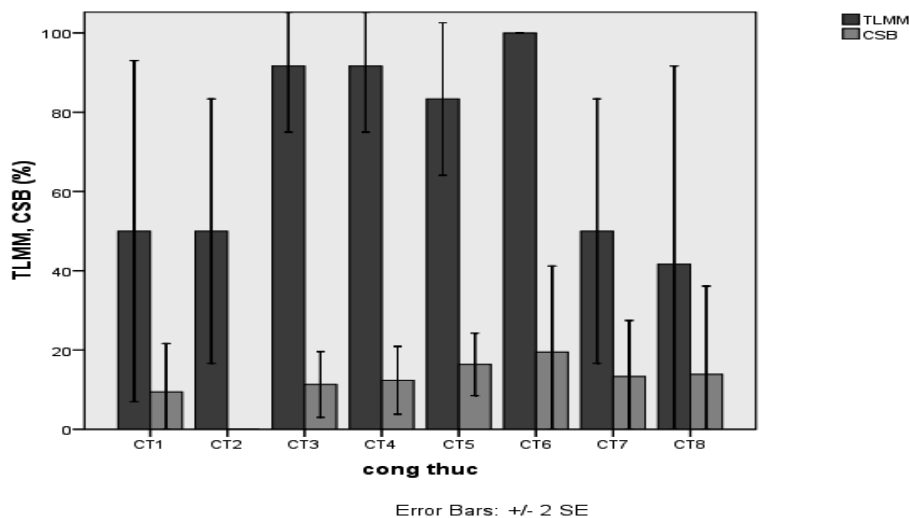
**Phương pháp xử lý số liệu:** Các số liệu tỉ lệ mọc mầm (TLMM), tỉ lệ bệnh (TLB), chỉ số bệnh (CSB), diện tích dưới đường cong phát triển bệnh (AUDPC) xử lý giá trị trung bình, phân tích sai số, T test. TLMM, TLB, CSB được chuyển đổi sang căn bậc 2 để phân tích phương sai ANOVA một nguyên tố, so sánh sự khác biệt giữa các công thức bằng Tukey test, tính tương quan giữa CSB và phần trăm giảm năng suất được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và SPSS 16.0.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Tỷ lệ mọc mầm và bệnh khảm lá sắn

Kết quả nghiên cứu về tỷ lệ mọc mầm sắn và bệnh khảm lá sắn được trình

bày ở hình 1 cho thấy tỷ lệ mọc mầm của các công thức xử lý chất kích kháng biến động rất lớn, giống KM94 được xử lý chất kích kháng vẫn bị bệnh. TLMM của các hom sắn thấp nhất là CT8 (41,67%) cao nhất là CT 6 (100%). Tuy nhiên, phân tích thống kê Tukey test không thấy có sự sai khác giữa các công thức về tỷ lệ mọc mầm. Về chỉ số bệnh của các công thức dao động từ 9,44% (CT1) - 19,47% (CT6), CT2 dùng giống sạch bệnh nên không xuất hiện triệu chứng bệnh. Phân tích thống kê Tukey test cũng cho thấy không có sự khác biệt về chỉ số bệnh giữa các công thức. Có thể kết luận rằng xử lý chất kích kháng không ảnh hưởng đến tỷ lệ mọc mầm và mức độ nhiễm bệnh khảm lá sắn.



Hình 1. Ảnh hưởng chất kích kháng đến tỉ lệ mọc mầm và bệnh khảm lá sắn

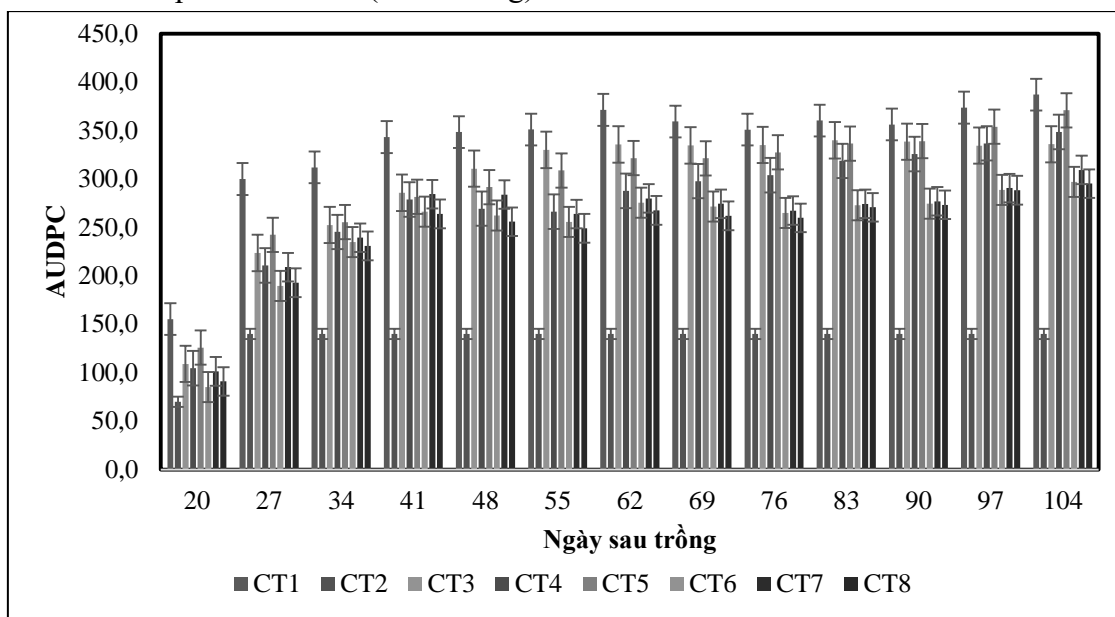
#### 3.2. Ảnh hưởng chất kích kháng đến bệnh khảm sắn giai đoạn mọc mầm đến giai đoạn phát triển thân lá

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của chất kích kháng đến bệnh khảm sắn giai đoạn mọc mầm đến giai đoạn phát triển thân

lá được trình bày ở hình 2 cho thấy rằng là tất cả các công thức đều bị nhiễm bệnh ngoài trừ CT2 (sử dụng giống kháng bệnh). Ở thời kì mọc mầm (27 ngày sau khi trồng) AUDPC của CT2 là thấp nhất và cao nhất là CT3. AUDPC liên tục tăng trong quá trình từ 20 đến

104 ngày sau trồng, nhưng khác biệt giữa các công thức. Ở lần điều tra cuối cùng (104 ngày sau trồng), AUDPC thấp nhất là CT2 và cao nhất là CT1, các công thức có xử lý chất kích kháng có AUDPC thấp hơn CT1 (đối chứng).

Phân tích thống kê cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về AUDPC giữa các công thức. Điều này cho thấy ảnh hưởng của chất kích kháng đến khả năng hạn chế sự phát triển của bệnh hại.



**Hình 2. Ảnh hưởng chất kích kháng đến bệnh khảm lá sắn giai đoạn phát triển thân lá**

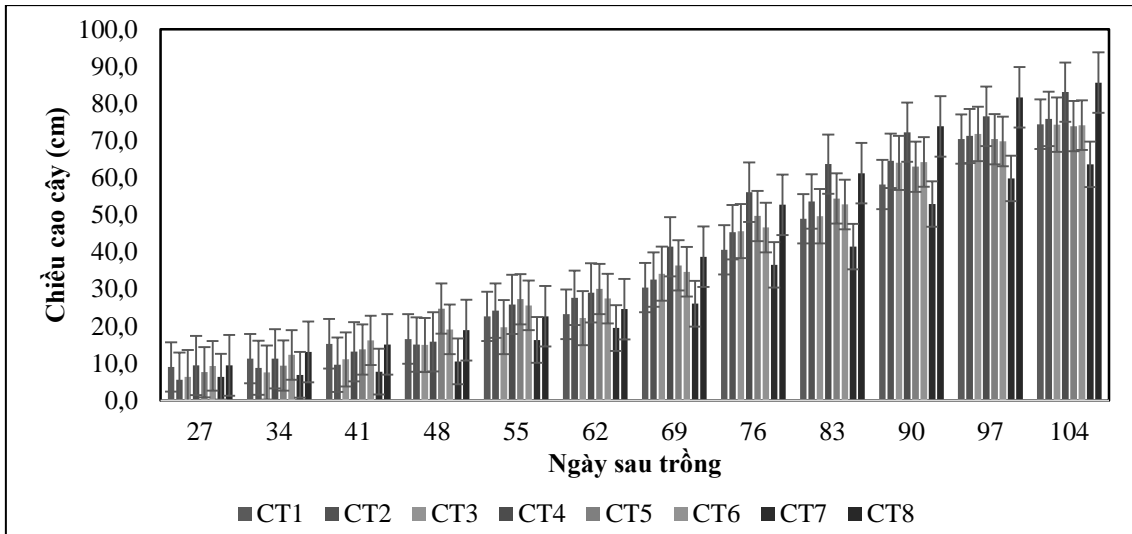
\* Lần điều tra đầu tiên là 20 ngày sau trồng và điều tra định kỳ 7 ngày/lần.

### 3.3. Ảnh hưởng của chất kích kháng đến sinh trưởng cây sắn giai đoạn mọc mầm đến giai đoạn phát triển thân lá

#### 3.3.1. Ảnh hưởng đến chiều cao cây

Kết quả theo dõi chiều cao cây sắn các công thức xử lý chất kích kháng được trình bày ở hình 3 cho thấy chiều cao cây sắn ở các công thức tăng dần và có sự sai khác. Ở giai đoạn mọc mầm (sau khi trồng 27 ngày) chiều cao cây sắn đạt cao nhất là 9,95cm (CT4) và thấp nhất là 6,33cm (CT3). Tuy nhiên, phân tích thống kê Tukey test cho thấy không có sự khác biệt về chiều cao cây giữa các công

thức. Kết quả theo dõi chiều cao cây ở giai đoạn cuối cùng (104 ngày sau trồng) đạt cao nhất là 63,05cm (CT4) và thấp nhất là 44,80cm (CT7). Phân tích thống kê Tukey test cho thấy không có sự khác biệt về chiều cao cây giữa các công thức. Cây sắn trồng trong nhà lưới và được bao lưới chống côn trùng đã ảnh hưởng đến chiều cao cây. Cây có khuynh hướng cao hơn trong điều kiện ánh sáng thấp hơn so với điều kiện trên đồng ruộng. Điều này cho thấy các chất kích kháng ảnh hưởng không rõ đến chiều cao cây sắn trong điều kiện trồng trong nhà lưới.

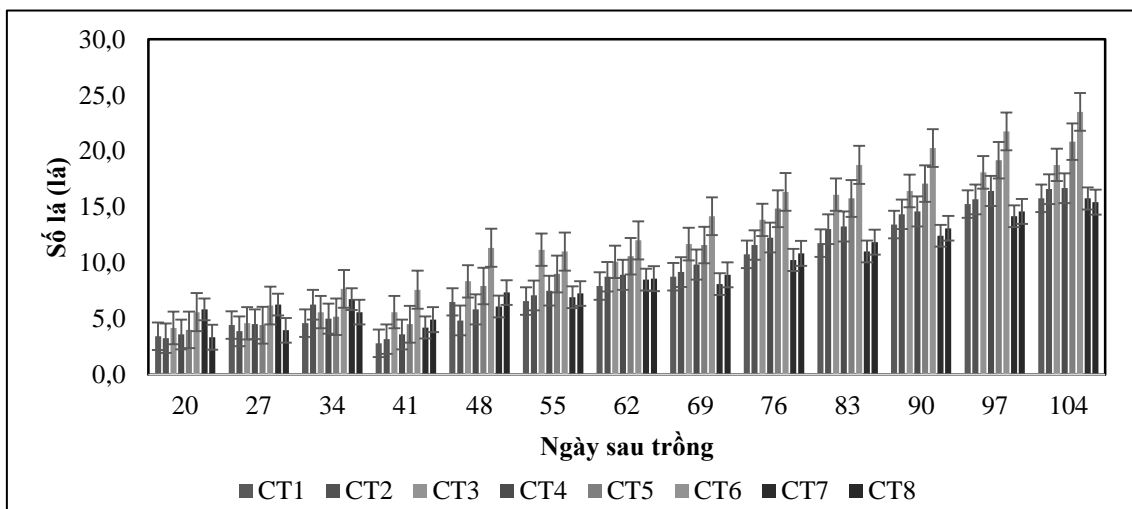


Hình 3. Ảnh hưởng chất kích kháng đến chiều cao cây sắn giai đoạn phát triển thân lá

### 3.3.2. Ảnh hưởng đến tốc độ ra lá

Kết quả theo dõi tốc độ ra lá của cây sắn được trình bày ở hình 4 cho thấy tốc độ ra lá tăng dần từ khi mọc mầm đến giai đoạn phát triển thân lá và có sự khác biệt. Ở thời kỳ này chồi (27 ngày sau trồng) tốc độ ra lá đạt cao nhất là 6,17 lá (CT6) và thấp nhất là 3,75 lá (CT8). Tuy nhiên, phân tích thống kê Tukey test không thấy có sự khác biệt về số lá giữa các công thức. Kết quả theo dõi số lá ở giai đoạn cuối cùng

(104 ngày sau trồng) số lá đạt cao nhất là 20,45 lá (CT6) và thấp nhất là 12,82 lá (CT1). Phân tích thống kê Tukey test cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa về số lá giữa các công thức được xử lý chất kích kháng. Các công thức xử lý hóa chất salicylic acid và Cruiser Plus 312.5FS (CT6) có khả năng làm tăng khả năng ra lá của cây sắn. Điều này có thể kết luận xử lý chất kích kháng cải thiện sinh trưởng của cây sắn khi nhiễm bệnh khảm lá.



Hình 4. Ảnh hưởng chất kích kháng đến số lá cây sắn giai đoạn phát triển thân lá

### 3.4. Đánh giá hiệu lực hạn chế bệnh khảm lá sần và năng suất sinh khối

Kết quả đánh giá hiệu lực hạn chế bệnh khảm lá sần được trình bày ở bảng 1 cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về hiệu lực hạn chế bệnh của các chất kích kháng. Hiệu lực ở 104 ngày cao nhất là xử lý Salicylic acid (24,3%) và thấp nhất là xử lý Ningna Star 80SL (3,2%). AUDPC cao nhất là đối

chứng không xử lý (387,2) và thấp nhất là xử lý Cruiser Plus 312.5FS (297,1). Năng suất sinh khối cao nhất là xử lý Cruiser Plus 312.5FS (4,34 tạ/ha) và thấp nhất ở đối chứng không xử lý (2,21 tạ/ha). Như vậy có thể kết luận xử lý chất kích kháng cho cây sần có thể giúp hạn chế bệnh khảm lá, cây sinh trưởng phát triển khỏe và nâng cao năng suất sinh khối.

**Bảng 1. Hiệu lực hạn chế bệnh khảm lá và năng suất sinh khối**

| Công thức | Hiệu lực hạn chế bệnh khảm lá sần (%) | AUDPC* | Năng suất sinh khối (tạ/ha) |
|-----------|---------------------------------------|--------|-----------------------------|
| CT1 (Đ/C) | -                                     | 387,2  | 2,21 <sup>a</sup>           |
| CT2**     | -                                     | 140,0  | 3,54 <sup>abc</sup>         |
| CT3       | 12,8                                  | 335,9  | 2,97 <sup>abc</sup>         |
| CT4       | 9,0                                   | 348,6  | 2,81 <sup>ab</sup>          |
| CT5       | 3,2                                   | 370,9  | 3,39 <sup>abc</sup>         |
| CT6       | 22,8                                  | 297,1  | 4,34 <sup>c</sup>           |
| CT7       | 16,7                                  | 309,3  | 3,19 <sup>abc</sup>         |
| CT8       | 24,3                                  | 295,2  | 3,88 <sup>bc</sup>          |

Ghi chú: \*: AUDPC được tính ở 104 ngày sau trồng; \*\*: Giống kháng bệnh.

Thực vật có thể tạo ra các phản ứng để chống lại với các khủng hoảng phi sinh học, cũng như sinh học do các tác nhân sinh học gây ra, như mầm bệnh và côn trùng (Romera *et al.*, 2019). Một số phản ứng này chỉ giới hạn ở cơ quan bị nhiễm bệnh, nhưng các phản ứng khác lại lan rộng ra xa cơ quan bị nhiễm và ảnh hưởng đến toàn cây một cách có hệ thống. Những phản ứng sau này bao gồm nâng cao sức đề kháng có hệ thống (SAR) và sức đề kháng do hệ thống cảm ứng (ISR). Một số hormone và phân tử như ethylene (ET), auxin, và nitric oxide (NO)... là những hoạt chất giúp nâng cao tính kháng bệnh của cây. Chất kích kháng là những sản phẩm sinh học có tác dụng hình thành

kháng thể giúp cây kháng bệnh, đồng thời tạo được môi trường miễn dịch cho cây trồng. Các biện pháp như tiêm chủng vaccine, chất kích kháng, xử lý hạt giống, biện pháp canh tác... có thể tạo ra được tính miễn dịch và chống bệnh của thực vật (Nguyễn Vĩnh Trường và CTG, 2021). Xử lý cho cây các chất kích kháng như acid salicylic, acid 2,6 - dichloroisonicotinic (INA), SAR3, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, potassium phosphonate, CuCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, chitosan, các chất nano có đặc tính làm biến đổi tính chất trao đổi chất của cây theo chiều hướng bất lợi cho sự phát triển của tác nhân gây bệnh, đồng thời làm tăng hoạt tính của enzyme peroxidase, catalase và các enzyme oxy hóa khác, làm thay đổi

thành phần chất nguyên sinh có tác dụng tạo cho cây tính miễn dịch tạo được. Sử dụng chất kích kháng để chống lại bệnh hại đã được nhiều tác giả trên thế giới nghiên cứu trên nhiều loại cây trồng gần ngày như trên dưa leo, cà chua, dưa bở, sắn... (Kim *et al.*, 2008; Romera *et al.*, 2019; Sangpueak *et al.*, 2021). Ở Việt Nam các nhà khoa học đã nghiên cứu ứng dụng chất kích kháng trong phòng chống bệnh (Trần Thị Thu Thủy và ctg., 2007) và điều chế các chất kích kháng (Biosar-3 ĐHCT, Biobac 1 - ĐHCT, Tricho ĐHCT) để phòng chống bệnh hại trên cây lúa, cây ăn quả và rau màu (Nguyễn Đắc Khoa và ctg., 2010). Các nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có thể áp dụng chất kích kháng để phòng chống bệnh khảm lá cho cây sắn. Đây là nghiên cứu đầu tiên về áp dụng chất kích kháng phòng chống bệnh cây sắn ở nước ta.

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu hạn chế sự tổng hợp virus SLCMV gây bệnh khảm lá sắn bằng các chất kích kháng trong điều kiện nhà lưới ở Thừa Thiên Huế cho thấy tỷ lệ mọc mầm cao nhất khi hom giống được xử lý Cruiser Plus 312.5FS (100%) và thấp nhất nếu xử lý  $\text{CuCl}_2$  (50%). Các chất kích kháng có khả năng hạn chế bệnh khảm lá sắn không cao nhưng ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây sắn nên nâng cao năng suất sinh khối. Xử lý các chất kích kháng Cruiser Plus 312.5FS và salicylic acid cho cây sắn có thể giúp cây phát triển mạnh chống lại bệnh khảm lá.

**Lời cảm ơn:** Các tác giả xin chân thành cảm ơn Sở Khoa học Công nghệ tỉnh Thừa Thiên Huế đã cung cấp kinh phí thực hiện nghiên cứu này thông qua đề tài “Nghiên cứu xây dựng và chuyển giao quy trình quản lý bệnh khảm lá sắn tổng hợp cho tỉnh Thừa Thiên Huế” mã số: TTH.2021 - KC.16.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abbott WS, 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18, 265 - 7.
2. Bộ Khoa học Công nghệ, 2018. Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 12561:2018 - Thuốc Bảo vệ thực vật - Khảo nghiệm hiệu lực sinh học của thuốc trên đồng ruộng. Bộ Khoa học Công nghệ.
3. Campbell CL and Madden LV, 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. New York: John Wiley & Sons.
4. FAO, 2022. World Food and Agriculture - Statistical Yearbook 2021. Rome.
5. Kim KS., Min JY., Dickman MB, 2008. Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Mol Plant Microbe Interact* 21, 605 - 12.
6. Minato N., Sok S., Chen S., Delaquis E., Phirun I. Vi Xuan Le, Dharani D. Burra, Jonathan C. Newby, Kris A.G. Wyckhuys, Stef de Haan, 2019. Surveillance for *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) in Cambodia and Vietnam one year after its initial detection in a single plantation in 2015. *PLoS One* 14, e212780. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212780>.
7. Nguyễn Đắc Khoa, Dương Minh, Phạm Văn Kim, 2010. Sản xuất các chế phẩm sinh học để quản lý 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 - 26.
8. Nguyễn Vinh Trường, Lê Như Cương, Trần Thị Thu Hà, Nguyễn Thị Thu Thủy, Trần Thị Nga, 2021. Giáo trình Bệnh cây đại cương. Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

9. Olasanmi B., Kyallo M., Yao N, 2021. Marker-assisted selection complements phenotypic screening at seedling stage to identify cassava mosaic disease-resistant genotypes in African cassava populations. *Scientific Reports* 11, 2850.
10. Rey C., Vanderschuren H, 2017. Cassava mosaic and brown streak diseases: Current perspectives and beyond. *Annual Review of Virology* 4, 429 - 52.
11. Romera FJ., García MJ., Lucena C., et al., 2019. Induced Systemic Resistance (ISR) and Fe Deficiency Responses in Dicot Plants. *Frontiers in plant science* 10.
12. Sangpueak R PP., Thumanu K., Siritwong S., Wongkaew S., Buensanteai N, 2021. Effect of salicylic acid formulations on induced plant defense against cassava anthracnose disease. *Plant Pathology Journal* 37: 356 - 64.
13. Tổng cục Thống kê, 2022. Số liệu thống kê nông lâm nghiệp thủy sản. <https://www.gso.gov.vn/so-lieu-thong-ke/>.
14. Trần Thị Thu Thủy, Nguyễn Hồng Tín, Đặng Thị Tho, Huỳnh Minh Châu, Phạm Văn Kim, 2007. Khảo sát mô học về khả năng kích kháng lưu dẫn của Benzoic acid, Clorua đồng và chitosan đối với bệnh cháy lá lúa do nấm *Pyricularia grisea* (Cook) Sacc. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ* 7, 138 - 46.
15. Uke A., Hoat TX., Quan MV., Liem NV., Ugaki M., Natsuaki KT, 2018. First Report of Sri Lankan Cassava Mosaic Virus Infecting Cassava in Vietnam. *Plant Disease* 102, 2669.
16. Ủy ban Nhân dân Thừa Thiên Huế, 2021. Chỉ thị về tăng cường công tác phòng, chống bệnh khảm lá sắn trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế. Tháng 4/2021.
17. Viện Bảo vệ thực vật, 2019. Báo cáo của Viện Bảo vệ thực vật 2019 về Dự án Satreps. Viện Bảo vệ thực vật.
18. Wang D., Yao XM., Huang GX., Shi T., Wang GF., Ye J, 2019. First Report of Sri Lankan Cassava Mosaic Virus Infected Cassava in China. *Plant Disease* 103, 1437.
19. Wang HL., Cui XY., Wang XW., Liu SS., Zhang ZH., Zhou XP, 2016. First report of Sri Lankan cassava mosaic virus Infecting cassava in Cambodia. *Plant Disease* 100, 1029.

## ABSTRACT

### **Studying the ability of systemic acquired resistance against the cassava mosaic disease in the greenhouse**

*Cassava mosaic disease (caused by Sri Lanka Cassava Mosaic Virus) is a serious disease globally. In 2019, the disease was found in Thua Thien Hue and caused damage to cassava production. If the cassava mosaic disease is not managed well, the disease will be constrained to cassava production in the province. Studying on the ability of systemic acquired resistance (SAR) in the greenhouse in Thua Thien Hue showed that the germination rate of cassava cuttings was highest at the treatment treated with Cruiser Plus 312.5FS (100%) and the lowest at treatment treated with  $\text{CuCl}_2$  (50%). The SLCMV was inhibited by the systemic acquired resistance of Cruiser Plus 312.5FS and salicylic acid. Cassava cuttings treated with Cruiser Plus 312.5FS and salicylic acid showed an increase in the growth and development of plants and an improvement in the biomass yield. Plants treated with Cruiser Plus 312.5FS and salicylic acid can be against leaf mosaic disease.*

**Keywords:** Cassava, Cruiser Plus, salicylic acid, Sri Lanka Cassava Mosaic Virus.

# TÁC DỤNG KHÁNG NẤM *Neoscytalidium dimidiatum* GÂY BỆNH ĐỐM NÂU TRÊN CÂY THANH LONG CỦA NANO SALICYLIC AXIT/CHITOSAN

Lê Nghiêm Anh Tuấn<sup>1\*</sup>, Bùi Duy Du<sup>1</sup>,  
Trần Phước Thọ<sup>1</sup>, Chu Trung Kiên<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng,  
Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam  
<sup>2</sup> Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam,  
Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam  
\* Tác giả liên hệ: lenghiemanh tuan@gmail.com

## TÓM TẮT

Bệnh đốm nâu do nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây ra trên cây thanh long (*Hylocereus undatus*) là một loại bệnh cực kỳ nguy hiểm. Axit salicylic (SA) và chitosan (CS) được coi là những hoạt chất kích kháng thực vật hiệu quả. Trong nghiên cứu này, vật liệu nano SA/CS có kích thước hạt  $\sim 22 \pm 8\text{nm}$ , phân bố hẹp dạng hình cầu được điều chế bằng phản ứng phức đồng trùng hợp. Hiệu lực kháng nấm *Neoscytalidium dimidiatum* được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán vật liệu nano SA/CS trong môi trường thạch ở các nồng độ hoạt chất khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy nano SA/CS thể hiện hiệu lực kháng nấm cao trong thí nghiệm *in vitro*. Nấm *Neoscytalidium dimidiatum* bị ức chế 100% sự nảy mầm ở nồng độ hoạt chất 550ppm (50ppm SA/500ppm CS), hiệu quả này thể hiện sự khác biệt rõ so với xử lý SA hoặc CS riêng lẻ. Kết quả thu được đã khẳng định thêm tiềm năng thương mại của các hạt nano SA/CS như một chất kích thích sinh học để kiểm soát bệnh hại cây trồng.

**Từ khóa:** Cây thanh long, nano salicylic axit/chitosan, *Neoscytalidium dimidiatum*.

## 1. GIỚI THIỆU

Việt Nam là nước có diện tích và sản lượng thanh long lớn nhất châu Á và cũng là nước xuất khẩu thanh long hàng đầu thế giới. Thanh long được trồng chủ yếu là loại *Hylocereus undatus*, có ruột trắng hoặc ruột đỏ. Tại Việt Nam, diện tích trồng thanh long hơn 55.000ha chủ yếu ở tỉnh Bình Thuận, Long An, Tiền Giang,

Người phân biên: TS. Hà Minh Thanh

Trà Vinh,... Thanh long là loại cây ăn trái sinh trưởng tốt ở điều kiện khô hạn nhưng một số bệnh đã phát sinh gây ảnh hưởng đáng kể đến năng suất và chất lượng. Theo kết quả điều tra, bệnh đốm nâu trên cây thanh long do nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây ra là một loại bệnh phổ biến ở Việt Nam (Lương Hữu Thành và cs., 2016). Tác nhân gây bệnh này cũng đã được báo cáo ở Trung Quốc, Malaysia, Đài Loan (Trung Quốc), Trung Đông và

Bắc Mỹ (Chuang M.F. và cs., 2012; Lan G.B. và cs., 2012), chúng gây ra các triệu chứng đốm nâu đỏ trên dây và quả (hình 1). Theo thời gian, các vết bệnh chuyển

thành các vết lồi to hơn, có màu cam đến nâu đỏ, chúng thường liên kết lại với nhau tạo thành các vết bệnh lớn.



Hình 1. Triệu chứng nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm nâu trên dây và trái thanh long

Chitosan (CS) hay poly-(1 → 4)- $\beta$ -D-glucosamine là sản phẩm của quá trình khử oxy hóa chitin. Chitosan có các đặc tính sinh học tuyệt vời như không độc, tương hợp, phân hủy sinh học, thân thiện môi trường nên được ứng dụng rộng rãi trong dẫn truyền thuốc, thực phẩm, nông nghiệp, mỹ phẩm và kỹ thuật nuôi cấy mô (Orzali L. và cs., 2017). Hiệu quả kháng vi sinh vật phổ rộng của CS đã được ghi nhận khi chúng chống lại các loài vi nấm, vi khuẩn gây bệnh khác nhau như *Fusarium solani*, *Phytophthora infestance*, *Botryties cienerte*, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas* và *Erwinia carotovora* (El-Mohamedya R.S.R. và cs., 2019). Nồng độ ức chế sinh trưởng vi sinh vật tối thiểu của CS trong khoảng từ 10 đến 5.000 ppm tùy thuộc vào khối lượng phân tử và độ đề acetyl (El Hadrami A. và cs., 2010). Hơn nữa, hoạt tính kháng nấm của CS

cũng được chứng minh qua các thí nghiệm *in vivo* gây bệnh trên các loài thực vật, chẳng hạn như CS kháng nấm *A. kikuchiana* và *Physalophora piricola* trên cây lê (Meng X.H. và cs., 2010), kháng nấm *C. gleosporoides* trên thanh long (Zahid N. và cs., 2015), và kháng nấm *R. solani* trên lúa (Liu H. và cs., 2012). Một vài nghiên cứu cho thấy rằng CS có hiệu quả kháng vi nấm cao hơn vi khuẩn (Orzali L. và cs., 2017). Hơn nữa, CS có khối lượng phân tử thấp hoạt động như một chất kích kháng sinh học, nó kích hoạt tạo ra kháng thể như chitinase, glucanase từ các phản ứng phản vệ thực vật làm gia tăng sức đề kháng của cây trồng đối với mầm bệnh xâm nhập (Yin H. và cs., 2010). Ví dụ, oligochitosan kích thích sản xuất enzyme chitinase trong cây thanh long chống lại nấm *N. dimidiatum* (Bùi Duy Du và cs., 2015; Lê Nghiêm Anh Tuấn và cs., 2019).

Axit salicylic (SA) là một phenolic ưa béo (Patel Z.M. và cs., 2020). SA là một loại hormone thực vật đóng nhiều vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật, nó có thể hoạt động như một "tác nhân điều trị bệnh" (Koo Y.M. và cs., 2020). Sự tổng hợp và tích lũy SA là một phần của phản ứng phòng vệ của thực vật chống lại sự tấn công của mầm bệnh (Sharma S. và cs., 2020). Một số nghiên cứu cũng đã chứng minh rằng salicylic axit/chitosan (SA/CS) composit có tác dụng kháng khuẩn vượt trội so với SA hoặc CS đơn lẻ. Molamohammadi H. và cs. (2019) đã báo cáo rằng màng phủ CS/SA duy trì chất lượng hạt dẻ cười sau thu hoạch. Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng vật liệu SA/CS có tác dụng cộng hợp trong việc thúc đẩy tăng trưởng thực vật và khả năng chống lại nấm bệnh. Thí nghiệm do Morovvat S.A. và cs. (2021) thực hiện nhằm khảo sát ảnh hưởng của việc bón lá CS và SA lên năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất khoai tây trong điều kiện khô hạn. Kết quả cho thấy năng suất được tăng lên khi sử dụng CS/SA so với CS hoặc SA đơn lẻ. Kumaraswamy R.V. và cs. (2019) báo cáo rằng nano SA/CS ở nồng độ 0,16% đã ức chế được 100% sự phát triển của sợi nấm và 60,5% sự nảy mầm của bào tử nấm *Fusarium verticillioides* trong thí nghiệm *in vitro*. Hiệu quả này cao hơn nhiều lần so với CS hoặc SA dạng khối.

Trong bài báo này, chúng tôi báo cáo kết quả điều chế vật liệu nano SA/CS và hiệu quả ức chế sự phát triển của nấm *N. dimidiatum* bằng phương pháp khuếch tán vật liệu nano SA/CS trong môi trường thạch.

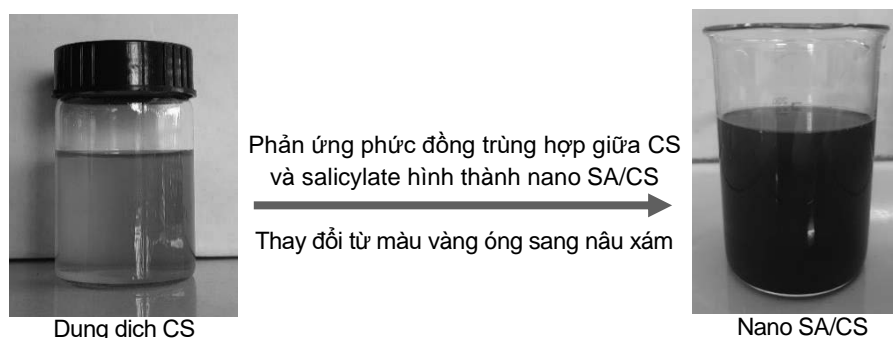
## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Chitosan được sử dụng có khối lượng phân tử 100.000 Da, độ đề acetyl là 94% và độ ẩm 9,9% (w/w) được cung cấp bởi Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng (TP.HCM, Việt Nam). Axit salicylic thuộc loại ACS (> 99,0%) của Merck. Axit lactic dùng để hòa tan CS và HCl, NaOH dùng để điều chỉnh pH của Xilong (Trung Quốc). Môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) của Himedia (Ấn Độ) dùng để phân lập và nuôi cấy nấm *Neoscytalidium dimidiatum*. Tất cả các hóa chất và thuốc thử khác được sử dụng trong nghiên cứu đều là loại tinh khiết phân tích.

### 2.2. Điều chế nano axit salicylic/chitosan

Dung dịch nano SA/CS có nồng độ 5.000 mg/L SA và 50.000 mg/L CS với kích thước hạt là  $22 \pm 8$ nm được điều chế theo quy trình của Kumaraswamy R.V. và cs. (2019) nhưng có một vài điều chỉnh. Trước tiên, chuẩn bị dung dịch CS: hòa tan 5,5g CS trong 80mL dung dịch axit lactic (2%, v/v) ở nhiệt độ phòng và khuấy cho tan hết CS bằng máy khuấy từ. Sau đó dung dịch muối amoni salicylate (5%, w/v) được điều chế bằng cách cho SA phản ứng với dung dịch amoni. Tiếp theo, cho từ từ dung dịch muối amoni salicylate vào dung dịch CS ở trên và khuấy ở tốc độ cao (500 v/p) để hình thành liên kết ion giữa nhóm amin của CS và nhóm cacboxyl của SA bởi phản ứng phức đồng trùng hợp. Dung dịch nano SA/CS chuyển sang nâu xám từ màu vàng óng của dung dịch CS (hình 2).



Hình 2. Sự thay đổi màu sắc của dung dịch trong quá trình điều chế nano SA/CS

### 2.3. Nghiên cứu *in vitro* ức chế sự phát triển của nấm *Neoscytalidium dimidiatum* bởi nano SA/CS

Nấm *Neoscytalidium dimidiatum* được phân lập theo phương pháp mô tả trong nghiên cứu Lương Hữu Thành và cs. (2016). Các vết bệnh trên dây được thu nhận từ cây thanh long (4 năm tuổi) ở huyện Càng Long, tỉnh Trà Vinh, Việt Nam (vĩ độ/kinh độ: 9,97/106,21) bị bệnh đốm nâu trên dây (hình 1). Tất cả các mô sau khi thu nhận được chuyển đến Phòng Thí nghiệm Vi sinh, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam để phân lập và định danh nấm *N. dimidiatum*. Để phân lập nấm, các mô bệnh được cắt thành nhiều mảnh nhỏ (dài 3 - 5mm), rửa sạch và khử trùng bề mặt bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 1 phút và NaOCl 1,05% trong 5 phút; tiếp theo rửa ba lần trong nước cất vô trùng. Sau đó, chúng được chuyển lên đĩa petri có chứa môi trường PDA đã được bổ sung 25 mg/L penicillin-streptomycin để ức chế vi khuẩn. Đĩa petri được ủ trong 5 ngày ở 30 ± 2°C. Sau khi mọc ra khỏi mô, sợi nấm được nuôi cấy vô trùng trên môi trường PDA và được tinh sạch bằng kỹ thuật phân lập sợi nấm.

Hoạt tính kháng nấm *N. dimidiatum* của nano SA/CS được xác định bằng phương pháp gây độc môi trường nuôi cấy (Bùi Duy Du và cs., 2019) thực hiện vào tháng 3 năm 2022 tại Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam. Đầu tiên, cho 15 mL môi trường PDA vô trùng đã được khuếch tán nano SA/CS với nồng độ hoạt chất khác nhau: 220ppm (20ppm SA/200ppm CS); 330ppm (30ppm SA/300ppm CS); 440ppm (40ppm SA/400ppm CS) và 550ppm (50ppm SA/500ppm CS) trong các đĩa petri (d~ 9cm). Mỗi nồng độ được lặp lại 03 lần. Tiếp theo, cắt tản nấm (3 x 3mm) sau 5 ngày tuổi chuyển vào giữa đĩa petri đã chuẩn bị ở trên. Đĩa petri chỉ chứa môi trường PDA được sử dụng làm mẫu đối chứng. Hai mẫu 500ppm CS và 50ppm SA được thí nghiệm là đối chứng dương. Sau 5 ngày ủ ở 30 ± 2°C đường kính tản nấm được xác định bằng thước đo và giá trị IC<sub>50</sub> (nồng độ ức chế 50%) được tính dựa trên hiệu quả ức chế (Bùi Duy Du và cs., 2019) như sau: Hiệu quả ức chế (%) = 100 × (d<sub>0</sub> - d)/d<sub>0</sub>. Trong đó: d<sub>0</sub> và d lần lượt là đường kính tản nấm (mm) của mẫu đối chứng và mẫu nghiên cứu.

## 2.4. Phân tích thống kê

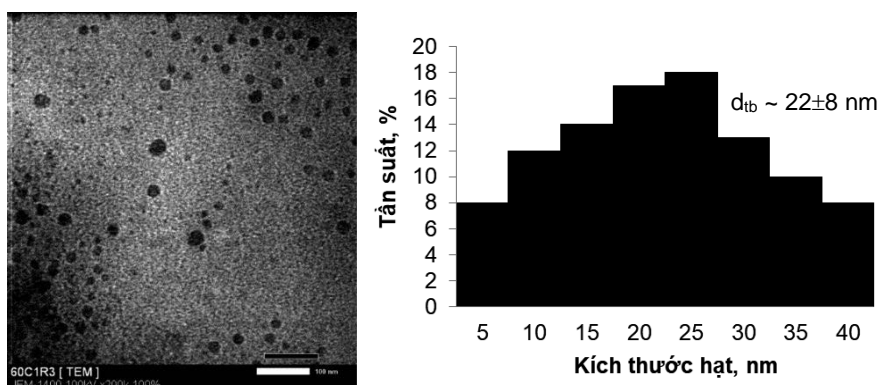
Kích thước hạt nano SA/CS được xác định thống kê từ ảnh TEM bằng phần mềm MS Excel 2013. Tất cả dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình  $\pm$  sai số chuẩn (SE). Tất cả dữ liệu của các nghiên cứu *in vitro* kháng nấm đều được phân tích phương sai một chiều để xác định ý nghĩa của sự khác biệt riêng lẻ ở các mức  $p < 0,05$ .

## 3. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

### 3.1. Đặc tính của vật liệu nano SA/CS

Quá trình điều chế vật liệu nano SA/CS xảy ra như sau: Proton hóa CS trong dung dịch axit lactic thu được dung dịch CS ở pH~4 theo phương trình 1. Axit salicylic được hoạt hóa gốc tự do

COO<sup>•</sup> bởi dung dịch ammonia theo phương trình 2. Kỹ thuật phức đồng trùng hợp từ chitosan proton (R-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) và axit salicylic hoạt hóa (R'-COO<sup>•</sup>) hình thành phức composit R-NH<sub>2</sub><sup>+</sup>-OOC-R' chứa SA có kích thước nano theo phương trình 3 (nano SA/CS). Hình thái và kích thước hạt nano SA/CS thể hiện qua ảnh TEM (hình 3). Hình 3 cho thấy rằng hạt nano SA/CS có hình cầu, kích thước hạt trung bình là  $22 \pm 8$ nm, phân bố trong phạm vi hẹp. Trong nghiên cứu của Kumaraswamy R.V. (2019), kích thước hạt nano SA/CS là 386 nm, kích thước này khá lớn vì tác giả xác định là kích thước của cả 02 phân tử SA và CS, còn trong nghiên cứu này chúng tôi chỉ xác định kích thước hạt SA qua ảnh TEM có độ phân giải cao nên xác định được kích thước nano của SA.



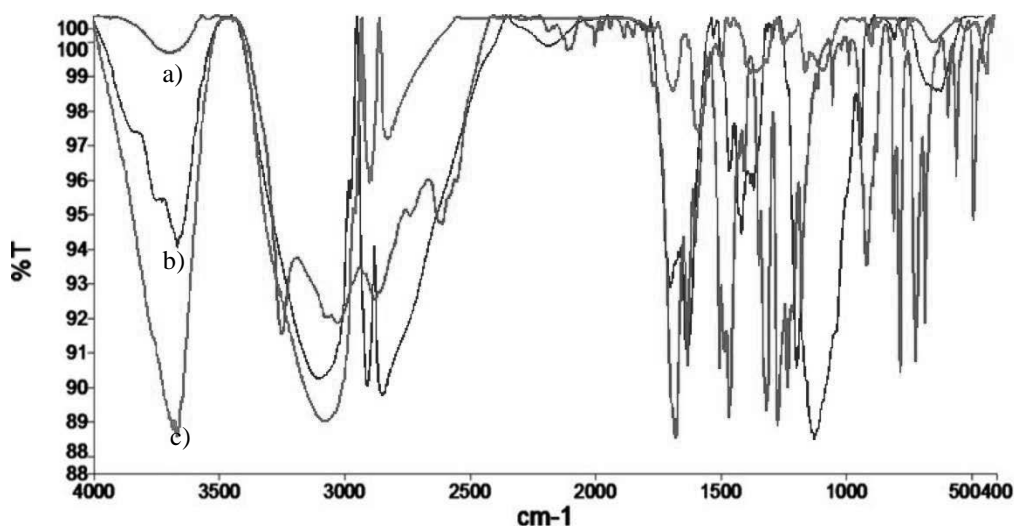
Hình 3. Ảnh TEM của nano SA/CS

Hình 4 mô tả phổ FT-IR của SA, CS và nano SA/CS. Kết quả chứng minh các đặc điểm cấu trúc cơ bản của SA (hình 4a) tại vị trí  $1.700 \text{ cm}^{-1}$  và  $1.650 \text{ cm}^{-1}$

tương ứng với dao động uốn cong của nhóm acetoxy và nhóm cacboxylic. Đối với CS (hình 4b) như sau: Ở vị trí số sóng  $3.626 \text{ cm}^{-1}$  đặc trưng cho dao động của

nhóm -OH và -NH<sub>2</sub> kéo dài, ở vị trí 2.922cm<sup>-1</sup> và 2.872cm<sup>-1</sup> đặc trưng cho dao động của nhóm -CH, ở vị trí 1.601cm<sup>-1</sup> đặc trưng cho dao động của nhóm -NH<sub>2</sub> giãn, ở vị trí 1.076cm<sup>-1</sup> đặc trưng cho dao động của nhóm C-O-C và vị trí 601cm<sup>-1</sup> đặc trưng cho dao động kéo vòng pyranoside. Đối với vật liệu nano SA/CS (hình 4c), đỉnh 3.423cm<sup>-1</sup> trở nên rộng hơn, cho thấy rằng liên kết hydro đã được tăng cường giữa sự bê cong của nhóm -OH của CS (Kumaraswamy R.V. và cs., 2019). Dao động uốn -NH<sub>2</sub> thay đổi từ vị trí

1.637cm<sup>-1</sup> đến 1.630cm<sup>-1</sup> và một đỉnh mới ở vị trí 1.595cm<sup>-1</sup> cho thấy rằng có một số tương tác giữa các nhóm NH<sub>3</sub><sup>+</sup> của CS và SA xảy ra trong vật liệu nano SA/CS. Đỉnh ở vị trí 1.300cm<sup>-1</sup> cho thấy sự uốn cong nhóm C-N do tương tác giữa nhóm cacboxylic (-COOH) của SA và nhóm amin (-NH<sub>2</sub>) của CS. Điều này cho thấy rằng liên kết ion được hình thành giữa nhóm cacboxyl của SA và nhóm amin của CS (Nasonova A. và cs., 2020). Kết quả có thể chỉ ra rằng nano SA đã được gắn kết thành công vào phân tử CS.



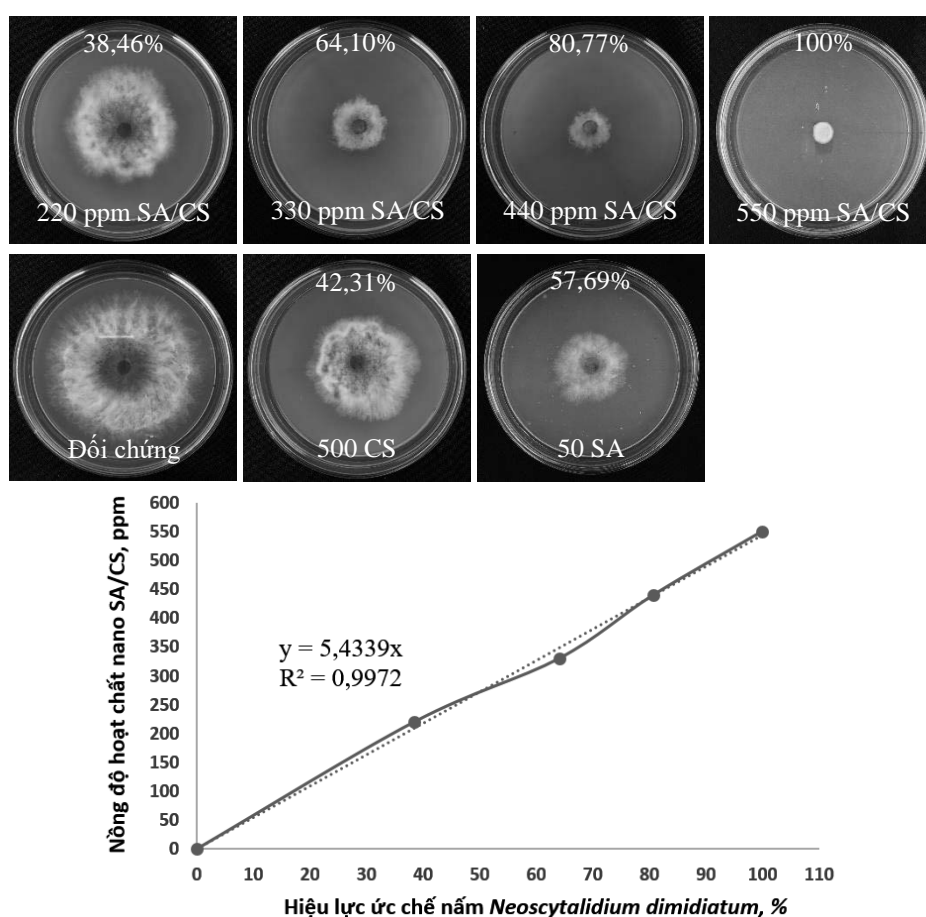
Hình 4. Phổ FT-IR của SA (a), CS (b) và nano SA/CS (c)

Hiệu quả ức chế sự phát triển nấm *N. dimidiatum* của vật liệu nano SA/CS tăng lên theo nồng độ hoạt chất (hình 5). Sau 5 ngày, hiệu quả ức chế sinh trưởng của nano SA/CS là 38,46%, 64,10%; 80,77 và 100% tương ứng với nồng độ hoạt chất là 220ppm; 330ppm; 440ppm và 550ppm. Nấm *N. dimidiatum* phát triển bình thường trên đĩa đối chứng và có đường kính tản nấm đạt 78mm sau 5

ngày nuôi cấy... Trong khi đó, 02 mẫu đối chứng dương 500ppm CS và 50ppm SA (dạng khối) có hiệu lực ức chế lần lượt là 42,31% và 57,69%. Kết quả này chứng tỏ vật liệu nano SA/CS có hiệu lực cộng hợp ức chế sự sinh trưởng của nấm *N. dimidiatum*. Dựa trên đồ thị và phương trình hồi quy:  $y = 5,4339x$  ( $R^2 = 0,9972$ ) thể hiện trong hình 5, IC<sub>50</sub> được xác định của vật liệu nano SA/CS trên

nấm *N. dimidiatum* là 272ppm tương ứng với 24,7ppm SA/247,3ppm CS. Một số tác giả cũng đã công bố kết quả nghiên cứu hiệu lực kháng nấm *N. dimidiatum* của vật liệu nano trên nền CS, cụ thể Phan Ngọc Uyên Thi và cs. (2018) báo cáo rằng vật liệu nano Ag/CS hiệu quả ức chế nấm *N. dimidiatum* gây bệnh đốm nâu trên cây thanh long cao nhất ở nồng độ 10ppm Ag và 2% CS. Bên cạnh đó,

vật liệu nano SiO<sub>2</sub>/oligochitosan cũng cho thấy hiệu quả cao trong việc phòng trừ bệnh đốm nâu trên cây thanh long do nấm *N. dimidiatum* gây ra (Lê Nghiê m Anh Tuán và cs., 2019). Ngoài ra, Bùi Duy Du và cs. (2015; 2019) báo cáo rằng oligochitosan và nano Cu<sub>2</sub>O-Cu/alginate ức chế sự phát triển của nấm *N. dimidiatum* với IC<sub>50</sub> = 51,5ppm oligochitosan và 20,8ppm Cu.



Hình 5. Hiệu lực ức chế sự phát triển nấm *N. dimidiatum* của nano SA/CS

#### 4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, vật liệu nano SA/CS được tổng hợp bằng phương pháp phức đồng trùng hợp giữa muối salicylic

và CS. Hạt nano SA thu được có đường kính trung bình là  $22 \pm 8$ nm, có dạng hình cầu và phân bố trong phạm vi hẹp. Các kết quả xác định đặc tính cho thấy nhóm cacboxyl của SA liên kết ion với nhóm

amin của CS. Kết quả thực nghiệm chỉ ra rằng nano SA/CS có hiệu quả ức chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm nâu thanh long là 100% ở nồng độ hoạt chất là 550ppm (50ppm SA/500ppm CS) và IC<sub>50</sub> được xác định là 272ppm (24,2ppm SA/247,3ppm CS). Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng nano SA/CS có thể ứng dụng là hoạt chất diệt nấm đầy tiềm năng và cần có thêm nghiên cứu để kiểm soát bệnh đốm nâu thanh long trên đồng ruộng.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Trà Vinh qua đề tài có mã số “CT.NN.07-2021”

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chuang M.F., Ni H.F., Yang H.R., Shu S.L., Lai S.Y., Jiang Y.L. First report of stem canker disease of Pitaya (*Hylocereus undatus* and *H. polyrhizus*) caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan. *Plant Disease*, 2012, 96:906.
2. Du B.D., Ngoc D.T.B., Thang N.D., Tuan L.N.A., Thach B.D., Hien N.Q., 2019. *Synthesis and in vitro antifungal efficiency of alginate-stabilized Cu<sub>2</sub>O-Cu nanoparticles against Neoscytalidium dimidiatum causing brown spot disease on dragon fruit plants (Hylocereus undatus)*, Vietnam J. Chem., 57 (3) 318.
3. Du B.D., Dung L.T.K., Khoa V.N.D., Thang N.D., Tuan L.N.A., 2015. *Chitinase-induced resistance against neoscytalidium dimidiatum on dragon trees: the effect of oligochitosan prepared by the heterogeneous degradation of chitosan with h<sub>2</sub>o<sub>2</sub> under hydrothermal conditions*, Vietnam J. Chem., 53(2) 161 - 165
4. El Hadrami A., Adam L. R., El Hadrami I., and Daayf F., 2010. *Chitosan in Plant Protection*. *Marine Drugs*, 8(4), 968 - 987.
5. El-Mohamedya R. S. R., M. E. Abd El-Aziz, and S. Kamel., 2019. *Antifungal activity of chitosan nanoparticles against some plant pathogenic fungi in vitro*, Agricultural Engineering International: CIGR Journal, 21(4): 201 - 209.
6. Koo Y.M., Heo A.Y., and Choi H.W., 2020. *Salicylic acid as a safe plant protector and growth regulator*, The Plant Pathology Journal, 36 (1), 1 - 10.
7. Kumaraswamy R.V., Kumari S., Choudhary R. C., Sharma S.S., Pal A., Raliya R., Biswas P., Saharan V., 2019. *Salicylic acid functionalized chitosan nanoparticle: A sustainable biostimulant for plant*, International Journal of Biological Macromolecules, 123, 59 - 69.
8. Lan G.B., He Z.-F., Xi P.G., and Jiang Z.D., 2012. *First report of brown spot disease caused by Neoscytalidium dimidiatum on Hylocereus undatus in Guangdong*, Chinese Mainland. *Plant Dis. Nov*; 96(11): 1702.
9. Liu H., Tian W.X., Li B., Wu G.X., Ibrahim M., Tao Z.Y., Wang Y.L., Xie G.L., Li H.Y. and Sun G.C., 2012. *Antifungal effect and mechanism of chitosan against the rice sheath blight pathogen, Rhizoctonia solani*. *Biotechnol. Lett.* 34:2291 - 2298.
10. Meng X.H., Yang L.Y., Kennedy J.F. and Tian S.P., 2010. *Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit*. *Carbohydr. Polym.* 81:70 - 75.
11. Molamohammadi H., Pakkish Z., Akhavan H.-R., and Saffari V. R., 2019. *Effect of salicylic acid incorporated chitosan coating on shelf life extension of fresh in-hull pistachio fruit*. *Food and Bioprocess Technology*.
12. Morovvat S. A., Sadrabadi R., Noferest K. S., Darban A. S., and Salati M., 2021. *Effects of foliar application chitosan and salicylic acid on physiological characteristics and yield under deficit irrigation condition*. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science*, 43(1), 101 - 113.
13. Nasonova A., Cohen Y., Poverenov E., and Borisover M., 2020. *Binding interactions of salicylic acid with chitosan and its N-*

- alkylated derivative in solutions: An equilibrium dialysis study.* Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 603, 125202.
14. Orzali L., Corsi B., Forni C., and Riccioni L., 2017. *Chitosan in Agriculture: A New Challenge for Managing Plant Disease.* Biological Activities and Application of Marine polysaccharides.
  15. Patel Z.M., Mahapatra R., & Jampala S.S.M., 2020. *Role of fungal elicitors in plant defense mechanism,* Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture, 143 - 158.
  16. Sharma S., Gupta N., 2020. *Defense signaling in plants against micro-creatures: do or die.* Indian Phytopathology 73, 605 - 613.
  17. Thanh H.L., Tam N.K.B., Nga V.T., Thuy H.T., Van T.H., Son H.T., Quynh N.N., Nga N.T.H., 2016. *Study on the possibility of using microorganisms as biological agents to control fungal pathogens Neoscytalidium dimidiatum causing disease of brown spots on the dragon fruit.* J. Vietnam Environ. 8:4 - 44.
  18. Tuan L.N.A., Du B.D., Ha L.D.T., Dung L.T.K., Phu D.V., Hien N.Q., 2019. *Induction of chitinase and brown spot disease resistance by oligochitosan and nanosilica-oligochitosan in dragon fruit plants.* Agric. Res. 8, 184 - 190.
  19. Uyen T.P.N. and Hai N.D., 2018. *Synergistic antifungal effect of fungicide and chitosan-silver nanoparticles on Neoscytalidium dimidiatum,* Green Processing and Synthesis, 7 (2), 132 - 138.
  20. Yin H., Zhao X. and Du Y., 2010. *Oligochitosan: A plant diseases vaccine-A review.* Carbohydrate Polymers. 82. 1 - 8.
  21. Zahid N., Maqbool M., Siddiqui Y., Manickam S. and Ali A., 2015. *Regulation of inducible enzymes and suppression of anthracnose using submicron chitosan dispersions.* Scientia Horticulturae. 193:381 - 388.

## ABSTRACT

### **Effects of nano salicylic acid/chitosan against *Neoscytalidium dimidiatum* cause reddish brown spot on dragon fruit plant**

*The brown spot disease caused by Neoscytalidium dimidiatum fungus on dragon fruit plants (Hylocereus undatus) is an extremely serious disease. Salicylic acid (SA) and chitosan (CS) have been considered as effective plant elicitors. In this study, the SA/CS nanoparticle with size 22±8 nm was prepared by interpolymer complexation method. The antifungal effect of Neoscytalidium dimidiatum was evaluated by diffusion of nano SA/CS materials in agar medium at different concentrations of ingredients. Finding unveiled that SA/CS nanoparticles expressed significant antifungal in vitro study. Results, 100% control of germination of Neoscytalidium dimidiatum at 550 ppm ingredients (50 ppm SA/500 ppm CS concentration was evident in SA/CS nanoparticles application compared to SA (bulk) and CS treatment. The obtained results have claimed the commercial potential of SA/CS nanoparticles as a biostimulant for plant disease control.*

**Keywords:** Nano salicylic acid/chitosan, *Neoscytalidium dimidiatum*, reddish brown spot disease.

# ĐÁNH GIÁ TÍNH KHÁNG BỆNH HÉO XANH DO VI KHUẨN (*Ralstonia solanacearum* Smith) CỦA CÁC GIỐNG LÀM GỐC GHÉP CHO CÀ CHUA TẠI NINH THUẬN

Đỗ Thị Huệ<sup>1\*</sup>, Dương Minh Hiến<sup>2</sup>, Lê Minh Khoa<sup>1</sup>  
Đào Thị Hằng<sup>1</sup>, Phan Công Kiên<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Chính<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu Bông và Phát triển nông nghiệp Nha Hồ  
<sup>2</sup> Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh  
\* Tác giả liên hệ: dohue1987@gmail.com

## TÓM TẮT

Bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* được xem là mối lo ngại đối với người dân sản xuất cà chua ở Ninh Thuận. Xác định gốc ghép có khả năng chống chịu được bệnh héo xanh là giải pháp cấp thiết đối với các vùng trồng rau chuyên canh. Thí nghiệm được thực hiện trên 10 giống cây họ cà (cà tím, cà địa phương, cà chua) và giống cà chua No.317 (F1) làm đối chứng. Thu thập mẫu, phân lập và nuôi cấy vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trên môi trường nhân tạo SPA. Các giống được lây nhiễm ở giai đoạn cây con 3 - 4 lá bằng cách cắt rễ ngâm vào 30 - 50ml dịch khuẩn với nồng độ vi khuẩn  $10^8$  cfu và chích dịch khuẩn vào thân cây. Sau 28 ngày lây nhiễm, các giống có tính kháng cao thích hợp làm gốc ghép cho cà chua là: cà dại, cà tím No.1 và cà pháo NT với tỷ lệ bệnh lần lượt là: 2,67; 4,40 và 7,62%; chỉ số bệnh tương ứng là: 0,50; 2,90 và 3,00%.

**Từ khóa:** Héo xanh vi khuẩn, gốc ghép, cà tím, SPA.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh héo xanh vi khuẩn (HXVK) do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith là một trong những bệnh có nguồn gốc từ đất gây hại rất phổ biến ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới (French, 1998; Kelman và Sequeira L., 1995). Bệnh gây hại trên cà chua ở hầu khắp các nước trên thế giới nói chung và tất cả các vùng trồng cà chua ở nước ta nói riêng. Bệnh này rất

khó phòng chống do vi khuẩn có khả năng tồn tại lâu dài trong đất, trong cơ thể ký chủ thực vật. Trong hạt giống, củ giống, vi khuẩn có thể tồn tại được 7 tháng, hơn nữa vi khuẩn có phổ ký chủ rất rộng đến hơn 200 loài thực vật trong 50 họ khác nhau, chủ yếu là các họ thân thảo, cây hai lá mầm của họ Solanaceae. Các đối tượng cây trồng như: thuốc lá, cà chua, khoai tây, cà tím, chuối, gừng, đậu phộng, hạt tiêu thường xuyên xuất hiện loại bệnh này (Denny, 2006).

Người phân biên: TS. Nguyễn Thị Nhã

Tại Việt Nam HXVK do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây hại trên nhiều loại cây trồng cạn, phổ biến trên cà chua, lạc, khoai tây, thuốc lá, ớt, cà tím,... ở vùng Hà Nội và phụ cận (Đỗ Tấn Dũng và cs., 1998). Bệnh gây hại nghiêm trọng với mức độ thiệt hại 10 - 30%, thậm chí làm mất thu hoạch hoàn toàn (Đặng Thái Thuận và cs., 1968).

Cà chua là cây trồng truyền thống tại các vùng Nam Trung Bộ nói chung và đối với Ninh Thuận nói riêng, sản xuất cà chua còn gặp nhiều rủi ro, năng suất và chất lượng cà chua chưa đạt như mong muốn. Nguyên nhân chính là do chưa sử dụng rộng rãi giống và gốc ghép kháng bệnh vào trong sản xuất. Đặc biệt là HXVK do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây thiệt hại lớn cho sản xuất cà chua tại tỉnh Ninh Thuận. Biện pháp tốt nhất cho vấn đề này là trồng cà chua bằng gốc ghép có khả năng kháng bệnh như cà tím, cà xanh, cà pháo, cà chua với ngọn ghép là giống cà chua có năng suất cao được xem là có hiệu quả hơn so với các biện pháp khác.

Theo Besri (2001) việc sử dụng gốc ghép kháng bệnh đối với cây rau đã được thực hiện phổ biến trên thế giới như Tây

Ban Nha, Ý, Đài Loan (Trung Quốc) và Nhật Bản. Ở Nhật Bản năm 1990 có đến 31,5% cà chua, 49,9% cà tím, 92% dưa hấu, 71,7% dưa leo và 43,8% các loại dưa khác được ứng dụng trồng bằng kỹ thuật ghép gốc kháng bệnh. Ở Việt Nam đã bắt đầu nghiên cứu kỹ thuật ghép cà chua năm 1999 tại Viện Nghiên cứu Rau Quả Hà Nội (Lê Thị Thủy, 2000) và Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam năm 2000 - 2003, đến nay khoảng 1/3 diện tích trồng cà chua sử dụng trên gốc ghép cà tím là chủ yếu. Vì vậy, trong bài viết này tập trung nội dung “Đánh giá tính kháng bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith của các giống gốc ghép cho cây cà chua tại Ninh Thuận”.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

*Chủng vi khuẩn (Ralstonia solanacearum Smith)*: Được phân lập từ cây cà chua có triệu chứng điển hình, đặc trưng bệnh héo xanh vi khuẩn trên đồng ruộng.

*Vật liệu nghiên cứu*: 10 giống và 01 đối chứng (bảng 1).

**Bảng 1. Các giống gốc ghép cho cà chua**

| STT | Tên giống            | Cấp giống   | Xuất xứ                | Địa điểm thu thập |
|-----|----------------------|-------------|------------------------|-------------------|
| 1   | Cà tím 252           | F1          | Thái Lan               | Lâm Đồng          |
| 2   | Cà tím NO.1          | F1          | Thái Lan               | Ninh Thuận        |
| 3   | Cà tím Runako        | F1          | Công ty Hai mũi tên đỏ | Ninh Thuận        |
| 4   | Cà đại               | Thuần chủng | Ninh Thuận             | Ninh Thuận        |
| 5   | Cà pháo NT           | Thuần chủng | Ninh Thuận             | Ninh Thuận        |
| 6   | Cà pháo TH           | Thuần chủng | Thanh Hóa              | Ninh Thuận        |
| 7   | Cà núi               | Thuần chủng | Dân tộc Raglai         | Ninh Thuận        |
| 8   | Cà xanh TN121        | F1          | Cty TNHH Trang Nông    | Ninh Thuận        |
| 9   | Cà chua Hawaii       | F1          | Ninh Thuận             | Lâm Đồng          |
| 10  | Cà chua NT           | Thuần chủng | Ninh thuận             | Ninh Thuận        |
| 11  | Cà chua No.317 (đ/c) | F1          | Đài Loan (TQ)          | Ninh Thuận        |

## 2.2. Địa điểm và thời gian

*Địa điểm:* Thí nghiệm được thực hiện tại nhà lưới Viện Nghiên cứu Bông và Phát triển Nông nghiệp Nha Hồ.

*Thời gian thí nghiệm:* Từ tháng 7/2021 đến tháng 7 năm 2022.

## 2.3. Phương pháp nghiên cứu

### 2.3.1. Phương pháp thu thập mẫu, phân lập và nuôi cấy vi khuẩn *R. solanacearum* Smith

Thu thập mẫu bệnh, phân lập, nuôi cấy và nhân sinh khối vi khuẩn theo Tiêu chuẩn ngành Nông nghiệp Việt Nam, TCVN 9300:2014 (Vi sinh vật - Phương pháp đánh giá hoạt tính đối kháng vi khuẩn gây bệnh héo xanh cây trồng cạn *Ralstonia solanacearum* Smith) và Burgess L.W và cs. (2009 - dịch bởi Phan Thúy Hiền).

### 2.3.2. Xác định đặc điểm hình thái của vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith trên môi trường nhân tạo SPA

Quan sát màu sắc của khuẩn lạc vi khuẩn, màu sắc bề mặt khuẩn lạc, tốc độ phát triển của vi khuẩn sau 48 giờ nuôi cấy trên môi trường SPA, TZC, King B trong điều kiện nhiệt độ thích hợp 30<sup>0</sup>C (Kelman, 1954). Dịch vi khuẩn có tính độc xuất hiện màu trắng hoặc kem, hình tròn không đều, dịch lồi lỏng và đục (Patrice G. Champoiseau, 2010).

### 2.3.3. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí CRD (ngẫu nhiên hoàn chỉnh) gồm 10 giống và 01 đối chứng, mỗi công thức nhắc lại 3 lần. Mỗi lần nhắc lại 50 cây.

### 2.3.4. Phương pháp lây nhiễm nhân tạo bệnh HXVK

Khi cây con 4 - 5 lá thật, sát thương rễ bằng cách cắt các rễ non nhúng vào dịch vi khuẩn đã chuẩn bị sẵn (có nồng độ 10<sup>8</sup>cfu/ml) khoảng 20 phút chuyển sang bầu đất đã được tưới 30 - 50ml dung dịch vi khuẩn (có nồng độ 10<sup>8</sup> cfu/ml) (Hong, JC và cs., 2012) và chích vào thân cũng là một phương pháp phổ biến khác được sử dụng để cấy trong quá trình kiểm tra khả năng gây bệnh và thường được thực hiện bằng cách dùng kim chọc thủng thân và tiêm 100ml huyền phù vi khuẩn (OD = 0,1) (Kelman, 1954).

Diễn biến bệnh được theo dõi 7, 14, 21 và 28 ngày sau lây nhiễm theo thang điểm từ 0 đến 5 (TanY.J. và Liao B.S., 1995) và (Ateka và cs.,2001), trong đó:

- 0: Không bị triệu chứng;
- 1: Một lá bị héo;
- 2: Hai đến ba lá bị héo;
- 3: Từ bốn lá trở lên bị héo;
- 4: Tất cả các lá bị héo;
- 5: Cây bị chết.

### 2.3.5. Phương pháp theo dõi và xử lý số liệu

$$\text{- Tỷ lệ bệnh (TLB\%)} = \frac{a}{b} \times 100\%$$

(a là số cây bị héo xanh; b là tổng số cây theo dõi).

Trên cơ sở tỷ lệ bệnh tiến hành phân loại mức kháng hoặc nhiễm (TanY.J. và Liao B.S., 1995) như sau:

Kháng cao (HK): > 90% cây sống sót (< 10% số cây chết).

Kháng (R): 70 - 90% cây sống sót (11 - 30% số cây chết).

Nhiễm trung bình (MS): 50 - 70% cây sống sót (31 - 50% số cây chết).

Nhiễm nặng (HS): 10 - 49% cây sống sót (51 - 90% số cây chết).

$$\text{- Chỉ số bệnh (CSB\%)} = \frac{(N1 \times 1 + N2 \times 2 + N3 \times 3 + N4 \times 4 + N5 \times 5)}{(Nt \times 5)} \times 100\%$$

*Trong đó:* N1 đến N5 số cây tương ứng mỗi cấp tại mỗi lần theo dõi và Nt là tổng số cây theo dõi (Ateka và cs., 2001).

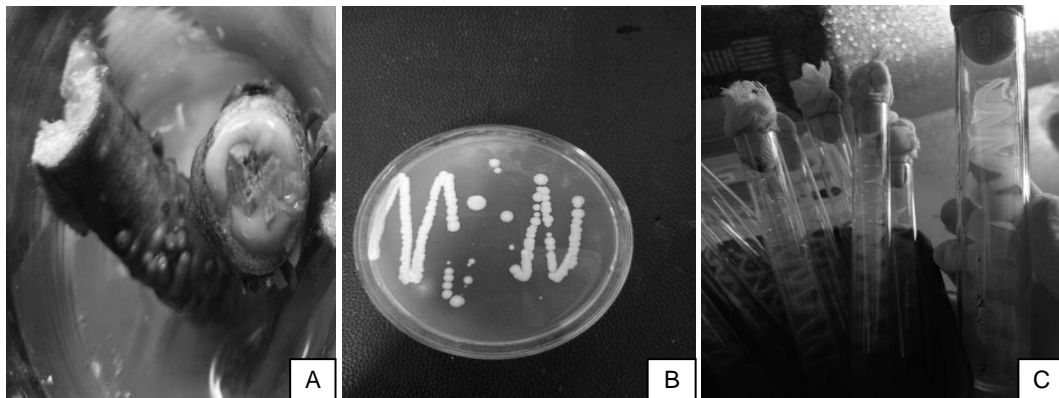
- *Xử lý số liệu:* Số liệu thu thập được xử lý Excel 2007 và phân tích thống kê bằng phần mềm SAS 9.4.

thường xuất hiện trên các thân cây cắt ngang ở các điểm tương ứng với các bó mạch, khử trùng bề mặt và lấy dịch nuôi cấy trên môi trường nhân tạo SPA. Sau 48 giờ trên môi trường thạch đặc các khuẩn lạc có tính độc xuất hiện màu trắng hoặc kem, hình tròn không đều, dịch lồi lõm và đục, hình thái này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Patrice G. Champoiseau và Timur M. Momol (2010) trên môi trường CPG và Suchitra Chanu Heikrujam và cs., (2020) trên môi trường thạch SPA (hình 1).

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Đặc điểm hình thái dịch vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith

*R. solanacearum* được phân lập từ các mô thực vật nhiễm bệnh là dịch rỉ vi khuẩn do *R. solanacearum* tạo ra thường bao gồm các tế bào vi khuẩn thuần khiết (Denny, 2006). Do đó, dịch vi khuẩn



Hình 1. A. Dịch vi khuẩn lấy từ thân cây cà chua bị nhiễm bệnh; B. Khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường SPA; C. Làm thuần và nhân sinh khối từ dịch khuẩn đơn lẻ

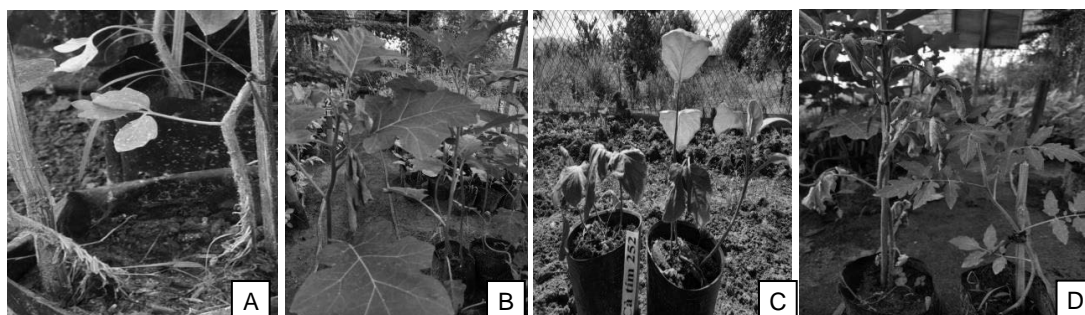
#### 3.2. Các triệu chứng biểu hiện héo xanh

Một số triệu chứng bên ngoài của bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* sau khi lây nhiễm là cây còi cọc và vàng lá. Đầu tiên các lá non và ngọn héo trước, lá bị cong xuống cho thấy lá có biểu hiện khô héo. Rễ mọc nhanh ở thân và xuất

hiện các sọc sẫm hẹp tương ứng với các bó mạch bị nhiễm bệnh bên dưới biểu bì. Sau vài ngày bệnh tiến triển nặng biểu hiện cây héo xanh hoàn toàn, chỉ thân thấy mô mạch phần thân dưới và rễ hóa nâu, cắt ngang thân nhúng vào nước sẽ thấy dòng vi khuẩn màu trắng đục trào ra

từ mạch dẫn. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Belén Álvarez và cs. (2015) cho rằng: Các triệu chứng và tốc độ phát triển của bệnh có thể khác nhau tùy thuộc vào tính nhạy cảm của vật chủ và khả năng gây hại của chủng vi khuẩn. Trong trường hợp cây bị nhiễm bệnh không có biểu hiện héo, các triệu chứng bên ngoài đặc trưng có thể là cây bị lùn,

còi cọc và mọc rễ bất định. Các triệu chứng bên trong thường xuyên nhất là sự đổi màu tiến triển của mô mạch, chủ yếu là xylem, vi khuẩn ký sinh gây hại bên trong các bó mạch dẫn đến các bó mạch bị tắc, mô xung quanh bị phá hủy, khi bệnh phát triển nhanh và nặng thì cây bị chết hoàn toàn.



**Hình 2. Các triệu chứng bên ngoài của bệnh héo xanh vi khuẩn**

A. Cà chua rễ mọc quanh thân; B. Cà dại lá non bị héo xanh;  
C. Cà tím héo toàn bộ lá; D. Cà chua héo toàn bộ lá

### 3.3. Diễn biến tỷ lệ bệnh HXVK của các giống gốc ghép

Thời gian lây nhiễm các giống gốc ghép là khi cây con được 3 - 4 lá (tương ứng 20 - 30 ngày sau gieo) thì bắt đầu lây nhiễm. Đối với giống cà chua Hawaii, cà chua NT sau 7 ngày lây nhiễm, cho thấy tỷ lệ bệnh là (12,38 - 12,47%) thấp hơn có ý nghĩa so với đối chứng cà chua No.317 (22,60%). Trong khi đó, các giống cà tím và cà dại tỷ lệ nhiễm bệnh thấp khoảng 2%. Điều này cho thấy rằng, các giống cà chua mẫn cảm và bị nhiễm bệnh nhanh hơn so với các giống họ cà khác cùng thí nghiệm. Nghiên cứu này phù hợp với Ngô Quang Vinh và Ngô Xuân Chinh (2000), Vũ Triệu Mân và Lê Lương Tề (1998) cho rằng tỉ lệ bệnh héo xanh thể hiện ở mức nặng trong giai đoạn cây con và đậu trái non.

Tỷ lệ nhiễm bệnh của các giống tăng nhanh qua các đợt theo dõi 7, 14, 21 ngày. Trong đó, các giống cà tím Runako tỷ lệ bệnh tăng (2,62 - 15,70%), cà núi (2,42 - 9,69%), cà xanh TN 121 (7,24 - 34,94%) và cà chua Hawaii (12,38 - 37,15%) nhưng thấp hơn có ý nghĩa so với đối chứng cà chua No.317 (22,60 - 70,31%). Hai giống cà tím No.1 và cà pháo NT tỷ lệ bệnh khá thấp lần lượt là 3,39% và 7,62%. Trong khi đó, cà dại chưa xuất hiện các triệu chứng bệnh (bảng 2). Kết quả này phù hợp với Trần Thị Ba và Phạm Thanh Phong (2010) cho rằng, các giống cà địa phương và giống cà tím tỷ lệ bệnh héo xanh thấp hơn so với các giống cà chua.

Sau 28 ngày lây nhiễm, đây là đợt đánh giá cuối cùng nhận thấy các giống hầu hết có biểu hiện nhiễm bệnh. Các giống có tỷ lệ bệnh cao nhất là cà chua Hawaii (46,81%)

và cà xanh TN121 (46,34%), kể đến cà chua (2,67%), cà tím No.1 (4,40%) và cà pháo NT (45,81%), thấp nhất là ba giống cà đại NT (7,62%) (bảng 2).

**Bảng 2. Tỷ lệ nhiễm bệnh HXVK (%) của các giống gốc ghép**

| STT | Tên giống            | Tỷ lệ bệnh (%) |         |         |         |
|-----|----------------------|----------------|---------|---------|---------|
|     |                      | 7 ngày         | 14 ngày | 21 ngày | 28 ngày |
| 1   | Cà tím 252           | 2,95           | 5,90    | 12,83   | 12,83   |
| 2   | Cà tím No.1          | 0,00           | 0,00    | 3,39    | 4,40    |
| 3   | Cà tím Runako        | 2,62           | 6,11    | 15,70   | 24,36   |
| 4   | Cà đại               | 0,00           | 0,00    | 0,00    | 2,67    |
| 5   | Cà pháo NT           | 0,00           | 2,54    | 7,62    | 7,62    |
| 6   | Cà pháo TH           | 2,77           | 11,09   | 11,95   | 19,23   |
| 7   | Cà núi               | 2,42           | 5,62    | 9,69    | 15,33   |
| 8   | Cà xanh TN121        | 7,24           | 20,45   | 34,94   | 46,34   |
| 9   | Cà chua Hawaii       | 12,38          | 24,76   | 37,15   | 46,81   |
| 10  | Cà chua NT           | 12,47          | 24,98   | 45,55   | 45,85   |
| 11  | Cà chua No.317 (đ/c) | 22,60          | 42,28   | 70,31   | 76,01   |
|     | LSD (0,05)           | 1,16           | 1,49    | 2,53    | 2,45    |
|     | CV (%)               | 11,4           | 6,7     | 6,5     | 4,0     |

### 3.4. Diễn biến chỉ số bệnh HXVK của các giống gốc ghép

Sau khi lây nhiễm để đánh giá mức độ nghiêm trọng gây hại của vi khuẩn

*R.solanacearum* đối với các giống, chúng tôi theo dõi tiến triển của bệnh thông qua chỉ số bệnh, kết quả được trình bày ở bảng 3.

**Bảng 3. Chỉ số bệnh HXVK (%) của các giống gốc ghép**

| STT | Tên giống            | Chỉ số bệnh (%) |         |         |         |
|-----|----------------------|-----------------|---------|---------|---------|
|     |                      | 7 ngày          | 14 ngày | 21 ngày | 28 ngày |
| 1   | Cà tím 252           | 0,59            | 1,77    | 4,54    | 11,54   |
| 2   | Cà tím No.1          | 0,00            | 0,00    | 0,68    | 2,91    |
| 3   | Cà tím Runako        | 0,52            | 1,93    | 6,63    | 17,52   |
| 4   | Cà đại               | 0,00            | 0,00    | 0,00    | 0,53    |
| 5   | Cà pháo NT           | 0,00            | 0,51    | 2,38    | 3,02    |
| 6   | Cà pháo TH           | 0,55            | 3,70    | 4,77    | 15,01   |
| 7   | Cà núi               | 0,48            | 1,61    | 3,72    | 12,10   |
| 8   | Cà xanh TN121        | 2,40            | 7,68    | 14,66   | 37,60   |
| 9   | Cà chua Hawaii       | 5,56            | 10,73   | 18,77   | 39,54   |
| 10  | Cà chua NT           | 5,90            | 10,45   | 34,06   | 40,69   |
| 11  | Cà chua No.317 (đ/c) | 8,40            | 26,21   | 49,79   | 69,41   |
|     | LSD (0,05)           | 0,95            | 2,53    | 2,16    | 1,69    |
|     | CV (%)               | 25,2            | 25,3    | 9,5     | 6,3     |

Sau 7 ngày lây nhiễm: Các giống cà chua Hawaii, cà chua NT, cà tím 252, cà tím Runako và cà xanh TN121 đã biểu hiện triệu chứng điển hình của bệnh HXVK với chỉ số nhiễm bệnh dao động 0,52 -5,90% thấp hơn có ý nghĩa đối với đối chứng cà chua No.317 (8,4%). Trong khi đó, cà tím No.1, cà pháo NT và cà đại chưa xuất hiện các triệu chứng bệnh.

Sau 14 ngày lây nhiễm: Ở thời điểm này, bệnh vẫn chưa xuất hiện đối với hai giống cà tím No.1 và cà đại. Trong khi đó, bệnh phát triển nhanh với chỉ số bệnh tăng gấp đôi so với thời điểm sau 7 ngày lây nhiễm đối với các giống thuộc nhóm cà chua NT (5,90 - 10,45%), cà chua Hawaii từ (5,56 -10,73%), cà xanh TN121 (2,40 - 7,68%) và pháo TH (0,55 - 3,70%) nhưng thấp hơn có ý nghĩa so với đối chứng cà chua No.317 (8,40 - 26,21%) (bảng 3).

Sau 21 ngày lây nhiễm: Chỉ số bệnh tăng mạnh, biểu hiện mức độ gây hại ở các cấp bệnh tăng rõ, ở giai đoạn này hầu hết các giống không dừng lại ở héo 1 lá hay rễ mọc trên thân, vàng còi cọc mà triệu chứng bệnh rõ rệt hơn là toàn bộ lá bị héo rũ, cây héo xanh. Biểu hiện rõ là chỉ

số bệnh cao ở hai giống cà chua Hawaii (18,77%) và cà chua NT (34,06%) đa số cây bị héo xanh ở cấp 4 (toàn bộ lá bị héo). Trong khi đó, các nhóm giống cà tím và cà địa phương mức độ gây hại của vi khuẩn không đáng kể với chỉ số bệnh dao động từ 0,68 - 6,63% chủ yếu cây bị héo 1 đến 2 lá (cấp 1, cấp 2).

Sau 28 ngày lây nhiễm: Các giống đã biểu hiện rõ khả năng nhiễm bệnh và mức độ gây hại nghiêm trọng của vi khuẩn. Các giống cà tím No.1, cà đại và cà pháo NT được đánh giá là kháng cao, chỉ số bệnh dao động 0,53 - 3,02%. Trong khi đó, giống cà tím Runako, cà pháo TH và cà núi mức độ gây hại vẫn tăng gấp đôi so với thời gian 21 ngày, tương ứng với chỉ số bệnh (6,63 - 17,52%), (4,77 - 15,01%) và (3,72 - 12,10%). Vì đây là đợt theo dõi cuối cùng, nên nhận thấy các giống cà chua Hawaii, cà chua NT và cà xanh TN 121 bị ảnh hưởng nghiêm trọng, biểu hiện các cây bị héo xanh hoàn toàn, thậm chí cây chết khô, chỉ số bệnh cao từ 37,60 - 40,69%, tuy nhiên vẫn thấp hơn có ý nghĩa so với đối chứng cà chua No.317 (69,41%) (bảng 3).

### 3.5. Tính kháng của các giống gốc ghép

**Bảng 4. Tỷ lệ cây sống, chết của các giống gốc ghép sau 28 ngày lây nhiễm**

| STT | Tên giống            | Tỷ lệ %  |          | Mức kháng | Ghi chú          |
|-----|----------------------|----------|----------|-----------|------------------|
|     |                      | Cây sống | Cây chết |           |                  |
| 1   | Cà tím 252           | 89,25    | 10,75    | R         | Kháng            |
| 2   | Cà tím No.1          | 97,76    | 2,24     | HK        | Kháng cao        |
| 3   | Cà tím Runako        | 85,28    | 14,72    | R         | Kháng            |
| 4   | Cà đại               | 100,00   | 0,00     | HK        | Kháng cao        |
| 5   | Cà pháo NT           | 99,21    | 0,79     | HK        | Kháng cao        |
| 6   | Cà pháo TH           | 87,17    | 12,83    | R         | Kháng            |
| 7   | Cà núi               | 89,51    | 10,49    | R         | Kháng            |
| 8   | Cà xanh TN121        | 67,03    | 32,97    | MS        | Nhiễm trung bình |
| 9   | Cà chua Hawaii       | 63,89    | 36,11    | MS        | Nhiễm trung bình |
| 10  | Cà chua NT           | 62,37    | 37,63    | MR        | Nhiễm trung bình |
| 11  | Cà chua No.317 (đ/c) | 33,72    | 66,28    | HS        | Nhiễm nặng       |

Kết quả bảng 4 cho thấy, sau 28 ngày lây nhiễm các giống cà dại, cà pháo NT và cà tím No.1 có tỷ lệ cây sống rất cao lần lượt là 100,00; 99,21 và 97,76%; tỷ lệ cây chết héo lần lượt 0,00; 0,79% và 2,24% thể hiện mức kháng cao (HR). Các giống có tỷ lệ cây sống dao động 85,28 - 89,51% thể hiện mức kháng (R) là giống Cà tím 252, cà tím Runako, cà pháo TH và cà núi. Trong khi đó, các giống cà chua NT, cà chua Hawaii và cà xanh TN121 thể hiện ở mức nhiễm trung bình với tỷ lệ cây sống tương ứng là: 62,37; 63,89 và 67,03%; tỷ lệ cây chết héo tương ứng là: 37,63; 36,11 và 32,97% (bảng 4).

#### 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

##### 4.1. Kết luận

Các giống cà dại, cà tím No.1 và cà pháo NT không bị ảnh hưởng nghiêm trọng bởi vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* sau 28 ngày lây nhiễm với tỷ lệ bệnh tương ứng là: 2,67; 4,40 và 7,62%; chỉ số bệnh tương ứng là: 0,50; 2,90 và 3,00%.

Tính kháng của các giống gốc ghép đối với bệnh héo xanh vi khuẩn: Mức kháng cao (HK) là cà tím No.1, cà pháo NT và cà dại với tỷ lệ cây sống lần lượt là 97,76; 99,21 và 100,00%; Mức kháng (R) là các giống cà tím 252, cà tím Runako, cà pháo TH và cà núi với tỷ lệ cây sống lần lượt là 89,25; 85,28; 87,17 và 89,51%; Nhiễm trung bình (MS) là các giống cà xanh TN 121, cà chua Hawaii và cà chua NT với tỷ lệ cây sống lần lượt là 67,17; 63,89 và 62,37%.

##### 4.2. Đề nghị

Sử dụng 03 giống có tính kháng cao gồm: Cà tím No.1, cà dại và cà pháo NT

làm gốc ghép trong sản xuất cà chua tại Ninh Thuận.

Tiếp tục nghiên cứu khả năng tiếp hợp, tính kháng và năng suất của tổ hợp ghép là các giống gốc ghép kháng bệnh HXVK cao với ngọn cà chua phục vụ sản xuất cây giống ghép.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. 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, 210 pp. CIAR: Canberra (Dịch bởi Phan Thúy Hiền).
2. Đặng Thái Thuận, Trần Huệ Tâm, Võ Thị Phương, 1968. Bệnh chết ẻo lạc ở Nghệ An. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật nông nghiệp*, số 78, 1968, Tr.338 - 343.
3. Đỗ Tấn Dũng, Đào Đức Thúc, Lê Lương Tề, 1998. Một số kết quả điều tra nghiên cứu bệnh héo rũ thuốc lá (*Pseudomonas solanacearum* Smith) vùng Hà Nội và phụ cận. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, số 6, Tr. 20 - 24.
4. Lê Thị Thủy, 2000. Nghiên cứu và ứng dụng phương pháp ghép trong sản xuất cà chua trái vụ. Luận văn tốt nghiệp Thạc sỹ, Hà Nội.
5. Ngô Quang Vinh và Ngô Xuân Chinh, 2003. Nghiên cứu và ứng dụng biện pháp ghép cà chua chống bệnh héo rũ vi khuẩn (*Ralstonia solanacearum*) tại Lâm Đồng 2003 - 2004. Báo cáo hội nghị khoa học tiểu ban Trồng trọt, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, tập 2.
6. Trần Thị Ba, Phạm Thanh Phong, 2010. Đánh giá khả năng sống và chống chịu bệnh héo tưới do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* của cà chua ghép trong nhà lưới. *Tạp chí Khoa học*, 2010:16b, Trường Đại học Cần Thơ, 272 - 279.
7. Vũ Triệu Mân và Lê Lương Tề, 1998. Bệnh cây Nông nghiệp. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.
8. Ateka, Mwang'Ombe and Kimenju, 2001. Reaction of potato cultivars to *Ralstonia solanacearum* in Kenya. *African Crop Science Journal*, 9(1), 251 - 256.

9. Besri M., 2001. New developments of Alternatives to Methyl Bromide for the control of Tomato Soil borne pathogens in covered cultivation in a developing country, Morocco. Proceedings of the international research conference on methyl bromide alternatives and emissions reductions, November 5 -8, San Diego, California., (9 - 1)-(9 - 3).
10. Belén Álvarez, Elena G. Biosca, María M. López, 2015. *On the life of Ralstonia solanacearum, a destructive bacterial plant pathogen*”, Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia (UEVG), Avenida Dr. Moliner, pp 267 - 273).
11. Denny, T. P., 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. Pages 573 - 644 in: Plant-Associated Bacteria. S. S. Gnanamanickam, ed. Springer, Dordrecht, the Netherlands.
12. French E.R., 1998. The usefulness of potato resistance to *R. solanacearum*, for the integrated control of Bacterial wilt. Bacterial Wilt Disease, Molecular and Ecological Aspects, Springer and INRA editions, pp.381 -385.
13. Hong, JC, Norman, DJ, Reed, DL, Momol, MT và Jones, JB, 2012. Diversity among strains of *Ralstonia solanacearum* isolated from the southeastern United States. *Phytopathology* 102: 924 - 936.
14. Kelman A., 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in Tetrazolium medium. *Phytopathology*, (51), pp. 158 - 161.
15. Kelman A., and Sequeira L., 1995. Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, (55), pp. 304 - 309.
16. Patrice G. Champoiseau and Timur M. Momol “Bacterial Wilt of Tomato” of the University of Florida; The United States Department of Agriculture - National Research Initiative Program (2007 - 2010)
17. Suchitra Chanu Heikrujam, RK Imotomba Singh, Pinky Chanu Laiphrakpam and Supriya Laishram, 2020. “Isolation and characterization of *Ralstonia solanacearum* from infected tomato plants of Bishnupur district of Manipur”, *The Pharma Innovation Journal*, 2020; 9 (1), pp.138 - 141.
18. Tan YJ and Liao B.S., 1995. General aspects of groundnut Bacterial wilt in China. Bacterial Wilt of groundnut, ACIAR Proceedings, No 31, pp.44 - 47 10.

## ABSTRACT

### **The evaluation of the resistance to Bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* Smith on tomato rootstocks cultivars in Ninh Thuan province**

*Bacterial wilt disease is caused by a bacterium Ralstonia solanacearum which is known as a major concern for tomato cultivating farmers in Ninh Thuan province. Identifying Bacterial wilt disease resistant rootstocks is an urgent solution for specialized vegetable growing regions. The study was carried out on 10 varieties of solanaceae family (eggplant, local eggplant, tomato) and tomato variety No.317 (F1) was referred to as a control. Bacterial samples contain R. solanacearum were collected, then isolated and grown in SPA culture medium. The cultivars were infected at the nursery stage of 3 - 4 leaves by cutting roots and soaked in 30 - 50 ml of bacterial solution at concentration of  $10^8$  cfu/ml and then injecting the inoculum into the stem. The results indicated that, after 28 days of infection, the high resistance cultivars suitable for usage as rootstock for tomato were wild eggplant, eggplant No.1 and eggplant NT with the disease rates were 2.67, 4.40, and 7.62%,; along with the corresponding disease index were 0.50, 2.90 and 3.00%, respectively.*

**Keywords:** Bacterial wilt disease, rootstocks, eggplant, SPA.

# BỆNH PHẤN TRẮNG (*Oidium erysiphoides*) HẠI TÁO VÀ HIỆU LỰC MỘT SỐ LOẠI THUỐC TRỪ BỆNH TẠI NAM TRUNG BỘ

Mai Văn Hào<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Chính<sup>1</sup>,  
Phan Công Kiên<sup>1</sup>, Trần Thị Hồng<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu Bông và Phát triển nông nghiệp Nha Hồ

## TÓM TẮT

Năm 2020 và 2021 đã nghiên cứu về mức độ phổ biến, diễn biến bệnh và khảo nghiệm để xác định thuốc có hiệu quả cao trừ bệnh hại trên cây táo tại các tỉnh Nam Trung Bộ. Kết quả nghiên cứu cho thấy, bệnh phấn trắng gây hại trên cây táo trong suốt cả năm ở hầu khắp các vùng trồng táo tại Nam Trung Bộ. Bệnh phấn trắng gây hại chủ yếu trên quả non và lá táo. Bệnh hại nặng từ khi quả táo còn non, đặc biệt trong các tháng mùa mưa. Kết quả nghiên cứu cũng đã xác định được 5 loại thuốc Manage 5WP (Imibenconazole), Validad 100SL (Validamycin A), Novinano 55WP (Kasugamycin + Streptomycin sulfate), Abi Kentomium (Chatomium sp.) và Abi PS (*Pseudomonas fluorescens*) có hiệu lực cao trừ bệnh phấn trắng hại táo.

**Từ khóa:** Cây táo, bệnh phấn trắng, thuốc trừ bệnh.

## 1. MỞ ĐẦU

Táo xanh là một trong những cây ăn quả được trồng khá phổ biến và cho hiệu quả kinh tế cao tại khu vực Nam Khánh Hòa đến Bắc Bình Thuận. Táo là cây trồng khá phù hợp trên vùng đất khô hạn và đang dần chiếm vị trí quan trọng trong cơ cấu cây trồng của khu vực, là cây trồng triển vọng để chuyển đổi cơ cấu cây trồng. Cây táo có bộ rễ phát triển mạnh, ăn sâu trong lòng đất nên cây táo chịu hạn, gió lớn. Năm 2021, diện tích trồng táo tại Nam Trung Bộ khoảng 1.300ha,

trong đó Ninh Thuận là tỉnh trồng táo lớn nhất với trên một ngàn ha. Bên cạnh đó, cây táo cũng trồng tại Khánh Hòa khoảng trên 100ha và Bình Thuận khoảng 70ha.

Táo cũng là một trong những loại cây giàu dinh dưỡng thường bị nhiều đối tượng sinh vật gây hại. Tại các tỉnh Nam Trung Bộ, cây táo thường bị nhiều loại sâu bệnh hại nguy hiểm, nhất là bệnh phấn trắng (*Oidium erysiphoides*). Đến nay, trong sản xuất, người trồng táo chủ yếu sử dụng thuốc hóa học để trừ bệnh nhưng chưa có các nghiên cứu liên quan nên hiệu quả không cao. Hơn nữa, người

Người phân biên: TS. Phùng Minh Lộc

dân sử dụng các loại thuốc có hóa học có độ độc cao dễ gây tổn hại đến sức khỏe của người sản xuất, môi trường sinh thái và tồn dư chất độc trong sản phẩm. Vì vậy, việc nghiên cứu thực trạng bệnh phấn trắng gây hại, diễn biến bệnh trên cây táo làm cơ sở cho nắm bắt quy luật phát sinh gây hại, dự tính dự báo cùng nghiên cứu xác định một số thuốc tốt nhưng ít độc với môi trường là rất cần thiết để khuyến sử dụng. Xuất phát từ yêu cầu của thực tiễn trên tập thể tác giả đã nghiên cứu bệnh phấn trắng (*O. erysipoides*) hại táo và hiệu lực một số loại thuốc trừ bệnh tại Nam Trung Bộ.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian: Từ năm 2020 đến 2021.

- Địa điểm nghiên cứu: Các vùng trồng táo tại Nam Trung bộ.

### 2.2. Vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Vật liệu, dụng cụ nghiên cứu

- Các dụng cụ để điều tra, thu mẫu; kính lúp, máy ảnh...

- Các loại thuốc Bionite WP (*Bacillus subtilis*), Novinano 55WP (Kasugamycin + Streptomycin sulfate), Validad 100SL (Validamycin A), Abi- PS (*Pseudomonas fluorescens*), Abi-Kentomium (*Chatomium* sp.), Risaza 3SL (Oligo-Chitosan), Lime Sulfur (Calcium Polysulfide), Starone 50WP (Chitosan + Polyoxin), Score® 250EC

(Difenoconazole), Manage 5WP (Imibenconazole).

### 2.3.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.2.1. Nghiên cứu mức độ phổ biến, diễn biến bệnh phấn trắng hại táo tại Nam Trung Bộ

\* Nội dung điều tra: Điều tra tại 3 vườn táo có độ tuổi từ 4 đến 10 năm tuổi và đang giai đoạn quả non của mỗi tiểu vùng sinh thái tại Nam Trung Bộ gồm: huyện Ninh Sơn và huyện Ninh Phước - tỉnh Ninh Thuận, TP. Cam Ranh - tỉnh Khánh Hòa, huyện Tuy Phong - tỉnh Bình Thuận.

\* Phương pháp theo dõi: Dựa theo QCVN 01 - 38:2010/BNNPTNT “Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về phương pháp điều tra phát hiện dịch hại cây trồng”. Định kỳ điều tra 10 ngày/lần.

#### 2.3.2.2. Khảo nghiệm hiệu lực trừ bệnh phấn trắng hại táo của một số thuốc

Bố trí thí nghiệm đồng ruộng theo kiểu RCBD gồm 11 công thức, 3 lặp lại, mỗi ô có diện tích 60m<sup>2</sup>.

Công thức 1: Bionite WP (*Bacillus subtilis*), liều lượng 0,3g/ha;

Công thức 2: Novinano 55WP (Kasugamycin + Streptomycin sulfate), liều lượng 0,8kg/ha;

Công thức 3: Validad 100SL (Validamycin A): Liều lượng 1,00 lít/ha;

Công thức 4: Abi-PS (*Pseudomonas fluorescens*), liều lượng 1,20kg/ha;

Công thức 5: Abi-Kentomium (*Chatomium* sp.): Liều lượng 1,20kg/ha;

Công thức 6: Risaza 3SL (Oligo-Chitosan): Liều lượng 0,80 lít/ha;

Công thức 7: Lime Sulfur (Calcium Polysulfide): Liều lượng 2,50kg/ha;

Công thức 8: Starone 50WP (Chitosan + Polyoxin): Liều lượng: 2,00kg/ha;

Công thức 9: Score® 250EC (Difenoconazole): Liều lượng 0,80 lít/ha;

Công thức 10: Manage 5WP (Imibenconazole): Liều lượng 0,64kg/ha;

Công thức 11: Đối chứng (phun nước lã).

Thí nghiệm được bố trí trên vườn táo xanh 6 năm tuổi giai đoạn quả non.

- Thời điểm xử lý: Phun thuốc lần 1 khi bệnh vừa xuất hiện với tỷ lệ bệnh 4,67 - 5,33%. Phun lại lần 2 sau lần thứ nhất 5 ngày.

- Phương pháp theo dõi: Theo dõi tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh (%) phần trắng tại các thời điểm ngay trước mỗi lần xử lý thuốc và 5, 10 ngày sau xử lý thuốc lần 2. Mỗi ô khảo nghiệm chọn 5 điểm cố định trên hai đường chéo góc, các điểm điều tra cách mép ô tối thiểu 1m. Mỗi điểm điều tra 10 quả cố định (quả vừa đậu). Quan sát và phân cấp bệnh trên từng quả.

\* *Chi tiêu theo dõi:*

Tính tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ bệnh (\%)} = \frac{\text{Số quả bị bệnh}}{\text{Tổng số quả điều tra}} \times 100$$

$$\text{Chỉ số bệnh trên quả (\%)} = ((9 \cdot n_9 + 7 \cdot n_7 + 5 \cdot n_5 + 3 \cdot n_3 + 1 \cdot n_1) / 9N) \cdot 100$$

Trong đó: + N: Tổng số quả điều tra.

+  $n_{1-9}$ : Số quả bị bệnh tương ứng ở cấp 1 -9.

- Bảng phân cấp bệnh phần trắng trên quả táo:

| Cấp bệnh | Triệu chứng   |
|----------|---|
| $n_1$    | quả bị bệnh ở cấp 1 với < 5% diện tích quả bị bệnh      |
| $n_3$    | quả bị bệnh ở cấp 3 với ≥ 5 - 10% diện tích quả bị bệnh |
| $n_5$    | quả bị bệnh ở cấp 5 với ≥ 10 -15% diện tích quả bị bệnh |
| $n_7$    | quả bị bệnh ở cấp 7 với ≥ 15 -20% diện tích quả bị bệnh |
| $n_9$    | quả bị bệnh ở cấp 9 với ≥ 20% diện tích quả bị bệnh     |

- Mức độ phổ biến:

| Tỷ lệ bất gặp (%) | Mức độ phổ biến | Ký hiệu |
|-------------------|-----------------|---------|
| 0                 | Không bất gặp   | -       |
| < 10              | Không phổ biến  | +       |
| 10 - < 25         | Ít phổ biến     | ++      |
| 25 - < 50         | Phổ biến        | +++     |
| ≥ 50              | Rất phổ biến    | ++++    |

- Tính tốc độ tăng trưởng của bệnh (r) theo Van Der Plank (1963):

$$r = \{2,3 / (T_1 - T_0)\} * \ln (X_1 / X_0)$$

Trong đó: 2,3 là hằng số

$T_0$ : Thời gian bắt đầu điều tra.

$T_1$ : Thời gian kết thúc điều tra.

$X_0$ : Giá trị tỷ lệ bệnh (hoặc chỉ số bệnh) ở định kỳ điều tra đầu.

$X_1$ : Giá trị tỷ lệ bệnh (hoặc chỉ số bệnh) ở định kỳ điều tra cuối.

+ Xử lý số liệu trên máy tính bằng chương trình MSTATC và Excel.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Mức độ phổ biến của bệnh phấn trắng gây hại trên cây táo tại Nam Trung Bộ

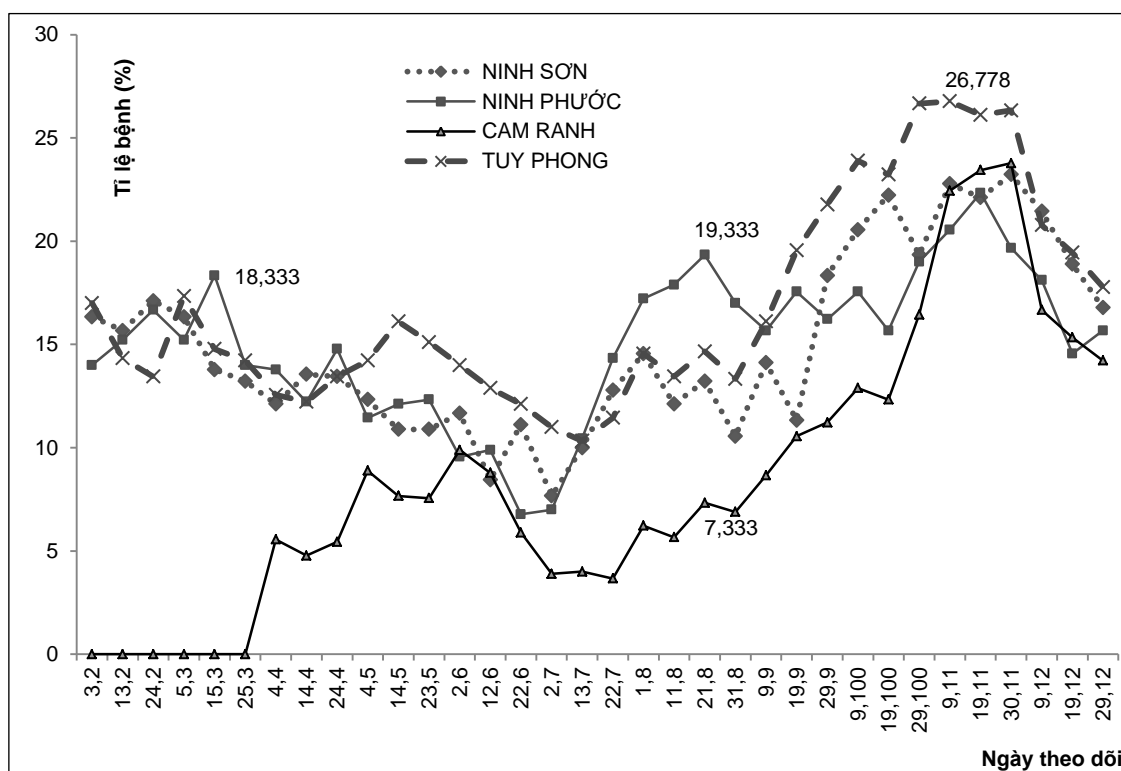
Kết quả điều tra bệnh phấn trắng gây hại trên cây táo tại các tỉnh Nam Trung Bộ cho thấy, bệnh phấn trắng xuất hiện

và gây hại ở tất cả các vùng trồng táo (bảng 1). Ghi nhận bệnh phấn trắng gây hại rất phổ biến trên quả non, ít phổ biến trên quả già và không gây hại trên quả chín. Bệnh phấn trắng có gây hại trên lá táo nhưng không phổ biến ở tất cả các vùng nghiên cứu.

**Bảng 1. Mức độ phổ biến của bệnh phấn trắng gây hại trên cây táo tại Nam Trung Bộ trong năm 2020**

| STT | Vùng điều tra           | Mức độ phổ biến của bệnh phấn trắng gây hại trên các bộ phận của cây táo |      |         |         |          |
|-----|-------------------------|--|------|---------|---------|----------|
|     |                         | Lá   | Cành | Quả non | Quả già | Quả chín |
| 1   | Cam Ranh - Khánh Hoà    | +  | -    | ++++    | +       | -        |
| 2   | Ninh Sơn - Ninh Thuận   | +  | -    | ++++    | +       | -        |
| 3   | Ninh Phước - Ninh Thuận | +  | -    | ++++    | +       | -        |
| 4   | Tuy Phong - Bình Thuận  | +  | -    | ++++    | +       | -        |

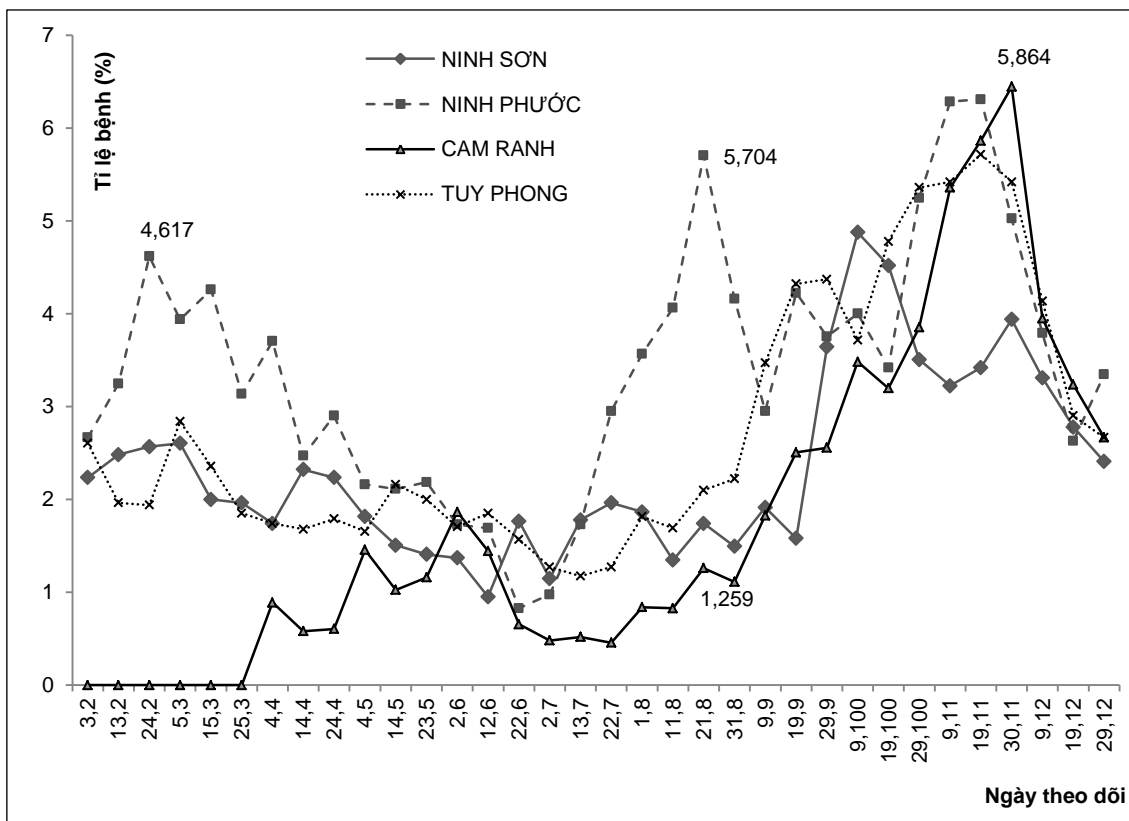
#### 3.2. Diễn biến bệnh phấn trắng gây hại trên quả táo tại các vùng điều tra



**Hình 1. Diễn biến tỉ lệ bệnh phấn trắng hại táo tại Nam Trung Bộ năm 2020**

Kết quả điều tra diễn biến bệnh phấn trắng gây hại trên cây táo tại các vùng nghiên cứu trong năm 2020 cho thấy, bệnh phấn trắng xuất hiện và gây hại trên cây táo quanh năm. Bệnh phấn trắng gây hại trên cây táo tại huyện Tuy Phong và huyện Ninh Phước cao hơn so với tại huyện Ninh Sơn và thành phố Cam Ranh. Trong đó, bệnh phấn trắng gây hại táo tại thành phố Cam Ranh thấp nhất. Cây táo tại huyện Ninh Sơn, huyện Ninh Phước

của Ninh Thuận và huyện Tuy Phong tỉnh Bình Thuận thường duy trì trên đồng và cho thu hoạch quanh năm nên nguồn bệnh luôn tồn tại, nguy cơ bệnh phấn trắng bùng phát thành dịch và hại nặng hơn so với thành phố Cam Ranh. Tại Cam Ranh, cây táo thường được cắt cành tập trung trong tháng 1 đến tháng 2 nên đến tháng 4 bệnh mới bắt đầu thấy xuất hiện gây hại (hình 1).



Hình 2. Diễn biến chỉ số bệnh phấn trắng hại táo tại Nam Trung Bộ năm 2020

Trên quả táo, bệnh phấn trắng xuất hiện và gây hại ngay sau khi đậu quả. Trong năm, bệnh phấn trắng xuất hiện và gây hại nặng nhất vào các tháng mùa mưa (tháng 9, 10, 11), bệnh luôn

duy trì ở tỷ lệ hại cao trong các tháng cuối mùa mưa đến đầu mùa khô và sau đó bệnh giảm dần, gây hại ít nhất trong mùa khô (tháng 4, 5, 6, 7) (hình 1 và hình 2).

### 3.3. Hiệu lực trừ bệnh phấn trắng hại quả táo của một số loại thuốc

#### 3.3.1. Tỷ lệ bệnh phấn trắng hại táo ở các công thức xử lý thuốc

Khi tỷ lệ bệnh phấn trắng từ 4,67 - 5,33% thì xử lý thuốc. Ở 3 ngày sau phun lần 1 và trước phun thuốc lần 2, tỷ lệ bệnh phấn trắng ở các công thức xử lý Bionite WP, Rizasa 3SL và không có sự sai khác có ý nghĩa so với đối chứng (bảng 2). Tỷ lệ bệnh ở công thức xử lý Manage 5WP thấp nhất và không sai khác nhiều so với các công thức xử lý NoviNano 55WP, Abi PS, Abi

Kentomium, Lime Sulfur và Starone 20WP. Tỷ lệ bệnh ở các công thức còn lại cũng có giảm so với đối chứng. Tỷ lệ bệnh ở các công thức xử lý thuốc khảo nghiệm luôn thấp hơn có ý nghĩa so với công thức đối chứng ở tất cả các kỳ điều tra sau phun thuốc.

Ở 5 ngày và 10 ngày sau phun thuốc lần 2, tỷ lệ bệnh phấn trắng thấp nhất ở các công thức xử lý Manage 5WP, NoviNano55WP, Abi PS, Abi Kentomium, Validad 100SL và Lime Sulfur. Các công thức này có tỷ lệ bệnh thấp hơn có ý nghĩa so với các công thức còn lại và đối chứng.

**Bảng 2. Ảnh hưởng của các thuốc khảo nghiệm đến tỷ lệ bệnh phấn trắng hại táo trong vụ khô năm 2021 tại Ninh Thuận**

| Công thức                 | Tỷ lệ bệnh phấn trắng qua các kỳ điều tra (%) |                    |                     |                     |                     |
|---------------------------|---|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                           | TP1   | 3 NSP1             | TP2                 | 5 NSP2              | 10 NSP2             |
| 1. Bionite WP             | 5,33  | 10,67 <sup>a</sup> | 15,67 <sup>a</sup>  | 19,00 <sup>b</sup>  | 21,00 <sup>b</sup>  |
| 2. NoviNano 55WP          | 4,67  | 7,00 <sup>cd</sup> | 7,68 <sup>cd</sup>  | 8,00 <sup>e</sup>   | 9,33 <sup>d</sup>   |
| 3. Validad 100SL          | 5,33  | 8,00 <sup>bc</sup> | 8,00 <sup>cd</sup>  | 9,00 <sup>de</sup>  | 11,00 <sup>d</sup>  |
| 4. Abi PS                 | 5,00  | 7,33 <sup>cd</sup> | 9,00 <sup>cd</sup>  | 9,33 <sup>de</sup>  | 9,67 <sup>d</sup>   |
| 5. Abi Kentomium          | 5,00  | 6,67 <sup>cd</sup> | 8,67 <sup>cd</sup>  | 8,67 <sup>de</sup>  | 10,00 <sup>d</sup>  |
| 6. Rizasa 3SL             | 5,33  | 10,67 <sup>a</sup> | 12,33 <sup>b</sup>  | 13,67 <sup>c</sup>  | 15,33 <sup>c</sup>  |
| 7. Lime Sulfur            | 5,00  | 7,67 <sup>cd</sup> | 8,67 <sup>cd</sup>  | 9,67 <sup>de</sup>  | 13,33 <sup>cd</sup> |
| 8. Starone 20WP           | 4,67  | 6,67 <sup>cd</sup> | 8,67 <sup>cd</sup>  | 11,67 <sup>cd</sup> | 15,00 <sup>c</sup>  |
| 9. Score 250EC            | 5,33  | 9,00 <sup>bc</sup> | 10,67 <sup>bc</sup> | 12,67 <sup>c</sup>  | 14,67 <sup>cd</sup> |
| 10. Manage 5WP            | 4,67  | 5,00 <sup>d</sup>  | 6,00 <sup>d</sup>   | 6,33 <sup>e</sup>   | 8,00 <sup>d</sup>   |
| 11. Đối chứng             | 5,00  | 11,33 <sup>a</sup> | 15,67 <sup>a</sup>  | 23,67 <sup>a</sup>  | 31,67 <sup>a</sup>  |
| <i>LSD<sub>0,05</sub></i> | <i>ns</i>                                     | <i>2,45</i>        | <i>3,12</i>         | <i>3,33</i>         | <i>3,64</i>         |

*Ghi chú:* \* Các giá trị trung bình trong cùng một cột được theo sau bởi cùng chữ ký tự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất 5%. TP1: Trước phun lần 1, TP2: Trước phun lần 2, NSP1: Ngày sau phun lần 1, NSP2: Ngày sau phun lần 2.

### 3.3.2. Chỉ số bệnh phấn trắng hại quả táo ở các công thức xử lý thuốc

**Bảng 3. Ảnh hưởng của các thuốc khảo nghiệm đến chỉ số bệnh phấn trắng hại táo trong vụ khô năm 2021 tại Ninh Thuận**

| Công thức           | Chỉ số bệnh phấn trắng qua các kì điều tra (%) |                   |                    |                    |                     |
|---------------------|--|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
|                     | TP1  | 3 NSP1            | TP2                | 5 NSP2             | 10 NSP2             |
| 1. Bionite WP       | 1,63   | 4,67 <sup>c</sup> | 8,85 <sup>b</sup>  | 13,15 <sup>b</sup> | 14,63 <sup>b</sup>  |
| 2. NoviNano 55WP    | 1,70   | 3,82 <sup>c</sup> | 4,48 <sup>c</sup>  | 5,56 <sup>de</sup> | 6,15 <sup>e</sup>   |
| 3. Validad 100SL    | 1,48   | 3,93 <sup>c</sup> | 5,18 <sup>c</sup>  | 5,96 <sup>de</sup> | 6,78 <sup>e</sup>   |
| 4. Abi PS           | 1,44   | 4,81 <sup>c</sup> | 9,00 <sup>b</sup>  | 5,59 <sup>de</sup> | 6,19 <sup>e</sup>   |
| 5. Abi Kentomium    | 2,26   | 4,07 <sup>c</sup> | 8,67 <sup>b</sup>  | 5,33 <sup>de</sup> | 6,74 <sup>e</sup>   |
| 6. Rizasa 3SL       | 2,00   | 6,15 <sup>b</sup> | 8,48 <sup>b</sup>  | 9,37 <sup>c</sup>  | 10,89 <sup>c</sup>  |
| 7. Lime Sulfur      | 1,40   | 4,85 <sup>c</sup> | 6,64 <sup>c</sup>  | 7,00 <sup>d</sup>  | 13,33               |
| 8. Starone 20WP     | 1,93   | 4,15 <sup>c</sup> | 5,48 <sup>c</sup>  | 7,52 <sup>cd</sup> | 10,11 <sup>cd</sup> |
| 9. Score 250EC      | 1,56   | 4,26 <sup>c</sup> | 5,56 <sup>c</sup>  | 6,82 <sup>de</sup> | 7,70 <sup>de</sup>  |
| 10. Manage 5WP      | 1,93   | 4,11 <sup>c</sup> | 4,74 <sup>c</sup>  | 5,00 <sup>e</sup>  | 5,41 <sup>e</sup>   |
| 11. Đối chứng       | 1,59   | 7,33 <sup>a</sup> | 12,11 <sup>a</sup> | 19,67 <sup>a</sup> | 26,26 <sup>a</sup>  |
| CV (%)              | 8,32   | 13,17             | 18,19              | 15,33              | 13,54               |
| LSD <sub>0,05</sub> | ns   | 1,09              | 2,16               | 2,42               | 2,58                |

*Ghi chú:* \*Các giá trị trung bình trong cùng một cột được theo sau bởi cùng chữ ký tự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất 5%. TP1: Trước phun lần 1, TP2: Trước phun lần 2, NSP1: Ngày sau phun lần 1, NSP2: Ngày sau phun lần 2.

Kết quả theo dõi chỉ số bệnh qua các kỳ điều tra cho thấy, trước khi xử lý thuốc chỉ số bệnh từ dao động từ 1,48 - 2,0%. Sau khi xử lý thuốc, tất cả các loại thuốc tham gia khảo nghiệm đều có khả năng hạn chế sự phát triển của bệnh phấn trắng hại táo. Chỉ số bệnh ở các công thức xử lý thuốc thấp hơn so với công thức đối chứng. Trong đó, các công thức khảo nghiệm có chỉ số bệnh thấp nhất là Manage 5WP, NoviNano 55WP, Validad 100SL, Abi PS, Abi Kentomium và Score 250EC và thấp hơn so với các công thức còn lại ở tất cả các kỳ theo dõi sau phun thuốc.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các loại thuốc Manage 5WP, NoviNano 55WP, Validad 100SL, Abi PS, Abi Kentomium có khả năng hạn chế sự phát triển của bệnh hại táo tốt nhất, tương đương với Score 250EC và cao hơn Bionite WP, Lime Sulfur, Rizasa 3SL, Starone 20WP.

### 3.3.3. Tốc độ tăng trưởng của bệnh phấn trắng hại quả táo ở các công thức xử lý thuốc

Sau khi phun thuốc, tốc độ tăng trưởng bệnh phấn trắng hại táo trên công thức phun thuốc đều thấp hơn so với đối chứng. Các công thức phun thuốc có tác động tích cực làm giảm tốc độ tăng trưởng của bệnh. Trong đó, các

thuốc có hiệu lực cao, làm cho tốc độ tăng trưởng bệnh thấp nhất là Manage 5WP, kế đến là các công thức Validad 100SL, Abi Kentomium, NoviNano 55WP và Abi PS (bảng 4).

Từ đó cho thấy thuốc Manage 5WP có khả năng hạn chế tốc độ tăng trưởng của bệnh phấn trắng hại táo tốt nhất, tiếp đến là Validad 100SL, Abi Kentomium và Novinano 55WP.

**Bảng 4. Ảnh hưởng của các loại thuốc khảo nghiệm đến tốc độ tăng trưởng bệnh phấn trắng hại táo trong vụ khô năm 2021 tại Ninh Thuận**

| Công thức                 | 3 NSP1      |                       | TP2         |                       | 5 NSP2      |                       | 10 NSP2     |                       |
|---------------------------|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|
|                           | r           | r giảm so với Đ/C (%) | r           | r giảm so với Đ/C (%) | r           | r giảm so với Đ/C (%) | r           | r giảm so với Đ/C (%) |
| 1. Bionite WP             | 0,37        | 28,85                 | 0,43        | 17,31                 | 0,25        | 30,56                 | 0,20        | 31,03                 |
| 2. NoviNano 55WP          | 0,26        | 50,00                 | 0,21        | <b>63,16</b>          | 0,12        | <b>66,67</b>          | 0,11        | 62,07                 |
| 3. Validad 100SL          | 0,18        | <b>65,38</b>          | 0,14        | <b>75,44</b>          | 0,07        | <b>80,56</b>          | 0,10        | 65,52                 |
| 4. Abi PS                 | 0,29        | 44,23                 | 0,26        | 54,39                 | 0,14        | 61,11                 | 0,10        | 65,52                 |
| 5. Abi Kentomium          | 0,20        | 61,54                 | 0,22        | <b>61,40</b>          | 0,11        | <b>69,44</b>          | 0,10        | 65,52                 |
| 6. Rizasa 3SL             | 0,45        | 13,46                 | 0,31        | 45,61                 | 0,17        | 52,78                 | 0,12        | 58,62                 |
| 7. Lime Sulfur            | 0,31        | 40,38                 | 0,23        | 59,65                 | 0,14        | 61,11                 | 0,13        | 55,17                 |
| 8. Starone 20WP           | 0,47        | 9,62                  | 0,39        | 31,58                 | 0,20        | 44,44                 | 0,14        | 51,72                 |
| 9. Score 250EC            | 0,37        | 28,85                 | 0,31        | 45,61                 | 0,18        | 50,00                 | 0,14        | 51,72                 |
| 10. Manage 5WP            | 0,05        | <b>90,38</b>          | 0,11        | <b>80,70</b>          | 0,06        | <b>83,33</b>          | 0,08        | 72,41                 |
| 11. Đối chứng             | 0,52        |                       | 0,57        |                       | 0,36        |                       | 0,29        |                       |
| <i>LSD<sub>0,05</sub></i> | <i>0,33</i> |                       | <i>0,25</i> |                       | <i>0,15</i> |                       | <i>0,10</i> |                       |

Ghi chú: TP2: Trước phun lần 2; NSP1: Ngày sau phun lần 1; NSP2: Ngày sau phun lần 2.

Từ kết quả nghiên cứu ở các bảng 2, 3, 4 cho thấy các thuốc có hiệu lực trừ bệnh phấn trắng hại táo tốt nhất gồm Manage 5WP (Imibenconazole), Validad 100SL (Validamycin A), Abi Kentomium (*Chatomium* sp.), NoviNano 55WP (Kasugamycin + Streptomycin sulfate) và Abi PS (*Pseudomonas fluorescens*). Nên khuyến cáo sử dụng các thuốc này trừ bệnh phấn trắng hại táo thay cho thuốc Score® 250EC (Difenoconazole), Lime

Sulfur (Calcium polysulfide) để đảm bảo an toàn cho sản xuất.

### 3.3.4. Chi phí sử dụng các loại thuốc trừ bệnh phấn trắng hại táo

Sử dụng thuốc trừ bệnh hại cây trồng không những đạt hiệu quả ngăn chặn sự phát triển của bệnh, an toàn cho sản phẩm, cho môi trường mà cần có chi phí chấp nhận được để đảm bảo hiệu quả kinh tế. Trong 10 loại thuốc khảo nghiệm,

chi phí thuốc có sự khác biệt nhau lớn, từ 400 - 2.000 ngàn đồng/lần phun/ha. Nghiên cứu đã xác định được 5 loại thuốc có độ độc thấp với môi trường nhưng hiệu quả trừ bệnh phấn trắng cao là Manage 5WP, Validad 100SL, Abi Kentomium, NoviNano 55WP và Abi PS với chi phí biến động từ 140 - 1.200 ngàn

đồng/lần phun/ha. Trong đó, chi phí cho Validad 100SL thấp nhất (140.000 đ/ha/lần phun), kế đến là Rizasa 3SL (400.000 đ/ha/lần phun), Manage 5WP (576.000 đ/ha/lần phun), NoviNano 55WP (6400.000 đ/ha/lần phun), Abi Kentomium và Abi PS có chi phí cao nhất (1.200.000 đ/ha/lần phun).

**Bảng 5. Chi phí các loại thuốc trừ bệnh phấn trắng hại táo năm 2021**

| Tên thuốc        | Liều lượng<br>(lít, kg/ha) | Đơn giá<br>(1.000 đồng/lít, kg) | Chi phí thuốc<br>(1.000 đồng/ha/lần phun) |
|------------------|----------------------------|---------------------------------|---|
| 1. Bionite WP    | 0,30                       | 1.200                           | 360                                       |
| 2. NoviNano 55WP | 0,80                       | 800                             | 640                                       |
| 3. Validad 100SL | 1,00                       | 140                             | 140                                       |
| 4. Abi PS        | 1,20                       | 1.000                           | 1.200                                     |
| 5. Abi Kentomium | 1,20                       | 1.000                           | 1.200                                     |
| 6. Rizasa 3SL    | 0,80                       | 500                             | 400                                       |
| 7. Lime Sulfur   | 2,50                       | 800                             | 2.000                                     |
| 8. Starone 20WP  | 2,00                       | 500                             | 1.000                                     |
| 9. Score 250EC   | 0,80                       | 1.400                           | 1.120                                     |
| 10. Manage 5WP   | 0,64                       | 900                             | 576                                       |

Nhìn chung, nên sử dụng các loại thuốc Novinano 55WP và Validad 100SL có hiệu lực cao trừ bệnh phấn trắng hại táo và chi phí thấp. Đồng thời, có thể sử dụng luân phiên các thuốc trên với Manage 5WP. Cả 3 loại thuốc này đều có độ độc thấp (nhóm IV theo WHO). Bên cạnh đó, 2 loại thuốc NoviNano 5WP và Validad 100SL là kháng sinh, ngoài công dụng trừ nấm phấn trắng ra còn có tác dụng ngăn ngừa sự phát sinh gây hại của các bệnh liên quan đến vi khuẩn, nấm khác. Ngoài ra, có thể sử dụng chế phẩm sinh học Abi Kentomium và Abi PS để phòng trừ bệnh phấn trắng giúp an toàn cho môi trường và con người.

## 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1. Kết luận

Bệnh phấn trắng gây hại trên quả và lá táo, chưa ghi nhận bệnh gây hại trên thân cành táo. Bệnh gây hại phổ biến trên quả non, ít phổ biến trên quả già và trên lá táo.

Bệnh phấn trắng gây hại trên cây táo trong suốt cả năm ở tất cả các vùng trồng táo chính tại Nam Trung Bộ. Bệnh gây hại nặng nhất trong các tháng mùa mưa (9, 10, 11) và ít gây hại trong mùa khô.

5 loại thuốc Manage 5WP, Validad 100SL, Abi Kentomium, NoviNano

55WP và Abi PS có hiệu lực cao trừ bệnh phấn trắng hại táo.

#### 4.2. Đề nghị

Điều tra bệnh phấn trắng hại táo phục vụ công tác dự tính dự báo và quản lý bệnh nên tập trung ở phần quả non và lá táo. Bố trí thời vụ cắt cành tránh cho táo ra hoa, đậu quả trong các tháng mùa mưa. Trường hợp phải cho táo đậu quả trong mùa mưa thì cần quan tâm theo dõi và xử lý nguồn bệnh kịp thời.

Sử dụng các thuốc Manage 5WP (0,94 kg/ha), Validad 100SL (0,62 lít/ha), Novinano 55WP (0,4 kg/ha), Abi Kentomium (1,2 kg/ha) và Abi PS (1,2 kg/ha) để trừ bệnh phấn trắng hại táo.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Achala Suroliya, 2013. Fungal diseases in fruit of ber (*Zizyphus mauritiana*) in tropical and subtropical region of India. Int J Cur Res Rev, Vol 05 (09) pp. 1 - 8.
2. D.K. Misra, J. Saha, P.V. Devidas và F.K. Bauri, 2013. Diseases of ber (*Zizyphus jujube*) in Eastern India. The Journal of Plant Protection Sciences, 5(1): 65 - 69.
3. Jamadar, M. M. và R.A. Balikai, 2008. Status of Diseases on Ber (*Zizyphus mauritiana* Lamarck) in India and Their Management Options. 1st International Jujube Symposium Baoding, China.
4. Meera Choudhary, 2017. Biochemical Resistance in Ber against Powdery Mildew (*Oidium erysiphoides* f. sp. *ziziphi*, Yan and Wang) and its Control. Thesis Master of Science in Agriculture - Sri Karan Narendra Agriculture University.
5. Quy chuẩn kỹ thuật Quốc Gia về phương pháp phát hiện dịch hại cây trồng. QCVN 01 - 38: 2010/BNNPTNT. Bộ NN & PTNT năm 2012.

#### ABSTRACT

##### **Disease studying of the powdery mildew (*Oidium erysiphoides*) on jujube (*Zizyphus mauritiana*) and the efficacy of some fungicides in the South Central Coastal, Vietnam**

*Powdery mildew (Oidium erysiphoides) is a dangerous disease on jujube (Zizyphus mauritiana), causing significant economic losses to growers in the South Central Coast. In 2020 and 2021, studying on the dynamic of fungal diseases and testing of fungicide were carried out on jujube in Ninh Thuan, Khanh Hoa and Binh Thuan provinces. Research results show that powdery mildew damaged on jujube during around year and in most jujube growing areas. The powdery mildew fungus mainly attacked and damaged on the young fruits and leaves of jujube. The powdery mildew mainly appeared and damaged in the months of the rainy season. As a result, there were 5 fungicides that had high effectiveness to control powdery mildew on jujube including Manage 5WP (Imibenconazole), Validad 100SL (Validamycin A), Novinano 55WP (Kasugamycin + Streptomycin sulfate), Abi Kentomium (Chatomium sp.) and Abi PS (Pseudomonas fluorescens).*

**Keywords:** Jujube/ber, fungicides, powdery mildew, *Oidium erysiphoides*, *Zizyphus mauritiana*.

# THÀNH PHẦN BỆNH HẠI LẠC VÀ HIỆU QUẢ SỬ DỤNG NẤM *Trichoderma viride* PHÒNG TRỪ BỆNH HÉO RŨ HẠI LẠC TẠI HUYỆN ĐỨC LINH VÀ TÁNH LINH, BÌNH THUẬN

Phan Công Kiên<sup>1</sup>, Phan Văn Tiêu<sup>1\*</sup>,  
Phạm Văn Phước<sup>1</sup>, Võ Minh Thư<sup>1</sup>, Mai Văn Hào<sup>1</sup>,  
Nguyễn Văn Chính<sup>1</sup>, Đoàn Thanh Mạnh<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu Bông và Phát triển nông nghiệp Nha Hồ

<sup>2</sup> Trung tâm Dịch vụ Nông nghiệp Lạc Tân

\* Tác giả liên hệ: phanvantieu@viennhaho.org.vn

## TÓM TẮT

Điều tra thành phần bệnh hại, diễn biến bệnh héo rũ và hiệu quả của việc sử dụng nấm *Trichoderma viride* trong phòng trừ bệnh héo rũ hại lạc được thực hiện trong vụ Đông Xuân 2020/2021 và 2021/2022 tại huyện Đức Linh và Tân Linh, tỉnh Bình Thuận với mục tiêu xác định được thành phần bệnh hại và hiệu quả của việc sử dụng nấm *Trichoderma viride* trong phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc trắng và héo rũ gốc mốc đen. Kết quả điều tra thành phần bệnh hại lạc đã xác định được 6 loại bệnh xuất hiện và gây hại trên cây lạc, một số loại bệnh hại xuất hiện khá phổ biến như: đốm lá (*Cercospora arachidicola* Hori.), gỉ sắt (*Puccinia arachidis*), héo rũ gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii* Sacc) và héo rũ gốc mốc đen (*Aspergillus niger*). Bệnh héo rũ gốc mốc trắng và héo rũ gốc mốc đen gây hại từ sớm (14 ngày sau gieo) và gây hại mạnh ở giai đoạn cuối vụ. Các nghiệm thức xử lý nấm *Trichoderma viride* với liều lượng 0,3 - 0,5 kg chế phẩm/kg hạt giống cho hiệu quả phòng trừ tốt hơn so với nghiệm thức xử lý bằng Anvil 5SC để phòng trừ bệnh héo rũ.

**Từ khóa:** Cây lạc, bệnh hại lạc, nấm *Trichoderma viride*, bệnh héo rũ.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lạc là một trong những cây trồng chủ lực ở huyện Đức Linh và Tân Linh, tỉnh Bình Thuận. Diện tích trồng lạc năm 2021 tại Đức Linh và Tân Linh đạt 1.195 ha, năng suất bình quân chỉ đạt khoảng 1,15 tấn/ha (Cục Thống kê Bình Thuận, 2021).

Một trong những nguyên nhân làm cho năng suất lạc ở Đức Linh và Tân Linh đạt thấp là do sâu bệnh gây hại, giống thoái hóa, quy trình canh tác lạc hậu.

Trong các bệnh hại, bệnh héo rũ gốc mốc trắng do nấm *Sclerotium rolfsii* là đối tượng thường xuyên gây hại trên đồng ruộng. Thiệt hại do bệnh héo rũ gốc mốc trắng có thể lên đến 80% tùy thuộc vào

Người phân biên: TS. Trần Văn Huy

thời kỳ nhiễm bệnh và giai đoạn sinh trưởng của cây lạc cũng như điều kiện thời tiết khí hậu khi nhiễm bệnh (Mehan và ctv., 1994). Để phòng trừ bệnh héo rũ, nếu chỉ áp dụng một vài biện pháp đơn lẻ sẽ không mang lại hiệu quả. Đặt biệt nếu quá lạm dụng các biện pháp hóa học lại càng tốn kém, giảm hiệu quả kinh tế, gây ô nhiễm môi trường. Từ thực tế trên, việc tìm ra một số biện pháp phòng trừ thân thiện với môi trường là rất cần thiết. Một trong các hướng đó là dùng biện pháp sinh học, sử dụng các vi sinh vật đối kháng trong phòng trừ sinh học trực tiếp hay gián tiếp tiêu diệt dịch hại. Trong đó nấm *Trichoderma viride* cũng mang lại hiệu quả cao trong phòng trừ bệnh héo rũ trồng (Jonnie White, 2000).

Trong khuôn khổ bài báo, chúng tôi tập trung vào kết quả điều tra thành phần bệnh hại chính, diễn biến bệnh héo rũ hại lạc và hiệu quả của việc sử dụng nấm *Trichoderma viride* xử lý hạt giống lạc phòng trừ bệnh héo rũ hại lạc trồng trong vụ Đông Xuân 2020/2021 và 2021/2022 tại huyện Đức Linh và Tánh Linh, tỉnh Bình Thuận.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian: Vụ đông xuân 2020/2021 và vụ đông xuân 2021/2022.

Địa điểm: Tại huyện Đức Linh và Tánh Linh, tỉnh Bình Thuận.

### 2.2. Vật liệu nghiên cứu

- Giống lạc L14 của Trung tâm Nghiên cứu Đậu đỗ (thuộc Viện Cây lương thực, Cây thực phẩm).

- Chế phẩm sinh học *Trichoderma viride*, độ ẩm < 30%; mật độ  $10^9$  cfu/g (do Trung tâm Đấu tranh sinh học của Viện BVTV cung cấp).

### 2.3. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Điều tra thành phần và diễn biến bệnh héo rũ hại lạc trong vụ đông xuân tại huyện Đức Linh và Tánh Linh, tỉnh Bình Thuận

- Điều tra thành phần bệnh hại lạc: Theo QCVN 01-168: 2014/BNNPTNT. Điều tra 5 ruộng/vùng, diện tích mỗi ruộng tối thiểu 2.000m<sup>2</sup>. Điều tra từ sau khi trồng 14 ngày đến lúc thu hoạch, định kỳ 7 ngày/lần; điều tra 10 điểm ngẫu nhiên nằm trên đường chéo của khu vực điều tra; điểm điều tra phải cách bờ ít nhất 2m, 30 cây/điểm,

- Điều tra diễn biến bệnh héo rũ trên cây lạc (bệnh héo rũ do *Aspergillus niger*, *Sclerotium rolfsii*). Điều tra 10 điểm ngẫu nhiên nằm trên đường chéo của ruộng thí nghiệm, điều tra 30 cây/điểm; định kỳ 7 ngày/lần từ sau khi trồng 14 ngày đến lúc thu hoạch.

#### 2.3.2. Đánh giá hiệu quả sử dụng chế phẩm *Trichoderma viride* phòng trừ bệnh héo rũ hại lạc trong vụ đông xuân 2020/2021 và 2021/2022 tại huyện Đức Linh và Tánh Linh tỉnh Bình Thuận

Thí nghiệm gồm 7 nghiệm thức 3 lần lặp lại, được bố trí theo khối đầy đủ hoàn toàn ngẫu nhiên (RCBD). Diện tích mỗi ô thí nghiệm là 15m<sup>2</sup>, tổng diện tích thí nghiệm là 500m<sup>2</sup> bao gồm cả diện tích bảo vệ và băng cách ly. Các nghiệm thức thí nghiệm gồm:

NT1: Không xử lý *Trichoderma viride*, phun Anvil 5SC với liều lượng 1 l/ha.

NT2: Không xử lý *Trichoderma viride* (đôi chứng).

NT3: Xử lý *Trichoderma viride* với liều lượng 0,1kg chế phẩm/kg hạt giống.

NT4: Xử lý *Trichoderma viride* với liều lượng 0,2kg chế phẩm/kg hạt giống.

NT5: Xử lý *Trichoderma viride* với liều lượng 0,3kg chế phẩm/kg hạt giống.

NT6: Xử lý *Trichoderma viride* với liều lượng 0,4kg chế phẩm/kg hạt giống.

NT7: Xử lý *Trichoderma viride* với liều lượng 0,5kg chế phẩm/kg hạt giống.

**Phương pháp xử lý hạt giống:** Chọn hạt lạc không bị sâu bệnh, ngâm hạt giống trong nước 3 giờ ở nhiệt độ bình thường, sau đó ủ cho nứt mầm. Đối chứng 1: Hạt giống nứt mầm mang gieo sau đó phun Anvil; đối chứng 2: Hạt

giống nứt mầm mang gieo. Các nghiệm thức xử lý *Trichoderma viride*: cân chế phẩm *Trichoderma viride* tương ứng với từng nghiệm thức; đong 0,5 lít nước sạch, hòa tan lượng chế phẩm *Trichoderma viride* và trộn đều chế phẩm sinh học *Trichoderma viride* với hạt giống đã nứt mầm sau 30 phút mang gieo. Lượng chế phẩm còn lại hòa vào bình 20 lít nước phun đều bề mặt ruộng tương ứng với từng nghiệm thức.

Điều tra 7 ngày/lần, điều tra 10 điểm cố định nằm trên đường chéo, mỗi điểm điều tra 30 cây, điều tra từ sau khi trồng 14 ngày đến lúc thu hoạch.

## 2.4. Chỉ tiêu theo dõi

### 2.4.1. Điều tra thành phần và diễn biến bệnh hại lạc trong vụ đông xuân 2020/2021 và 2021/2022 tại huyện Đức Linh và Tánh Linh

- Điều tra thành phần bệnh hại lá:

$$\text{Tỷ lệ bệnh (\%)} = \frac{\text{Tổng số lá bị bệnh}}{\text{Tổng số lá điều tra}} \times 100$$

$$\text{Chỉ số bệnh (\%)} = \frac{(N_1 \times 1) + (N_3 \times 3) + \dots + (N_n \times n)}{N \times 9} \times 100$$

Trong đó:

$N_1$  là số lá bị bệnh ở cấp 1.

$N_3$  là số lá bị bệnh ở cấp 3.

$N_n$  là số lá bị bệnh ở cấp n.

N là tổng số lá điều tra.

9 là cấp bệnh cao nhất trong thang phân cấp.

Phân cấp lá bệnh theo các cấp như sau:

Cấp 1: < 1% diện tích lá bị bệnh.

Cấp 3: Từ 1 - 5% diện tích lá bị bệnh.

Cấp 5: > 5 - 25% diện tích của lá bị bệnh.

Cấp 7: > 25 - 50% diện tích của lá bị bệnh.

Cấp 9: > 50% diện tích của lá bị bệnh.

- Điều tra thành phần và diễn biến bệnh hại thân, rễ:

$$\text{Tỷ lệ bệnh (\%)} = \frac{\text{Tổng số cây bị bệnh}}{\text{Tổng số cây điều tra}} \times 100$$

#### 2.4.2. Đánh giá hiệu quả sử dụng chế phẩm *Trichoderma viride* phòng trừ bệnh héo rũ hại lạc trong vụ đông xuân 2020/2021 và 2021/2022 tại huyện Đức Linh và Tánh Linh tỉnh Bình Thuận

\* Xác định hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ của các nghiệm thức:

$$\text{Tỷ lệ cây bị bệnh (\%)} = \frac{\text{Tổng số cây bị bệnh}}{\text{Tổng số cây điều tra}} \times 100$$

Đánh giá hiệu lực phòng trừ bệnh héo rũ thông qua giá trị AUDPC: AUDPC (Area Under The Disease Progress Curve) là tổng diện tích các hình thang bên dưới đường chỉ số bệnh qua các lần thu thập dữ liệu, AUDPC được tính bởi công thức:

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

Trong đó:  $y_i$ : Mức độ bệnh (% diện tích vết bệnh) ở lần quan trắc thứ  $i$ .

$y_{i+1}$ : Mức độ bệnh (% diện tích vết bệnh) ở lần quan trắc thứ  $i+1$ .

$t_{i+1} - t_i$ : Thời gian (ngày) giữa hai lần quan trắc liên tiếp.

$n$ : Tổng số lần quan trắc.

\* Các yếu tố cấu thành năng suất:

Theo QCVN 01-57:2011/BNNPTNT quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lạc. Theo dõi các chỉ tiêu: Số quả/cây (quả), số quả chắc/cây (quả), khối lượng 100 quả (g), khối lượng 100 hạt (g), năng suất lý thuyết (tấn/ha) và năng suất thực thu (tấn/ha).

#### 2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được tổng hợp bằng phần mềm Microsoft Excel 2010, phân tích và

Điều tra dựa vào QCVN 01-168: 2014/BNNPTNT quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về phương pháp điều tra phát hiện dịch hại trên cây lạc. Tính tỷ lệ cây bị bệnh (%) theo công thức sau:

xử lý số liệu bằng theo ANOVA, trắc nghiệm phân hạng Duncan ở mức  $\alpha = 0,05$  (nếu có) bằng phần mềm SAS 9.1.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Thành phần bệnh hại trên cây lạc trong vụ đông xuân 2020/2021 và 2021/2022 tại huyện Đức Linh và Tánh Linh, tỉnh Bình Thuận

Kết quả điều tra cho thấy, thành phần bệnh hại lạc tại huyện Đức Linh và Tánh Linh tỉnh Bình Thuận trong vụ đông xuân 2020/2021 và 2021/2022 gồm có 6 loại bệnh khác nhau; trong đó, bệnh đốm nâu (*Cercospora arachidicola*), bệnh đốm đen (*Cercospora personata* Beck & Curtis), bệnh gỉ sắt (*Puccinia arachidis* Speg) xuất hiện phổ biến, tần suất xuất hiện > 50% số lần điều tra ở các ruộng thí nghiệm. Bệnh héo rũ gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii* Sacc) xuất hiện với tần suất phổ biến tại huyện Đức Linh và xuất hiện tương đối phổ biến tại các ruộng điều tra ở huyện Tánh Linh. Với bệnh héo rũ gốc mốc đen (*Aspergillus niger*) và héo xanh vi khuẩn (*Ralstonia solanacearum*) xuất hiện ít hơn (bảng 1).

**Bảng 1. Thành phần và mức độ phổ biến của các loại bệnh hại trên cây lạc vụ đông xuân 2020/2021 và 2021/2022 tại huyện Đức Linh và Tánh Linh, tỉnh Bình Thuận**

| STT | Tên bệnh                  | Tác nhân gây bệnh                       | Mức độ phổ biến |           | Vị trí gây hại |
|-----|---------------------------|---|-----------------|-----------|----------------|
|     |                           |   | Đức Linh        | Tánh Linh |                |
| 1   | Bệnh đốm nâu              | <i>Cercospora arachidicola</i>          | +++             | +++       | Lá             |
| 2   | Bệnh đốm đen              | <i>Cercospora personata</i> Beck&Curtis | +++             | +++       | Lá             |
| 3   | Bệnh gỉ sắt               | <i>Puccinia arachidis</i> Speg          | +++             | +++       | Lá             |
| 4   | Bệnh héo rũ gốc mốc trắng | <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc          | +++             | ++        | Gốc rễ         |
| 5   | Bệnh héo rũ gốc mốc đen   | <i>Aspergillus niger</i>                | ++              | +         | Gốc rễ         |
| 6   | Bệnh héo xanh vi khuẩn    | <i>Ralstonia solanacearum</i>           | +               | +         | Toàn cây       |

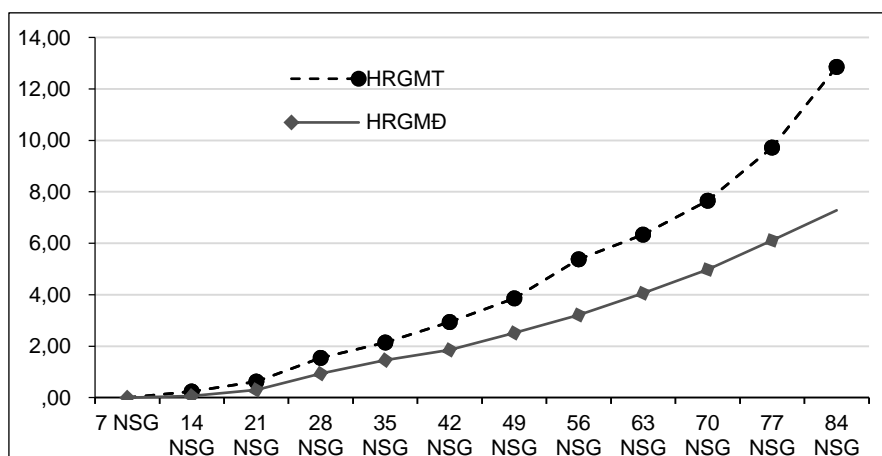
*Ghi chú:* +: Ít phổ biến (Tần suất xuất hiện 5 - 25% số lần điều tra); ++: Tương đối phổ biến (Tần suất xuất hiện 26 - 50% số lần điều tra); +++: Rất phổ biến (Tần suất xuất hiện > 50% số lần điều tra).

### 3.2. Diễn biến bệnh héo rũ gốc mốc trắng và mốc đen trên cây lạc trong vụ đông xuân tại huyện Đức Linh và Tánh Linh tỉnh Bình Thuận

#### 3.2.1. Diễn biến bệnh héo rũ gốc mốc trắng và héo rũ gốc mốc đen tại huyện Đức Linh, tỉnh Bình Thuận vụ đông xuân 2020/2021

Kết quả điều tra diễn biến bệnh héo rũ gốc mốc trắng và héo rũ gốc mốc đen

tại huyện Đức Linh tỉnh Bình Thuận vụ đông xuân 2020/2021 cho thấy, bệnh héo rũ xuất hiện từ 14 ngày sau gieo (NSG) và tăng dần, gây hại mạnh ở cuối vụ. Tỷ lệ bệnh héo rũ gốc mốc trắng trung bình ở định kỳ 28 NSG là 1,5%, tăng dần lên 5,4% ở giai đoạn 56 NSG và 12,9% vào 84 NSG. Tỷ lệ bệnh héo rũ gốc mốc đen trung bình giai đoạn 28 NSG là 0,9%, tăng dần lên 3,2% ở 56 NSG và 7,3% ở thời điểm 84 NSG (hình 1).

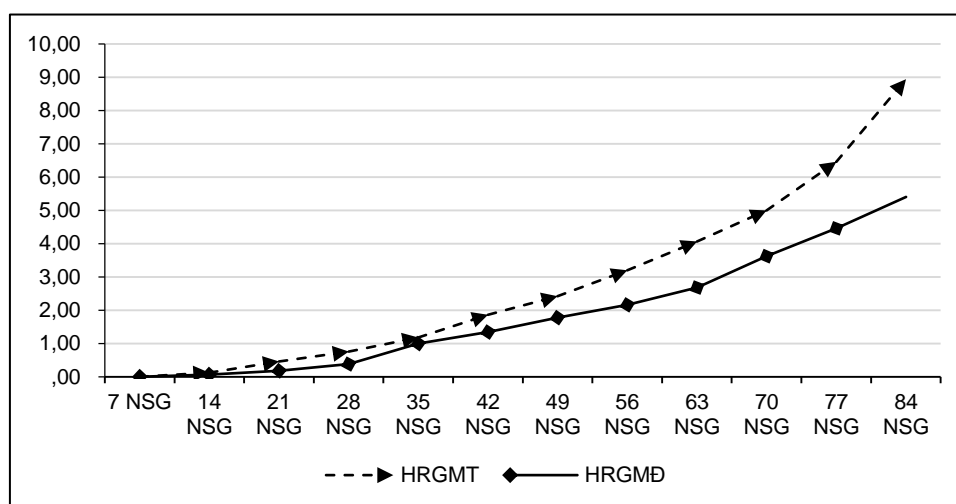


**Hình 1. Diễn biến bệnh héo rũ gốc mốc trắng và héo rũ gốc mốc đen tại huyện Đức Linh, tỉnh Bình Thuận vụ đông xuân 2020/2021**

### 3.2.2. Diễn biến bệnh héo rũ gốc mốc trắng và héo rũ gốc mốc đen tại huyện Tánh Linh, tỉnh Bình Thuận vụ đông xuân 2021/2022

Kết quả điều tra diễn biến bệnh héo rũ gốc mốc trắng và héo rũ gốc mốc đen tại huyện Tánh Linh tỉnh Bình Thuận vụ đông xuân 2021/2022 cho thấy, bệnh héo rũ bắt đầu xuất hiện ở định kỳ 14

ngày sau gieo, sau đó tăng dần và gây hại mạnh ở giai đoạn cuối vụ. Tỷ lệ bệnh héo rũ gốc mốc trắng trung bình ở định kỳ 28 NSG là 0,8%, tăng lên 3,2% ở 56 NSG và 8,9% ở giai đoạn 84 NSG. Tỷ lệ bệnh héo rũ gốc mốc đen trung bình ở các thời điểm điều tra 28, 56 và 84 NSG tương ứng là 0,4%, 2,2% và 5,4% (hình 2).



Hình 2. Diễn biến bệnh héo rũ gốc mốc trắng và héo rũ gốc mốc đen tại huyện Tánh Linh, tỉnh Bình Thuận vụ đông xuân 2021/2022

### 3.3. Đánh giá hiệu quả sử dụng chế phẩm *Trichoderma viride* phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc trắng và héo rũ gốc mốc đen trong vụ đông xuân 2020/2021 và 2021/2022 tại huyện Đức Linh và Tánh Linh, tỉnh Bình Thuận

#### 3.3.1. Đánh giá hiệu quả sử dụng chế phẩm *Trichoderma viride* phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc trắng và héo rũ gốc mốc đen trong vụ đông xuân 2020/2021 tại Đức Linh tỉnh Bình Thuận

##### 3.3.1.1. Hiệu quả sử dụng chế phẩm *Trichoderma viride* phòng trừ bệnh héo rũ hại cây lạc trong vụ đông xuân 2020/2021 tại Đức Linh, Bình Thuận

Kết quả theo dõi cho thấy, bệnh héo rũ xuất hiện và gây hại từ rất sớm, khi cây được 2 - 3 lá nhưng tỷ lệ bệnh rất thấp, khi cây lạc bắt đầu ra hoa thì bệnh có xu hướng tăng nhanh và gây hại nghiêm trọng trên đồng ruộng.

Ở nghiệm thức đối chứng (không xử lý Anvil 5 SC và *Trichoderma viride*), tỷ lệ bệnh là 2,9% ở giai đoạn 28 ngày sau gieo (NSG) và tăng dần cho đến khi thu hoạch, tỷ lệ bệnh là 27,8% (ở 84 NSG). Đối với các nghiệm thức có xử lý chế phẩm *T. viride* thì tỷ lệ bệnh héo rũ khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng không xử lý. Tỷ lệ bệnh ở các nghiệm thức có

xử lý *T. viride* chỉ từ 6,8 - 14,0%; trong đó, nghiệm thức xử lý ở liều lượng 0,4 và 0,5 kg chế phẩm/kg hạt giống có tỷ lệ bệnh thấp nhất, từ 6,8 - 7,6% ở giai đoạn 84 NSG. Như vậy, sử dụng chế phẩm *Trichoderma viride* xử lý hạt giống đã mang lại hiệu quả cao trong phòng trừ bệnh héo rũ. Kết quả nghiên cứu này

cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Viên và ctv. (2012).

Giá trị AUDPC ở thời điểm 84 NSG của các nghiệm thức trong vụ đông xuân 2020/2021 tại huyện Đức Linh, tỉnh Bình Thuận dao động từ 574,0 - 2.418,5; khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng (bảng 2).

**Bảng 2. Hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ hại cây lạc của chế phẩm *Trichoderma viride* trong vụ đông xuân 2020/2021 tại Đức Linh, Bình Thuận**

| Nghiệm thức   | Tỉ lệ bệnh (%)   |                   |                    | Giá trị AUDPC 84 NSG |
|---|------------------|-------------------|--------------------|----------------------|
|   | 28 NSG           | 56 NSG            | 84 NSG             |                      |
| Phun Anvil 5SC 1,0 lít/ha, không xử lý <i>T. viride</i> | 2,1 <sup>b</sup> | 8,2 <sup>b</sup>  | 19,1 <sup>b</sup>  | 1.546,7 <sup>c</sup> |
| Không xử lý <i>T. viride</i> và Anvil 5SC (đối chứng)   | 2,9 <sup>b</sup> | 12,9 <sup>c</sup> | 27,8 <sup>c</sup>  | 2.418,5 <sup>d</sup> |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,1kg chế phẩm/kg hạt giống      | 1,4 <sup>a</sup> | 5,6 <sup>ab</sup> | 14,0 <sup>ab</sup> | 1.044,8 <sup>b</sup> |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,2kg chế phẩm/kg hạt giống      | 1,2 <sup>a</sup> | 5,1 <sup>ab</sup> | 12,1 <sup>ab</sup> | 968,5 <sup>b</sup>   |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,3kg chế phẩm/kg hạt giống      | 1,1 <sup>a</sup> | 3,9 <sup>a</sup>  | 9,8 <sup>ab</sup>  | 764,8 <sup>ab</sup>  |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,4kg chế phẩm/kg hạt giống      | 0,9 <sup>a</sup> | 3,1 <sup>a</sup>  | 7,6 <sup>a</sup>   | 618,1 <sup>a</sup>   |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,5kg chế phẩm/kg hạt giống      | 0,9 <sup>a</sup> | 3,1 <sup>a</sup>  | 6,8 <sup>a</sup>   | 574,0 <sup>a</sup>   |
| CV (%)  | 12,3             | 13,7              | 14,1               | 15,4                 |
| F tính  | 11,7*            | 20,0*             | 18,3**             | 17,4**               |

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê; \*: Khác biệt có ý nghĩa ở mức  $\alpha \leq 0,05$ ; \*\*: Khác biệt rất có ý nghĩa ở mức  $\alpha \leq 0,01$ .

### 3.3.1.2. Ảnh hưởng của các nghiệm thức xử lý *Trichoderma viride* đến năng suất lạc trong vụ đông xuân 2020/2021 tại huyện Đức Linh, tỉnh Bình Thuận

Về số quả/cây và số quả chắc/cây: Vụ đông xuân 2020/2021, số quả/cây của các nghiệm thức dao động từ 16,2 - 25,2 quả/cây; trong đó, nghiệm thức NT5 có số quả/cây đạt cao nhất (25,2 quả) và sai khác có ý nghĩa so với các nghiệm thức khác. Tuy nhiên, số quả chắc/cây của các nghiệm thức lại không sai khác nhau, đạt từ 11,6 - 15,3 quả.

Số liệu bảng 3 cho thấy, khối lượng 100 quả dao động từ 131,2 - 140,3g; khác biệt có ý nghĩa ở các nghiệm thức có sử dụng chế phẩm *T. viride* so với đối chứng. Khối lượng 100 hạt của các nghiệm thức dao động từ 59,2 - 63,4g và không sai khác so với đối chứng.

Năng suất thực thu của các nghiệm thức dao động từ 1,4 - 2,8 tấn/ha; trong đó, các nghiệm thức có xử lý chế phẩm *T. viride* và nghiệm thức xử lý bằng Anvil có năng suất thực thu khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng không xử lý.

**Bảng 3. Ảnh hưởng của các nghiệm thức xử lý *Trichoderma viride* đến năng suất lạc trong vụ đông xuân 2020/2021 tại huyện Đức Linh, tỉnh Bình Thuận**

| Nghiệm thức   | Số quả/cây         | Số quả chắc trên/cây | Khối lượng 100 quả (g) | Khối lượng 100 hạt (g) | NSTT (tấn/ha)     |
|---|--------------------|----------------------|------------------------|------------------------|-------------------|
| Phun Anvil 5SC 1,0 lít/ha, không xử lý <i>T. viride</i> | 17,3 <sup>b</sup>  | 11,6                 | 136,0 <sup>b</sup>     | 60,3                   | 2,0 <sup>b</sup>  |
| Không xử lý <i>T. viride</i> và Anvil 5SC (đối chứng)   | 16,2 <sup>b</sup>  | 13,6                 | 131,2 <sup>c</sup>     | 59,2                   | 1,4 <sup>c</sup>  |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,1kg chế phẩm/kg hạt giống      | 16,4 <sup>b</sup>  | 12,8                 | 140,1 <sup>ab</sup>    | 62,8                   | 2,2 <sup>b</sup>  |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,2kg chế phẩm/kg hạt giống      | 18,0 <sup>b</sup>  | 12,9                 | 140,3 <sup>a</sup>     | 63,4                   | 2,5 <sup>ab</sup> |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,3kg chế phẩm/kg hạt giống      | 25,2 <sup>a</sup>  | 14,6                 | 137,5 <sup>ab</sup>    | 62,0                   | 2,2 <sup>b</sup>  |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,4kg chế phẩm/kg hạt giống      | 21,2 <sup>ab</sup> | 14,6                 | 137,7 <sup>ab</sup>    | 62,5                   | 2,4 <sup>ab</sup> |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,5kg chế phẩm/kg hạt giống      | 22,5 <sup>ab</sup> | 15,3                 | 136,9 <sup>ab</sup>    | 61,9                   | 2,8 <sup>a</sup>  |
| CV(%)   | 15,7               | 13,7                 | 1,5                    | 2,5                    | 11,4              |
| F tính  | 2,4*               | 1,1 <sup>ns</sup>    | 5,3*                   | 2,7 <sup>ns</sup>      | 7,2**             |

*Ghi chú:* Trong cùng một cột chỉ tiêu, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. ns: Khác biệt không có ý nghĩa. \*: Khác biệt có ý nghĩa ở mức  $\alpha = 5\%$ . \*\*: Khác biệt rất có ý nghĩa ở mức:  $\alpha = 1\%$ ; NSTT: Năng suất thực thu.

### 3.3.2. Đánh giá hiệu quả sử dụng *Trichoderma viride* phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc trắng và héo rũ gốc mốc đen trong vụ đông xuân 2021/2022 tại huyện Tánh Linh tỉnh Bình Thuận

#### 3.3.2.1. Hiệu quả sử dụng chế phẩm *Trichoderma viride* phòng trừ bệnh héo rũ trên cây lạc trong vụ đông xuân 2021/2022 tại huyện Tánh Linh, tỉnh Bình Thuận

Trong vụ đông xuân 2021/2022 tại huyện Tánh Linh, tỉnh Bình Thuận; bệnh héo rũ xuất hiện từ rất sớm khi cây được 2 - 3 lá nhưng tỷ lệ bệnh rất thấp, khi cây lạc bắt đầu ra hoa thì bệnh có xu hướng

tăng nhanh và gây hại nghiêm trọng ở giai đoạn cuối vụ.

Ở định kỳ 84 NSG, các nghiệm thức xử lý nấm *T. viride* với liều lượng từ 0,3 - 0,5kg chế phẩm/kg hạt giống có tỷ lệ bệnh rất thấp, chỉ từ 5,4 - 7,8%; trong khi ở nghiệm thức xử lý bằng Anvil 5SC có tỷ lệ bệnh là 16,3% và nghiệm thức đối chứng, tỷ lệ bệnh là 23,1%.

Giá trị AUDPC ở giai đoạn sau 84 NSG của các nghiệm thức sử dụng chế phẩm sinh học *T. viride* khác biệt rất có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng. Như vậy, sử dụng chế phẩm *Trichoderma*

*viride* xử lý hạt giống lạc với liều lượng từ 0,3 - 0,5kg chế phẩm/kg hạt giống mang lại hiệu quả cao trong phòng trừ bệnh héo rũ.

**Bảng 4. Hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ hại lạc của chế phẩm *Trichoderma viride* trong vụ đông xuân 2021/2022 tại huyện Tánh Linh, tỉnh Bình Thuận**

| Nghiệm thức   | Tỉ lệ bệnh (%)    |                    |                    | Giá trị AUDPC<br>84 NSG |
|---|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|
|   | 28 NSG            | 56 NSG             | 84 NSG             |                         |
| Phun Anvil 5SC 1,0 lít/ha, không xử lý <i>T. viride</i> | 1,3 <sup>c</sup>  | 6,7 <sup>c</sup>   | 16,3 <sup>bc</sup> | 1.213,5 <sup>c</sup>    |
| Không xử lý <i>T. viride</i> và Anvil 5SC (đối chứng)   | 2,4 <sup>d</sup>  | 9,8 <sup>c</sup>   | 23,1 <sup>c</sup>  | 1.893,2 <sup>d</sup>    |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,1kg chế phẩm/kg hạt giống      | 1,0 <sup>bc</sup> | 3,4 <sup>b</sup>   | 12,4 <sup>b</sup>  | 809,6 <sup>b</sup>      |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,2kg chế phẩm/kg hạt giống      | 0,8 <sup>b</sup>  | 3,0 <sup>b</sup>   | 9,6 <sup>ab</sup>  | 646,5 <sup>ab</sup>     |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,3kg chế phẩm/kg hạt giống      | 0,6 <sup>b</sup>  | 3,1 <sup>b</sup>   | 7,8 <sup>ab</sup>  | 556,9 <sup>ab</sup>     |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,4kg chế phẩm/kg hạt giống      | 0,6 <sup>b</sup>  | 2,4 <sup>a</sup>   | 5,7 <sup>a</sup>   | 481,3 <sup>a</sup>      |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,5kg chế phẩm/kg hạt giống      | 0,3 <sup>a</sup>  | 1,8 <sup>a</sup>   | 5,4 <sup>a</sup>   | 377,7 <sup>a</sup>      |
| CV (%)  | 11,7              | 14,8               | 13,1               | 15,3                    |
| F tính  | 10,6 <sup>*</sup> | 22,0 <sup>**</sup> | 21,5 <sup>**</sup> | 17,4 <sup>**</sup>      |

*Ghi chú:* Trong cùng một cột chỉ tiêu, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. ns: Khác biệt không có ý nghĩa. \*: Khác biệt có ý nghĩa ở mức  $\alpha = 5\%$ . \*\*: Khác biệt rất có ý nghĩa ở mức:  $\alpha = 1\%$ .

### 3.3.2.2. Ảnh hưởng của các nghiệm thức đến các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất trong vụ đông xuân 2021/2022 tại huyện Tánh Linh tỉnh Bình Thuận

Trong vụ đông xuân 2021/2022 tại huyện Tánh Linh, tỉnh Bình Thuận, số quả/cây và số quả chắc/cây của các nghiệm thức sai khác nhau có ý nghĩa. Trong đó, các nghiệm thức có xử lý nấm *T. viride* NT5, NT6 và NT7 (Xử lý *T. viride* 0,3; 0,4 và 0,5kg chế phẩm/kg hạt giống) có số quả/cây và số quả chắc/cây đạt cao nhất, từ 19,3 - 20,2 quả/cây và từ 15,2 - 15,8 quả chắc/cây (bảng 5).

Khối lượng 100 quả của các nghiệm thức dao động từ 132,6 - 140,7g; khác biệt có ý nghĩa ở các nghiệm thức có sử dụng chế phẩm *T. viride* so với đối chứng (bảng 5).

Năng suất thực thu của các nghiệm thức dao động từ 1,3 - 2,5 tấn/ha; trong đó, các nghiệm thức có xử lý chế phẩm *T. viride* có năng suất thực thu khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng 2 (không xử lý) và đối chứng xử lý bằng Anvil 5SC.

**Bảng 5. Ảnh hưởng của các nghiệm thức xử lý *Trichoderma viride* đến năng suất lạc trong vụ đông xuân 2021/2022 tại huyện Tánh Linh, tỉnh Bình Thuận**

| Nghiệm thức   | Số quả/cây        | Số quả chắc trên/cây | Khối lượng 100 quả (g) | Khối lượng 100 hạt (g) | NSTT (tấn/ha)     |
|---|-------------------|----------------------|------------------------|------------------------|-------------------|
| Phun Anvil 5SC 1,0 lít/ha, không xử lý <i>T. viride</i> | 15,2 <sup>b</sup> | 13,4 <sup>b</sup>    | 139,3 <sup>a</sup>     | 60,3                   | 1,8 <sup>b</sup>  |
| Không xử lý <i>T. viride</i> và Anvil 5SC (đối chứng)   | 13,7 <sup>b</sup> | 11,2 <sup>c</sup>    | 132,6 <sup>c</sup>     | 59,2                   | 1,3 <sup>c</sup>  |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,1kg chế phẩm/kg hạt giống      | 15,8 <sup>b</sup> | 13,1 <sup>b</sup>    | 139,8 <sup>a</sup>     | 62,8                   | 2,1 <sup>b</sup>  |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,2kg chế phẩm/kg hạt giống      | 16,5 <sup>b</sup> | 13,5 <sup>b</sup>    | 140,2 <sup>a</sup>     | 63,4                   | 2,2 <sup>ab</sup> |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,3kg chế phẩm/kg hạt giống      | 19,3 <sup>a</sup> | 15,2 <sup>a</sup>    | 139,3 <sup>a</sup>     | 62,0                   | 2,4 <sup>a</sup>  |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,4kg chế phẩm/kg hạt giống      | 19,5 <sup>a</sup> | 15,7 <sup>a</sup>    | 140,7 <sup>a</sup>     | 62,5                   | 2,5 <sup>a</sup>  |
| Xử lý <i>T. viride</i> 0,5kg chế phẩm/kg hạt giống      | 20,2 <sup>a</sup> | 15,8 <sup>a</sup>    | 140,5 <sup>a</sup>     | 61,9                   | 2,6 <sup>a</sup>  |
| CV (%)  | 15,3              | 10,4                 | 3,2                    | 2,7                    | 13,8              |
| F tính  | 3,7*              | 3,1*                 | 6,2*                   | 3,8 <sup>ns</sup>      | 7,2*              |

*Ghi chú:* Trong cùng một cột chỉ tiêu, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. ns: Khác biệt không có ý nghĩa. \*: Khác biệt có ý nghĩa ở mức  $\alpha = 5\%$ . \*\*: Khác biệt rất có ý nghĩa ở mức:  $\alpha = 1\%$ ; NSTT: Năng suất thực thu.

Như vậy, các nghiệm thức có sử dụng *T. viride* ở nồng độ cao thì cho hiệu quả phòng trừ tốt hơn. Ở nghiệm thức đối chứng sử dụng Anvil cho hiệu quả phòng trừ không cao bằng so với xử lý *T. viride*.

#### 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

##### 4.1. Kết luận

- Có 6 loại bệnh khác nhau gây hại trên cây lạc tại huyện Đức Linh và Tánh Linh tỉnh Bình Thuận; trong đó, bệnh đốm

nâu (*Cercospora arachidicola*), bệnh đốm đen (*Cercospora personata* Beck & Curtis), bệnh gỉ sắt (*Puccinia arachidis* Speg) xuất hiện với tần suất phổ biến; bệnh héo rũ gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii* Sacc) xuất hiện với tần suất phổ biến tại huyện Đức Linh và tương đối phổ biến tại huyện Tánh Linh.

- Bệnh héo rũ gốc mốc trắng gây hại nặng nhất ở định kỳ 84 NSG với tỷ lệ bệnh là 12,9% tại huyện Đức Linh và 8,9% ở huyện Tánh Linh. Bệnh héo rũ gốc mốc đen gây hại nặng nhất ở định kỳ 84

NSG với tỷ lệ bệnh là 7,3% ở huyện Đức Linh và 5,4% ở huyện Tân Linh.

- Đã xác định được liều lượng sử dụng từ 0,3 - 0,5kg chế phẩm *Trichoderma viride* để xử lý cho 1kg hạt giống mang lại hiệu quả cao trong phòng trừ bệnh héo rũ tại huyện Đức Linh và Tân Linh tỉnh Bình Thuận.

#### 4.2. Đề nghị

Sử dụng liều lượng từ 0,3 - 0,5kg chế phẩm *Trichoderma viride* cho 1kg hạt giống để phòng trừ bệnh héo rũ gây hại trên cây lạc tại huyện Đức Linh và Tân Linh, tỉnh Bình Thuận.

**Lời cảm ơn:** Các nội dung nghiên cứu trong bài báo này được tài trợ bởi nguồn ngân sách Khoa học công nghệ với đề tài cấp tỉnh Bình Thuận, mã số ĐT-04-03-2020.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cục Thống kê tỉnh Bình Thuận, 2021. Niên giám thống kê tỉnh Bình Thuận năm 2021
2. Cục Bảo vệ thực vật, 2014. QCVN 01-168: 2014/BNNPTNT Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về phương pháp điều tra phát hiện dịch hại trên cây lạc, đậu tương.
3. Nguyễn Văn Viên, Nguyễn Thị Tú và Bùi Văn Công, 2012. Nghiên cứu sản xuất và sử dụng chế phẩm nấm đối kháng *Trichoderma viride* phòng trừ một số bệnh nấm hại vùng rễ cây khoai tây, lạc, đậu tương, Tạp chí Khoa học và Phát triển, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội, trang 95 - 102.
4. Mehan V. K., C. D. Mayee and D. McDonald, 1994. Management of *Sclerotium rolfsii* caused stem and pod rots of groundnut - a critical-review, International journal of pest management, 40, 313 - 320.
5. Jonnie White, 2000. *Potassium in Agriculture Australia and New Zealand*. Caprotex Publisher.

#### ABSTRACT

#### Composition, wilt disease progression and effectiveness of using *Trichoderma viride* for controlling the peanut wilt disease in Duc Linh and Tanh Linh district, Binh Thuan province

*Investigation of composition, wilt disease progression and effectiveness of using Trichoderma viride for controlling the peanut wilt disease was carried out in Winter-Spring season 2020/2021 and 2021/2022 in Duc Linh and Tanh Linh, Binh Thuan province. The goal of determining the disease components and the effectiveness of Trichoderma viride has prevented stem-rot disease. The results of the investigation into the disease composition of peanuts have identified 6 diseases that appear and cause damage on peanuts, including leaf spot (Cercospora arachidicola Hori.), rust (Puccinia arachidis), stem-rot (Sclerotium rolfsii Sacc) and (Aspergillus niger) appear quite commonly. The stem-rot cause damage from early (14 days after sowing) and cause strong damage at the end of the crop. The efficacy of the Trichoderma viride with a dosage of 0.3 - 0.5kg of inoculum/kg of seeds could for controlling disease is better than those treated with Anvil 5SC to prevent wilt disease.*

**Keywords:** Peanut, peanut disease, *Trichoderma viride*, wilt disease.

## MỤC LỤC

1. LỜI KHAI MẠC HỘI THẢO LẦN THỨ 21 CỦA HỘI NGHIÊN CỨU BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM 3  
*GS.TS. Vũ Triệu Mân - Chủ tịch Hội*
2. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG BỆNH VIRUS CỦA GIỐNG CHANH LEO MỚI QUÊ PHONG 1 11  
*Nguyễn Văn Viêt, Hoàng Mạnh Hùng, Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Đức Trung*
3. KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG CỦA XẠ KHUẨN ĐỐI VỚI NẤM *Colletotrichum* sp. GÂY BỆNH THÁN THƯ HẠI MĂNG CÀU XIÊM (*Annona muricata* Linn.) 19  
*Đinh Hoàng Kha và Lê Minh Tường*
4. TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN NUÔI CÂY ĐỂ KÍCH THÍCH KHẢ NĂNG TẠO BÀO TỬ CỦA VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG *Bacillus subtilis* ST-14 PHÒNG TRỊ BỆNH BẠC LÁ LÚA 26  
*Bí Trường Giang, Nguyễn Quang Tiến, Nguyễn Đắc Khoa*
5. HIỆU QUẢ GIẢM BỆNH BẠC LÁ LÚA CỦA HỖN HỢP HAI CHỦNG VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG *Bacillus pumilus* TG-71 VÀ *Bacillus aerophilus* HG-33 TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI 36  
*Huỳnh Yến Nhi, Nguyễn Quang Tiến, Nguyễn Đắc Khoa*
6. MỘT SỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TÒN TRỮ, PHỐI TRỘN VÀ TẠO BÀO TỬ CÁC VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG VỚI VI KHUẨN *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* GÂY BỆNH BẠC LÁ LÚA 44  
*Nguyễn Đắc Khoa và Nguyễn Thị Phi Oanh*
7. HIỆU QUẢ GIẢM BỆNH BẠC LÁ LÚA CỦA HỖN HỢP HAI CHỦNG VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG *Bacillus safensis* AG-131 VÀ *Bacillus stratosphericus* AG-62 TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI 53  
*Thái Trần Anh Thư, Nguyễn Thị Mỹ Á, Nguyễn Quang Tiến, Nguyễn Đắc Khoa*
8. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÒNG TRỪ SINH HỌC BỆNH THÁN THƯ TRÊN ỚT DO NẤM *Colletotrichum* sp. CỦA 2 DÒNG VI KHUẨN *Bacillus* sp. M3 VÀ *Bacillus* sp. G5 Ở ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM VÀ NHÀ LƯỚI 61  
*Nguyễn Khởi Nghĩa, Trần Thị Cẩm Nhung, Lê Thị Xã và Nguyễn Hữu Thiện*

9. TUYỂN CHỌN VI KHUẨN VÙNG RỄ CÂY HỒ TIÊU (*Piper nigrum* L.)  
CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG TUYẾN TRÙNG (*Meloidogyne* sp.)  
TẠI TỈNH GIA LAI 72  
*Trịnh Thị Huyền Trang, Trần Thị Phương Hạnh,  
Trang Thị Nguyệt Quế, Nguyễn Anh Dũng*
10. NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM BỆNH HÉO XANH VI KHUẨN TRÊN HOA CÚC  
TẠI MÊ LINH, HÀ NỘI 82  
*La Việt Hồng, Ong Xuân Phong, Dương Tiến Viện,  
Ngô Thị Thương, Nguyễn Thị Thu Hiền, Nguyễn Văn Thiệp,  
Chu Đức Hà, Nguyễn Thị Lệ Thùy*
11. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÒNG TRỪ CỦA XẠ KHUẨN *Actinomycetes*  
ĐỐI VỚI VI KHUẨN *Erwinia* sp. GÂY BỆNH THỐI GỐC LÚA  
TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI 90  
*Trần Thị Nam Lý, Nguyễn Thị Phong Lan, Nguyễn Đức Cường*
12. THÀNH PHẦN NẤM GÂY BỆNH MỤC RUỘT KEO TẠI TƯỢNG  
TẠI VIỆT NAM 101  
*La Ánh Dương, Phí Hồng Hải, Nguyễn Hoài Thu,  
Nguyễn Minh Chí, Đặng Như Quỳnh*
13. BƯỚC ĐẦU XÁC ĐỊNH NGUYÊN NHÂN GÂY BỆNH KHÔ ĐẦU LÁ  
CÂY KIM GIAO 113  
*Trần Xuân Hưng, Nguyễn Thị Minh Hằng*
14. KHẢ NĂNG KÝ SINH TRÊN TUYẾN TRÙNG *Meloidogyne*  
GÂY BƯỚU RỄ HỒ TIÊU VÀ PHÂN HỦY CHITIN CỦA NẤM *Paecilomyces* 122  
*Huỳnh Minh Châu, Nguyễn Vương Tuấn,  
Lương Thị Hoàng Dung, Dương Thị Nguyễn Quyên*
15. TUYỂN CHỌN CÁC DÒNG NẤM KÝ SINH TUYẾN TRÙNG  
TRONG PHÒNG TRỪ BỆNH BƯỚU RỄ TRÊN CÂY CÀ CHUA 129  
*Nguyễn Văn Tuấn, Nguyễn Thanh Hào,  
Lương Hoàng Minh Triết, Đoàn Thị Kiều Tiên, Nguyễn Thị Thu Nga*
16. NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN PHÁT SINH  
VÀ GÂY HẠI CỦA BỆNH ĐÓM NÂU (*Alternaria sesami*) CHANH LEO  
TẠI TỈNH NGHỆ AN 139  
*Võ Thị Dung, Vũ Triệu Mân, Hà Minh Thanh*

17. ĐA DẠNG DI TRUYỀN THEO CHỈ THỊ SRAP CỦA MỘT SỐ MẪU NẤM  
*Colletotrichum* spp. GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN ỚT 149  
*Huỳnh Nguyễn Quỳnh Như, Nguyễn Mai Nghiệp,  
Trần Thuỳ Trang, Nguyễn Ngọc Bảo Châu, Nguyễn Bảo Quốc*
18. NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH NẤM GÂY BỆNH HÉO RŨ GÓC MỐC TRẮNG  
HẠI CÂY LẠC TẠI QUẢNG TRỊ 161  
*Nguyễn Xuân Hiếu, Nguyễn Đức Huy, Cao Thị Thuyết,  
Nguyễn Quang Cơ, Nguyễn Tiến Long, Nguyễn Thị Minh Nga,  
Nguyễn Thị Thu Thủy*
19. NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ ĐỊNH DANH NẤM MĐT6  
PHÂN LẬP TỪ LÁ ĐẬU TƯƠNG NHIỄM BỆNH PHẤN TRẮNG 168  
*Trần Thị Hoa, Nguyễn Thị Hồng Hà, Bùi Phương Thảo,  
Trần Thị Trường, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Đỗ Tiến Phát*
20. ĐÁNH GIÁ SỰ GÂY HẠI KÉP CỦA NẤM *Pyricularia oryzae*  
VÀ VI KHUẨN *Erwinia* sp. TRÊN LÚA TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI 176  
*Võ Thị Thu Ngân, Trần Thị Kiều, Nguyễn Đức Cường*
21. TÁC NHÂN GÂY BỆNH RỤNG LÁ ĐÓM TRÒN TRÊN CÂY CAO SU  
Ở TỈNH ĐỒNG NAI VÀ BÌNH PHƯỚC 183  
*Nguyễn Đôn Hiệu, Nguyễn Thị Kim Uyên, Nguyễn Phương Vinh,  
Nguyễn Thị Thanh Trang, Nguyễn Ngọc Mai, Đoàn Nhân Luân,  
Bùi Thanh Tuấn, Trần Ánh Pha, Nguyễn Anh Nghĩa*
22. NGHIÊN CỨU BIỆN PHÁP SINH HỌC PHÒNG TRỪ TÁC NHÂN GÂY CHẾT  
CÀ PHÊ SAU TÁI CANH TẠI VÙNG TÂY NGUYÊN 191  
*Nguyễn Văn Tuất, Nguyễn Văn Viêt, Nguyễn Xuân Hòa*
23. KHẢ NĂNG VÀ CƠ CHẾ KÍCH KHÁNG BỆNH BẠC LÁ LÚA  
CỦA DỊCH TRÍCH LÁ CỎ HÔI (*Chromolaena odorata*)  
BẰNG BIỆN PHÁP PHUN QUA LÁ 202  
*Trương Văn Xạ, Nguyễn Thị Tuyết Mai, Nguyễn Đắc Khoa*
24. XÁC ĐỊNH VÀ KHAI THÁC BIỂU HIỆN CỦA NHÓM GENE MÃ HÓA  
NHÂN TỐ PHIÊN MÃ GATA LIÊN QUAN ĐẾN BỆNH SỌC NÂU VIRUS  
Ở CÂY SẴN (*Manihot esculenta*) BẰNG CÔNG CỤ TIN SINH HỌC 213  
*Trần Văn Tiến, Lê Hoàng Phương, La Việt Hồng, Lưu Thế Long,  
Trịnh Thị Thu Thủy, Nguyễn Quốc Trung, Chu Đức Hà, Lê Huy Hàm*

25. NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG CHẤT KÍCH KHÁNG  
CHỐNG LẠI BỆNH KHẢM LÁ SẴN TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI 220  
*Nguyễn Kim Chi, Trần Thanh Dũng,  
Trần Thị Ánh Tuyết, Nguyễn Vĩnh Trường*
26. TÁC DỤNG KHÁNG NẤM *Neoscytalidium dimidiatum* GÂY BỆNH ĐÓM NÂU  
TRÊN CÂY THANH LONG CỦA NANO SALICYLIC AXIT/CHITOSAN 229  
*Lê Nghiêam Anh Tuấn, Bùi Duy Du,  
Trần Phước Thọ, Chu Trung Kiên*
27. ĐÁNH GIÁ TÍNH KHÁNG BỆNH HÉO XANH DO VI KHUẨN (*Ralstonia solanacearum* Smith) CỦA CÁC GIỐNG LÀM GỐC GHÉP CHO CÀ CHUA TÀI NINH THUẬN 238  
*Đỗ Thị Huệ, Dương Minh Hiến, Lê Minh Khoa,  
Đào Thị Hằng, Phan Công Kiên, Nguyễn Văn Chính*
28. BỆNH PHÂN TRẮNG (*Oidium erysiphoides*) HẠI TÁO VÀ HIỆU LỰC MỘT SỐ LOẠI THUỐC TRỪ BỆNH TẠI NAM TRUNG BỘ 247  
*Mai Văn Hào, Nguyễn Văn Chính, Phan Công Kiên, Trần Thị Hồng*
29. THÀNH PHẦN BỆNH HẠI LẠC VÀ HIỆU QUẢ SỬ DỤNG NẤM *Trichoderma viride* PHÒNG TRỪ BỆNH HÉO RŨ HẠI LẠC TÀI HUYỆN ĐỨC LINH VÀ TÁNH LINH, BÌNH THUẬN 257  
*Phan Công Kiên, Phan Văn Tiêu, Phạm Văn Phước,  
Võ Minh Thư, Mai Văn Hào, Nguyễn Văn Chính, Đoàn Thanh Mạnh*

# 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, TRẦN HỮU NGUYỄN BẢO,  
PHẠM THANH THUỶ  
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](mailto:nxbnn1@gmail.com)  
CHI NHÁNH NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP  
58 Nguyễn Bình Khiêm - Q.I - Tp. Hồ Chí Minh  
ĐT: (028) 38299521, 38297157 - Fax: (028) 39101036

---

In 150 bản khổ 19 × 26,5cm 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: 3286-2022/CXBIPH/2-60/NN ngày 19/9/2022.  
Quyết định xuất bản số: 119/QĐ-NXBNN ngày 14/12/2022.  
ISBN: 978-604-60-3647-0  
In xong và nộp lưu chiểu quý IV/2022.