

TẠP CHÍ

p-ISSN 3093 - 3382

# Nông nghiệp & Môi trường

SCIENCE JOURNAL OF AGRICULTURE AND ENVIRONMENT

TẠP CHÍ KHOA HỌC CỦA BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ MÔI TRƯỜNG

Số đặc biệt

BỆNH HẠI

THỰC VẬT

Tháng 7  
2025

# HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

## Editorial Committee

### 1. CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG:

PHÙNG ĐỨC TIẾN

### 2. PHÓ CHỦ TỊCH KIÊM TỔNG THƯ KÝ HỘI ĐỒNG:

NGUYỄN THỊ THANH THỦY

### 3. CÁC ỦY VIÊN:

NGUYỄN HỮU NINH

*Vụ Khoa học, Công nghệ và Môi trường*

TRẦN ĐÌNH LUÂN

*Cục Thủy sản*

VÕ ĐẠI HẢI

*Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam*

TRẦN ĐÌNH HÒA

*Viện Khoa học Thủy lợi Việt Nam*

PHẠM VĂN TOÀN

*Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*

PHẠM ANH TUẤN

*Viện Cơ điện nông nghiệp và Công nghệ  
sau thu hoạch*

TRẦN CÔNG THẮNG

*Viện Chính sách và  
Chiến lược phát triển nông nghiệp nông thôn*

PHẠM DOÃN LÂN

*Viện Chăn nuôi*

TRỊNH MINH THỤY

*Trường Đại học Thủy lợi*

PHẠM VĂN ĐIỀN

*Trường Đại học Lâm nghiệp*

PHẠM VĂN CƯỜNG

*Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

LÊ ANH TUẤN

*Đại học Bách Khoa Hà Nội*

TRẦN ĐĂNG HÒA

*Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*

NGUYỄN THANH PHƯƠNG

*Trường Đại học Cần Thơ*

BÙI HUY HIỀN

*Hội Khoa học Đất Việt Nam*

NGÔ XUÂN BÌNH

*Ban Chủ nhiệm Chương trình công nghệ  
sinh học, Bộ Khoa học và Công nghệ*

LÊ MẠNH HÙNG

*Hội Khoa học và Kỹ thuật Thủy lợi  
thành phố Hồ Chí Minh*

NGUYỄN VĂN CẨM

*Hội Thú y Việt Nam*

BÙI CHÍ BỬU

*Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền  
Nam, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*

TRẦN VĂN CHỨ

*Trường Đại học Lâm nghiệp*

PHẠM QUANG THU

*Trung tâm Nghiên cứu Bảo vệ rừng,  
Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam*

NGUYỄN DUY HOAN

*Trường Đại học Nông Lâm,  
Đại học Thái Nguyên*

NGUYỄN VĂN THANH

*Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

LÊ ĐỨC NGOAN

*Hiệp hội thức ăn chăn nuôi Việt Nam*

ĐỖ KIM CHUNG

*Học viện Nông nghiệp Việt Nam*



## TẠP CHÍ

### NÔNG NGHIỆP & MÔI TRƯỜNG

p-ISSN 3093-3382

NĂM THỨ HAI MƯƠI LĂM

SỐ ĐẶC BIỆT  
BỆNH HẠI THỰC VẬT

Tháng 7/2025

TỔNG BIÊN TẬP  
TS. ĐÀO XUÂN HƯNG  
ĐT: 024.37711070

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP  
TS. DƯƠNG THANH HẢI  
ThS. KIỀU ĐĂNG TUYẾT

ĐT: 024.38345457

#### TOÀ SOẠN

Số 10 Nguyễn Công Hoan  
Quận Ba Đình - Hà Nội  
ĐT: 024.37711072  
Fax: 024.37711073  
E-mail: tapchinmt@mae.gov.vn  
Website: www.tapchinongnghiep.vn

#### Giấy phép số:

23/GP - BVHTTDL

Bộ Văn hoá, Thể thao và Du lịch  
cấp ngày 25 tháng 4 năm 2025

Chế bản tại Tạp chí  
Nông nghiệp và Môi trường  
In tại Công ty CP Khoa học và  
Công nghệ Hoàng Quốc Việt

Đơn vị phát hành: Công ty  
Phát hành báo chí Trung ương  
ĐT: 0913023486

## MỤC LỤC

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| ❑ BÙI CHÍ BỬU, NGUYỄN THỊ LANG. Nguồn vật liệu cho gen kháng bệnh đạo ôn từ giống lúa Tê Tép, Việt Nam                                                                                                                                                                                                         | 5-12    |
| ❑ LÊ MINH TƯỜNG, NGUYỄN ĐỨC NHUẬN, ĐINH HOÀNG KHA, LÊ THỊ NGỌC XUÂN, NGÔ THÀNH TRÍ, ĐÀO THỊ HỒNG XUYẾN. Nghiên cứu đa dạng di truyền của nấm <i>Phytophthora</i> spp. gây bệnh thối lá, thối thân hại cây sen ( <i>Nelumbo nucifera</i> )                                                                      | 13-18   |
| ❑ PHẠM ĐỨC TOÀN, PHÙNG THỊ MỸ LINH, BÙI CÁCH TUYẾN. Ứng dụng kỹ thuật multiplex RT-PCR phát hiện <i>Cymbidium mosaic virus</i> (CymMV) và <i>Odontoglossum ringspot virus</i> (ORSV) gây hại trên chi đăng lan ( <i>Dendrobium</i> )                                                                           | 19-24   |
| ❑ TRẦN THỊ NGỌC BÍCH, NGUYỄN THỊ NGỌC THUẬN, TRƯƠNG CÔNG LỰC. Phân lập, định danh và xác định đặc điểm của <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV) trên cây đu đủ và bầu bí tại thành phố Hồ Chí Minh                                                                                                              | 25-33   |
| ❑ HUỲNH THỊ HỒNG PHẤN, ĐẶNG THỊ BẢO QUYÊN, NGUYỄN THỊ NGỌC TUYẾN, VÕ THỊ BÍCH ĐÀO, ĐINH QUỐC TOÀN, TRẦN THỊ VÂN, LÊ ĐÌNH ĐÔN, BÙI CÁCH TUYẾN. Ghi nhận nấm <i>Curvularia intermedia</i> gây đốm nâu trên lá lan Phi điệp vàng ( <i>Dendrobium chrysanthum</i> ) trồng tại thành phố Hồ Chí Minh                | 34-40   |
| ❑ PHẠM THANH VŨ, TRƯƠNG VĨNH HẢI, TRẦN MINH TRÍ, CHU TRUNG KIÊN. Xác định tác nhân gây bệnh cháy lá trên mai vàng và khả năng ức chế nấm gây bệnh bằng vật liệu nano                                                                                                                                           | 41-51   |
| ❑ PHẠM MINH NHỰT, CHU TRUNG KIÊN. Xác định tác nhân gây bệnh thán thư trên trái xoài tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu và hiệu lực kiểm soát mầm bệnh của chitosan và nano chitosan                                                                                                                                   | 52-60   |
| ❑ HUỲNH THỊ THÔNG, PHẠM VĂN LỰC, NGUYỄN THỊ THÙY DƯƠNG, ĐOÀN THỊ KIỀU TIỀN, NGUYỄN THỊ THU NGÀ. Xác định tác nhân gây bệnh thối trái mít và bước đầu đánh giá thuốc hóa học phòng trừ tác nhân gây bệnh                                                                                                        | 61-69   |
| ❑ ĐỖ HOÀNG YẾN, NGUYỄN THỊ MINH HẰNG, NGUYỄN THỊ LOAN, TRẦN ANH TUẤN, PHẠM XUÂN TRƯỜNG, TRẦN THANH TRĂNG, NGUYỄN MINH CHÍ, HÀ BÍCH HỒNG, NGUYỄN MẠNH HẢI. Phòng trừ sinh học nấm <i>Cryptosporiopsis eucalypti</i> gây bệnh đốm lá bạch đàn bằng vi nấm nội sinh                                               | 70-85   |
| ❑ QUẢNG KHÔI NGÔ, LÊ MINH TƯỜNG. Phân lập và đánh giá khả năng đối kháng của xạ khuẩn đối với nấm <i>Fusarium oxysporum</i> gây bệnh héo vàng trên cây đậu nành rau                                                                                                                                            | 86-94   |
| ❑ NGUYỄN PHÚ DŨNG, VĂN VIỄN LƯƠNG, NGUYỄN THỊ THÁI SƠN, PHẠM THỊ BÉ THỊ, PHAN QUÝ QUẢ, LƯU VĨNH TRÍ, NGUYỄN TRƯỞNG HỒNG CÔNG. Định danh và đánh giá khả năng sản sinh enzyme, đối kháng của <i>Bacillus</i> sp. với <i>Phytophthora palmivora</i> gây bệnh nứt thân xì mù mít tại huyện Chợ Mới, tỉnh An Giang | 95-105  |
| ❑ NGUYỄN THỊ LIÊN, PHẠM THỊ PHƯỚC NHI, NGUYỄN LAM MINH, NGUYỄN TĂNG PHÚ. Hoạt tính kháng nấm <i>Fusarium sambucinum</i> FG2 gây thối cuống chuối của <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HGG10 phân lập từ vùng rễ chuối                                                                                         | 106-113 |
| ❑ VÕ THỊ NGỌC HÀ, HUỲNH THANH HÙNG. Tuyển chọn các vi khuẩn đối kháng kiểm soát vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i> gây bệnh héo xanh trên cây cà chua                                                                                                                                                      | 114-126 |

**TẠP CHÍ**

**NÔNG NGHIỆP  
& MÔI TRƯỜNG**

**p-ISSN 3093-3382**

**NĂM THỨ HAI MƯƠI LĂM**

**SỐ ĐẶC BIỆT  
BỆNH HẠI THỰC VẬT**

**Tháng 7/2025**

**TỔNG BIÊN TẬP  
TS. ĐÀO XUÂN HÙNG  
ĐT: 024.37711070**

**PHÓ TỔNG BIÊN TẬP  
TS. DƯƠNG THANH HẢI  
ThS. KIỀU ĐĂNG TUYẾT**

**ĐT: 024.38345457**

**TOÀ SOẠN**  
Số 10 Nguyễn Công Hoan  
Quận Ba Đình - Hà Nội  
ĐT: 024.37711072  
Fax: 024.37711073  
E-mail: tapchinmnt@mae.gov.vn  
Website: www.tapchinongnghiep.vn

**Giấy phép số:**  
23/GP - BVHTTDL  
Bộ Văn hoá, Thể thao và Du lịch  
cấp ngày 25 tháng 4 năm 2025

**Chế bản tại Tạp chí  
Nông nghiệp và Môi trường  
In tại Công ty CP Khoa học và  
Công nghệ Hoàng Quốc Việt**

**Đơn vị phát hành: Công ty  
Phát hành báo chí Trung ương  
ĐT: 0913023486**

- ☐ LÊ VĂN MẠNH, HỒ MẠNH TƯỜNG, PHẠM QUANG HUY, NGUYỄN THỊ HỒNG HÀ, TRẦN THỊ HOA, PHAN QUYỀN, LÊ THỊ THẢO LINH, CHU HOÀNG HÀ, ĐỖ TIẾN PHÁT. Đánh giá đặc điểm hóa sinh, khả năng kháng bệnh và kích thích sinh trưởng của chủng *Klebsiella variicola* BR12 được phân lập từ đất vùng rễ cây cam 127-136
- ☐ THÁI TRẦN ANH THƯ, HỒ XUÂN BÁCH, NGUYỄN QUANG TIẾN, NGUYỄN ĐẮC KHOA. Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy để kích thích khả năng tạo nội bào tử của vi khuẩn đối kháng *Bacillus pumilus* TG-71 phòng trị bệnh bạc lá lúa (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 137-145
- ☐ VÕ THỊ DUNG, VŨ TRIỆU MÂN, VƯƠNG THỊ THÚY HẰNG, NGUYỄN HOÀNG TIẾN. Nghiên cứu dịch chiết lá cây bạch đàn phòng chống nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh trên cây cà chua tại tỉnh Nghệ An 146-152
- ☐ TRƯƠNG VĂN XA, NGUYỄN CHÍ THIÊN, NGUYỄN ĐẮC KHOA. So sánh hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa của dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc (*Ageratum conyzoides*) và cây cỏ hôi (*Chromolaena odorata*) 153-162
- ☐ PHẠM THIẾT TRÌNH, NGUYỄN MINH KHÔI, TRƯƠNG VĂN XA, NGUYỄN ĐẮC KHOA. Khả năng kích kháng bệnh bạc lá (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) khi ngâm hạt giống kết hợp phun lên lá lúa cao chiết lá sống đời (*Kalanchoe pinnata*) ly trích bằng dung môi nước 163-172
- ☐ HỒ HOÀNG NAM, NGUYỄN HOÀNG DUY, ĐOÀN THỊ KIỀU TIỀN, NGUYỄN THỊ THÙY DƯƠNG, NGUYỄN THỊ THU NGÀ. Cơ chế kích kháng của một số hóa chất chống lại bệnh sương mai do *Peronospora belbahrii* trên cây húng quế 173-179
- ☐ NGUYỄN ĐÔN HIỆU, NGUYỄN THỊ THANH TRANG, NGUYỄN THỊ KIM UYÊN, NGUYỄN NGỌC MAI. Đánh giá hiệu lực *in vitro* của một số hoạt chất thuốc bảo vệ thực vật đối với nấm *Pestalotiopsis microspora* và *Colletotrichum gloeosporioides* tác nhân gây bệnh rụng lá đốm tròn trên cây cao su 180-188
- ☐ LÊ THỊ PHƯƠNG LAN, NGUYỄN XUÂN ĐOAN, NGUYỄN HUY CHUNG, NGUYỄN XUÂN THU, NGUYỄN THỊ THO, LÊ TUẤN TÚ. Sàng lọc nguồn vật liệu lạc (*Arachis hypogaea* L.) chịu hạn và kháng bệnh héo xanh vi khuẩn (*Ralstonia solanacearum* Smith) cho các tỉnh miền Trung 189-196
- ☐ NGUYỄN VĂN MINH, HOÀNG MAI ĐỨC. Ảnh hưởng của lượng phân bón và mật độ trồng đến năng suất và hiệu quả kinh tế của giống sắn kháng bệnh khảm lá HN1 trên đất nâu đỏ bazan tại tỉnh Đắk Lắk 197-206
- ☐ ĐỖ VĂN CHUNG, PHAN TỬ QUÝ, NGUYỄN VĂN BỐN. Nghiên cứu ứng dụng phụ phẩm bã bột mì trong lên men *Acinetobacter nosocomialis* CYS-V3 tạo nano bạc sinh học và đánh giá tiềm năng kháng tuyến trùng nốt sừng trên hồ tiêu 207-215
- ☐ TRẦN VŨ PHẾN, ĐẶNG QUỐC HUY, NGUYỄN TRƯỜNG VŨ, HUỖNH VĂN SÁU. Nghiên cứu quần xã tuyến trùng ký sinh cây sầu riêng ở một số vùng canh tác chính tại đồng bằng sông Cửu Long 216-223
- ☐ PHẠM VĂN LỰC, NGUYỄN KIM CƯỜNG, NGUYỄN THỊ THU NGÀ, ĐOÀN THỊ KIỀU TIỀN. Khảo sát thành phần tuyến trùng ký sinh thực vật trên cây ổi tại huyện Châu Thành, tỉnh Đồng Tháp 224-230
- ☐ NGUYỄN THỊ THANH PHỤNG, DƯƠNG THỊ OANH, TRẦN THỊ DIỆU HIỀN, NGUYỄN TỐ CÁT TRIỆU, NGUYỄN ĐÔ, NGUYỄN QUANG NGỌC, NGUYỄN VĂN LONG. Ảnh hưởng của tuyến trùng *Meloidogyne* spp. đến sinh trưởng của cây hồ tiêu trong điều kiện vườn ươm 231-240

**VIETNAM JOURNAL OF  
AGRICULTURE AND  
ENVIRONMENT**

**p-ISSN 3093-3382**

**SPECIAL ISSUE IN  
PHYTOPATHOLOGY**

**July - 2025**

**Editor-in-Chief**  
**Dr. DAO XUAN HUNG**  
Tel: 024.37711070

**Deputy Editor-in-Chief**  
**Dr. DUONG THANH HAI**  
**MS. KIEU DANG TUYET**  
Tel: 024.38345457

**Head-office**  
No 10 Nguyenconghoan  
Badinh - Hanoi - Vietnam  
Tel: 024.37711072  
Fax: 024.37711073  
E-mail: tapchinnmt@mae.gov.vn  
Website: www.tapchinongnghiep.vn

License No.23/GP - BVHTTDL issued  
by the Ministry of Culture, Sports and  
Tourism on April 25, 2025

Printing in Hoang Quoc Viet  
technology and science  
joint stock company

**CONTENTS**

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| ❑ BUI CHI BUU, NGUYEN THI LANG. Resistance donor of rice blast from Te Tep cultivar, Vietnam                                                                                                                                                                                                                                                                   | 5-12    |
| ❑ LE MINH TUONG, NGUYEN DUC NHUAN, DINH HOANG KHA, LE THI NGOC XUAN, NGO THANH TRI, DAO THI HONG XUYEN. Genetic diversity of <i>Phytophthora</i> spp. causing leaf and stem rot disease on lotus ( <i>Nelumbo nucifera</i> )                                                                                                                                   | 13-18   |
| ❑ PHAM DUC TOAN, PHUNG THI MY LINH, BUI CACH TUYEN. Application of multiplex RT-PCR for detection of <i>Cymbidium mosaic virus</i> (CymMV) and <i>Odontoglossum ringspot virus</i> (ORSV) causing diseases in the genus <i>Dendrobium</i> orchids                                                                                                              | 19-24   |
| ❑ TRAN THI NGOC BICH, NGUYEN THI NGOC THUAN, TRUONG CONG LUC. Isolation, identification and characterization of pathogenic <i>Papaya ringspot virus</i> PRSV-P in Ho Chi Minh city                                                                                                                                                                             | 25-33   |
| ❑ HUYNH THI HONG PHAN, DANG THI BAO QUYEN, NGUYEN THI NGOC TUYEN, VO THI BICH DAO, DINH QUOC TOAN, TRAN THI VAN, LE DINH DON, BUI CACH TUYEN. <i>Curvularia intermedia</i> causing brown spots on <i>Dendrobium chrysanthum</i> in Ho Chi Minh city                                                                                                            | 34-40   |
| ❑ PHAM THANH VU, TRUONG VINH HAI, TRAN MINH TRI, CHU TRUNG KIEN. Identification of the causal agent of leaf blight disease on <i>Ochna integerrima</i> and evaluation of nano-materials for spore germination inhibition                                                                                                                                       | 41-51   |
| ❑ PHAM MINH NHUT, CHU TRUNG KIEN. Identification of the agent causing anthracnose disease on mango fruit in Ba Ria - Vung Tau province and efficacy of chitosan and chitosan nanoparticles against the pathogen                                                                                                                                                | 52-60   |
| ❑ HUYNH THI THONG, PHAM VAN LUC, NGUYEN THI THUY DUONG, DOAN THI KIEU TIEN, NGUYEN THI THU NGA. Identification of the causative agent of fruit rot on jackfruit and primary evaluation of fungicides in controlling the pathogen                                                                                                                               | 61-69   |
| ❑ DO HOANG YEN, NGUYEN THI MINH HANG, NGUYEN THI LOAN, TRAN ANH TUAN, PHAM XUAN TRUONG, TRAN THANH TRANG, NGUYEN MINH CHI, HA BICH HONG, NGUYEN MANH HA. Biocontrol of <i>Cryptosporiopsis eucalypti</i> causing leaf spot of eucalypts using endophytic fungi                                                                                                 | 70-85   |
| ❑ QUANG KHOI NGO, LE MINH TUONG. Isolation and evaluation of antibacterial activity of actinomyces isolates on <i>Fusarium oxysporum</i> causing yellow wilt disease on vegetable soybean                                                                                                                                                                      | 86-94   |
| ❑ NGUYEN PHU DUNG, VAN VIEN LUONG, NGUYEN THI THAI SON, PHAM THI BE THI, PHAN QUY QUA, LUU VINH TRI, NGUYEN TRUONG HONG CONG. Identification and assessment of the enzyme-based, antagonistic potential of <i>Bacillus</i> sp. against <i>Phytophthora palmivora</i> causing gummosis trunk canker disease on jackfruit in Cho Moi district, An Giang province | 95-105  |
| ❑ NGUYEN THI LIEN, PHAM THI PHUOC NHI, NGUYEN LAM MINH, NGUYEN TANG PHU. Antifungal activity of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HGG10 isolated from banana rhizosphere against <i>Fusarium sambucinum</i> FG2 causing crown rot in banana                                                                                                                    | 106-113 |
| ❑ VO THI NGOC HA, HUYNH THANH HUNG. Selection of antagonistic bacteria for the biocontrol of <i>Ralstonia solanacearum</i> causing bacterial wilt in tomato                                                                                                                                                                                                    | 114-126 |

**VIETNAM JOURNAL OF  
AGRICULTURE AND  
ENVIRONMENT**

**p-ISSN 3093-3382**

**SPECIAL ISSUE IN  
PHYTOPATHOLOGY**

**July - 2025**

**Editor-in-Chief**  
**Dr. DAO XUAN HUNG**  
Tel: 024.37711070

**Deputy Editor-in-Chief**  
**Dr. DUONG THANH HAI**  
**MS. KIEU DANG TUYET**  
Tel: 024.38345457

**Head-office**  
No 10 Nguyenconghoan  
Badinh - Hanoi - Vietnam  
Tel: 024.37711072  
Fax: 024.37711073  
E-mail: tapchinmt@mae.gov.vn  
Website: www.tapchinongnghiep.vn

License No.23/GP - BVHTTDL issued  
by the Ministry of Culture, Sports and  
Tourism on April 25, 2025

Printing in Hoang Quoc Viet  
technology and science  
joint stock company

- ❑ LE VAN MANH, HO MANH TUONG, PHAM QUANG HUY, NGUYEN THI HONG HA, TRAN THI HOA, PHAN QUYEN, LE THI THAO LINH, CHU HOANG HA, DO TIEN PHAT. Evaluation of biochemical characterization, antagonistic activity against phytopathogens and plant - growth - promoting of *Klebsiella variicola* BR12 isolated from the orange rhizosphere 127-136
- ❑ THAI TRAN ANH THU, HO XUAN BACH, NGUYEN QUANG TIEN, NGUYEN DAC KHOA. Optimization of culture medium ingredients to stimulate sporulation of the antagonistic *Bacillus pumilus* TG-71 against rice bacterial leaf blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 137-145
- ❑ VO THI DUNG, VU TRIEU MAN, VUONG THI THUY HANG, NGUYEN HOANG TIEN. Research on eucalyptus extract to prevent *Colletotrichum* spp. disease on tomato in Nghe An province 146-152
- ❑ TRUONG VAN XA, NGUYEN CHI THIEN, NGUYEN DAC KHOA. Comparisons of the disease-reducing effects against rice bacterial leaf blight of aqueous leaf extracts of *Ageratum conyzoides* and *Chromolaena odorata* 153-162
- ❑ PHAM THIET TRINH, NGUYEN MINH KHOI, TRUONG VAN XA, NGUYEN DAC KHOA. Seed soaking combined with foliar spraying using aqueous *Kalanchoe pinnata* leaf extracts induces rice resistance against bacterial leaf blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 163-172
- ❑ HO HOANG NAM, NGUYEN HOANG DUY, DOAN THI KIEU TIEN, NGUYEN THI THUY DUONG, NGUYEN THI THU NGA. Induced resistance mechanism of some chemicals against downy mildew caused by *Peronospora belbahrii* in basil 173-179
- ❑ NGUYEN DON HIEU, NGUYEN THI THANH TRANG, NGUYEN THI KIM UYEN, NGUYEN NGOC MAI. *In vitro* efficacy evaluation of some active ingredient of pesticides against *Pestalotiopsis microspora* and *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agents of circular leaf spot disease on rubber trees 180-188
- ❑ LE THI PHUONG LAN, NGUYEN XUAN DOAN, NGUYEN HUY CHUNG, NGUYEN XUAN THU, NGUYEN THI THO, LE TUAN TU. Screening groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm for drought tolerant and bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum* Smith) resistance in central Vietnam provinces 189-196
- ❑ NGUYEN VAN MINH, HOANG MAI DUC. Effects of fertilizers and crop density on yield and economic efficiency of HN1 mosaic disease resistant cassava variety cultivated on basalt soil in Dak Lak province 197-206
- ❑ DO VAN CHUNG, PHAN TU QUY, NGUYEN VAN BON. Study on the application of wheat flour residue in the fermentation of *Acinetobacter nosocomialis* CYS-V3 for biosynthesis of silver nanoparticles and evaluation of their potential against root-knot nematodes on black pepper 207-215
- ❑ TRAN VU PHEN, DANG QUOC HUY, NGUYEN TRUONG VU, HUYNH VAN SAU. Study on plant-parasitic nematode communities associated with durian in some major cultivation areas of the Mekong delta 216-223
- ❑ PHAM VAN LUC, NGUYEN KIM CUONG, NGUYEN THI THU NGA, DOAN THI KIEU TIEN. Survey on the composition of plant parasitic nematodes on guava in Chau Thanh district, Dong Thap province 224-230
- ❑ NGUYEN THI THANH PHUNG, DUONG THI OANH, TRAN THI DIEU HIEN, NGUYEN TO CAT TRIEU, NGUYEN DO, NGUYEN QUANG NGOC, NGUYEN VAN LONG. Effects of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) on the growth of black pepper (*Piper nigrum* L.) under nursery conditions 231-240

# NGUỒN VẬT LIỆU CHO GEN KHÁNG BỆNH ĐẠO ÔN TỪ GIỐNG LÚA TÊ TẾP, VIỆT NAM

Bùi Chí Bửu<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Lang<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Viện Khoa học và Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam

<sup>2</sup> Viện Nghiên cứu Nông nghiệp Công nghệ cao đồng bằng sông Cửu Long

\*Email: buubuichi@gmail.com

## TÓM TẮT

Phát triển giống lúa kháng đạo ôn là giải pháp tối ưu trong chiến lược quản lý bệnh đạo ôn trong sản xuất lúa toàn thế giới. Giống lúa bản địa Việt Nam là Tê Tép đã trở thành nguồn vật liệu cung cấp gen kháng bệnh đạo ôn phổ rộng và bền vững. Tê Tép thuộc loại hình indica với genome mang nhiều gen kháng và cụm gen kháng (cluster) được phân lập gần đây và trong quá khứ như sau: Gen *Pi-tp* trên nhiễm sắc thể 1; *Pi-54* và *Pi-k<sup>h</sup>* trên nhiễm sắc thể 11; *Pi-2t* trên nhiễm sắc thể 2; *Pita*, *Pita2*, *Pi-67* trên nhiễm sắc thể 12, gần tâm động; đặc biệt là cụm gen kháng (cluster) mã hóa protein NLR-LRR (nucleotide-binding site leucine-rich repeat). Tất cả đã hình thành nên một hệ gen có khả năng cho nguồn vật liệu di truyền (donors) rất quý hiếm, phục vụ chương trình lai tạo giống lúa cao sản kháng bệnh đạo ôn phổ rộng và bền vững.

**Từ khóa:** Bệnh đạo ôn cổ bông, bệnh đạo ôn lá, chủng nổi, hệ gen tham chiếu, genome, kháng phổ rộng, kháng bền vững, LRR, mẫu phân lập, NLR, trình tự gen.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phát triển giống lúa kháng đạo ôn là giải pháp tối ưu trong chiến lược ổn định năng suất lúa của thế giới. Việt Nam tự hào là nơi có nguồn tài nguyên di truyền đa dạng về gen kháng bệnh đạo ôn, cụ thể là giống bản địa Tê Tép được thế giới vinh danh.

Hiện có khoảng 120 gen kháng (R) với nấm *Magnaporthe grisea* được phân lập thành công. Trong đó, 26 gen được dòng hóa (cloned) [1, 2]. Hệ thống phát sinh bệnh (pathosystem) của nấm đạo ôn *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr, là một hệ thống mẫu mực (model) để thực hiện nghiên cứu tương tác giữa ký sinh và ký chủ.

Tiến bộ giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) đã cho biết được trình tự haplotype của mỗi gen kháng được dòng hóa thành công và xác định được nhiều alen hoặc biến thể tự nhiên của gen kháng phổ rộng như: *Pib*, *Pik locus Pi1*, *Pike*, *Pikg*, *Pi54 a*, novel *Pi21 haplotypes*, alen mới của *Pi2/9 locus*. Những gen đích có phổ kháng rộng và kháng bền vững được ghi nhận từ nguồn vật liệu Tê Tép và nguồn lúa hoang là sự kiện được thế giới chú ý.

## 2. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 2.1. Nguồn gen kháng đạo ôn của tẻ tép

Giống lúa bản địa loại hình indica: ‘Tetep’ nổi tiếng khắp thế giới vì tính kháng bền vững và phổ kháng rộng đối với nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa.

Cho đến nay, có 6 gen kháng đã được ghi nhận trên giống Tẻ Tép: *Pi-1*, *Pi-kh* và *Pi54* định vị trên nhiễm sắc thể 11, hai gen giả định tương tác allelic với *Pita*, *Pita2* và *Pi67* trên nhiễm sắc thể 12 đã được phân lập trên mẫu giống Tẻ Tép của Việt Nam [3, 4]. Gen kháng đạo ôn cổ bông *Pb2* định vị gần tâm động của nhiễm sắc thể 12, được phân lập gần đây trong quần thể con lai RIL4, tính kháng có nguồn gốc từ mẫu giống Tẻ Tép [5].

Kiyosawa (1986) [6] đã hình thành một bộ giống chuẩn kháng (differential), mỗi giống mang một đến hai gen kháng bệnh đạo ôn. Những gen kháng bổ sung sau này đều được tìm thấy trên giống lúa indica, rất hiếm gặp trong loại hình cây lúa japonica. Nghiên cứu này đã được bắt đầu từ việc du nhập gen kháng từ 4 giống lúa trồng LAC23, 5173, Pai-Kan-Tao và Tẻ Tép vào giống lúa nhiễm bệnh CO39. Tiến hành thực hiện việc tạo nên các quần thể gần như đẳng gen (NILs: nearly isogenic lines), mỗi quần thể NIL mang một đến 2 gen kháng. Các quần thể NILs này cho phép khám phá nhiều gen kháng mới, có tên là: *Pi1*, *Pi2 (=Piz<sup>5</sup>)*, *Pi3*, *Pi4<sup>p</sup>* [7 - 10].

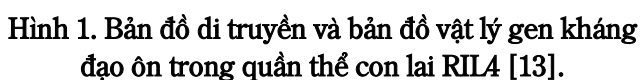
### 2.2. Tẻ Tép cung cấp nguồn gen *Pita/Pita2*

*Pita* là một trong những gen R được biết nhiều nhất trong *Oryza sativa* ở mức độ phân tử. *Pita* mã hóa protein có chức năng “thụ thể trong tế bào chất” (receptor) với 928 amino axit, thực hiện tiến trình

hiệu bên trái bản đồ là khoảng cách di truyền tính bằng cM. (b) Bản đồ vật lý gen *Pi-1(t)* thông qua kỹ thuật E-landing những chỉ thị phân tử liên kết chặt theo trình tự tham chiếu của giống lúa Nipponbare (IRGSP 1.0) của International Rice Genome Sequencing Project (<http://rapdb.dna.afrc.go.jp>). Đường chấm chấm biểu thị vị trí markers trên hệ gen Nipponbare. Số bên phải bản đồ là khoảng cách được tính bằng Mb. Vị trí vật lý của gen *Pita3(t)* (9,88 - 10,06), *Pita* (10,60), *Pi67(t)* (10,61 - 12,09), *Pi* - 42(t) (8,07 - 12,24) và *Ptr* (10,71 - 10,98) tính theo triệu cặp base (Mb) bởi Chen và cs (2014) [14], Jia và Martin (2008) [15], Joshi và cs (2019) [16], Kumar và cs (2010) [17], Meng và cs (2020) [18]. (c) Gen kháng ứng cử viên với đặc điểm NBS-LRR được phân lập trên vùng có gen *Pi-1(t)* tham khảo trên TIGR Rice Genome Annotation Project. CEN: viết tắt chữ centromere (tâm động).

### 2.3. Tè Tép cung cấp nhiều nguồn gen mang chức năng NLR- LRR (nucleotide-binding site and leucine-rich repeat)

Nghiên cứu của Wang và cs (2019a) [20] đã dòng hóa và xét nghiệm được 219 gen NLR như những transgenes trong 2 giống lúa nhiễm đạo ôn, với 5 - 12 chủng nổi nấm đạo ôn rất đa dạng. Trong nhiều trường hợp, có ít hơn 12 chủng nổi (strains)



**NÔNG NGHIỆP VÀ MÔI TRƯỜNG - THÁNG 7/2025**



**Blast strains**

A: B2007  
 B: BE11  
 C: TPxLL  
 D: B30  
 E: B2004  
 F: B2815  
 G: S1  
 H: B7  
 I: B13  
 J: S1686  
 K: B15  
 L: LaKlan

**Code**

A: *PhaA*  
 B: *PhaB*  
 C: *PhaC*  
 D: *PhaD*  
 E: *PhaE*  
 F: *PhaF*  
 G: *PhaG*  
 H: *PhaH*  
 I: *PhaI*  
 J: *PhaJ*  
 K: *PhaK*  
 L: *PhaL*

-1.0  
 -0.5  
 0.0  
 0.5  
 1.0

21.0  
 22.0  
 23.0  
 24.0  
 25.0  
 26.0  
 27.0  
 28.0  
 29.0  
 30.0

Kết quả điều tra toàn hệ gen ngẫu nhiên, có 219 gen NLRs (đánh số từ 001 - 219) của hệ gen giống lúa Tẻ Tép được dòng hóa và được xét nghiệm kiểu hình kháng bệnh đối với 12 chủng nấm nấm đa dạng cao (từ chủng nấm S2007 đến LaiXian). Hai giống lúa japonica nhiễm bệnh, TP309 và Shin2, được dùng làm vật liệu để chuyển nạp gen. Mỗi gen NLR được xét nghiệm biểu thị màu sắc theo trạng thái kháng bệnh, i.e., kháng (R) hoặc nhiễm (S), đối với từng chủng nấm. Gen NLRs có khả năng di truyền tại ít nhất 1 trong 5 giống dẫn xuất từ Tẻ Tép được đánh dấu bằng tam giác xanh blue. Cặp gen NLRs được đánh dấu bằng vòng tròn xanh blue (helper) hoặc dấu thập (sensor) [20].

Sharma và cs (2012) [22] sử dụng Tế Tép như nguồn vật liệu cho gen kháng bệnh đạo ôn để lập bản đồ gen *Pi-k<sup>h</sup>* thông qua kỹ thuật RAPD và AFLP kết hợp với BSA (bulk segregant analysis). Quần thể con lai phân ly F<sub>2</sub> bao gồm 205 cá thể, dẫn xuất từ cặp lai Tetep x HP2216 (HP2216 là giống chuẩn nhiễm). Chúng isolate PLP-1 của nấm đạo ôn *Magnaporthe grisea* vào cây mạ tuổi 3. Kết quả cho thấy, gen *Pi-k<sup>h</sup>* là gen đơn, trội. Kết quả phân tích RAPD với 240 mỗi phát hiện được đa hình giữa kháng và nhiễm của bố mẹ. Trong đó, có 48 mỗi cho băng đa hình. Kết quả BSA cho thấy, có 5 mỗi/48 mỗi, biểu hiện đa hình giữa băng kháng và nhiễm. Băng hình phân tử ADN 700 bp biểu thị từ cây kháng bệnh với mỗi ký hiệu “5-129”. Kết hợp với 64 cặp mỗi AFLP theo điều tra đa hình giữa giống lúa HP 2216 và Tế Tép. Kết quả có 11 kết hợp AFLP primer giúp phân biệt được “bulks” kháng với “bulks” nhiễm. Băng hình AFLP ở vị trí 75 bp thu được kết quả kết hợp với primer, E-TAIM-CTC đồng phân ly với gen kháng bệnh. Mỗi RAPD 5-129<sub>700</sub> và mỗi AFLP<sub>75</sub> định vị trên bản đồ di truyền, giá trị liên kết 2,1 cM và 15,1 Em, kề cận với gen đích *Pi-k<sup>h</sup>*, theo thứ tự. Băng hình RAPD cho thấy, liên kết chặt chẽ với gen *Pi-k<sup>h</sup>*. sản phẩm PCR này được giải trình tự ADN và dùng để phát triển chỉ thị CAPs đồng phân ly với kiểu hình kháng bệnh trong quần thể con lai. Phân tích trình tự và tìm kiếm gen đồng dạng cho kết quả: Chỉ thị phân tử CAPs đồng phân ly với gen đích. Gen định vị trên vai dài của nhiễm sắc thể 11 [22].

Joshi và cs (2019) [16] đã khai thác nguồn gen *Pi-67* từ giống lúa Tẻ Tép có phổ kháng bệnh đạo ôn rộng và kháng bền vững. Quần thể con lai được sử dụng là quần thể đơn bội kép TDH251 dẫn xuất tính kháng bệnh đạo ôn của Tẻ Tép. Gen đích được “*fine-mapped*” ở quãng giữa đoạn phân tử mục tiêu, với kích thước 0,4 cm; định vị giữa hai chỉ thị phân tử YL87/155 và RRS8; nằm gần tâm động trên nhiễm sắc thể 12. So sánh với hệ gen tham chiếu Nipponbare, vùng có độ lớn phân tử 2,03 Mb trải dài từ vị trí 10,60 - 12,63 Mb, gần tâm động của nhiễm sắc thể 12 được phân định là vùng mang cụm gen kháng đạo ôn. Có tất cả 106 gen được dự đoán được phân lập lại trong vùng *Pi-67* thông qua điều tra với

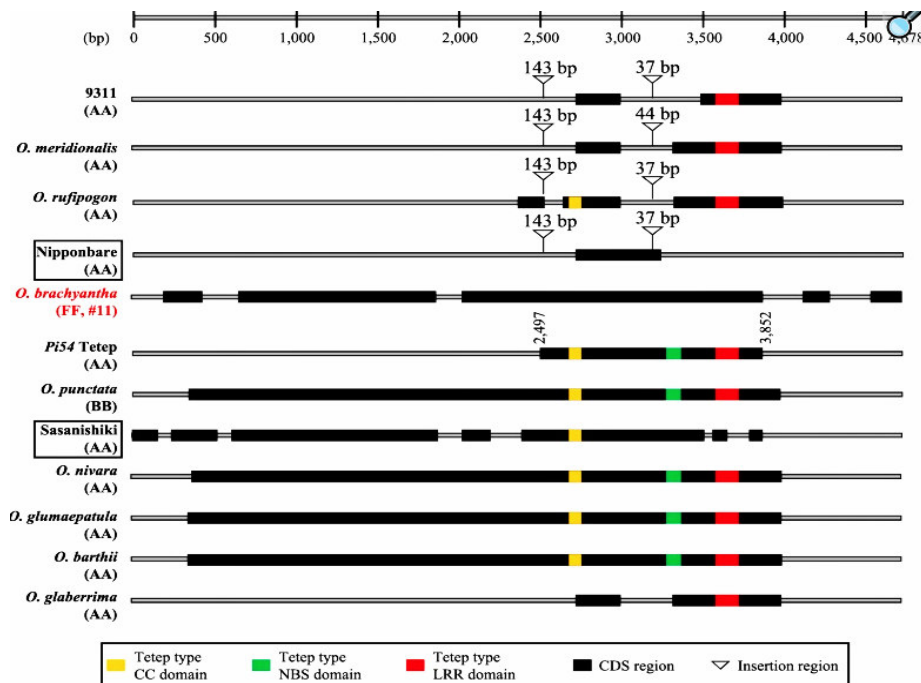
hệ gen tham chiếu Nipponbare. Hơn tất cả, gen *Os12g0281600* mã hóa protein “nucleotide-binding site and leucine-rich repeat” (NBS-LRR) là ứng cử viên tiềm năng nhất được xác định từ dòng đơn bội kép TDH251. Kết quả phân tích “pathotype” và chạy trình tự alen, gen *Pi67(t)* có thể phân biệt với hai gen khác *Pi19* và *Pi42(t)*; chúng định vị tại vùng *syntenic* (đồng dạng di truyền) trên nhiễm sắc thể 12. Định vị vật lý gen *Pi67* và xác định gen *Os12g0281600* (NBS-LRR) là một ứng viên gen kháng bệnh tiềm năng nhất để dòng hóa và định tính chức năng gen [16].

## 2.6. Tế Tép cung cấp nguồn gen Pi54

Zhang và cs (2018) [1] đã khai thác nguồn gen kháng đạo ôn *Pi54* và dòng hóa gen này từ giống lúa Tế Tép. Gen đích có khả năng kháng bệnh phổ rộng với nấm *Magnaporthe oryzae*. Các biến thể của gen *Pi54* đều được xác định không chỉ ở quần thể lúa thuần hóa mà còn xem xét quần thể lúa hoang dại, nhưng hầu hết lúa thuộc loại hình japonica và một vài thuộc loại hình indica đều mất đi chức năng.

Nghiên cứu của Zhang và cs (2018) [1] cho thấy, *Pi54* (*Os11g0639100*) và đồng dạng của nó *Os11g0640600* (đặt tên là: #11 gene) định vị rất gần nhau trên vùng có độ lớn phân tử 25 kb trong hệ

gen giống lúa japonica cv. *Sasanishiki*. Tiến hành so sánh với hệ gen tham chiếu Nipponbare ở vùng có độ lớn phân tử 99 kb. Giống *Sasanishiki* đã mất đi ít nhất 6 gen; một chùm gen kháng R khác nữa (*Os11g0639600*, *Os11g0640000*, *Os11g0640300*). Tám loài lúa hoang thuộc genome AA bao gồm năm loài được phân loại là tổ tiên của Nipponbare, hoặc *Sasanishiki* cũng được xem xét. Loài lúa hoang thuộc genome BB như *O. punctata* cũng được xem như tổ tiên của *Sasanishiki*. Lúa hoang thuộc genome FF, ví dụ *O. brachyantha* (tổ tiên gốc của nhiều loài thuộc chi *Oryza*) cũng không có gen đích khi phân tích, vì *Pi54* có thể đã mất đi trong quá trình thuần hóa. Kết quả nghiên cứu đã định hướng tìm kiếm vào những cluster di truyền (chùm gen R) đã bị đảo ngược, đem so sánh với hệ gen tham chiếu Nipponbare và các loài thuộc nhóm thuần hóa tương tự. Kết quả cho thấy, về di truyền huyết thống có khoảng 11 gen đích của lúa hoang *O. brachyantha* là căn nguyên của cả hai gen *Pi54* và #11 alleles. Gen *Pi54* của Nipponbare đặc biệt bị xáo trộn bởi 143 chèn đoạn (insertion) với kích thước 37/44 bp so với hệ gen Tế Tép và *Sasanishiki*. Gen *Pi54* của lúa japonica cv. *Sasanishiki* đã mất các domains của protein NBS-LRR (Hình 3).



Hình 3. Trình tự ADN của những *Pi54* alleles. Trình tự của Nipponbare, *O. rufipogon*, *O. meridionalis*, *O. sativa* ssp. *indica* (9311 và Tế Tép), *O. glaberrima* bao gồm sequences và 800 bp upstream sequences, trong khi đó, 5 sequences khác là gen đích (bắt đầu ATG).

CC: viết tắt của coiled coil [1]



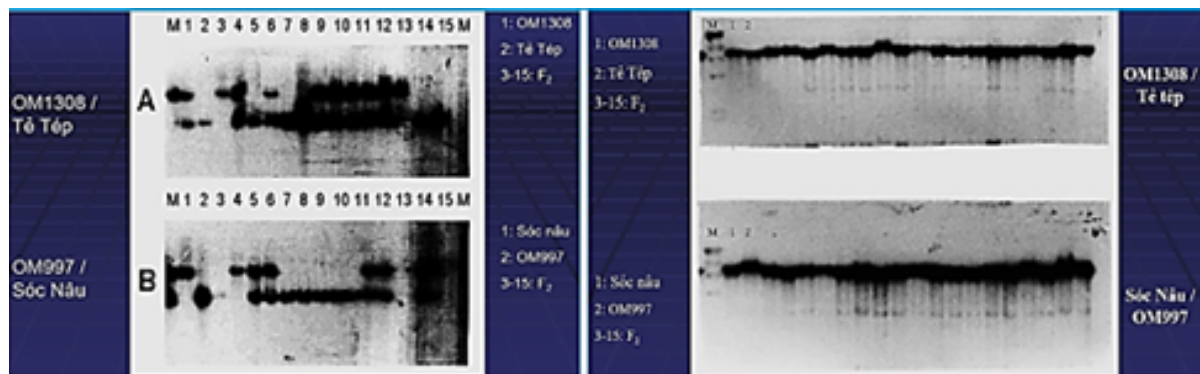
Kết quả nghiên cứu của Zhang và cs (2018) [1] cho thấy, gen *Pi54* có thể dẫn xuất từ một lặp đoạn song song (tandem duplication) từ gen đích có tên “#11 gene” trong những loài tổ tiên lúa hoang thuộc genome FF. Hai cấu trúc khác nhau của *Pi54* locus có được ngày nay, nhờ một đơn vị di động nằm gần với cụm gen kháng R, được phát triển thông qua nhiều năm thuần hóa. Giống lúa Việt Nam Tẻ Tép có được nguồn gen quý này là điều đáng tự hào, không bị mất đi trong quá trình thuần hóa từ lúa hoang sang lúa trồng.

## 2.7. Tẻ Tép, sóc nâu cung cấp nguồn gen kháng đạo ôn cùng với quần thể lúa hoang *O. punctata-1*, *O. latifolia-1*, *O. nivara-1*

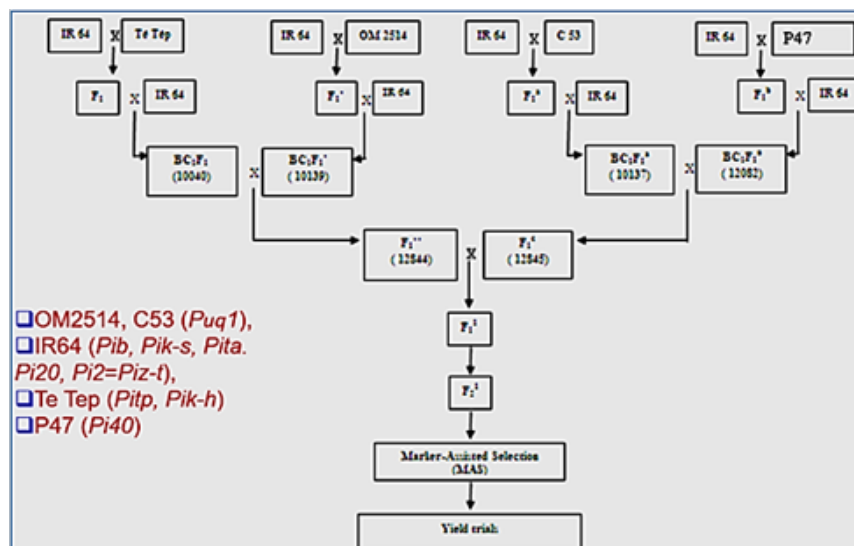
Nghiên cứu của Nguyễn Thị Lang và cs (2014 a và b) [23, 24], Fukuta và cs (2017) [25] đã xác định được các mẫu lúa hoang *Oryza punctata-1*, *O. latifolia-1*, *O.*

*nivara-1* phân bố trong cùng nhóm di truyền với Tẻ Tép, nguồn cho gen kháng bệnh đạo ôn.

Những chỉ thị phân tử có tính đa hình, được áp dụng để tìm gen kháng bệnh đạo ôn là RG64, LPO111-112; RM162 (NST 6); RM483 (NST 8); RM21 (NST 11). Gen *Pi-2* liên kết với chỉ thị RFLP (RG64), khoảng cách di truyền là 3,8 cM trong Sóc Nâu và 1,0 cM trong Tẻ Tép (Hình 4). Dòng hóa gen kháng thành công là tiền đề khẳng định cơ sở phân tử và hoá sinh của gen kháng theo hướng bền vững. Nghiên cứu thực hiện đối với gen *Pi-2* trên đoạn phân tử 90 kb với 7 BAC clone chồng lấp. Các mẫu lúa hoang *Oryza rufipogon* ở đồng bằng sông Cửu Long có tiềm năng cung cấp nguồn vật liệu bố mẹ cho gen kháng đạo ôn phổ rộng và bền vững.



Hình 4. Phân tích Southern Blot để kiểm chứng loci của marker RG64 được phân cắt bởi XbaI (trái) và Bgl/II (phải) [23, 24]



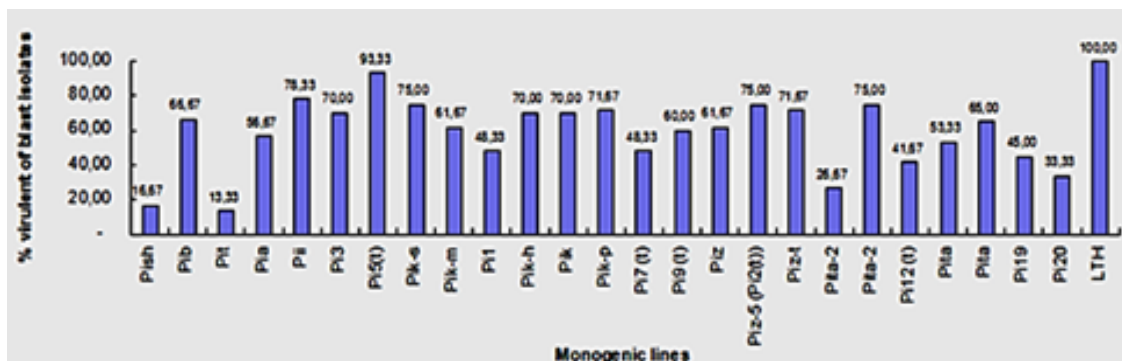
Hình 5. Quy tụ gen kháng R với 4 tổ hợp lai được thực hiện tại Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long [23, 24]

Phân tích cho thấy, *Oryza minuta* biểu thị tính kháng tất cả các nòi phân lập của nấm gây bệnh đạo ôn (trừ ID10), trùng khớp với kết quả của IRRI

hiện nay. Các mẫu lúa hoang *O. officinalis*, *O. nivara* của Việt Nam trong thí nghiệm này, đều có phản ứng kháng với tất cả các mẫu phân

lập (isolates) có độc tính cao ở đồng bằng sông Cửu Long. Trong khi các giống chuẩn kháng có gen *Pit* và *Pi20* có phản ứng nhiễm với một vài mẫu phân lập. Trong các mẫu lúa hoang thuộc *Oryza rufipogon*, có 39% mẫu biểu hiện cùng một lúc 2 gen kháng *Pit* và *Pi20*, biểu thị phản ứng cấp 0 là 40%; biểu thị phản ứng cấp 1 là 6%; cấp 3: 11%; cấp 5: 2%; cấp 7: 2%. Như vậy, nguồn gen kháng đạo ôn trong *O. rufipogon* có tiềm năng rất lớn. Đặc biệt, gen *Pi-2t* liên kết với chỉ thị RG64, khoảng cách di truyền là 3,8 cM trong Sóc Nâu và 1,0 cM trong Tẻ Tép. Các chỉ thị phân tử SSR được xác định là: RM162 liên kết với *Pi-2* trên nhiễm sắc thể 6; RM483 liên kết với *Pi-36* trên nhiễm sắc thể 8; RM21 liên kết với gen *Pi-44* trên nhiễm sắc thể 11 [23 - 25].

Kết quả nghiên cứu cho thấy: (1) Tính đa hình ADN của 181 isolates nấm gây bệnh đạo ôn ở đồng bằng sông Cửu Long được ghi nhận, cho ra 181 kiểu gen tương ứng với 181 haplotype của nấm; (2) Gen *Pi-1*, *Pi-5(t)*, *Pi-3*, *Pi-4(t)* kháng tốt với các nòi nấm ở miền Bắc, phản ứng không rõ ở miền Nam; (3) Ở đồng bằng sông Cửu Long, 24 gen thử nghiệm với 158 isolates của 3 nhóm nấm gây bệnh hại chính; không có gen nào biểu thị hiệu lực hoàn toàn. Chỉ có *Pi-z*, *Pik-m* có tỷ lệ isolates nấm gây bệnh đạo ôn tấn công thấp nhất. Tẻ Tép còn biểu hiện gen kháng *Pitp* trên nhiễm sắc thể 1 và *Pi-k<sup>h</sup>* trên nhiễm sắc thể 11, thông qua xét nghiệm chỉ thị phân tử SSR [23 - 25].



**Hình 6. Tỷ lệ gây bệnh của 60 isolates đối với từng dòng mang gen kháng đơn [23, 24]**

### 3. KẾT LUẬN

Giống lúa bản địa Việt Nam là Tẻ Tép đã trở thành nguồn vật liệu cung cấp gen kháng bệnh đạo ôn phổ rộng và bền vững.

Giống lúa Tẻ Tép thuộc loại hình indica, hệ gen (genome) của Tẻ Tép mang nhiều gen kháng và chùm gen kháng (cluster). Chúng định vị trên các nhiễm sắc thể sau đây: *Pi-tp* trên nhiễm sắc thể 1; *Pi-2t* trên nhiễm sắc thể 2; *Pi-k<sup>h</sup>* trên nhiễm sắc thể 11; *Pi-54* trên nhiễm sắc thể 11; *Pi-k<sup>h</sup>* trên nhiễm sắc thể 11; *Pi-67* trên nhiễm sắc thể 12; *Pita*, *Pita2* trên nhiễm sắc thể 12; chùm gen mã hóa protein NLR-LRR (nucleotide-binding site and leucine-rich repeat).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zhang L, Nakagomi Y, Endo T, Teranishi M, Hidema J, Sato S, Higashitani A. (2018). Divergent evolution of rice blast resistance pi54 locus in the genus *Oryza*. *Rice* (NY) 11(1): 63.
2. Zhao H, Wang X, Jia Y, Minkenberg B, Wheatley M, Fan J, Jia MH, Famoso A, Edwards D, Wamishie Y, Valent B, Wang GL, Yang Y. (2018).

The rice blast resistance gene *Ptr* encodes an atypical protein required for broad-spectrum disease resistance. Nat. Commun. 9: 2039.

3. Kiyosawa S. (1966). Studies on inheritance of resistance of rice varieties to blast 3 inheritance of resistance of a rice variety *Pi No. 1* to the blast fungus. *Jpn. J. Breed*, 16: 243 - 250.
4. Wang L, Zhao L, Zhanga X, Zhang Q, Jia Y, Wang G, Li S, Tian D, Li WH and Yang S. (2019). Large-scale identification and functional analysis of NLR genes in blast resistance in the Tetep rice genome sequence. *PNAS*, 116(37): 18479 - 18487.
5. Kalia S, Rathour R. (2019). Current status on mapping of genes for resistance to leaf - and neck-blast disease in rice. *3 biotech (springer nature)*, 9: 209, DOI: 10.1007/s13205-019-1738-0
6. Kiyosawa S. (1986). Estimation of stabilizing selection of virulence genes in the rice blast fungus population in prefectures of Japan. *Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour*, 2: 61 - 91.
7. Yu Z. H, Mackill D. J, Bonman J. M, Tanksley S. D. (1991). Tagging genes for blast resistance in

- rice via linkage to RFLP markers. *Theor Appl Genet*, 81: 471 - 476.
8. Wu Y *et al.* (2019). Comprehensive evaluation of resistance effects of pyramiding lines with different broad-spectrum resistance genes against *Magnaporthe oryzae* in rice (*Oryza sativa* L.). *Rice* (N. Y.) 12, 11.
  9. Mackill D. J and Bonman J. B. (1992). Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. *Phytopathology*, 82: 746 - 749.
  10. Inukai T, Zeigler R. S, Sarkarung S, Bronson M, Dung L. V, Kinoshita T, Nelson R. J. (1996). Development of pre-isogenic lines for rice blast-resistance by marker-aided selection from a recombinant inbred population. *Theor Appl Genet*, 93(4): 560 - 567.
  11. Bryan G. T, K. S Wu, L Farrall, Y. L Jia, H. P Hershey, S. A McAdams, K. N Faulk, G. K Donaldson, R Tarchini, B Valent. (2000). tA single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell*, 12: 2033 - 2046
  12. Yoshida K and Miyashita N. (2009). DNA polymorphism in the blast disease resistance gene *Pita* of the wild rice *Oryza rufipogon* and its related species. *Genes & Genetic Systems*, 84(2), 121 - 236.
  13. Biswas B, Thakur K, Pote TD, Sharma KD, Gopala Krishnan S, Singh AK, Sharma TR, Rathour R. (2023). Genetic and molecular analysis of leaf blast resistance in Tetep derived line RIL4 and its relationship to genes at *Pita/Pita2* locus. *Nature Scientific Reports*, 13, 18683, DOI:10.1038/s41598-023-46070-7
  14. Chen X. L, Shi T, Yang Y, Shi W, Gao X, Chen D, Xu X. W, Xu J. R, Talbot N. J, Peng Y. L. (2014). N-Glycosylation of Effector Proteins by an  $\alpha$ -1,3-Mannosyltransferase Is Required for the Rice Blast Fungus to Evade Host Innate Immunity. *The Plant Cell*, (26)3: 1360 - 1376.
  15. Jia Y, Martin R. (2008). identification of a new locus, *ptr(t)*, required for rice blast resistance gene *pi-ta*-mediated resistance. abs on-line publication 21(4), <https://doi.org/10.1094/mpmi-21-4-0396>.
  16. Joshi S, Dhatwalia S, Kaachra A, Sharma K. D, Rathour R. (2019). Genetic and physical mapping of a new rice blast resistance specificity *Pi-67* from a broad spectrum resistant genotype Tetep. *Euphytica*, 215(1), 9.
  17. Kumar P, Pathania S, Katoch P, Sharma TR, Plaha P, Rathour R. (2010). Genetic and physical mapping of blast resistance gene *Pi-42(t)* on the short arm of rice chromosome 12. *Mol. Breed.* 25: 217 - 228.
  18. Meng X, Xiao G, Telebanco-Yanoria MJ, Siazon PM, Padilla J, Opulencia R, Bigirimana J, Habarugira G, Wu J, Li M, Wang B, Lu GD, Zhou B. (2020). The broad-spectrum rice blast resistance (R) gene *Pita2* encodes a novel R protein unique from *Pita*. *Rice* 13, 19. <https://doi.org/10.1186/s12284-020-00377-5>.
  19. Hiroshi Tsunematsu H, Mary Jeanie T. Yanoria, Ebron L. A, Hayashi N, Ando I, Kato H, Imbe T, Khush G. S. (2000) Development of monogenic lines of rice for blast resistance. *Breed. Sci*, 50, 229 - 234.
  20. Wang Z. X, Yano M, Yamanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Katayose Y, Sasaki T. (1999a). The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J*, 19, 55 - 64.
  21. Wang L, Zhao L, Zhang X. H, Zhang Q, Jia Y, Wang G, Li S, Tian D, Li W. H, Yang S. (2019b). Large-scale identification and functional analysis of *NLR* genes in blast resistance in the Tetep rice genome sequence. *PNAS*, 116(37): 18479 - 18487.
  22. Sharma T. R, Shanker P, Singh B. K, Jana T. K, Madhav M. S, Gaikwad K, Singh N. K, Plaha P & Rathour R. (2012). Molecular mapping of rice blast resistance gene *Pi-kh* in the rice variety Tetep. *Theor And Appl. Genetics*, 14: 127 - 133.
  23. Nguyễn Thị Lang, Phạm Thị Thu Hà, Fukuta Y, Bùi Chí Bửu (2014). Du nhập gen kháng đạo ôn từ loài lúa hoang sang lúa trồng (*Oryza sativa* L.). *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, 234 - 235: 18 - 24.
  24. Nguyễn Thị Lang, Fukuda Y, Bùi Chí Bửu (2014). Du nhập gen kháng bệnh đạo ôn từ loài lúa hoang sang lúa trồng (*Oryza sativa* L.) và từ lúa bản địa Tẻ Tép, Sóc Nâu. Proc. of the 13<sup>th</sup> National Conference of Phytopathological Society of Vietnam, May 6-7, 2014, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh. 161 - 169.

25. Fukuta Y, Kyoko Kobayashi, Nguyen Thi Lang, Pham Thi Thu Ha, Trinh Thi Luy, Pham Van Du, Nagao Hayashi, Mitsuhiro Obara, Tran Bao Toan, Bui Chi Buu. (2017). Pathogenicity of Rice Blast (*Pyricularia oryzae* Cavara) Isolates from Mekong River Delta, Vietnam. Plant Disease, *The American Phytopathological Society*.

## RESISTANCE DONOR OF RICE BLAST FROM TE TEP CULTIVAR, VIETNAM

Bui Chi Buu<sup>1</sup>, Nguyen Thi Lang<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam*

<sup>2</sup> *High Agricultural Technology Research Institute for Mekong Delta (HATRI)*

### Abstract

Rice breeding for blast resistance is the optimal strategy to effectively manage the disease in rice production worldwide. The Vietnamese landrace “Te Tep” has become a source of breeding material providing target genes for broad-spectrum and sustainable blast resistance. Te Tep is an indica subspecies with a genome carrying many resistance genes and gene clusters to blast fungus. The included genes could be cited as followed: *Pi-tp* gene on chromosome 1; *Pi-54* and *Pi-kh* on chromosome 11; *Pi-2t* on chromosome 2; *Pita*, *Pita2*, *Pi-67* on chromosome 12, near the centromere; and especially the gene cluster encoding the protein NLR-LRR (nucleotide-binding site leucine-rich repeat). All of these have formed a rice genome dealing with many rare genetic material (donors) for rice breeding program of high-yielding varieties with broad-spectrum and sustainable blast resistance.

**Keywords:** *Broad-spectrum resistance, gene sequence, genome, isolates, leaf blast, LRR, neck blast, NLR, reference genome, strain, sustainable resistance*

**Ngày nhận bài:** 10/5/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 14/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 9/6/2025

**Ngày duyệt đăng:** 23/6/2025

# NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA NẤM *Phytophthora* spp. GÂY BỆNH THỐI LÁ, THỐI THÂN HẠI CÂY SEN (*Nelumbo nucifera*)

Lê Minh Tường<sup>1,\*</sup>, Nguyễn Đức Nhuận<sup>2</sup>, Đinh Hoàng Kha<sup>1</sup>,

Lê Thị Ngọc Xuân<sup>1</sup>, Ngô Thành Trí<sup>1</sup>, Đào Thị Hồng Xuyên<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Học viên cao học ngành Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Cần Thơ

\*Email: lmtuong@ctu.edu.vn

## TÓM TẮT

Bệnh thối lá, thối thân hại cây sen (*Nelumbo nucifera*) do nấm *Phytophthora* spp. gây ra là một trong những bệnh hại quan trọng ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng các sản phẩm từ sen. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm xác định chính xác đến loài các mẫu nấm gây bệnh thối lá, thối thân hại cây sen tại tỉnh Đồng Tháp. Trong nghiên cứu này, các mẫu nấm được xác định dựa vào đặc điểm hình thái, đặc tính sinh học và triệu chứng bệnh. Kết quả cho thấy, cả 30 mẫu nấm đều thuộc chi *Phytophthora* và các mẫu nấm đều có khả năng gây bệnh trên cây sen với triệu chứng điển hình của bệnh thối lá, thối thân. Trình tự đoạn gen vùng ITS-rADN của các mẫu nấm đã được xác định và sử dụng để xây dựng giản đồ phả hệ thể hiện mối tương quan di truyền giữa các mẫu nấm thí nghiệm. Kết quả cho thấy, 30 mẫu nấm thí nghiệm được chia thành 3 nhóm: Nhóm 1 gồm 12 mẫu nấm thuộc loài *Phytophthora cinnamomi*, nhóm 2 gồm 8 mẫu nấm thuộc loài *Phytophthora cactorum*, nhóm 3 gồm 10 mẫu nấm thuộc loài *Phytophthora palmivora*. Kết quả của nghiên cứu này là cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo, góp phần tìm ra biện pháp phòng trị bệnh thối lá, thối thân hại cây sen một cách có hiệu quả.

**Từ khóa:** Bệnh thối lá thối thân hại sen, đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh học, *Phytophthora* spp., vùng ITS-rADN.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây sen mang lại giá trị kinh tế cao cho bà con nông dân, vì tất cả các bộ phận của cây sen như: Lá, bông, hạt củ... đều mang giá trị dinh dưỡng và có thể sử dụng vào các mục đích khác nhau [1]. Trước những lợi ích và ý nghĩa mà cây sen mang lại, nhu cầu về sen trên thị trường ngày càng cao, do đó diện tích trồng sen đang ngày càng được mở rộng. Bên cạnh việc gia tăng diện tích thì nông dân trồng sen cũng gặp phải vấn đề hết sức nghiêm trọng, đó là dịch hại, trong đó phải kể đến bệnh thối lá, thối thân do nấm *Phytophthora* spp. gây ra [2]. Bệnh gây hại chủ yếu ở bộ phận lá mác (ngó) và thân của cây sen, các bộ phận bị nhiễm *Phytophthora* spp. có thể xuất hiện các mô bệnh màu đen, có thể lan rộng và dẫn đến thối rữa, lá có thể bị héo và rụng sớm [3]. Bệnh gây hại có thể làm giảm khả năng nâng đỡ các bộ phận khác của cây như lá và hoa, ảnh hưởng đến sự phát triển và chất lượng của cây sen, ngoài ra bệnh còn làm cây sen phát triển kém và năng suất giảm [3].

Hiện nay, có rất ít nghiên cứu tác nhân gây ra bệnh thối lá, thối thân hại sen ở tỉnh Đồng Tháp nói riêng và đồng bằng sông Cửu Long nói chung. Vì vậy, việc xác định chính xác đến loài tác nhân gây bệnh là rất cần thiết, góp phần tìm ra được biện pháp phòng trị bệnh trên cây sen một cách hiệu quả.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

### 2.1. Thu mẫu bệnh thối lá, thối thân hại cây sen

Thu thập mẫu bệnh có triệu chứng điển hình của bệnh thối lá mác, thối thân trên cây sen tại các huyện thuộc tỉnh Đồng Tháp. Mẫu bệnh khi thu được gói trong giấy báo và mang về Phòng thí nghiệm Bệnh cây, thuộc Khoa Bảo vệ Thực vật, Trường Đại học Cần Thơ để tiến hành giám định bệnh.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

**2.2.1. Phân lập, tách rong và định danh mầm bệnh trên bộ phận bị bệnh**

- Phân lập các mẫu nấm trên môi trường WA (20 g agar, 1.000 ml nước), tách dòng, làm thuần trên môi

trường V8 (200 ml V8, 3 g CaCO<sub>3</sub>, 20 g agar, 1.000 ml nước, pH = 6,8) bằng phương pháp cấy đỉnh sinh trưởng của Burgess và cs (2009) [4]. Lưu trữ nguồn nấm đã phân lập ở nhiệt độ 4 - 8°C để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

- Khảo sát tốc độ phát triển của tản nấm, các đặc điểm hình thái của tản nấm và bào tử của các mẫu nấm *Phytophthora* spp.: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố, với 4 lặp lại, mỗi lặp lại là một đĩa petri. Mỗi mẫu nấm được nuôi trên môi trường V8 sau 6 ngày cho sợi nấm phát triển; khuẩn ty được đục khoanh tròn ở gần mép rìa tản nấm có đường kính 5 mm và cấy vào tâm đĩa petri chứa 10 ml môi trường V8, đặt các đĩa nấm vào trong tủ chiếu sáng - tối xen kẽ 12 giờ ở nhiệt độ 25°C. Chỉ tiêu theo dõi gồm: Đo và ghi nhận đường kính của tản nấm ở các thời điểm 6 ngày sau khi cấy; ghi nhận các đặc điểm tản nấm của mỗi mẫu nấm (hình dạng, kích thước và màu sắc của túi bào tử, sự tăng sinh túi bào tử (proliferation), bào tử hậu (chlamydospore) và sự phóng thích bào tử của nấm).

- Quan sát lại triệu chứng gây bệnh của các mẫu nấm phân lập: Dùng mẫu cấy đã thuần để lây bệnh nhân tạo lên lá cây sen khỏe mạnh.

+ Cách bố trí: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức là 1 mẫu nấm phân lập.

+ Chuẩn bị nấm: Các mẫu nấm *Phytophthora* spp. được nuôi trong môi trường V8, đặt trong điều kiện nhiệt độ 25°C, dưới ánh đèn neon 12 giờ tối - 12 giờ sáng, trong 6 ngày. Dùng nước cất thanh trùng để thu huyền phù bào tử nấm, xác định mật độ túi bào tử bằng lamên buồng đếm và pha loãng để chuyển huyền phù về nồng độ 10<sup>6</sup> túi bào tử/ml.

+ Chuẩn bị các lá sen (lá hình mũi giáo) còn non, màu xanh sáng và không có biểu hiện bệnh hay côn trùng gây hại. Các lá sen được chọn có kích thước tương đối đều nhau. Sau khi đã chuẩn bị lá sen, tiến hành khử trùng toàn bộ lá sen bằng cồn 70°. Sau đó, lau lại bằng bông gòn thấm sạch đã thanh trùng có tẩm nước cất đã thanh trùng, để yên khoảng 20 - 30 phút thì tiến hành chủng bệnh. Trước khi chủng bệnh, tạo vết thương ở phần liên kết giữa thân và lá sen bằng bó kim (5 kim/bó).

+ Tiến hành lây bệnh nhân tạo: Dùng khoanh giấy thấm đã thanh trùng có đường kính 5 mm cho

vào huyền phù nấm *Phytophthora* spp. nồng độ 10<sup>6</sup> túi bào tử/ml. Sau đó, kéo khoanh giấy thấm lên ống falcon để ráo khoảng 10 - 15 phút rồi đặt vào vị trí đã tạo vết thương. Lá sen sau khi được lây bệnh, được đặt vào bình tam giác có chứa khoảng 200 ml nước cất thanh trùng sao cho phần cuống nằm trong nước để giữ cho chúng được tươi lâu và tạo độ ẩm cho bệnh phát triển, đặt bình tam giác vào túi ni lông và buộc lại. Sau khi tiến hành lây bệnh nhân tạo, các lá sen xử lý đem vào phòng ủ bệnh, Khoa Bảo vệ Thực vật, Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ. Để tạo điều kiện tối ưu cho giai đoạn xâm nhiễm của mầm bệnh, điều kiện nhiệt độ được duy trì ở 26°C, ẩm độ ≥ 96% (phòng ủ bệnh).

+ Chỉ tiêu theo dõi: Mô tả và ghi nhận sự phát triển của bệnh hàng ngày sau khi lây bệnh, so sánh với một số tài liệu có mô tả triệu chứng gây hại của nấm *Phytophthora* spp..

- Xác định loài nấm gây bệnh thối lá, thối thân hại cây sen bằng kỹ thuật sinh học phân tử: ADN tổng số của các mẫu nấm được chiết suất theo phương pháp của Saitoh và cs (2006) [5] và sử dụng cặp mồi vùng ITS-rADN với mồi xuôi là ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và mồi ngược là ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATA TGC-3') để khuếch đại đoạn gen vùng ITS [6]. Thành phần 1 phản ứng PCR bao gồm: ADN tổng số của nấm (30 ng); 2,5 µl buffer 1X (Tris 10 mM, KCl 50 mM, pH 9,0; 0,1% (v/v) Triton X-100); 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 30 ng cho mỗi dNTP; 0,2 µM mồi xuôi ITS1; 0,2 µM mồi ngược ITS4; 0,5 µl Taq ADN polymerase. Phản ứng PCR với chu kỳ nhiệt: 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ (95°C trong 1 phút, 53°C trong 30 giây và 72°C trong 90 giây), 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên agarose gel 1,5% và được tinh sạch bằng QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN). Sản phẩm PCR được giải trực tiếp cả hai chiều bằng mồi xuôi ITS1 và mồi ngược ITS4 trên hệ thống máy ABI 3130XL. Trình tự gen mẫu nấm thu được sau khi giải trình tự sẽ được so sánh với trình tự của mẫu nấm đã có sẵn trên ngân hàng gen và xác định loài của mẫu nấm khảo sát. Từ trình tự của các mẫu nấm, cây phả hệ được xây dựng dựa trên phần mềm Mega 12.0 [7], sử dụng phương pháp Neighbor-joining (NJ) để xác định mối tương quan giữa các mẫu nấm đã phân lập được.



### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Triệu chứng bệnh thối lá, thối thân hại cây sen ở điều kiện ngoài đồng

Bệnh xuất hiện chủ yếu trên thân và lá mấu (ngó) của cây sen, nhận dạng ban đầu là lá bị vàng úa sau đó khô đi rất nhanh. Trên thân xuất hiện các mô bệnh bị thối đen, nhầy nhớt có mùi hôi. Bệnh gây hại làm đình sinh trưởng và cả thân bị thối đen. Mô bệnh bị thối đen, nhầy nhớt có mùi thối ngay cả rễ vẫn phát triển tốt. Bệnh xuất hiện trên lá cây sen khi lá sen mọc khỏi mặt nước không cao, triệu chứng ban đầu là lá bị vàng úa cả lá, sau đó lá bắt đầu khô đi rất nhanh, có màu nâu đậm đến đen. Ngoài ra, bệnh cũng xuất hiện trên lá trưởng thành

với vết bệnh là các vết hoại tử không có hình dạng nhất định, có thể xuất hiện tại nhiều vị trí khác nhau trên lá, nhưng phổ biến ở phần sát cuống lá. Vết bệnh có thể lan toàn bộ làm cháy lá, có màu nâu đậm đến đen. Triệu chứng bệnh này tương tự với mô tả trong kết quả nghiên cứu Trần Nguyễn Tấn Tài (2024) [3] về triệu chứng bệnh thối lá, thối thân trên sen ở ngoài đồng do nấm *Phytophthora* spp. gây ra.

#### 3.2. Đặc tính hình thái của các mẫu nấm *Phytophthora* spp.

Nghiên cứu đã thu thập và phân lập được 30 mẫu nấm *Phytophthora* spp. tại các khu vực trồng sen thuộc tỉnh Đồng Tháp. Qua khảo sát đặc điểm hình thái, 30 mẫu nấm được chia thành 3 nhóm:



Hình 1. Đặc điểm hình thái của các mẫu nấm thuộc nhóm I trên môi trường V8

- Nhóm I: Trên môi trường V8, tản nấm phát triển nhanh, dày và đều trên bề mặt môi trường nuôi cấy, sợi nấm trong suốt, không vách ngăn. Túi bào tử có hình trứng và không có núm (non-papillate), hoặc có dạng bán núm do hơi dày ở đỉnh (semi - papillate), kích thước túi bào tử khoảng trung bình  $57 \times 33 \mu\text{m}$ . Bào tử hậu (chlamydospore) được hình thành từ các khối phồng của sợi nấm và có vách mỏng (Hình 1).

- Nhóm II: Các dòng nấm này phát triển khá chậm trên môi trường V8, các sợi nấm trong suốt, không vách ngăn. Túi bào tử có núm với nhiều hình dạng khác nhau, từ hình quả lê ngược đến hình trứng ngược hoặc hình elip; kích thước không đều nhau, trung bình khoảng từ  $16 - 50 \times 16 - 45 \mu\text{m}$ . Bào tử hậu (chlamydospore) thường mọc xen kẽ giữa sợi nấm hoặc mọc từ đầu sợi nấm (Hình 2).



Hình 2. Đặc điểm hình thái của các mẫu nấm thuộc nhóm II trên môi trường V8

- Nhóm III: Các mẫu nấm thuộc nhóm III phát triển tương đối chậm trên môi trường V8. Túi bào tử thường có núm và có dạng hình trứng hoặc hình quả

lê, có kích thước trung bình khoảng từ  $25 - 35 \times 22 - 30 \mu\text{m}$ . Bào tử hậu (chlamydospore) thường mọc từ đầu sợi nấm (Hình 3).

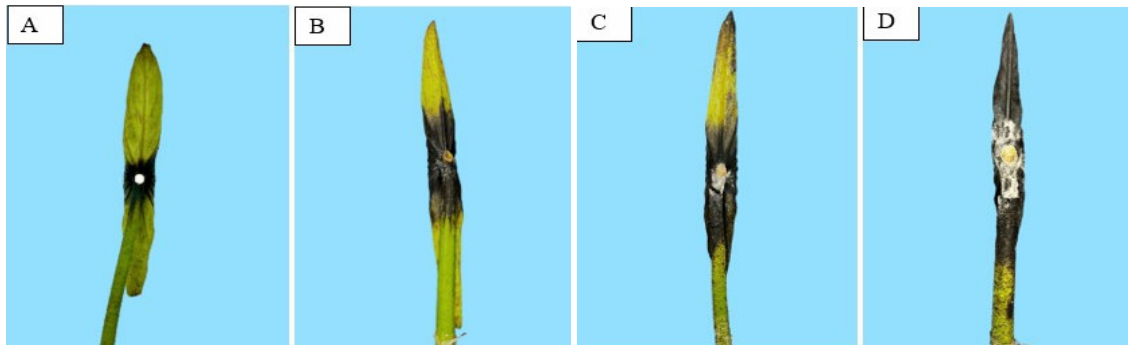


Hình 3. Đặc điểm hình thái của các mẫu nấm thuộc nhóm III trên môi trường V8

Tóm lại, tổng hợp đặc điểm hình thái của 30 mẫu nấm phân lập dùng trong thí nghiệm và so sánh với mô tả về đặc điểm của nấm thuộc chi *Phytophthora*

của Vũ Triệu Mân (2007) [8] cho thấy, cả 30 mẫu nấm đều thuộc chi *Phytophthora*.

### 3.3. Triệu chứng bệnh thối lá, thối thân cây sen khi lây bệnh nhân tạo



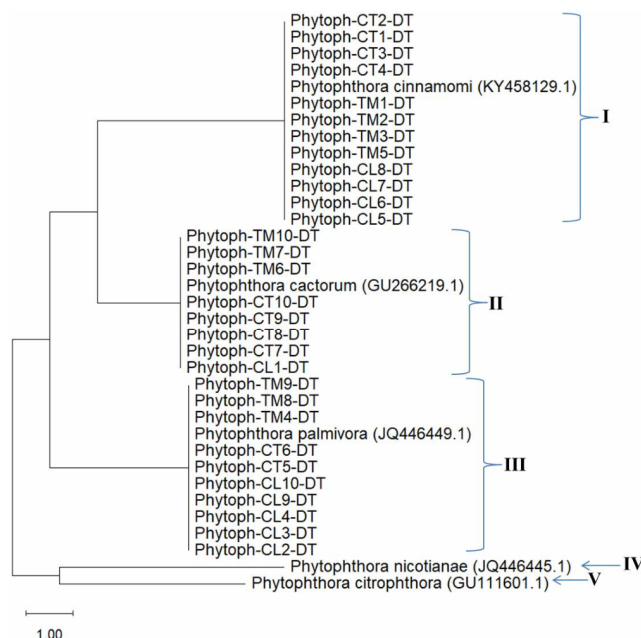
Hình 4. Triệu chứng bệnh thối lá, thối thân hại cây sen do nấm *Phytophthora* spp. gây ra qua các thời điểm khảo sát (A: Triệu chứng bệnh 3 NSLB; B: Triệu chứng bệnh ở 4 NSLB; C: Triệu chứng bệnh ở 5 NSLB; D: Triệu chứng bệnh ở 6 NSLB)

Hầu hết 30 mẫu nấm khảo sát đều có khả năng gây bệnh và biểu hiện triệu chứng điển hình của bệnh thối lá, thối thân hại cây sen. Vào thời điểm 3 ngày sau lây bệnh nhân tạo (NSLB), vết bệnh xuất hiện với vết chấm đen ở giữa và lan ra 2 phía (Hình 4A).

Vào thời điểm 4 NSLB, lá sen bị vàng úa và có dấu hiệu khô lại và vết bệnh bắt đầu xuất hiện tơ nấm (Hình 4B). Ở thời điểm 5 NSLB, bệnh làm cho thân

sen gần như khô lại hoàn toàn và mô bệnh bị thối đen, nhũn, có mùi thối và tơ nấm màu trắng xuất hiện xung quanh vị trí vết bệnh (Hình 4C). Ở thời điểm 6 NSLB, mô bệnh bị thối đen hoàn toàn và thân sen khô lại, tơ nấm màu trắng xuất hiện nhiều hơn và có mùi hôi thối (Hình 4D).

### 3.4. Định danh đến loài các mẫu nấm *Phytophthora* spp. gây bệnh thối lá, thối thân hại cây sen dựa vào trình tự gen vùng ITS-rADN



Hình 5. Cây phả hệ của 30 mẫu nấm nghiên cứu và các mẫu nấm tham khảo dựa vào trình tự gen vùng ITS

Tổng hợp các đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh học quan sát được, giải trình tự gen vùng ITS-rADN và phân tích cây phả hệ của 30 mẫu nấm gây bệnh

thối lá, thối thân hại cây sen dùng trong thí nghiệm đã xác định được: 12 mẫu nấm (*Phytoph*-CT1-DT; *Phytoph*-CT2-DT; *Phytoph*-CT3-DT; *Phytoph*-CT4-

DT; *Phytoph*-TM1-DT; *Phytoph*-TM2-DT; *Phytoph*-TM3-DT; *Phytoph*-TM5-DT; *Phytoph*-CL5-DT; *Phytoph*-CL6-DT; *Phytoph*-CL7-DT; *Phytoph*-CL8-DT) nằm chung nhóm với loài chuẩn *Phytophthora cinnamomi* (có mã số trên ngân hàng gen là KY458129.1), vì thế chúng là loài *Phytophthora cinnamomi*; 8 mẫu nấm (*Phytoph*-TM6-DT; *Phytoph*-TM7-DT; *Phytoph*-TM10-DT; *Phytoph*-CT7-DT; *Phytoph*-CT8-DT; *Phytoph*-CT9-DT; *Phytoph*-CT10-DT; *Phytoph*-CL1-DT)) là loài *Phytophthora cactorum* vì nằm chung nhóm với loài chuẩn *Phytophthora cactorum* (mã số: GU266219.1) trong cây phả hệ và 10 mẫu nấm (*Phytoph*-TM4-DT; *Phytoph*-TM8-DT; *Phytoph*-TM9-DT; *Phytoph*-CT5-DT; *Phytoph*-CT6-DT; *Phytoph*-CL2-DT; *Phytoph*-CL3-DT; *Phytoph*-CL4-DT; *Phytoph*-CL5-DT; *Phytoph*-CL6-DT; *Phytoph*-CL9-DT; *Phytoph*-CL10-DT) là loài *Phytophthora palmivora* vì nằm chung nhóm với loài chuẩn *Phytophthora palmivora* (mã số: JQ446449.1) trong cây phả hệ (Hình 5).

Theo Hyeon-Jin Jee và cs (1997) [9], *Phytophthora cactorum* là loài nấm phân bố rộng rãi và phạm vi kí chủ được báo cáo là hơn 200 loài, bao gồm ít nhất 154 chi thực vật, gồm cả cây thân thảo và cây thân gỗ. Bên cạnh đó, Cahill và cs (2008) [10] cho rằng, *P. cinnamomi* là một trong những tác nhân gây bệnh thực vật phân bố rộng rãi trên toàn thế giới và phạm vi kí chủ lên đến 5.000 loài. Theo Drenth và Guest (2004) [11], nấm *P. cinnamomi* là tác nhân gây bệnh cho nhiều loại cây trồng như: Cây ca cao, cây quế và cây dứa. *Phytophthora palmivora* có thể tấn công hơn 170 loài thực vật chủ khác nhau, bao gồm cả thực vật một lá mầm và hai lá mầm, từ cây rau màu đến cây thân gỗ và gây ra thiệt hại đáng kể cho sản xuất [12]. Ngoài việc tấn công nhiều loài thực vật chủ khác nhau, *P. palmivora* còn có khả năng tấn công nhiều loại mô thực vật như rễ, thân, hoa, lá và quả, vì vậy *P. palmivora* là mầm bệnh đặc biệt nghiêm trọng ở vùng nhiệt đới [13]. Trong nghiên cứu này, đã xác định được 3 loài *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora palmivora* và *Phytophthora cactorum* gây bệnh thối lá, thối thân trên sen. Nghiên cứu này là một trong những ghi nhận đầu tiên đến loài về tác nhân gây bệnh thối lá, thối thân hại cây sen do nấm *Phytophthora* spp. gây ra ở tỉnh Đồng Tháp nói riêng và vùng đồng bằng sông Cửu Long nói chung. Thông qua việc xác định tác nhân và hiểu biết ban đầu về sự phân bố của bệnh, có thể thấy rằng, đây là loại bệnh

tác động không nhỏ đến việc sản xuất cũng như chất lượng các sản phẩm từ cây sen. Việc xác định chính xác tác nhân gây bệnh là cơ sở cho việc phát triển chiến lược quản lý bệnh hại, góp phần giúp ngành trồng sen ở tỉnh Đồng Tháp phát triển bền vững.

#### 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Đã phân lập được 30 dòng nấm *Phytophthora* spp. gây bệnh thối lá, thối thân hại cây sen. Nấm *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum* và *Phytophthora palmivora* là 3 loài gây bệnh thối lá, thối thân hại cây sen ở tỉnh Đồng Tháp.

Cần tiếp tục tiến hành nghiên cứu về biện pháp phòng trị bệnh thối lá, thối thân hại cây sen

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện từ nguồn kinh phí nghiên cứu khoa học của đề tài cấp tỉnh Đồng Tháp: Nghiên cứu quy trình quản lý tổng hợp một số bệnh hại quan trọng trên cây sen tại tỉnh Đồng Tháp.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Moon, S. W., C. B. Ahn, Y. Oh and Y. J. Je (2019). Lotus (*Nelumbo nucifera*) seed protein isolate exerts anti-inflammatory and antioxidant effects in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via inhibiting NF-κB and MAPK pathways and upregulating catalase activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134: 791 - 797.
2. Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology 5th edition*. San Diego, California: Elsevier Academic Press.
3. Trần Nguyễn Tấn Tài (2024). Đánh giá khả năng gây hại của nấm *Phytophthora* spp. gây bệnh thối thân, thối ngò trên sen và bước đầu nghiên cứu biện pháp phòng trị. Luận văn tốt nghiệp Đại học, Khoa Bảo vệ Thực vật, Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.
4. Burgess L. W., T. E. Knight, L. Tesoriero and H. T. Phan (2009). *Diagnostic manual for plant diseases in Vietnam*. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra. Australia.
5. Saitoh. K., K.Togashi, T. Arie and T. Teraoka (2006). A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. *Journal of General Plant Pathology*, 72(6): 348 - 350.
6. Martin, K. J. and P. T. Rygielwicz (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis

- of the ITS region of environmental DNA extracts. *PudMed Central Microbiology*, 5(28): 1 - 11.
7. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar (2013). Mega: Molecular evolutionary genetics analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725 – 2729.
8. Vũ Triệu Mân (2007). *Giáo trình Bệnh cây chuyên khoa*. Nxb Nông nghiệp, 233 trang.
9. Hyeong-Jin Jee, Weon-Dae Cho and Wan-Gyu Kim (1997). Phytophthora diseases of apple in Korea: Occurrence of a destructive collar rot caused by *P. cactorum*. *Korean Journal Plant Pathology*, 13(3): 139 - 144.
10. Cahill, D. M., Rookes, J. E., Wilson, B. A., Gibson, L. and McDougall, K. L. (2008). *Phytophthora cinnamomi* and Australia's biodiversity: Impacts, predictions and progress towards control. *Australian Journal of Botany*, 56(4), 279 - 310.
11. Drenth, A. and D. I. Guest (2004). *Diversity and management of Phytophthora diseases in South Asia*. Australia Center for International Agricultural Research, 238 pages.
12. Drenth A. and D. Guest (2013). *Phytophthora palmivora* in tropical tree crops. *Phytophthora: A global perspective*. K. Lamour. Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI, 187 - 196.
13. Erwin, D. C. and O. K. Ribeiro (1996). *Phytophthora diseases worldwide*. *American Phytopathological Society*. 562 pages.

**GENETIC DIVERSITY OF *Phytophthora* spp. CAUSING LEAF AND STEM ROT DISEASE ON LOTUS (*Nelumbo nucifera*)**

**Le Minh Tuong<sup>1</sup>, Nguyen Duc Nhuan<sup>2</sup>, Dinh Hoang Kha<sup>1</sup>,  
Le Thi Ngoc Xuan<sup>1</sup>, Ngo Thanh Tri<sup>1</sup>, Dao Thi Hong Xuyen<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*College of Agriculture, Can Tho University*

<sup>2</sup>*Master student in Plant Protection major, Can Tho University*

**Abstract**

Leaf and stem rot disease on lotus (*Nelumbo nucifera*) caused by *Phytophthora* spp. is one of the important diseases affecting the productivity and quality of lotus products. The objective of this research was to identify *Phytophthora* species causing leaf and stem rot disease on lotus. In this study, the fungi samples were determined based on morphological, biological characteristics and pathogenicity. The results showed that all 30 fungi strains belonged to genus *Phytophthora* and they induced typical symptoms of leaf and stem rot disease on lotus. The nucleotide sequences of ITS-rDNA region were determined and used for phylogenetic analysis. The results indicated that 30 strains divided three groups: group 1 including 12 strains testing that was belong to *Phytophthora cinnamomi* species; group 2 including 8 strains that was belong to *Phytophthora cactorum* species and group 3 including 10 strains testing that was belong to *Phytophthora palmivora* species. The results of this study will be the basis for further researches to contribute to finding the effective methods to control leaf and stem rot disease on lotus.

**Keywords:** *Biological characteristics, ITS-rDNA region, leaf and stem rot disease on lotus, morphology characteristics, Phytophthora spp.*

**Ngày nhận bài:** 15/4/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 12/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 30/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 23/6/2025



# ỨNG DỤNG KỸ THUẬT MULTIPLEX RT-PCR PHÁT HIỆN *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) VÀ *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) GÂY HẠI TRÊN CHI ĐĂNG LAN (*Dendrobium*)

Phạm Đức Toàn<sup>1</sup>, Phùng Thị Mỹ Linh<sup>1</sup>, Bùi Cách Tuyến<sup>2, \*</sup>

<sup>1</sup> Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup> Phòng Chẩn đoán Bệnh cây, Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường,

Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh

\* Email: buicachtuyen@gmail.com

## TÓM TẮT

Lan là một trong những loài hoa đẹp, quý và có tiềm năng kinh tế rất cao. Tuy nhiên, bệnh do virus gây ra trên lan là rào cản lớn đã tác động rất tiêu cực đến kinh tế ngành trồng lan. Mục tiêu của nghiên cứu này là áp dụng quy trình multiplex RT-PCR để phát hiện và khảo sát tỉ lệ nhiễm CymMV và ORSV trên các mẫu lan *Dendrobium*. Kết quả nghiên cứu đã chứng minh khả năng phát hiện virus từ quy trình multiplex RT-PCR hoàn toàn trùng khớp với kết quả phát hiện virus từ quy trình simplex RT-PCR. Như vậy, kết quả đã chỉ ra rằng, multiplex RT-PCR được ứng dụng trong nghiên cứu này là kỹ thuật nhanh chóng, đơn giản, chính xác và đáng tin cậy. Thêm nữa, kết quả sử dụng quy trình multiplex RT-PCR trên 40 mẫu lan *Dendrobium* thu thập từ vườn thực địa đã phát hiện 26 mẫu nhiễm CymMV, 2 mẫu nhiễm ORSV, trong đó có 2 mẫu nhiễm ORSV cũng là mẫu nhiễm đồng thời CymMV và ORSV. Kết quả đạt được của nghiên cứu này là những thông tin hữu ích góp phần cung cấp thêm thông tin về nghiên cứu virus gây hại trên chi đăng lan *Dendrobium*.

**Từ khóa:** CymMV, ORSV, Genus, *Dendrobium*, multiplex RT-PCR.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, xu thế trồng hoa và cây cảnh đang ngày càng phổ biến, hoa lan được biết đến là một trong những loài hoa đắt đỏ với nhu cầu cung ứng cao trên thị trường này. Hoa lan thường được coi là biểu tượng của vẻ đẹp, sự thanh lịch, tình yêu và lòng hiếu khách. Trong đó, đăng lan (*Dendrobium*) là chi lan phổ biến và được ưa chuộng nhất trong ngành hoa lan cắt cành. Chi *Dendrobium* là một chi lớn thuộc phân họ Epidendroideae, họ lan (Orchidaceae), chi này bao gồm khoảng 1.400 loài, phân bố khắp châu Á, châu Âu và Úc đặc biệt hơn, gần đây *Dendrobium* còn được biết đến có nhiều chức năng quan trọng trong y học cổ truyền Trung Quốc, bao gồm: Thuốc hạ sốt, chất chống viêm, hỗ trợ có lợi cho mắt và hệ tiêu hóa, giúp điều chỉnh lượng đường trong máu [1]. Tuy nhiên, một rào cản nghiêm trọng cho ngành trồng hoa lan đến từ bệnh hại do virus gây ra. Trong đó, 2 loài virus trên lan phổ biến là: *Potexvirus cymbidium* (Syn. *Cymbidium mosaic virus* - CymMV) và *Tobamovirus odontoglossum* (Syn. *Odontoglossum ringspot virus* - ORSV) đã gây ra thiệt hại kinh tế nghiêm trọng cho

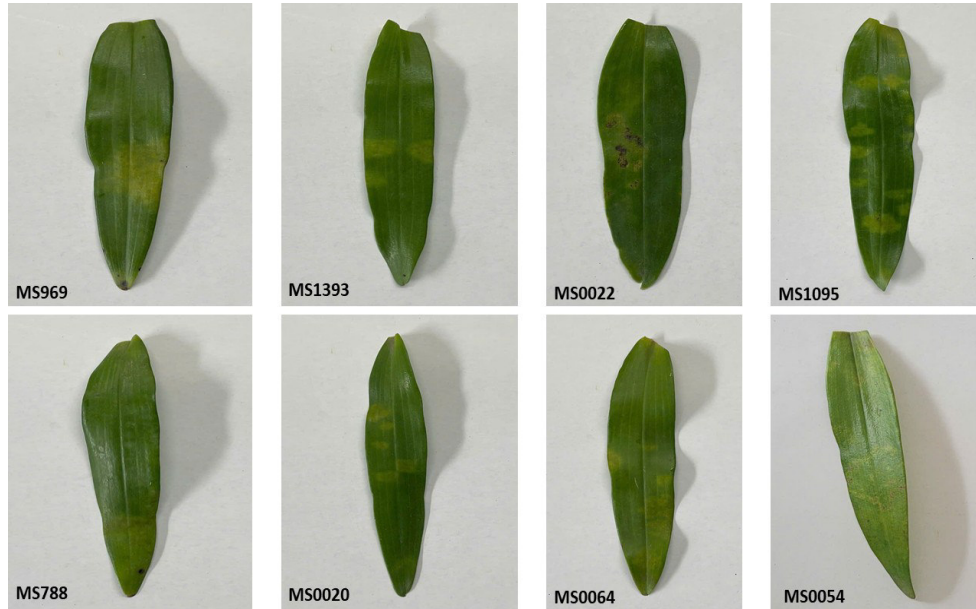
ngành công nghiệp trồng lan. Các loại virus có tác động bất lợi đến sự sinh trưởng và phát triển của hoa lan. Hoa lan nhiễm virus có tình trạng phát triển kém, cho hoa nhỏ hơn và đôi khi có vết hoại tử, lá bị khảm vàng, đốm sọc, chính vì vậy, sẽ làm giảm giá trị của hoa lan thương phẩm. CymMV xâm nhiễm trên lan thường có các triệu chứng rất đa dạng, từ không có triệu chứng chiếm đa số đến hoại tử thân, chậm phát triển rõ rệt, virus gây hại trên lá và hoa, làm hư hại các tế bào từ bên trong, dẫn đến các dấu hiệu biểu hiện ra bên ngoài như: Các nốt đen hoại tử, các đường sọc dài đen hay các vết loang lỗ màu đen, vàng trên lá lan, hoa sẽ có các triệu chứng như biến dạng, mất màu, khảm, hay vết đen [2, 3]. Tương tự, ORSV có thể xâm nhiễm trên cả hoa và lá, biểu hiện triệu chứng hoặc không, nó xâm nhập và tấn công sâu vào trong các tế bào trên cây lan, gây ra các triệu chứng như: Các đốm hoại tử hay đốm vàng lam trên cả hoa và lá, các vòng tròn đồng tâm úa và sẫm màu, các đường sọc, vết đen loang lỗ trên lá, cùng với hiện tượng mất màu ở hoa [2, 4]. Trong trường hợp hoa lan bị đồng nhiễm cả CymMV và ORSV thì triệu chứng tổn thương nghiêm trọng hơn nhiều so với lây

nhễm đơn lẻ, thậm chí có thể gây chết cây [5]. Cả CymMV và ORSV đều có thể lây truyền qua cơ giới do các dụng cụ nông nghiệp đã tiếp xúc với nhựa cây bị nhiễm bệnh hoặc do côn trùng môi giới. Do vậy, nghiên cứu xác định sự hiện diện và khảo sát tỉ lệ nhiễm virus gây bệnh bằng kỹ thuật multiplex RT-PCR sẽ góp phần phục vụ công tác phát hiện nhanh,

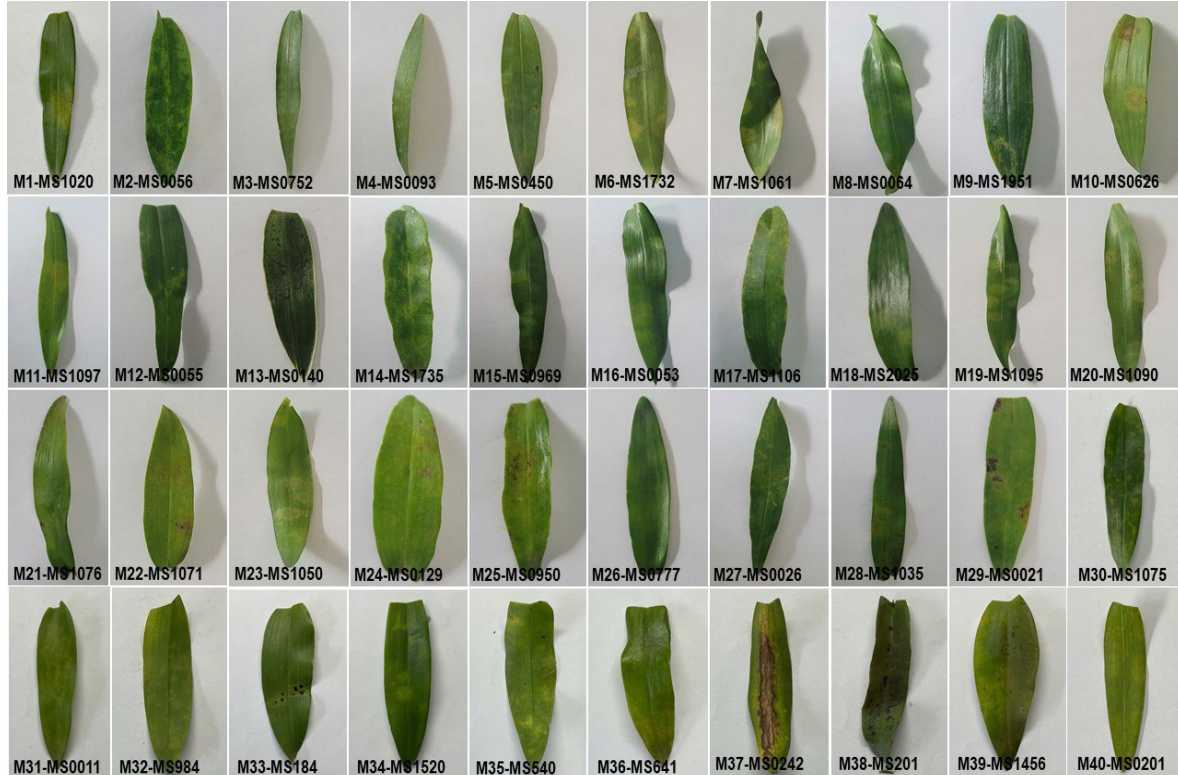
chính xác và đáng tin cậy, từ đó giúp kiểm soát hạn chế nguồn bệnh do CymMV và ORSV gây ra trên chi đáng lan.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu



Hình 1. Triệu chứng đốm, sọc lá điển hình của CymMV và ORSV trên lan *Dendrobium*



Hình 2. Triệu chứng nghi ngờ do virus của 40 mẫu lan *Dendrobium* được thu thập

Tổng số 48 mẫu lan *Dendrobium* được thu thập tại vườn lan ở xã Nhị Bình, huyện Hóc Môn, thành phố Hồ Chí Minh, trong đó có 8 mẫu (Hình 1) với triệu chứng đốm lá, sọc lá nặng rõ rệt nghi ngờ

nhễm CymMV và ORSV dùng để kiểm chứng quy trình Multiplex RT-PCR cùng với các mẫu đối chứng, còn lại 40 mẫu có các triệu chứng đốm, khảm, sọc, không thể hiện triệu chứng rõ ràng (Hình 2). Đối chứng dương CymMV và ORSV được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử, Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh. Đối chứng âm trong phản ứng PCR là mẫu không chứa cDNA mà chỉ có các thành phần hóa chất phản ứng, trong đó cDNA được thay thế bằng nước cất khử ion.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

RNA tổng số được ly trích dựa theo quy trình của bộ KIT EZ-10 Spin Column Plant RNA Miniprep (Canada). Quá trình tổng hợp cDNA được tiến hành dựa theo quy trình bộ KIT SensiFAST cDNA Synthesis (Mỹ). Thực hiện PCR với cặp primer 18S115(F/R) để kiểm tra chất lượng và sự hiện diện của cDNA sau khi tổng hợp [6]. Sử dụng 2 cặp primer đặc hiệu CY348(F/R) và OR257(F/R), nhằm xác định 2 đối tượng: CymMV và ORSV có kích thước đoạn khuếch đại lần lượt là 348 bp và 257 bp [6]. Phản ứng PCR với tổng thể tích 12,5  $\mu$ l gồm: 1X MasterMix (6,25  $\mu$ l), 0,2 mM mỗi primer (0,25  $\mu$ l), 1  $\mu$ l cDNA và nước cất khử ion đủ thể tích phản ứng 12,5  $\mu$ l [7]. Chu trình nhiệt phản ứng PCR được thực

hiện như sau: Tiền biến tính ở 95°C trong 5 phút; tiếp theo là các bước biến tính, bắt cặp, kéo dài lần lượt ở 95°C, 63°C, 72°C trong 30 giây lặp lại với 30 chu kỳ; sau đó là hậu kéo dài ở 72°C trong 7 phút và cuối cùng là bảo quản mẫu ở 4°C [7]. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% với dung dịch đệm 0,5 X TAE trong 30 phút và đọc kết quả trên máy soi gel dưới đèn tia UV.

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả kiểm tra chất lượng sản phẩm cDNA

Sau khi tiến hành PCR sản phẩm cDNA với cặp primer 18S115(F/R) và điện di với thang chuẩn 100 bp, kết quả điện di cho thấy, đoạn khuếch đại mục tiêu 18S rDNA được khuếch đại hiệu quả, chất lượng cDNA đạt yêu cầu, được tổng hợp hoàn chỉnh, band sáng xuất hiện đều ở các mẫu (Hình 3A). Kết quả thể hiện các mẫu đã được tổng hợp cDNA thành công chứng tỏ RNA tổng số đã được ly trích đảm bảo điều kiện để thực hiện phản ứng RT-PCR, kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Kim và Choi (2015) [6] khi sử dụng cặp primer 18S115(F/R) để kiểm tra chất lượng cDNA sau khi tổng hợp, cho sản phẩm PCR với kích thước đoạn khuếch đại là 115 bp.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm cDNA với cặp primer 18S115(F/R) (hình A); cặp primer CY348 (F/R) (hình B); OR257 (F/R) (hình C); multiplex PCR cùng lúc 3 cặp primer 18S115(F/R), CY348 (F/R) và OR257 (F/R) (hình D). Ladder 100 bp; IC: đối chứng nội; “+” đối chứng dương; sản phẩm PCR 8 mẫu lan (tên mẫu theo hình 1); sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% trong dung dịch TAE 0,5X với 30 phút ở hiệu điện thế 100 V



### 3.2. Kết quả khuếch đại CymMV và ORSV bằng simplex RT-PCR

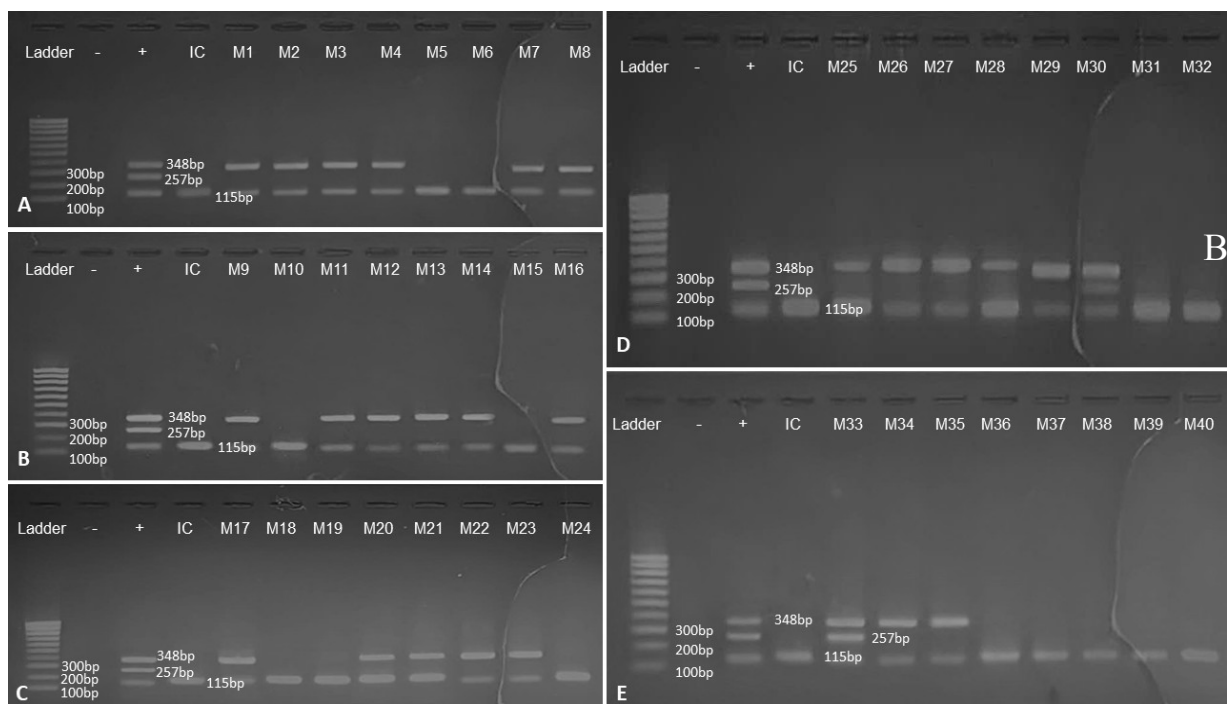
Nghiên cứu đã thực hiện phản ứng simplex RT-PCR để khảo sát sự hiện diện riêng lẻ của CymMV, ORSV. Theo đó, CymMV được khảo sát sự hiện diện thông qua việc sử dụng hai cặp primer CY348 (F/R) và 18S115 (F/R) và khảo sát ORSV bằng 2 cặp primer OR257(F/R) và 18S115(F/R). Kết quả khảo sát tình trạng nhiễm bệnh virus của mẫu được thể hiện lần lượt ở hình 3B (CymMV) và 3C (ORSV). Kết quả đã phát hiện 6 mẫu nhiễm CymMV (MS969, MS11393, MS1095, MS0020, MS0064), 1 mẫu nhiễm ORSV (MS0022).

### 3.3. Kết quả phát hiện CymMV và ORSV bằng multiplex RT-PCR

Sau khi thực hiện phản ứng multiplex RT-PCR với cùng lúc 3 cặp primer 18S115(F/R), CY348(F/R), OR257(F/R) và điện di kiểm tra kích thước cũng như sự tồn tại của mầm bệnh virus, quan sát cho thấy, sản

phẩm đặc hiệu xuất hiện ở 6 mẫu (MS969, MS11393, MS0022, MS1095, MS0020, MS0064), tương ứng với các giếng thứ tự số 5 - 8, 10 - 11, tính từ ladder (Hình 3D). Kết quả phát hiện bao gồm 6 mẫu nhiễm CymMV với kích thước đoạn khuếch đại 348 bp (MS969, MS11393, MS1095, MS0020, MS0064), 1 mẫu nhiễm ORSV với kích thước 257 bp (MS0022), trong đó 1 mẫu nhiễm kép đồng thời cả CymMV và ORSV (MS0022). Từ kết quả thực hiện khảo sát phát hiện CymMV và ORSV bằng quy trình multiplex RT-PCR và simplex RT-PCR trong nghiên cứu này cho thấy, kết quả tương đồng trùng khớp nhau về khả năng phát hiện virus trong mẫu. Do vậy, quy trình multiplex RT-PCR đảm bảo tin cậy khi áp dụng vào việc phát hiện CymMV và ORSV cho các mẫu thực địa thu thập từ vườn trồng.

### 3.4. Kết quả áp dụng quy trình multiplex RT-PCR phát hiện đồng thời CymMV và ORSV trên các mẫu lan thực địa vườn trồng



**Hình 4. Kết quả sử dụng quy trình multiplex RT-PCR phát hiện virus 40 mẫu lan thu thập từ thực địa vườn trồng (tên mẫu theo hình 2). Ladder 100 bp; (-): đối chứng âm; (+): đối chứng dương; IC: đối chứng nội; (A): Mẫu thực địa (M1-M8); (B): Mẫu thực địa (M9-M16); (C): Mẫu thực địa (M17-M24); (D): Mẫu thực địa (M25-M32); sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% trong dung dịch TAE 0,5X với 30 phút ở hiệu điện thế 100 V**

Sau khi hoàn thiện quy trình multiplex RT-PCR sử dụng trong nghiên cứu đã được tối ưu tốt và hợp lý, tiến hành áp dụng trên các mẫu lan được thu thập từ vườn trồng để khảo sát và đánh giá tỉ lệ nhiễm

CymMV và ORSV. Quy trình thực hiện qua các bước cơ bản lần lượt là ly trích RNA, đo OD và tổng hợp cDNA để khuếch đại sản phẩm đối chứng nội, nhằm hạn chế kết quả âm tính giả, thực hiện phản ứng

multiplex RT-PCR để phát hiện mẫu nhiễm CymMV và ORSV. Kết quả khảo sát mẫu nhiễm virus trên các mẫu lan thực địa bằng quy trình multiplex RT-PCR với phản ứng PCR cùng lúc 3 cặp primer 18S115(F/R), CY348(F/R), OR257(F/R) được trình bày ở hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, đoạn khuếch đại với kích thước khoảng 115 bp đều xuất hiện theo đúng mong muốn ở 40 mẫu thực địa, đây là đoạn khuếch đại của mẫu với cặp primer 18S115(F/R), dùng làm đối chứng nội. Do đó, có thể kết luận rằng, cDNA của tất cả các mẫu đều được tổng hợp hoàn chỉnh, quá trình ly trích RNA và khuếch đại cDNA đã diễn ra thành công. Chính vì vậy, sản phẩm cDNA được tổng hợp đạt đủ điều kiện để tham gia vào quá trình phản ứng multiplex RT-PCR.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sản phẩm PCR sau khi điện di trên gel agarose có các band sản phẩm xuất hiện đúng với kích thước mong muốn đối với từng đối tượng mục tiêu, trong đó cặp primer 18S115(F/R) cho kích thước đoạn khuếch đại 115 bp, cặp primer CY348(F/R) phát hiện CymMV có kích thước đoạn khuếch đại 348 bp, cặp primer OR257(F/R) nhận dạng ORSV với kích thước đoạn khuếch đại 257 bp, các band rõ, không có band phụ, độ sáng của từng band có phần khác biệt do phụ thuộc vào nồng độ virus ở mỗi mẫu nhưng nhìn chung sự khác biệt không đáng kể (Hình 4). Kết quả chẩn đoán phát hiện có 26/40 mẫu dương tính với CymMV, tương đương khoảng 65%, trong đó có 24/40 chiếm 60% mẫu chỉ nhiễm đơn CymMV và 2 mẫu mẫu nhiễm kép CymMV và ORSV chiếm 5%. Các mẫu lá nhiễm CymMV cả đơn và kép đều có liên quan đáng kể đến 2 triệu chứng khảm vàng, sọc lá và hoại tử trên loài lan *Dendrobium*. Tương tự, chỉ có 2/40 mẫu dương tính với ORSV (mẫu số M30, M33), tương đương khoảng 5%, trong 2 mẫu nhiễm này, đồng thời cũng nhiễm CymMV, do đó 5% mẫu này cũng là mẫu nhiễm kép CymMV và ORSV (Hình 4). Còn lại, phát hiện 14/40 mẫu âm tính hoàn toàn, tương ứng 35% (Hình 4). Trên lý thuyết, những mẫu nhiễm kép đa phần có biểu hiện đa dạng, phức tạp và khó nhận diện hơn, thường sẽ kèm theo hoại tử. Trong nghiên cứu này, các mẫu lá nhiễm virus ORSV và đồng nhiễm CymMV có biểu hiện triệu chứng bị đốm hoại tử, đốm vàng và sọc trên lá. Kết quả nghiên cứu cho thấy, CymMV là loại virus phổ biến trên *Dendrobium*, trong khi đó, ORSV hiếm gặp hơn trên loài lan này. Nếu nhiễm ORSV thì nhiễm kép sẽ

chiếm ưu thế hơn. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đây khi khảo sát về tỉ lệ nhiễm CymMV và ORSV ở Thái Lan của Tanaka và cs (1997) [8], theo đó kết quả khảo sát 442 mẫu lan thuộc 24 chi ở 43 vườn lan của 8 tỉnh thuộc miền Bắc, miền Trung và miền Nam Thái Lan đã cho thấy, ORSV ít phổ biến hơn CymMV, không có phát hiện nào đối với ORSV trên các mẫu lan *Dendrobium* được chọn khảo sát [8]. Kết quả nghiên cứu này cũng góp phần cung cấp thêm thông tin về mức độ nhiễm CymMV và ORSV trên chi đăng lan *Dendrobium*, trong khi đó kết quả nghiên cứu của Moraes và cs (2017) đã xác định, tỉ lệ nhiễm CymMV và ORSV lần lượt là 71,16% và 15,85% [9]. Tương tự, kết quả nghiên cứu của Nongsang và Das (2022) ở Ấn Độ, đã phát hiện 53,5% mẫu lan *Dendrobium* nhiễm ORSV và 46,4% nhiễm CymMV [10].

#### **4. KẾT LUẬN**

Kết quả nghiên cứu đã chứng minh khả năng phát hiện virus từ quy trình multiplex RT-PCR hoàn toàn trùng khớp với kết quả phát hiện virus từ quy trình simplex RT-PCR. Kết quả cho thấy, multiplex RT-PCR được ứng dụng trong nghiên cứu này là kỹ thuật nhanh chóng, đơn giản, chính xác và đáng tin cậy. Thêm nữa, kết quả ứng dụng multiplex RT-PCR chẩn đoán trên các mẫu đăng lan được thu thập từ vườn thực địa đã phát hiện 26/40 (65%) mẫu nhiễm CymMV, 2/40 (5%) mẫu nhiễm ORSV, đồng thời 2/40 mẫu này đồng nhiễm cả CymMV và ORSV, còn lại 14/40 (35%) mẫu âm tính. Kết quả đạt được của nghiên cứu này là những thông tin hữu ích góp phần cung cấp thêm thông tin về nghiên cứu virus trên chi đăng lan *Dendrobium* ở Việt Nam, từ đó đưa ra các giải pháp kiểm soát hạn chế sự lây nhiễm của virus trên hoa lan.

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Zhai, D., Lv, X., Chen, J., Peng, M., Cai, J. (2022). Recent research progress on natural stilbenes in *Dendrobium* species. *Molecules*, 27(21), 7233.
2. Engelmann, J., Hamacher, J. (2008). Plant virus diseases: Ornamental plants. *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology*, 4, 436 - 458.
3. Pant, R. P., Rashmi, E. R., Manjunath, N. and Baranwal, V. K. (2020). Status of orchid viruses in India and management strategies for them. *Applied Plant Virology*, 725 - 745.
4. Panjaitan, M. V. T., Mahfut, M., Handayani, T. T., Wahyuningsih, S. (2021). Various ORSV

- infection symptoms on ceratorhiza induction in orchid plants. *Journal of Sustainability Science and Technology*, 1(2), 13 - 20.
5. Pai, H., Jean, W., Lee, Y., Chang, Y. A., and Lin, N. (2019). Genome-wide analysis of small RNAs from *Odontoglossum ringspot virus* and *Cymbidium mosaic virus* synergistically infecting Phalaenopsis. *Mol. Plant Pathol.*, 21, 188 - 205. doi: 10.1111/mpp.12888.
6. Kim, M. S. and Choi, H. S. (2015). Simultaneous detection of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in orchids using multiplex RT - PCR. *Virus Genes*, 51, 417 - 422.
7. Phạm Đức Toàn, Nguyễn Khánh Ngọc Hà, Bùi Cách Tuyến (2024). Phát triển quy trình multiplex RT-PCR phát hiện *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) và *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) gây bệnh trên hoa lan. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 1, 24 - 31.
8. Tanaka, S., Nishii, H., Ito, S., Kameya-Iwaki, M., Sommartya, P. (1997). Detection of *Cymbidium mosaic potexvirus* and *Odontoglossum ringspot tobamovirus* from Thai orchids by rapid immunofilter paper assay. *Plant disease*, 81(2), 167 - 170.
9. Moraes, L. A., Krause-Sakate, R., Pavan, M. A. (2017). Incidence and characterization of viruses infecting orchids in São Paulo state, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 42(2), 126 - 131.
10. Nongsang, A., Das, M. C. (2022). Simultaneous detection of *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) and *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) infecting orchids in Meghalaya, India by Multiplex RT-PCR. *South African Journal of Botany*, 151, 774 - 780.

**APPLICATION OF MULTIPLEX RT-PCR FOR DETECTION OF *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) AND *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) CAUSING DISEASES IN THE GENUS *Dendrobium* ORCHIDS**

**Pham Duc Toan<sup>1</sup>, Phung Thi My Linh<sup>1</sup>, Bui Cach Tuyen<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Faculty of Biological Science - Nong Lam University - Ho Chi Minh city

<sup>2</sup> Plant Disease Diagnostic Clinic, Research Institute for Biotechnology and Environment  
- Nong Lam University - Ho Chi Minh city

**Abstract**

*Dendrobium* orchids are beautiful and precious cut flowers with high economic potential. However, virus diseases in orchids is a major barrier causing very negative impact on the orchid growing industry. The purpose of this study was to apply multiplex RT-PCR to detect and survey the infection rate of CymMV and ORSV in the orchid genus *Dendrobium*. The study results demonstrated that the virus detection capacity from the multiplex RT-PCR completely identical to the virus detection results from the simple RT-PCR. Thus, the results showed that the multiplex RT-PCR applied in this study was a rapid, simple, accurate and reliable technique. In addition, the results of using multiplex RT-PCR on 40 *Dendrobium* orchid samples collected from the orchid garden detected 26 CymMV infections, 2 ORSV infections, two of which 2 ORSV infections. Two of which were co-infected with CymMV and ORSV. The archived results of this study were useful information contributing to virus research on the genus *Dendrobium* orchid in Vietnam.

**Keywords:** *CymMV*, *ORSV*, Genus, *Dendrobium*, multiplex RT-PCR.

**Ngày nhận bài:** 18/4/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 9/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 29/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 25/6/2025

# PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC ĐIỂM CỦA *Papaya ringspot virus* (PRSV) TRÊN CÂY ĐU ĐỦ VÀ BẦU BÍ TẠI THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Trần Thị Ngọc Bích<sup>1</sup>\*, Nguyễn Thị Ngọc Thuần<sup>1</sup>, Trương Công Lực<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup> Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật thành phố Hồ Chí Minh

\* Email: ttnbich@hcmuaf.edu.vn

## TÓM TẮT

Virus đốm vòng đu đủ (PRSV) thuộc chi *Potyvirus*, lan truyền do rệp gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sản xuất đu đủ và bầu bí trên toàn thế giới. Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập, xác định sự hiện diện và đặc điểm của PRSV. Từ 54 mẫu bệnh được thu thập trên cây đu đủ và họ bầu bí tại thành phố Hồ Chí Minh, kết quả cho thấy, có 15 mẫu bệnh nhiễm PRSV, trong đó 12 mẫu nhiễm PRSV-P (22,22%) và 3 mẫu nhiễm PRSV-W (5,56%). Tất cả mẫu nhiễm PRSV-P đều thu được trên cây đu đủ, không ghi nhận mẫu nhiễm PRSV-P trên cây họ bầu bí. Khi chủng PRSV-P chủng trên cây dưa gai (*Cucumis metuliferus*), virus có thể được phát hiện sớm ở thời điểm 5 ngày sau chủng bằng kỹ thuật ELISA gián tiếp, dù cây chỉ thể hiện triệu chứng bệnh trên lá ở 10 ngày sau chủng bệnh. Kết quả phản ứng RT-PCR với cặp mồi SMK 8701(F)/3'UTR(R) vùng protein vỏ (CP) và giải trình tự sản phẩm PCR cũng cho kết quả mẫu bệnh là PRSV-P, có độ tương đồng trình tự amino axit và trình tự nucleotide vùng gen CP gần nhất với mẫu có mã số genbank AY010721.1 (Thái Lan).

**Từ khóa:** Bệnh cây đu đủ, đặc điểm PRSV-P, *Papaya ringspot virus*, *Potyvirus*.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh đốm hình nhẫn đu đủ hay còn gọi bệnh đốm vòng đu đủ có tên tiếng Anh là *Papaya ringspot virus* (PRSV) gây ra là nguyên nhân ảnh hưởng nghiêm trọng đến sản xuất đu đủ và cây họ bầu bí trên toàn thế giới [1, 2], bao gồm cả Việt Nam [3, 4]. PRSV thuộc loài *Potyvirus papayanuli* (Syn. *Papaya ringspot virus*), chi *Potyvirus*, gây hại chủ yếu trên đu đủ và được xem là bệnh virus nguy hiểm nhất ở tất cả các nước trồng đu đủ [5]. Bệnh lây lan chủ yếu qua côn trùng môi giới, đặc biệt là rầy mềm và qua tiếp xúc cơ học [6]. Khi bị nhiễm virus, cây biểu hiện các triệu chứng còi cọc, lá khảm biến dạng, xuất hiện vết bệnh ở thân như vết dầu loang, quả có đốm dạng hình nhẫn, sản lượng và chất lượng quả giảm, đặc biệt lượng đường trong quả có thể bị giảm đến hơn 50% [6, 7]. Hiện nay, vẫn chưa có biện pháp phòng trừ hiệu quả bệnh do PRSV gây ra, việc phát hiện sớm và xác định chính xác tác nhân gây bệnh là cần thiết giúp cách ly, tiêu hủy nguồn bệnh và tiêu diệt véc tơ truyền bệnh để tránh lây lan diện tích rộng, nâng cao hiệu quả phòng bệnh đốm vòng đu đủ. Vì vậy, nghiên cứu này tiến hành thu mẫu, phân lập PRSV trên cây đu đủ và cây họ bầu bí tại

thành phố Hồ Chí Minh. Triệu chứng trên các loại cây ký chủ, kỹ thuật ELISA gián tiếp, phản ứng RT-PCR và giải trình tự gen được thực hiện để định danh virus. Từ đó, cung cấp thêm thông tin về đặc điểm của PRSV tại khu vực này, góp phần hỗ trợ phòng bệnh PRSV giai đoạn sớm.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Điều tra, thu thập mẫu bệnh trên đồng ruộng

Tiến hành điều tra thu thập mẫu bệnh từ tháng 02 năm 2024 đến tháng 4 năm 2024 dựa theo phương pháp của Revill và cs (2004) [3], mẫu bệnh được thu từ các cây đu đủ và cây họ bầu bí tại các khu vực trồng trọt cũng như từ các cây trong vườn nhà và dọc các con đường ở huyện Hóc Môn và Củ Chi, thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu thu có các triệu chứng đặc trưng của bệnh virus như: Khảm lá, lá biến dạng, quả méo mó, có đốm vòng trên vỏ quả. Mỗi mẫu bệnh cho vào từng túi thu mẫu riêng, gói kín miệng, ghi thông tin, sau đó được bảo quản lạnh và chuyển về Phòng thí nghiệm Bệnh cây Bộ môn Bảo vệ thực vật, Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh để xác định tác nhân và lưu mẫu.

### **2.1.1. Xác định tác nhân PRSV bằng phương pháp ELISA gián tiếp**

Các mẫu bệnh sau khi thu từ đồng ruộng được xác định có sự hiện diện của PRSV trong mẫu bệnh bằng phương pháp ELISA gián tiếp [2] với kháng thể đa dòng PRSV CP [2] có cải tiến như sau: Mẫu bệnh được nghiền trong dung dịch đệm (15 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 35 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 3,1 mM  $\text{NaN}_3$ , pH 9,6) theo tỷ lệ 1: 100, hút 200  $\mu\text{l}$  dung dịch cho vào mỗi giếng và ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 1 giờ. Sau đó, bản ELISA được rửa 3 lần (5 phút/lần) bằng đệm PBST 1X (137 mM  $\text{NaCl}$ , 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,7 mM  $\text{KCl}$ , 3,1 mM  $\text{NaN}_3$ , Tween-20 0,025%, pH 7,4). Kháng thể đa dòng PRSV CP được pha loãng với tỷ lệ 1: 5.000 trong đệm pha kháng thể (PBST 100%, PVP 18 mM, BSA 30,1 mM) và thêm 200  $\mu\text{l}$  dung dịch này vào giếng và ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 1 giờ. Bản ELISA tiếp tục được rửa 3 lần bằng đệm PBST 1X. Sau đó, thêm kháng thể thứ cấp (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, AP) của Công ty Invitrogen/Thermo Fisher Scientific - Mỹ pha loãng 1: 5.000 vào giếng và ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 1 giờ. Rửa bản ELISA với đệm rửa PBST 1X 3 lần. Cuối cùng, thêm 150  $\mu\text{l}$  đệm pha chất nền (Diethanolamine 9,7%, 3,1 mM  $\text{NaN}_3$ ) pha với chất nền (p-nitrophenol phosphate) theo tỷ lệ 1: 1.000 vào giếng và ủ trong bóng tối 20 phút. Kết quả được đánh giá bằng mắt thường hoặc đo mật độ quang học (OD) ở bước sóng 405 nm bằng máy ALTA ELISA Reader ADX-110 (CTK Biotech Inc, Hoa Kỳ).

### **2.1.2. Phương pháp phân lập mẫu bệnh nhiễm PRSV**

Các mẫu bệnh được xác định nhiễm PRSV bằng ELISA gián tiếp tiếp tục được chủng lên cây diêm mạch (*Chenopodium quinoa*). Tiến hành nghiền lá bệnh với dung dịch đệm phosphate buffer 0,01 M, pH 7,2 theo tỷ lệ 1: 20. Dung dịch nghiền được quét lên lá cây diêm mạch (*Chenopodium quinoa*) đã được phủ một lớp cacborundum bằng tấm bông. Sau khi chủng, rửa lá với nước sạch để loại bỏ bột cacborundum và các chất thừa để tránh hư hại lá. Sau đó, các cây được giữ trong nhà lưới sạch và tiến hành quan sát triệu chứng hằng ngày. Sau 10 ngày, cây diêm mạch xuất hiện các vết đốm trên lá. Tiến hành phân lập virus gây bệnh từ các vết đốm riêng lẻ này, mỗi vết đốm chủng riêng sang từng cây quinoa. Quá trình phân lập virus được lặp lại ít nhất 3 lần, cho đến khi các đốm bệnh biểu hiện đồng

nhất thì chủng virus lên cây dưa sừng (*Cucumis metuliferus*) để duy trì nguồn bệnh. Để phân biệt PRSV thu thập là type P hay W, các mẫu nhiễm PRSV sẽ được chủng lên cây đu đủ. PRSV-P sẽ nhiễm trên cây đu đủ và thể hiện triệu chứng còn PRSV-W không nhiễm trên cây đu đủ.

### **2.1.3. Triệu chứng của PRSV-P trên một số cây ký chủ**

Sau khi xác định được PRSV-P, tiến hành chủng nhiễm nguồn virus này lên cây ký chủ bằng phương pháp tạo vết thương. Cây ký chủ sử dụng bao gồm: Mướp hương, bí đỏ, dưa leo, dưa lưới, dưa hấu, khổ qua, dưa sừng khi chúng có 2 lá thật. Cây sau chủng được đặt trong nhà lưới thực hiện chăm sóc và ghi nhận các triệu chứng trên lá.

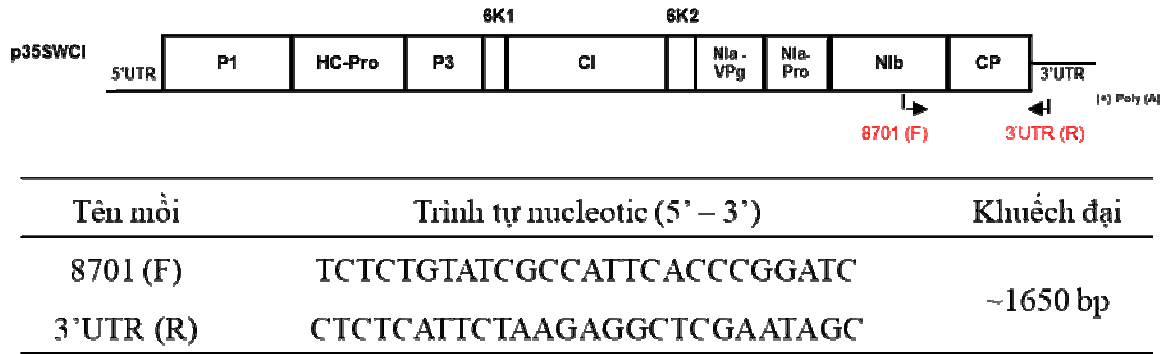
### **2.2. Định lượng nồng độ PRSV-P trong mẫu bệnh bằng ELISA gián tiếp**

Thí nghiệm được thực hiện trên dưa sừng khi cây có 2 lá thật thì chủng nguồn PRSV-P vào cây bằng phương pháp tạo vết thương như ở mục 2.1. Sau đó, mẫu lá cây được thu ở 5, 10, 15, 20, 25, 30 ngày sau chủng bệnh. Ba lá trưởng thành tính từ trên ngọn xuống gồm lá đầu tiên đã phát triển hoàn toàn với 2 lá phía dưới tiếp theo được theo dõi và thu mẫu, mỗi lá bấm lấy 3 vòng tròn lá có đường kính 0,6 cm bằng dụng cụ đục lỗ [8]. Thí nghiệm gồm 3 lần lặp lại ở 3 cây riêng biệt cho mỗi mốc thời gian thu mẫu. Mẫu bệnh sau khi thu thì tiến hành kiểm tra nồng độ PRSV-P bằng cách sử dụng kỹ thuật ELISA gián tiếp như ở mục 2.1

### **2.3. Xác định PRSV-P bằng kỹ thuật RT-PCR**

Mẫu lá từ cây nhiễm PRSV-P đã xác nhận trước đó được sử dụng tách chiết RNA bằng kit TRIsure (Meridian Bioscience, Hoa Kỳ) theo quy trình của nhà sản xuất. Tiến hành tổng hợp cDNA bằng bộ kit Tetro cDNA (Meridian Bioscience, Hoa Kỳ). Phản ứng PCR được thực hiện theo quy trình của Lorenz (2012) [9] với cặp mồi đặc hiệu là SMK 8701 (F) và 3'UTR (R) [4]. Sản phẩm PCR khuếch đại sau đó được điện di trên gel agarose 1% và chụp hình ảnh bằng máy chụp gel Vilber Lourmat (Vilber, Pháp) để quan sát sự khuếch đại gen CP. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit ADN clean theo quy trình của nhà sản xuất trước khi gửi mẫu giải trình tự 2 chiều.





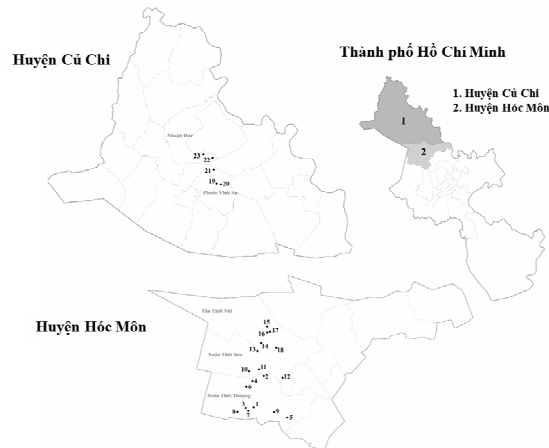
Hình 1. Tổ chức bộ gen và đoạn mồi sử dụng trong nghiên cứu

#### 2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được tổng hợp, vẽ đồ thị bằng phần mềm Microsoft Excel 2016. Kết quả giải trình tự được xử lý bằng phần mềm Bioedit 7.7, so sánh trình tự bằng công cụ online Clustalw [10]

#### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

##### 3.1. Kết quả thu thập mẫu và triệu chứng bệnh trên các cây ký chủ



Hình 2. Bản đồ các vị trí thu mẫu có triệu chứng nhiễm virus ở 2 huyện Hóc Môn và Củ Chi, thành phố Hồ Chí Minh

Ghi chú: Các dấu chấm đại diện cho tọa độ thu mẫu. Các số thứ tự là số đánh dấu trên mẫu thu.

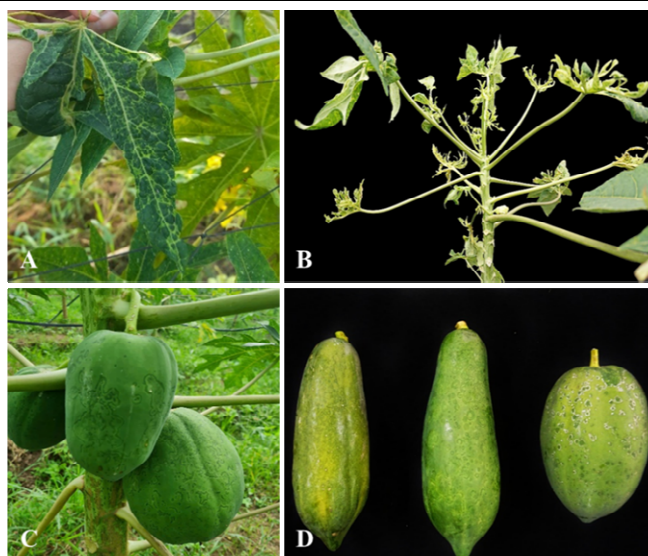
Trong nghiên cứu này, các mẫu bệnh đã được thu thập ở huyện Hóc Môn và Củ Chi với các triệu chứng như: Khảm lá, lá biến dạng, nhăn nheo, quả có đốm vòng. Tổng số mẫu thu thập là 54 mẫu, trong đó

ở huyện Hóc Môn thu ở 3 xã với 47 mẫu bệnh và huyện Củ Chi thu ở 2 xã với 7 mẫu bệnh, các địa điểm được đánh dấu như ở hình 2 và cụ thể các tọa độ ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả kiểm tra sự xuất hiện PRSV trong mẫu bệnh được thu thập

| STT | Cây ký chủ | Tọa độ địa lý           | Địa chỉ (xã, huyện)       | Tổng số mẫu | Số mẫu nhiễm |
|-----|------------|-------------------------|---------------------------|-------------|--------------|
| 1   | Đu đủ      | 10.8489240, 106.5616410 | Xuân Thới Thượng, Hóc Môn | 1           | 1            |
| 2   | Đu đủ      | 10.870745, 106.566908   |                           | 1           | 1            |
| 3   | Đu đủ      | 10.8482800, 106.5573150 |                           | 1           | 1            |
| 4   | Mướp       | 10.8645210, 106.5590200 |                           | 1           | 1            |
| 5   | Dưa leo    | 10.841960, 106.580378   |                           | 5           | 0            |

|                           |          |                         |                           |    |   |
|---------------------------|----------|-------------------------|---------------------------|----|---|
| 6                         | Bầu      | 10.863684, 106.556310   |                           | 2  | 0 |
| 7                         | Mướp     | 10.847115, 106.557938   |                           | 5  | 0 |
| 8                         | Mướp     | 10.8470530, 106.5541210 |                           | 4  | 0 |
| 9                         | Khổ qua  | 10.850616, 106.574291   |                           | 1  | 0 |
| 10                        | Đu đủ    | 10.8731130, 106.557660  | Xuân Thới Sơn,<br>Hóc Môn | 2  | 2 |
| 11                        | Đu đủ    | 10.8732420, 106.5626310 |                           | 2  | 1 |
| 12                        | Bí đao   | 10.868848, 106.575473   |                           | 5  | 0 |
| 13                        | Dưa leo  | 10.886676, 106.561504   |                           | 5  | 0 |
| 14                        | Đu đủ    | 10.8885690, 106.5648600 | Tân Thới Nhì,<br>Hóc Môn  | 2  | 1 |
| 15                        | Bầu      | 10.896258, 106.567340   |                           | 1  | 0 |
| 16                        | Bầu      | 10.8943640, 106.5680160 |                           | 5  | 2 |
| 17                        | Dưa leo  | 10.894382, 106.568044   |                           | 4  | 0 |
| 18                        | Dưa gang | 10.885478, 106.571603   |                           | 1  | 0 |
| 19                        | Đu đủ    | 10.989007, 106.525011   | Phước Vĩnh An,<br>Củ Chi  | 1  | 1 |
| 20                        | Đu đủ    | 10.9879750, 106.5277920 |                           | 1  | 1 |
| 21                        | Dưa leo  | 11.001539, 106.521422   |                           | 2  | 0 |
| 22                        | Đu đủ    | 11.0126250, 106.5194360 | Nhuận Đức,<br>Củ Chi      | 1  | 1 |
| 23                        | Mướp     | 11.015124, 106.511328   |                           | 1  | 1 |
| Tổng số mẫu bệnh thu thập |          |                         |                           | 54 |   |

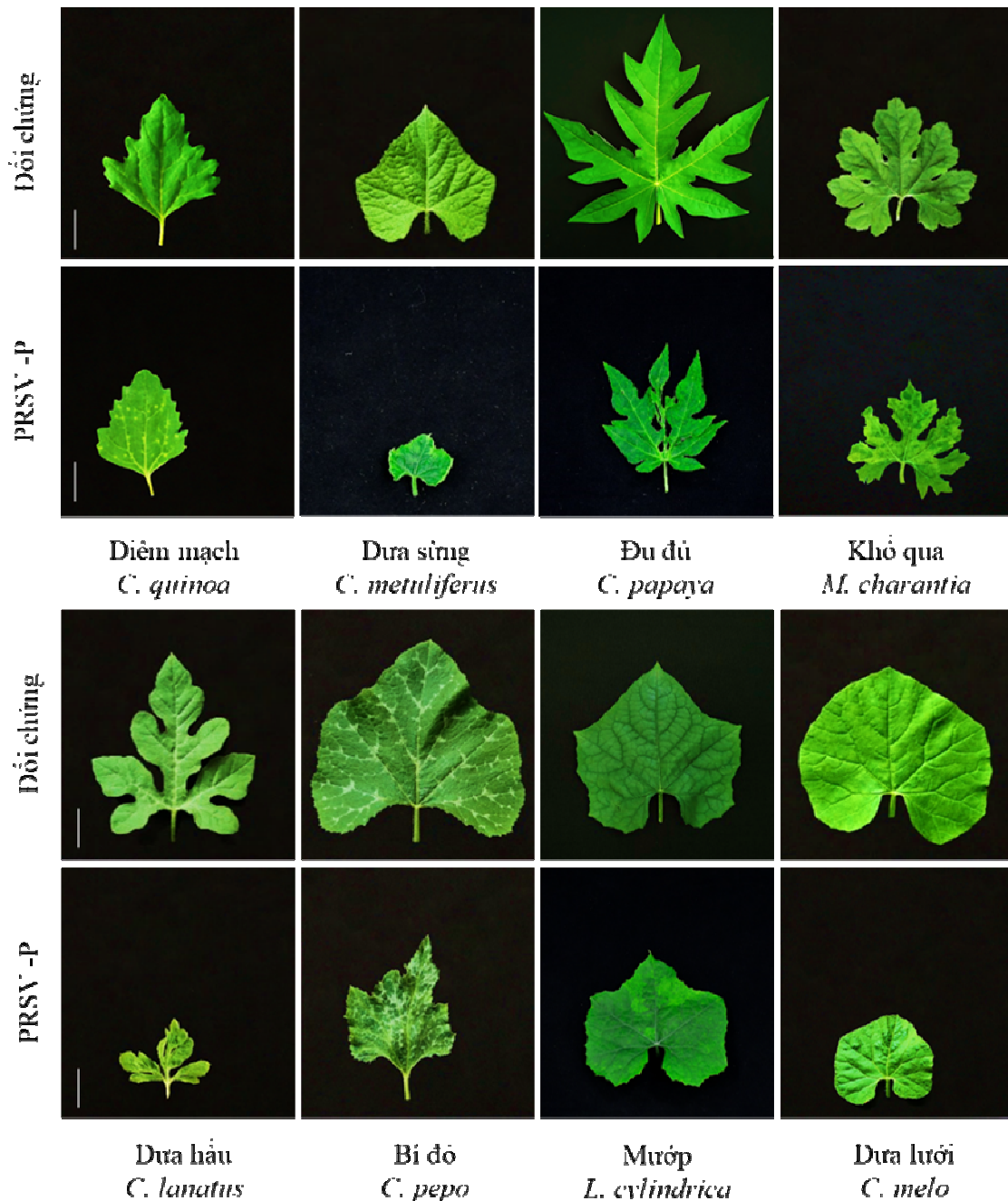


**Hình 3. Triệu chứng bệnh PRSV-P gây hại trên cây đu đủ. (A) Trên lá; (B) Trên ngọn; (C) Trên trái trước khi thu hoạch; (D) Trên trái già sau khi thu hoạch**

Sau khi thu mẫu bệnh với các triệu chứng như hình 3, tiến hành xác định tác nhân bằng phương pháp huyết thanh học ELISA gián tiếp. Kết quả cho thấy, trong tổng số 54 mẫu bệnh có triệu chứng bệnh khám được thu thập từ 7 loại cây ký chủ khác nhau là đu đủ, mướp, bầu, dưa leo, khổ qua, bí đao và dưa

gang sau khi kiểm tra virus đã phát hiện có 15/54 mẫu (27,77%) nhiễm virus PRSV và đu đủ là cây có tỷ lệ nhiễm cao nhất 10/12 mẫu nhiễm (83,33%) (Bảng 1). Điều này chứng minh rằng, PRSV là nguyên nhân chính gây bệnh do virus trên cây đu đủ, kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Gonsalves và cs (2010) [11], theo đó PRSV là nguyên nhân chính gây thiệt hại nặng nề nhất trên đu đủ và xảy ra ở hầu hết ở các vùng trồng đu đủ trên toàn thế giới.

Các mẫu nhiễm bệnh tiếp tục được phân lập và cho kết quả có 10 mẫu nhiễm PRSV-P trong tổng số 15 mẫu nhiễm PRSV từ ELISA gián tiếp, các mẫu nhiễm PRSV-P thu được trên cây đu đủ và không có mẫu nhiễm PRSV-P thu được trên cây họ bầu bí. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Gonalves (1998) [12], theo đó PRSV-P vẫn có thể được lây nhiễm nhân tạo nhưng thường không được tìm thấy ở các cây bầu bí ngoài đồng ruộng.



Hình 4. Triệu chứng PRSV-P trên các loại cây ký chủ khác nhau.

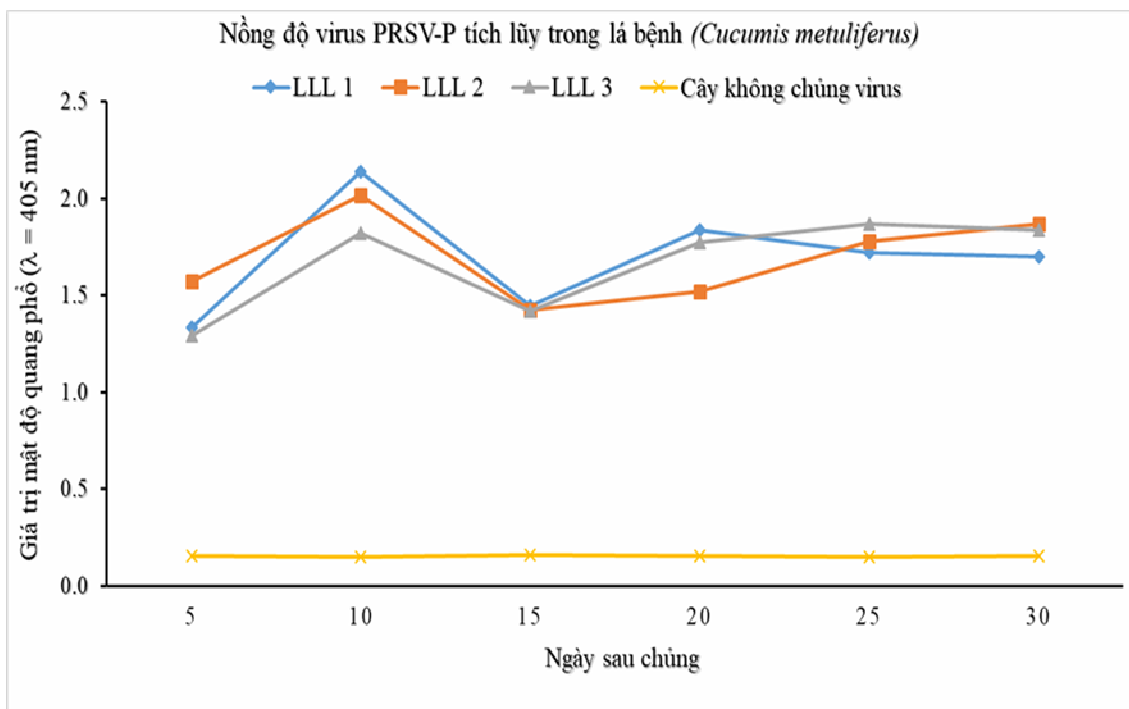
Ghi chú: Trong cùng 1 loại cây ký chủ, hàng phía trên là cây đối chứng, hàng phía dưới là cây chủng virus PRSV-P. Thanh thước 1 cm.

Sau khi xác định được PRSV-P, tiến hành chủng nguồn virus này lên các cây ký chủ như: Dưa sừng, dưa hấu, bí đỏ, mướp hương, khổ qua, dưa lưới, đu đủ để ghi nhận các triệu chứng đặc trưng của PRSV-P (Hình 4). Nhìn chung, các cây ký chủ khi nhiễm PRSV-P đều biểu hiện hệ thống toàn cây. Lá có hiện tượng khảm, trong trường hợp bị nặng lá có thể bị biến dạng. Đối với cây dưa sừng, đây là cây khi nhiễm virus sẽ biểu hiện hệ thống toàn cây, lá bệnh có hiện tượng khảm, lá chỗ vàng chỗ xanh xen kẽ nhau, mặt trên lá bệnh lõm lõm nhăn nheo và kích thước lá giảm so với lá không bị bệnh. Đối với cây đu đủ, lúc đầu lá xuất hiện các đốm sáng vàng nhạt, lá hơi co lại, nhăn nheo và có hiện tượng khảm, sau đó lá bắt đầu biến dạng (lá co quắp lại, mất thùy, chỉ còn trơ gân lá), kích thước lá giảm so với lá không bệnh. Riêng với các cây khổ qua, dưa hấu, bí đỏ, mướp và cây dưa lưới: Triệu chứng bệnh xuất hiện lâu hơn (khoảng 20 ngày sau chủng), lá có hiện tượng khảm vàng, có các vết đốm xanh đậm xen lẫn những phần còn lại, lá hơi phồng, lâu dần sẽ làm biến dạng và giảm kích thước rõ rệt so với lá không bệnh. Đối với cây diêm mạch,

khi nhiễm virus sẽ xuất hiện vết bệnh cục bộ là những đốm tròn trên lá, thường là khoảng 10 ngày sau chủng. Lúc đầu, trên lá xuất hiện các đốm tròn màu vàng nhạt, sau đó đậm dần và thời gian càng lâu thì các vết đốm sẽ chết hoại ở phần tâm. Tuy nhiên, PRSV-P không làm giảm và biến dạng lá diêm mạch bệnh.

### 3.2. Định lượng nồng độ PRSV-P trong cây bệnh

Kết quả cho thấy, nồng độ virus bắt đầu tăng lên ở giai đoạn 5 ngày sau chủng và đạt giá trị cao nhất ở 10 ngày sau chủng, sau đó nồng độ bắt đầu giảm và tăng, cuối cùng nồng độ ổn định và không có sự chênh lệch nhiều sau 25 ngày chủng bệnh (Hình 5). Từ kết quả này cho thấy, trên cây dưa sừng PRSV-P có thể được phát hiện ở thời điểm 5 ngày sau khi virus xâm nhập vào cây bằng kỹ thuật ELISA gián tiếp trước khi cây biểu hiện triệu chứng bệnh trên lá (10 ngày sau chủng), nồng độ PRSV-P tích lũy trong lá dưa sừng bệnh cao nhất tại thời điểm 10 ngày sau chủng và sau đó nồng độ virus giảm đột ngột và tích lũy ổn định ở mức cao trong cây.

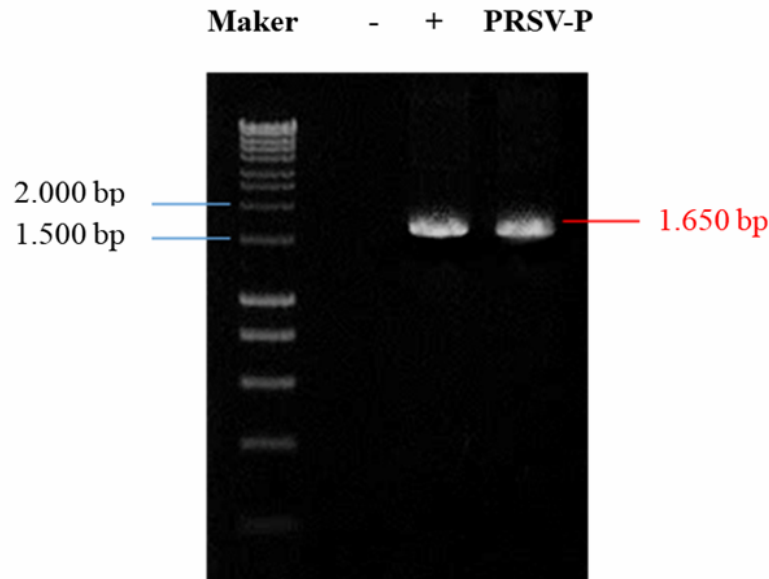


Hình 5. Nồng độ PRSV-P trong lá cây bị bệnh

### 3.3. Kết quả phản ứng RT-PCR mẫu bệnh nhiễm PRSV-P

Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại từ mẫu cDNA trên gel agarose 1% (Hình 6) cho thấy, xuất hiện sản phẩm khuếch đại rõ ràng ở vị trí tương ứng với kích thước là 1.650 bp và không có sản phẩm phụ.

Sản phẩm khuếch đại đoạn gen PRSV đúng với kích thước dự kiến là 1.650 bp [4]. Đối chứng dương là sản phẩm khuếch đại cDNA của virus PRSV-P. Đối chứng âm (-) không có sản phẩm khuếch đại. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây sử dụng đoạn trình tự protein vỏ CP để xác định PRSV-P [13].



Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại của gen PRSV-P

Ghi chú: Marker: thang chuẩn 1 kb, (-): mẫu đối chứng âm, (+): mẫu đối chứng dương, (PRSV-P): mẫu bệnh cần kiểm tra.

#### 3.4 So sánh trình tự đoạn gen protein vỏ (CP) với các trình tự đã công bố

Sản phẩm PCR được tinh sạch và gửi giải trình tự 2 chiều sau đó được hiệu chỉnh bằng phần mềm BioEdit 7.7 cho kết quả độ dài đoạn gen protein vỏ (CP) của mẫu nghiên cứu là 918 nucleotide. Để xem xét độ tương đồng của mẫu nghiên cứu với các mẫu trên ngân hàng gen, tiến hành so sánh trình tự CP nucleotide và CP amino axit của mẫu nghiên cứu với các trình tự CP nucleotide và CP amino axit có sẵn trên NCBI (National Center for Biotechnology Information). Kết quả ở bảng 2 cho thấy, trình tự nucleotide của CP tương đồng cao nhất ở mức 93,71% và trình tự amino axit của CP tương đồng cao nhất ở mức 97,90% so với trình tự CP của PRSV-P mã số AY010721.1 (Thái Lan) đã được công bố bởi Kertbundit và cs (2016) [14]. Trình tự CP Nucleotide và CP amino axit của mẫu nghiên cứu

tương đồng lần lượt ở mức 90,90% và 95,39% với trình tự CP của virus PRSV-P mã số MT470189.1 (tỉnh Tiền Giang) được công bố bởi Tran và cs (2023) [13]. Trình tự CP Nucleotide và CP amino axit của mẫu nghiên cứu tương đồng lần lượt ở mức 90,24% và 94,41% với trình tự CP của PRSV-P mã số OL514007.1 (tỉnh Đồng Nai) được công bố bởi Tran và cs (2022) [4]. Điều này khẳng định rằng, gen virus trong mẫu nghiên cứu là của PRSV-P và phản ứng RT-PCR được thiết lập trong nghiên cứu này đã khuếch đại đúng đoạn gen CP của PRSV-P. Điều đặc biệt là mẫu được phân lập trong nghiên cứu này được thu trên cây đu đủ tại huyện Hóc Môn, thành phố Hồ Chí Minh nhưng khi so sánh trình tự nucleotide và amino axit của CP thì cho kết quả tương đồng cao nhất với mẫu có mã số genbank AY010721.1 (Thái Lan), điều này cho thấy sự đa dạng của gen virus tại các khu vực khác nhau.

Bảng 2. So sánh tương đồng về trình tự Nucleotit (nt) và axit amin (aa) của CP (coat protein) của PRSV-P HM với một số trình tự công bố ở các khu vực khác

| Mã số truy cập trên NCBI | Nguồn gốc mẫu | Trình tự Nucleotide (PRSV-P HM) (%) | Trình tự amino axit (PRSV-P HM) (%) |
|--------------------------|---------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| AY010721.1               | Thái Lan      | 93,71                               | 97,90                               |
| AY010713.1               | Thái Lan      | 93,24                               | 97,55                               |
| AY010714.1               | Thái Lan      | 93,23                               | 97,19                               |
| AY010718.1               | Thái Lan      | 92,89                               | 96,85                               |



|            |                            |       |       |
|------------|----------------------------|-------|-------|
| AY010716.1 | Thái Lan                   | 92,54 | 96,50 |
| AY010712.1 | Thái Lan                   | 92,42 | 96,50 |
| EF183499.1 | Trung Quốc (Hải Nam)       | 90,96 | 91,48 |
| MT470189.1 | Việt Nam (tỉnh Tiền Giang) | 90,90 | 95,39 |
| JX448369.1 | Đài Loan                   | 90,63 | 93,46 |
| KT633943.1 | Trung Quốc                 | 90,31 | 93,14 |
| OL514007.1 | Việt Nam (tỉnh Đồng Nai)   | 90,24 | 94,41 |
| AY231130.1 | Mexico                     | 88,42 | 93,77 |
| OL477597.1 | Guatemala                  | 87,54 | 94,77 |

#### 4. KẾT LUẬN

Virus đốm vòng đu đủ P (PRSV-P) gây hại nghiêm trọng đặc biệt trên cây đu đủ. Nghiên cứu đã xác định được PRSV-P dựa trên triệu chứng, ELISA gián tiếp và phản ứng RT-PCR. Ngoài ra, nghiên cứu cũng ghi nhận các triệu chứng đặc trưng của PRSV-P tại thành phố Hồ Chí Minh trên các cây ký chủ khác nhau. Trong đó, PRSV-P trên cây dưa sừng có thể được phát hiện ở 5 ngày sau chủng nhiễm bằng phương pháp ELISA gián tiếp, giúp cho việc phát hiện PRSV-P được nhanh chóng ngay cả khi cây chưa thể hiện triệu chứng bệnh. Kết quả phân tích cho thấy, chủng PRSV-P phân lập tại thành phố Hồ Chí Minh có trình tự nucleotide và amino axit của CP tương đồng cao nhất với chủng được báo cáo ở Thái Lan.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Purcifull, D. E. (1984). *Papaya ringspot virus*. In: CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No. 292. CABI: Wallingford, UK, 1984.
2. Yeh, S., Gonsalves, D., and Provvidenti, R. (1984). Comparative studies on host range and serology of Papaya ringspot virus and Watermelon mosaic virus 1. *Phytopathology*, 74, 1081 - 1085.
3. Revill, P. A., Ha, C. V., Lines, R. E., Bell, K. E., Vu, M. T., Dale, J. L. (2004). PCR and ELISA - based virus surveys of banana, papaya and cucurbit crops in Vietnam. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology & Biotechnology*, 12(1, 2), 27 - 32.
4. Tran, T. T. Y., Cheng, H. W., Nguyen, V. H., Yeh, S. D. (2022). Modification of the helper - component protease of *Papaya ringspot virus* Vietnam isolate to generate attenuated mutants for

disease management by cross protection. *Phytopathology*, 113(2), 334 - 344.

5. Nguyễn Thị Hải Yến (2011). *Nghiên cứu bệnh virus trên đu đủ và bầu bí do Papaya ringspot virus (PRSV)*. Luận văn Thạc sĩ, Khoa Nông học, chuyên ngành Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
6. Tripathi, S., Suzuki, J. Y., Ferreira, S. A., Gonsalves, D. (2008). *Papaya ringspot virus-P*: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. *Molecular plant pathology*, 9(3), 269 - 280.
7. Wu, Z., Mo, C., Zang, S., Li, H. (2018). Characterization of papaya ringspot virus isolates infecting transgenic papaya 'Huanong No. 1' in South China. *Scientific reports*, 8(1), 1 - 11.
8. Lin, S. S., Wu, H. W., Jan, F. J., Hou, R. F., Yeh, S. D. (2007). Modifications of the helper component - protease of Zucchini yellow *Mosaic virus* for generation of attenuated mutants for cross protection against severe infection. *Phytopathology*, 97(3), 287 - 296.
9. Lorenz T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (63), e3998.
10. Trung tâm tin sinh học của Đại học Kyoto (2024). Căn chỉnh nhiều chuỗi bởi CLUSTALW, <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>, truy cập ngày 29/7/2024.
11. Gonalves, D., Tripathi, S., Carr, J. B., Suzuki, J. Y. (2010). *Papaya ringspot virus*. *The Plant Health Instructor*, 10, 1094.



12. Gonsalves, D. (1998). Control of *Papaya* strain-specific cross-protection. *Phytopathology*®, *ringspot virus* in papaya: A case of study. *Annual Review of Phytopathology*, 36(1), 415 - 437.
13. Tran, T. T. Y., Cheng, H. W., Nguyen, V. H., Yeh, S. D. (2023). Generation of mild recombinants of *Papaya ringspot virus* to minimize the problem of
14. Kertbundit, S., Attasart, P., Panyim, S. and Juricek, M. (2016). *Papaya ringspot virus strain P isolate Ratchaburi coat protein gene, partial cds* [GenBank accession no. AY010721.1]. NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY010721.1>

**ISOLATION, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PATHOGENIC *Papaya ringspot virus* PRSV-P IN HO CHI MINH CITY**

**Tran Thi Ngoc Bich<sup>1</sup>, Nguyen Thi Ngoc Thuan<sup>1</sup>, Truong Cong Luc<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Department of Plant Protection, Faculty of Agronomy,*

*Nong Lam University - Ho Chi Minh city*

<sup>2</sup> *Ho Chi Minh city Crops Production and Plant Protection Branch*

**Abstract**

*Papaya ringspot virus* (PRSV) is a common aphid-transmitted potyvirus, seriously affecting cucurbit production worldwide. This study was conducted to isolate, detect and characterize the presence of PRSV. A total of 54 symptomatic samples were collected from papaya and cucurbit plants in Ho Chi Minh city. The results showed that 15 samples were infected with PRSV, of which 12 samples (22%) were identified as PRSV-P and 3 samples as PRSV-W. All PRSV-P infected samples were collected from papaya plants, with no PRSV-P infection detected in cucurbit crops. In *Cucumis metuliferus* (horned melon), PRSV-P virus concentration could be detected using indirect ELISA at 5 days post-inoculation, while visible symptoms on the leaves appeared at 10 days post-inoculation. RT-PCR using the primer pair SMK 8701(F)/3'UTR(R), followed by sequencing of the PCR products, confirmed the presence of PRSV-P. The coat protein (CP) amino acid and nucleotide sequences showed the highest similarity to the GenBank accession AY010721.1 (Thailand).

**Keywords:** *Papaya*, *PRSV-P*, *Papaya ringspot virus*, *Potyvirus*.

**Ngày nhận bài:** 10/4/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 5/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 22/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 27/6/2025

# GHI NHẬN NẤM *Curvularia intermedia* GÂY Đốm NẤU TRÊN LÁ LAN PHI ĐIỆP VÀNG (*Dendrobium chrysanthum*) TRỒNG TẠI THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Huỳnh Thị Hồng Phấn<sup>1,2</sup>, Đặng Thị Bảo Quyên<sup>1,2</sup>, Nguyễn Thị Ngọc Tuyền<sup>1,2</sup>,  
Võ Thị Bích Đào<sup>1,2</sup>, Đinh Quốc Toàn<sup>1,2</sup>, Trần Thị Vân<sup>2</sup>, Lê Đình Đôn<sup>1,2</sup>, Bùi Cách Tuyến<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Phòng Chẩn đoán Bệnh cây, Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường,

Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh

\*Email: buicachtuyen@gmail.com

## TÓM TẮT

Phi điệp vàng (*Dendrobium chrysanthum*) là một loài lan bản địa thuộc nhóm thực vật nguy cấp của Việt Nam. Từ các đốm nâu được quan sát trên lá lan Phi điệp vàng trồng tại thành phố Hồ Chí Minh, tác nhân gây ra triệu chứng đã được xác định là một loài nấm thuộc chi *Curvularia* dựa vào đặc điểm hình thái trên môi trường dinh dưỡng và lây nhiễm bệnh nhân tạo. Trên môi trường PDA, mẫu nấm nghiên cứu phát triển ở 25 - 30°C và dừng sinh trưởng ở 12°C và 40°C. Mẫu đại diện 2-Dch được thực hiện PCR và phân tích trình tự vùng gene ITS, TEF1, LSU, kết quả so sánh với dữ liệu được chọn lọc trên Genbank cho thấy, *Curvularia intermedia* là tên của loài nấm phân lập và gây bệnh. Kết hợp nhiều kết quả, *C. intermedia* được đề nghị là tác nhân gây ra đốm nâu trên lá lan Phi điệp vàng trồng tại thành phố Hồ Chí Minh.

**Từ khóa:** Bệnh đốm nâu trên lan, *Curvularia intermedia*, *Dendrobium chrysanthum*, hoa lan.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phi điệp vàng (*Dendrobium chrysanthum*) là loài thuộc họ Lan (Orchidaceae), sinh trưởng trong vùng rừng núi tỉnh Quảng Trị, thành phố Huế và một số tỉnh phía Bắc Việt Nam. Loài lan này có thân màu bạc, dài đến 1,5 m và có hoa màu vàng với đốm sẫm màu trên môi, hoa mọc theo chùm từ 2 - 3 bông dọc theo các đốt gần ngọn [1]. Lan Phi điệp vàng thuộc nhóm thực vật nguy cấp (EN) cần bảo tồn được ghi trong Sách Đỏ Việt Nam [2]. Hiện nay, còn rất ít các nghiên cứu về bệnh hại trên lan, đặc biệt trên các loài lan thuộc nhóm nguy cấp. Tháng 7/2023, trên lá lan Phi điệp vàng xuất hiện nhiều đốm nâu, được ghi nhận trong vườn lan sưu tập có nguồn gốc bản địa tại thành phố Hồ Chí Minh. Do đó, lá có đốm bệnh đã được thu thập và tiến hành xác định danh pháp mẫu nấm phân lập có biểu hiện bệnh nhân tạo.

Có nhiều chi nấm gây đốm bệnh trên lá ở họ Lan như: *Colletotrichum* được báo cáo gây bệnh thán thư; *Fusarium* gây bệnh đốm lá, bệnh đốm vàng; *Nigrospora* gây bệnh đốm lá [3]. Trong nghiên cứu này, trình tự vùng nội phiên mã (ITS), yếu tố kéo dài dịch mã (TEF1) và vùng tiểu đơn vị lớn (LSU) được so sánh với cơ sở dữ liệu Genbank, kết hợp với mô tả

hình thái mẫu nấm phân lập biểu hiện bệnh nhằm xác nhận tác nhân gây đốm nâu trên lá lan Phi điệp vàng.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu và địa điểm nghiên cứu

Mẫu lá lan Phi điệp vàng có đốm nâu được thu thập tại vườn sưu tập lan ở thành phố Hồ Chí Minh (10°55'08.2"N 106°40'05.2"E) và bảo quản trong túi vô trùng có hạt hút ẩm. Các thí nghiệm được thực hiện tại Phòng Chẩn đoán Bệnh cây thuộc Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh.

### 2.2. Phương pháp thực hiện

*2.2.1. Phân lập tác nhân gây bệnh và quan sát hình thái mẫu nấm phân lập*

Sau khi rửa lá dưới dòng nước chảy, các mảnh cắt chứa vết đốm (4 cm<sup>2</sup>/mảnh) được khử trùng lần lượt với ethanol 70% trong 30 giây, NaClO 1% trong 60 giây và rửa qua 3 lần nước vô trùng. Mẫu được thấm khô bằng giấy vô trùng và cắt thành các mảnh nhỏ có chứa phần giao thoa giữa mô khỏe và mô bị đổi màu,

sau đó đặt lên môi trường WA (242 M, TMEDIA). Sau 2 ngày, tơ nấm phát triển quanh rìa của mô, đỉnh tơ nấm được chuyển sang PDA (GM096, HIMEDIA) và duy trì ở 28°C trong điều kiện tối. Mẫu nấm được lưu trữ lâu dài trong ống thạch nghiêng PDA có chứa glycerol 20%.

Mẫu nấm phân lập (MPL) được quan sát đặc điểm hình thái trên môi trường PDA, OA (TM 243, HIMEDIA) và CA (200 g cà rốt, 15 g agar) [4, 5]. Tơ nấm được chuyển sang khối WA (1 × 1 cm) trên phiến lame có giữ ẩm trong đĩa petri để quan sát giác bám theo phương pháp tạo buồng ẩm của Yang và cs (2009) [6]. Hình thái của bào tử, cành mang bào tử và các cấu trúc vi thể khác được quan sát dưới kính hiển vi (L1100A, Shinea). MPL được đặt trên 3 đĩa PDA đường kính 90 mm ở các nhiệt độ khác nhau trong điều kiện tối để quan sát hình thái tản nấm.

### 2.2.2. Phương pháp kiểm tra khả năng gây bệnh đốm của mẫu nấm phân lập

Nhánh với hơn 3 lá thật tách từ đốt thân của cây lan Phi điệp vàng được dùng làm vật liệu chủng theo quy trình Koch. Một MPL được lây nhiễm trên 3 nhánh, một nhánh được lây nhiễm với 3 lá, một lá gồm 3 vị trí có vết thương và 3 vị trí không vết thương ở phía đối diện. Nhỏ 5  $\mu$ l dung dịch chứa  $10^6$  bào tử/ml vào mỗi vị trí chủng và nước vô trùng được dùng thay cho dịch bào tử ở lá đối chứng. Mẫu chủng được đặt trong hộp vô trùng, duy trì ẩm độ 70 - 80%, chiếu sáng 12 giờ/ngày ở 28°C. Ghi nhận kích thước mô bị chuyển màu tại vị trí chủng sau 7 ngày lây nhiễm. So sánh hình thái vết chủng với đốm bệnh trên lan Phi điệp vàng và quan sát mẫu nấm phân lập từ vết chủng để xác nhận tác nhân.

### 2.2.3. Phương pháp PCR với các cặp mồi chuyên biệt vùng ITS, TEF1 và LSU



**Hình 1. Đặc điểm hình thái *Curvularia* sp. (mẫu 2-Dch) phân lập từ đốm lá lan Phi điệp vàng**

a: Lan Phi điệp vàng; b: Đốm nâu trên bản lá (hình trái - mặt trên, hình phải - mặt dưới); c: Tản nấm trên PDA; d: Thạch bị chuyển màu ở phần rìa (PDA); e: Tản nấm trên CA; f: Tản nấm trên OA; g: Cành mang bào tử; po: Vị trí đính bào tử; st: Vách ngăn; h-l: Bào tử (h - mẫu 2-Dch, i - mẫu 1-Dch, j - mẫu 3-Dch, k - mẫu 4-Dch, l - mẫu 5-Dch); bc: Tế bào đáy; ec: Tế bào đỉnh; m: Vi bào tử; n: Ống mầm; o: Bào tử vách dày đơn bào; p: Bào tử vách dày có vách ngăn; q: Giác bám. Thanh tỷ lệ: c-f = 1 cm, g-q = 25  $\mu$ m; g, h, m-q: Nhuộm với Safranin 0,01%.

ADN của MPL gây bệnh điển hình được ly trích theo phương pháp của Nakayashiki và cs (1999) [7]. Phản ứng tổng hợp được thực hiện bằng máy luân

hiệt (GeneQ, Bioer). Vùng ITS, TEF1, LSU lần lượt được khuếch đại với cặp mồi ITS1/ITS4, EF1-1080/EF1-1620, LR0R/LR5 theo chu kì nhiệt của

White và cs (1990) [8], O'Donnell và cs (1998) [9], Rehner và Samuels (1994) [10].

Trình tự vùng ITS, TEF1 và LSU được gửi phân tích tại Công ty 1st BASE (<https://base-asia.com/>). Hai chiều của trình tự được phân tích riêng biệt và ghép nối với nhau bằng công cụ Global alignment

trong phần mềm Geneious Prime phiên bản 11.0.20.1+1. Trình tự trong nghiên cứu này được so sánh với các trình tự tham chiếu đã được chọn lọc trên cơ sở dữ liệu NCBI bằng BLAST phiên bản 2.15.0. Cây phân nhóm được xây dựng bằng phương pháp nối lân cận và lặp lại 1.000 bootstrap.

**Bảng 1. Đặc điểm hình thái các cấu trúc vi thể của *Curvularia* sp. (mẫu 2-Dch)**

| Cấu trúc vi thể  | Đặc điểm màu sắc, hình dạng của cấu trúc              | Kích thước của cấu trúc                                    |
|------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Sợi nấm          | Không màu đến màu nâu đỏ, có vách ngăn                | $3,7 \pm 0,8 \mu\text{m}$<br>(n = 30)                      |
| Cành mang bào tử | Màu nâu đỏ, có nhiều vị trí hình thành bào tử         | $145,2 \pm 44,0 \mu\text{m}$<br>(n = 30)                   |
| Bào tử           | Hình sừng bò, màu nâu, có 2 - 3 vách ngăn             | $23,2 \pm 2,5 \times 13,1 \pm 1,9 \mu\text{m}$<br>(n = 30) |
| Vi bào tử        | Hình trứng đến hình oval, màu nâu, có 0 - 2 vách ngăn | $9,9 \pm 2,8 \times 6,0 \pm 1,4 \mu\text{m}$<br>(n = 30)   |
| Giác bám         | Đơn bào, hình cầu đến hình bình                       | $13,1 \pm 0,8 \times 12,1 \pm 0,8 \mu\text{m}$<br>(n = 20) |
| Bào tử vách dày  | Đa bào, hình cầu đến hình bầu dục                     | $11,3 \pm 4,3 \times 7,7 \pm 1,9 \mu\text{m}$<br>(n = 30)  |

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Đặc điểm hình thái *Curvularia* sp. phân lập từ đốm bệnh

Từ các lá lan Phi điệp vàng có đốm bệnh, đã phân lập được 5 mẫu nấm (1-Dch, 2-Dch, 3-Dch, 4-Dch, 5-Dch) có hình thái giống nhau và giống với *Curvularia* sp. theo khoá phân loại của A. Sivanesan (1987) [11].

Mẫu đại diện 2-Dch được quan sát và mô tả hình thái như hình 1 và bảng 1, với tản nấm màu nâu vàng đến xanh ô liu, nhô cao ở giữa và thấp dần về phía rìa. Tản nấm có các vòng sinh trưởng đồng tâm và phần thạch chuyển màu vàng nhạt ở rìa. Cành mang bào tử hình thành trực tiếp từ sợi nấm, có từ 4 - 6 bào tử tại một vị trí (Hình 1. g). Đa số bào tử có 3 vách ngăn với vách ngăn ở giữa màu nâu đen, dày và cắt ngang bào tử tại vị trí có độ rộng lớn nhất (Hình 1. h-l). Hai tế bào trung tâm của bào tử đậm màu hơn, có kích thước lớn và cong hơn tế bào đáy và tế bào đỉnh. Tế bào đáy thường hẹp nhất và không có

ron lõm (sẹo lõm khi bào tử tách khỏi cành mang bào tử). Vi bào tử được hình thành từ một trong các tế bào của bào tử lớn, thường là 2 tế bào dưới cùng (Hình 1. m). Ống mầm mọc từ tế bào đáy và đỉnh (Hình 1. n). Bào tử vách dày hình thành đơn lẻ, thành chuỗi hay kết thành cụm, thường hình thành trên CA và OA (Hình 1. o-p). Giác bám hình thành trên bề mặt của lame khi ủ nấm trong buồng ẩm (Hình 1. q). Vi bào tử có hình thái giống với nấm *C. phaeospora*, trong khi bào tử vách dày dạng chuỗi có hình dạng giống với *C. sacchari-officinarum* [12] và bào tử vách dày dạng cụm giống với *C. siddiquii* [13]. Hình thái hữu tính của MPL chưa được ghi nhận trong nghiên cứu này.

Đường kính tản nấm mẫu 2-Dch có khác biệt khi đặt ở các nhiệt độ khác nhau (Bảng 2). Mẫu 2-Dch sinh trưởng trong khoảng từ 25 - 37°C, trong đó đường kính tản nấm lớn nhất ở 28°C. Không ghi nhận sự gia tăng đường kính tản nấm trong 5 ngày trên PDA ở 12°C và 40°C.

**Bảng 2. Đường kính tản nấm (mm) *Curvularia* sp. (mẫu 2-Dch) trên PDA sau 5 ngày theo dõi**

| Nhiệt độ (°C) | Ngày 1     | Ngày 2     | Ngày 3     | Ngày 4     | Ngày 5     |
|---------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 12            | 0,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0  |
| 15            | 0,0 ± 0,0  | 6,3 ± 0,6  | 13,0 ± 1,0 | 18,3 ± 1,2 | 20,7 ± 0,6 |
| 20            | 3,0 ± 0,0  | 9,7 ± 0,6  | 19,3 ± 0,6 | 26,3 ± 0,6 | 33,3 ± 0,6 |
| 25            | 12,0 ± 0,0 | 24,0 ± 0,0 | 35,7 ± 1,2 | 44,7 ± 0,6 | 55,0 ± 1,0 |
| 28            | 10,5 ± 0,5 | 30,0 ± 1,0 | 43,3 ± 1,2 | 56,0 ± 1,0 | 64,0 ± 1,0 |
| 30            | 12,5 ± 0,5 | 27,7 ± 0,6 | 41,3 ± 0,6 | 52,3 ± 1,5 | 60,5 ± 0,9 |
| 35            | 7,2 ± 0,3  | 15,8 ± 0,3 | 24,7 ± 0,6 | 33,7 ± 0,6 | 42,7 ± 0,6 |
| 37            | 8,2 ± 1,0  | 12,7 ± 1,3 | 16,3 ± 1,3 | 21,0 ± 0,9 | 23,5 ± 0,5 |
| 40            | 0,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0  |

### 3.2. Khả năng gây bệnh của *Curvularia* sp. phân lập từ đốm bệnh

Bào tử của 5 MPL được lấy nhiễm trên nhánh thứ cấp của lan Phi điệp vàng. Ban đầu phần mô tại vị trí có vết thương chuyển sang màu vàng nâu, sau đó kích thước vết chũng tăng dần và phần giữa có màu

xám nâu (Hình 2). Kích thước vết chũng sau 7 ngày lây nhiễm được thể hiện trong bảng 3. Không có mô bị chuyển màu tại vị trí không vết thương và lá đối chứng. MPL từ vết chũng có đổi màu cũng có hình thái giống với mẫu nấm ban đầu, cho thấy rằng *Curvularia* sp. gây vết đốm trên lá lan Phi điệp vàng



**Hình 2. Vết chũng sau 7 ngày lây nhiễm bào tử *Curvularia* sp. (mẫu 2-Dch) trên lan Phi điệp vàng**  
a: Mặt trên lá; b: Mặt dưới lá; c: Lá đối chứng. Thanh tỷ lệ = 1 cm

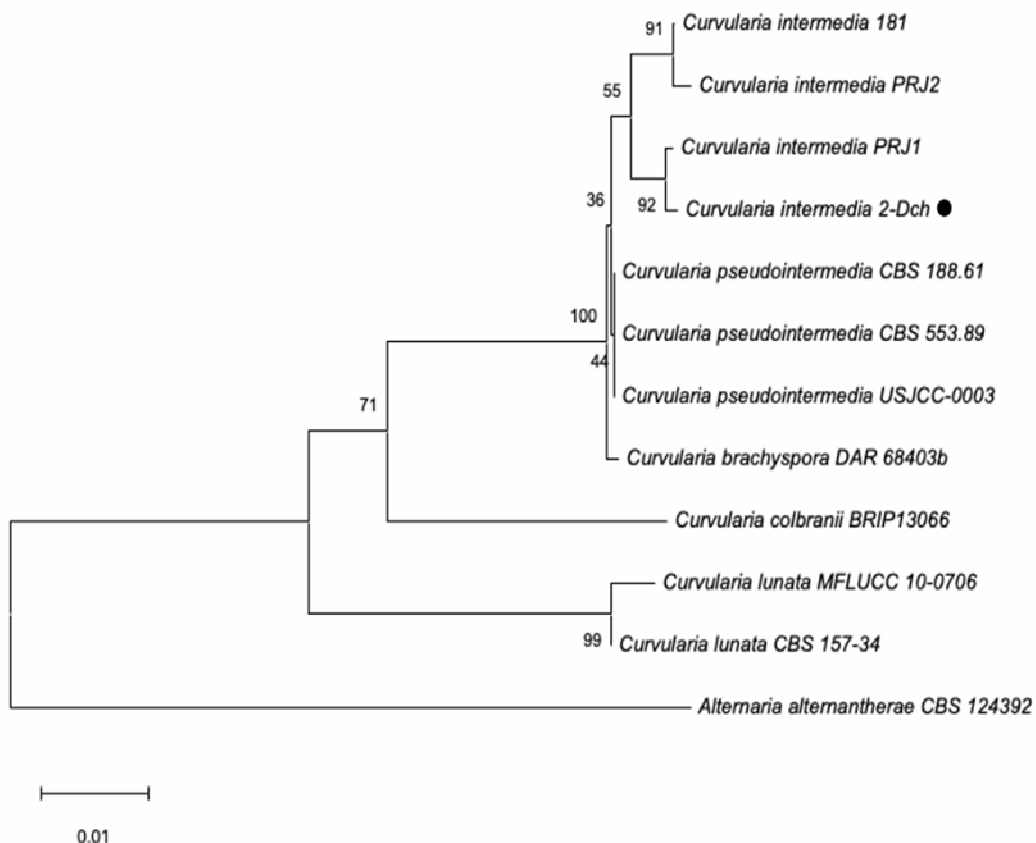
**Bảng 3. Kích thước vết chủng (mm) sau khi lây nhiễm bào tử *Curvularia* sp.**

| Mẫu nấm | Kích thước vết chủng (mm)                 |
|---------|-------------------------------------------|
| 1-Dch   | $1,7 \pm 0,1 \times 1,2 \pm 0,2$ (n = 9)  |
| 2-Dch   | $2,0 \pm 0,0 \times 1,3 \pm 0,1$ (n = 27) |
| 3-Dch   | $1,5 \pm 0,2 \times 1,2 \pm 0,2$ (n = 9)  |
| 4-Dch   | $1,5 \pm 0,2 \times 1,2 \pm 0,2$ (n = 9)  |
| 5-Dch   | $1,3 \pm 0,4 \times 1,0 \pm 0,1$ (n = 9)  |

### 3.3. Phân tích trình tự vùng ITS, TEF1, LSU của *Curvularia* sp. (mẫu 2-Dch)

Phân tích phân tử được thực hiện cho mẫu 2-Dch. Sản phẩm PCR của vùng ITS và TEF1 có kích thước 700 bp và vùng LSU có kích thước 1.000 bp. Kết quả BLAST trên NCBI cho thấy, trình tự mẫu 2-Dch có độ tương đồng 99,1% với ITS của *C. intermedia* (mã số truy cập MT605137); có độ tương đồng 97,9% với TEF1 của *C. lunata* (mã số truy cập JX266597) và có độ tương đồng 100,0% với LSU của

*C. intermedia* (mã số truy cập HG779038). Cây phân nhóm tương đồng trình tự vùng ITS giữa mẫu 2-Dch và trình tự tham chiếu được chọn lọc trên Genbank cho thấy, mẫu 2-Dch có mối tương quan gần gũi với các loài khác trong chi *Curvularia* (Hình 3). Mặc dù dữ liệu trình tự vùng TEF và LSU của loài *C. intermedia* còn khá ít trên Genbank, song việc kết hợp trình tự của cả 3 vùng gene với đặc điểm hình thái vi thể đã có thể xác định nấm gây đốm nâu trên lan Phi điệp vàng là *C. intermedia*.



**Hình 3. Phân nhóm tương đồng trình tự vùng ITS giữa mẫu 2-Dch với các trình tự tham chiếu**

Sơ đồ được vẽ bằng phương pháp nối lân cận với lặp lại 1.000 bootstrap, các số trên nhánh biểu thị % bootstrap, *Alternaria alternantherae* được dùng làm nhóm ngoài.



*Curvularia* sp. có thể được nhận diện dựa vào hình thái bào tử, tuy nhiên một số loài khó phân biệt với loài khác trong họ Pleosporaceae như: *Bipolaris* sp., *Drechslera* sp. và *Exserohilum* sp. Do đó, vẫn cần kết hợp giữa quan sát hình thái và phân tích phân tử để xác định tên loài trong chi *Curvularia*. Có nhiều tác nhân là nấm gây bệnh trên lan, nhưng nghiên cứu chỉ ra *Curvularia* sp. gây bệnh trên lan vẫn còn khá ít. Trong nghiên cứu của Alam và cs (2023) [14], lần đầu tiên *C. geniculata* được báo cáo là gây đốm lá trên họ Lan tại Ấn Độ. Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy, mẫu nấm phân lập từ vết đốm nâu trên lá lan Phi điệp vàng là *C. intermedia*, có hình thái khác với nấm *C. geniculata*. Nấm *C. intermedia* cũng được ghi nhận gây bạc lá trên cỏ *Lactuca serriola* ở Hàn Quốc [15] và cỏ tia (*Lolium multiflorum*) ở Trung Quốc [16]. Việc xác định phạm vi ký chủ của *C. intermedia* đóng góp nhiều trong việc dự báo và quản lý các rủi ro cho ngành trồng trọt và sản xuất hoa, cây cảnh.

#### **4. KẾT LUẬN**

Nấm *C. intermedia* là tác nhân gây bệnh đốm nâu trên lan Phi điệp vàng (*D. chrysanthum*) tại thành phố Hồ Chí Minh. Trình tự vùng ITS, TEF1 và LSU của *C. intermedia* (mẫu 2-Dch) đã được công bố trên Genbank với mã số truy cập lần lượt là PV133109, PV130727 và PQ882031. Nghiên cứu về phổ ký chủ và đánh giá mối nguy hại của nấm *C. intermedia* trên các loài lan khác nhau là cần thiết trong các nghiên cứu tiếp theo.

#### **LỜI CẢM ƠN**

*Xin cảm ơn các cựu sinh viên bệnh cây đã tài trợ dụng cụ, thiết bị cho nghiên cứu này.*

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. David P. Banks (1999). *Tropical Orchids of Southeast Asia*. Tuttle Publishing.
2. Bộ Khoa học và Công nghệ (2007). *Sách Đỏ Việt Nam: Danh lục các loài nguy cấp, quý, hiếm cần được ưu tiên bảo vệ - Phần II: Thực vật* (ấn bản 2). Nxb Khoa học Tự nhiên và Công nghệ.
3. Jain, A., Sarsaiya, S., Chen, J., Wu, Q., Lu, Y. & Shi, J. (2021). Changes in global Orchidaceae disease geographical research trends: Recent incidences, distributions, treatment and challenges. *Bioengineered*, 12, 13 - 29.
4. Bhatt, D. & Kumar, P. (2018). Effect of media, temperature and light wavelength on the growth of *Curvularia lunata* causing *Curvularia* leaf spot of maize. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7, 2227 - 2230.
5. Billah, M. B., Sikder, M. M., Mallik, M. R. I., Hossain, M. K. & Alam, N. (2021). Molecular characterization and vegetative growth of pathogenic seed-borne fungus, *Curvularia lunata* of tomato and its *in vitro* control measures. *International Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology*, 11, 124 - 132.
6. Yang, Y. L., Liu, Z. Y., Cai, L., Hyde, K. D., Yu, Z. N. & McKenzie, E. H. C. (2009). Colletotrichum anthracnose of Amaryllidaceae. *Fungal Diversity*, 39, 123 - 146.
7. Nakayashiki, H., Kiyotomi, K., Tosa, Y. & Mayama, S. (1999). Transposition of the retrotransposon MAGGY in heterologous species of filamentous fungi. *Genetics*, 153, 693 - 703.
8. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press.
9. O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 2044 - 2049.
10. Rehner, S. A. & Samuels, G. J. (1994). Taxonomy and phylogeny of Gliocladium analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*, 98, 625 - 634.
11. A. Sivanesan (1987). *Graminicolous species of Bipolaris, Curvularia, Drechslera, Exserohilum and their teleomorphs*. Commonwealth Mycological Institute.
12. Raza, M., Zhang, Z. F., Hyde, K. D., Diao, Y. Z. & Cai, L. (2019). Culturable plant pathogenic fungi associated with sugarcane in southern China. *Fungal diversity*, 99, 1 - 104.
13. Marin-Felix, Y., Hernandez-Restrepo, M. & Crous, P. W. (2020). Multi-locus phylogeny of the genus *Curvularia* and description of ten new species. *Mycological Progress*, 19, 559 - 588.

14. Alam, S. H., Mahapatra, S., Chakraborty, S., Hooi, A., Bhushan, B. T. & Samanta, M. (2023). First report of *Curvularia geniculata* causing leaf spot in orchid in India. *Indian Phytopathology*, 76, 943 - 945.
15. Lee, J. A., Lee, S. Y. & Choi, Y. J. (2023). Leaf blight caused by *Curvularia intermedia* on the invasive weed *Lactuca serriola* in Korea. *The Korean Journal of Mycology*, 51, 245 - 249.
16. Li, J., Li, M., Gao, X. X. & Fang, F. (2019). First report of *Curvularia intermedia* causing leaf blight on annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) in China. *Plant Disease*, 103, 582 - 585.

***Curvularia intermedia* CAUSING BROWN SPOTS ON *Dendrobium chrysanthum*  
IN HO CHI MINH CITY**

Huynh Thi Hong Phan<sup>1,2</sup>, Dang Thi Bao Quyen<sup>1,2</sup>, Nguyen Thi Ngoc Tuyen<sup>1,2</sup>,  
Vo Thi Bich Dao<sup>1,2</sup>, Dinh Quoc Toan<sup>1,2</sup>, Tran Thi Van<sup>2</sup>, Le Dinh Don<sup>1,2</sup>, Bui Cach Tuyen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University - Ho Chi Minh city

<sup>2</sup>Plant Disease Diagnostic Clinic, Research Institute for Biotechnology and Environment,  
Nong Lam University - Ho Chi Minh city

**Abstract**

*Dendrobium chrysanthum*, commonly known as Phi diep vang, is a native orchid species listed among the endangered plant groups in Vietnam. Brown spots on the leaves of *D. chrysanthum* were linked to a fungus called *Curvularia* sp., based on morphological characteristics and pathogen test. On PDA medium, the fungal isolate grew at temperatures ranging from 25°C to 30°C, with no growth observed at 12°C and 40°C. The presentative isolate (2-Dch) was subjected to PCR amplification and sequencing of the ITS, TEF1 and LSU gene regions. BLAST comparison with selected GenBank sequences confirmed the identity of the pathogen as *Curvularia intermedia*. Based on integrated evidence, *C. intermedia* is proposed as the causal agent of brown spot disease on *D. chrysanthum* cultivated in Ho Chi Minh city, Vietnam.

**Keywords:** Brown spots disease, *Curvularia intermedia*, *Dendrobium chrysanthum*, orchid.

**Ngày nhận bài:** 16/4/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 9/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 26/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 27/6/2025

# XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN GÂY BỆNH CHÁY LÁ TRÊN MAI VÀNG VÀ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM GÂY BỆNH BẰNG VẬT LIỆU NANO

Phạm Thanh Vũ<sup>1,2</sup>, Trương Vĩnh Hải<sup>1</sup>, Trần Minh Trí<sup>2</sup>, Chu Trung Kiên<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam

<sup>2</sup>Sinh viên Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh

\*Email: kien.ct@iasvn.org

## TÓM TẮT

Cháy lá là một trong ít bệnh gây hại rất nghiêm trọng trên cây mai vàng (*Ochna integerrima*) tại vùng trồng mai chủ lực của thành phố Hồ Chí Minh. Bệnh cũng là một trong những nguyên nhân dẫn đến sự lạm dụng hóa chất bảo vệ thực vật của nông hộ trong phòng trị, gây ra mối nguy rất lớn đối với môi trường sinh thái và sức khỏe cộng đồng. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định nguyên nhân gây ra bệnh cháy lá mai tại thành phố Hồ Chí Minh và hiệu quả kiểm soát mầm bệnh bằng nano AgCu và nano Cu trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả khảo sát trên vườn đã xác định được bệnh cháy lá gây hại 36% số lá mai trên cành. Kết quả định danh hình thái kết hợp áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử và kiểm chứng mầm bệnh theo quy trình Koch đã xác định *Neopestalotiopsis* sp. là nguyên nhân gây ra bệnh cháy lá mai với triệu chứng điển hình như: Vết bệnh là cá đốm tròn, màu nâu đậm, rìa gồ ghề và có quầng vàng nhạt. Vùng mô bệnh bị khô, nhưng không rách. Các quả thể màu đen hình thành và phân bố rải rác trên vết bệnh ở mặt dưới lá. Trong điều kiện phòng thí nghiệm, nano AgCu và nano Cu ở nồng độ 250 ppm và 200 ppm có khả năng ức chế hoàn toàn sự nảy mầm của bào tử *Neopestalotiopsis* sp. đến 15 giờ sau ủ.

**Từ khóa:** Bệnh cháy lá, cây mai vàng, *Neopestalotiopsis* sp., nano AgCu, nano Cu.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây mai (*Ochna* sp.) phân bố ở vùng nhiệt đới Đông Nam Á và châu Phi [1]. Tại Việt Nam, cây hoa này phân bố rộng rãi từ dãy núi Bạch Mã thuộc tỉnh Thừa Thiên Huế trở vào phía Nam và được sử dụng chủ yếu làm cảnh trong dịp tết cổ truyền của dân tộc nên có giá trị đặc biệt cả về kinh tế và xã hội. Vùng mai huyện Bình Chánh, thành phố Hồ Chí Minh là một trong những vùng trồng chủ lực không chỉ của thành phố mà còn trong cả nước. Tuy vậy, người trồng mai tại thành phố Hồ Chí Minh cũng chịu rất nhiều rủi ro, nhất là về dịch hại và ô nhiễm môi trường do hóa chất bảo vệ thực vật gây ra [2].

Cháy lá mai là một trong những bệnh hại rất quan trọng và phổ biến trên cây mai tại thành phố Hồ Chí Minh. Mầm bệnh được đề cập là do các chi nấm thuộc họ Sporocadaceae gây ra. Trong đó, *Pestalotia* sp. đã được báo cáo là nguyên nhân gây ra bệnh cháy lá mai tại thành phố Hồ Chí Minh và tỉnh An Giang dựa theo các kết quả giám định hình thái triệu chứng trên lá [3]. Sau đó, trên cơ sở hình thái bào tử chi này được chia lại thành 3 chi *Truncatella*, *Pestalotiopsis*

và *Pestalotia* dựa vào số vách ngăn trong khoảng 3 - 5 [4]. Những năm gần đây, chi *Pestalotiopsis* cũng được chia thành 3 chi là *Neopestalotiopsis*, *Pseudopestalotiopsis* và *Pestalotiopsis* trên cơ sở kết hợp giữa hình thái học và kỹ thuật sinh học phân tử [5]. Các loài *Neopestalotiopsis* spp. gần đây đã được thường xuyên báo cáo là nguyên nhân gây bệnh trên rất nhiều cây trồng ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới [6]. Do nấm này là mầm bệnh đa ký chủ [7]. Vì vậy, chi *Neopestalotiopsis* có khả năng rất cao cũng là nguyên nhân gây ra bệnh cháy lá mai tại thành phố Hồ Chí Minh.

Tại huyện Bình Chánh, thành phố Hồ Chí Minh, nông hộ thường phun định kỳ 5 - 7 ngày/lần và kết hợp nhiều loại hóa chất trừ bệnh trong cùng lần áp dụng. Do đó, mối nguy ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe cộng đồng là rất lớn và rõ ràng. Hơn nữa, sử dụng liên tục hóa chất trừ nấm bệnh cũng làm tăng nguy cơ phát sinh loài mầm bệnh mới kháng thuốc. Vì vậy, áp dụng các loại vật liệu an toàn hơn như nano đồng (CuNPs) và nano bạc-đồng (Ag-CuNPs) trong kiểm soát bệnh cháy lá

mai nhằm giảm dần việc sử dụng hóa chất trừ nấm bệnh trong sản xuất mai tại thành phố Hồ Chí Minh là rất quan trọng.

## **2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu nghiên cứu**

*Mẫu lá bệnh thu thập:* Các lá mai có vết cháy lá màu nâu đậm, không có vòng tròn đồng tâm, rìa gồ ghề với quần vàng nhạt được thu thập trên 6 vườn tại làng mai xã Bình Lợi, huyện Bình Chánh, thành phố Hồ Chí Minh. Trong đó, 3 vườn ở giai đoạn kiến thiết cơ bản (2 - 3 năm tuổi) và 3 vườn ở đầu thời kỳ kinh doanh (4 - 5 năm tuổi).

*Vật liệu nano:* Dung dịch nano bạc-đồng (Ag-CuNPs) có nồng độ gốc 820 ppm và nano đồng (CuNPs) có nồng độ gốc 950 ppm có kích thước các hạt trung bình từ 14,99 - 17,52 nm do Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng cung cấp.

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

#### **2.2.1. Khảo sát mức độ bệnh trên lá mai và thu thập mẫu bệnh**

Chọn vườn và cây mai khảo sát, thu thập mẫu được áp dụng phù hợp theo TCVN 13268-6:2022 [8]. 6 vườn khảo sát được chọn trong khu vực sản xuất mai tập trung (hơn 600 ha) với diện tích mỗi vườn tối thiểu là 1 ha. Tại mỗi vườn, 10 cây mai được chọn ngẫu nhiên phân tán trên 2 đường chéo góc và cách rìa vườn tối thiểu 2 hàng mai. Trên mỗi cây, chọn 8 cành theo 4 hướng, mỗi hướng 2 cành ở tầng giữa của cây và cách mặt đất 70 - 100 cm. Đếm toàn bộ số lá khỏe và lá bệnh của các cây mai điều tra để xác định mức độ bệnh hại trên lá. Ở cùng thời điểm khảo sát, 30 mẫu lá bị bệnh của mỗi vườn được thu thập để xác định mầm bệnh. Sau đó, ghi các thông tin thiết yếu về mẫu bệnh và bảo quản lạnh trong thùng xốp như mô tả của Chu Trung Kiên và cs (2024) [9] trước khi đem về phòng thí nghiệm. Các mẫu lá bệnh thu thập được bảo quản trong tủ mát ở 4°C khoảng 24 giờ trước khi phân lập mẫu.

#### **2.2.2. Định danh hình thái tác nhân gây bệnh trên lá**

*Phân lập mầm bệnh:* Các mẫu lá bệnh có triệu chứng như mô tả ở mục 2.1 được rửa sạch dưới vòi nước chảy trước khi các miếng mẫu bệnh có kích thước 2 x 2 mm ở vùng tiếp giáp giữa mô khỏe và mô bệnh được cắt ra và khử trùng bằng cồn 70% trong 10 giây. Sau đó, loại bỏ cồn trên các miếng mẫu bằng

nước cất tiệt trùng trước khi đặt trên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) của hãng Himedia, Ấn Độ và được ủ ở điều kiện phòng thí nghiệm với nhiệt độ khoảng 25 - 28°C. Khi hệ sợi nấm được mọc ra từ mẫu cấy, tiến hành cấy truyền miếng thạch có đỉnh sinh trưởng sang đĩa PDA mới để làm thuần. Các bước cấy miếng mẫu bệnh và cấy truyền được thực hiện trong tủ cấy sinh học cấp II.

*Định danh sơ bộ nấm bệnh dựa trên hình thái:* Quan sát và ghi nhận đặc điểm hình thái, màu sắc của hệ sợi và bào tử mầm bệnh trên môi trường PDA cấy thuần để xác định các chi nấm bệnh chính theo mô tả của Abera và cs (2016) đối với *Colletotrichum* sp. và Nozawa và cs (2019) đối với *Neopestalotiopsis* sp. [10, 11]. Sau đó, chi *Neopestalotiopsis* sp. tiếp tục được nhân nuôi duy trì trên môi trường PDA để tạo nguồn mầm bệnh sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo.

*Định danh mẫu Neopestalotiopsis sp. bằng kỹ thuật sinh học phân tử:* Mẫu *Neopestalotiopsis* sp. trên môi trường PDA ở thời điểm 7 ngày được tách chiết ADN trong định danh sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử theo mô tả của Kaur và cs (2023) [7] như sau:

*Tách chiết ADN nấm:* Mẫu (20 g) được ly giải bằng Lysis Buffer, TL buffer và CL buffer, sau đó bổ sung ethanol 96% và ủ 1 giờ. ADN được tinh sạch qua cột lọc với các bước rửa bằng WB1 và WB2 buffer, sau đó thu hồi bằng EB buffer. ADN thu được bảo quản ở -20°C.

*Thực hiện phản ứng PCR:* Vùng gen ITS được khuếch đại bằng cặp mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [12]. Mỗi phản ứng PCR được thực hiện trong tổng thể tích 50 µL gồm: 25 µL Master mix, 2 µL ITS1, 2 µL ITS4, 2 µL ADN mẫu và 19 µL nước cất. Chu trình nhiệt gồm bắt đầu là biến tính ở 95°C trong 3 phút. Sau đó là 35 chu kỳ gồm: Biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở 58°C trong 30 giây và bắt cặp ở 72°C trong 60 giây. Kết thúc là kéo dài chuỗi trình tự gen ở 72°C trong 10 phút [12].

*Kiểm tra sản phẩm PCR:* Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% nhuộm GelRed™ để kiểm tra sự hiện diện của băng ADN có kích thước mong muốn (~500 - 600 bp). Các sản phẩm PCR được gửi đến Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa để giải trình tự.

**Giải trình tự gen:** Trình tự thu được từ mẫu được so sánh với các chuỗi đã công bố trên GenBank với sự hỗ trợ của công cụ tìm kiếm BLAST tại NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) để xác định loài dựa trên mức độ tương đồng.

### **2.2.3. Kiểm chứng mẫu *Neopestalotopsis* sp. là tác nhân gây bệnh cháy lá mai theo quy trình Koch**

**Chuẩn bị lá mai chủng nhiễm:** Ba lá mai khỏe ở giai đoạn chuẩn bị thành thực (bánh tẻ) được thu thập tại vùng khảo sát và được rửa sạch dưới vòi nước chảy trước khi vô trùng bằng cồn 70% trong 10 giây. Sau đó, loại bỏ cón trên lá bằng nước cất tiệt trùng. Các lá mai được xếp ngửa ở trên một vỉ nhựa đã chuẩn bị trước trong cùng hộp nhựa sạch có kích thước chiều dài, rộng, cao tương ứng là 40 x 20 x 20 cm.

**Chuẩn bị dung dịch bào tử:** Các quả thể *Neopestalotopsis* sp. được hình thành trên môi trường PDA ở thời điểm 10 ngày sau cấy trong điều kiện phòng thí nghiệm với nhiệt độ 25 - 28°C được cho vào dung dịch nước cất tiệt trùng trong 5 phút. Sau đó, sử dụng đĩa thủy tinh sạch ấn nhẹ làm vỡ các quả thể và giải phóng các bào tử. Định lượng bào tử bằng buồng đếm hồng cầu Neubauer (Đức) trước khi bổ sung thêm nước cất và Tween 20 để thu được dung dịch  $10^6$  bào tử/mL và 1% Tween 20.

**Nhiễm bào tử lên lá mai:** Dung dịch  $10^6$  bào tử *Neopestalotopsis* sp./mL được nhỏ vào 2 vị trí ở gần phía cuống và chóp lá bằng micropipette 1.000  $\mu$ L. Mỗi vị trí nhỏ 100  $\mu$ L dung dịch huyền phù bào tử. Ở cùng thời điểm, 2 vị trí ở phía đối diện của lá được nhỏ với mỗi 100  $\mu$ L nước cất tiệt trùng. Sau đó, mỗi góc hộp được nhỏ 10 mL nước cất tiệt trùng để tạo ẩm độ và đậy kín hộp trước khi ủ ở điều kiện phòng thí nghiệm với nhiệt độ 25 - 28°C.

**Ghi nhận triệu chứng bệnh:** Các lá mai trong hộp được theo dõi hàng ngày để ghi nhận thời điểm xuất hiện triệu chứng, hình thái và màu sắc vết bệnh cũng như thời điểm quả thể hình thành trên vết bệnh. Ở thời điểm 5 ngày sau khi triệu chứng bệnh xuất hiện, 1 lá mai được lấy ra khỏi hộp và mẫu bệnh được tái phân lập và định danh mầm bệnh.

### **2.2.4. Đánh giá khả năng ức chế bào tử *Neopestalotopsis* sp. nảy mầm bằng vật liệu nano**

**Chuẩn bị dung dịch bào tử mầm bệnh:** Tương tự như mục 2.2.3 ở trước khi pha loãng thêm với nước cất tiệt trùng và 1% Tween 20.

**Bố trí thí nghiệm:** Thực hiện đồng thời 2 thí nghiệm tương ứng với hai loại nano, các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với cùng 6 nghiệm thức gồm: 5 mức nồng độ nano (50, 100, 150, 200, 250 và 300 ppm) và 1 nghiệm thức đối chứng là nước cất tiệt trùng. Mỗi nghiệm thức gồm 6 ống eppendorf 1,5 mL có chứa 1 mL dung dịch thí nghiệm tương ứng với các thời điểm theo dõi 3, 6, 9, 12 và 15 giờ sau ủ.

**Phương pháp nhiễm bào tử vào dung dịch CuNPs và Ag-CuNPs:** Bào tử *Neopestalotopsis* sp. được nhiễm với CuNPs hoặc Ag-CuNPs ở các mức nồng độ thí nghiệm theo phương pháp của Palma-Guerrero và cs (2008) [13] có cải tiến. Mỗi nghiệm thức là một bình tam giác 20 mL chứa 10 mL dung dịch CuNPs hoặc Ag-CuNPs và bào tử (9 mL CuNPs hoặc Ag-CuNPs và 1 mL dung dịch  $10^6$  bào tử). Nghiệm thức đối chứng là 9 mL nước cất và 1 mL dung dịch bào tử. Tại thời điểm 3, 6, 9, 12 và 15 giờ sau ủ, mỗi nghiệm thức lấy 1 ống eppendorf và nhỏ 1 giọt phenol cotton blue để ngưng nẩy mầm bào tử và nhuộm màu ống mầm. Sau đó, 50  $\mu$ L được lấy ra và nhỏ trên lame kính, đậy lamelle và quan sát ngẫu nhiên 50 bào tử ở độ phóng đại 100 - 400 lần bằng kính hiển vi điện tử Olympus BX41 để xác định số bào tử nẩy mầm. Bào tử được xác định nẩy mầm khi ống mầm có chiều dài tối thiểu gần bằng  $\frac{1}{2}$  chiều dài bào tử.

**Các chỉ tiêu theo dõi gồm:** Tỷ lệ nẩy mầm của bào tử (%), hiệu lực ức chế nẩy mầm bào tử (%).

Hiệu lực ức chế (H%) được tính theo công thức của Abbott (1925) [14]:  $H = (1 - D/d) \times 100$

Trong đó: d là số bào tử nẩy mầm ở nghiệm thức ủ với vật liệu nano. D là số bào tử nẩy mầm ở nghiệm thức ủ với nước cất.

### **2.3. Xử lý số liệu**

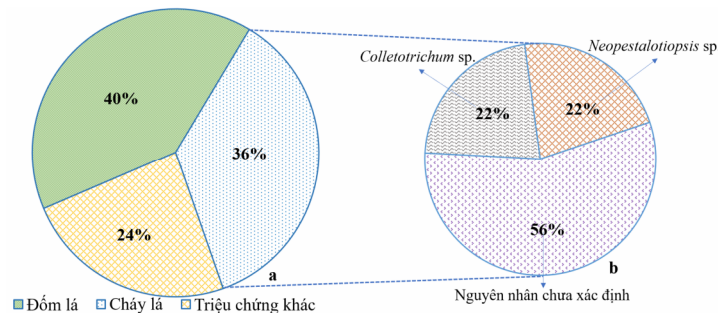
Vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2016. Giá trị trung bình của các nghiệm thức được so sánh ANOVA và xác định sự sai khác có ý nghĩa thống kê qua trắc nghiệm phân hạng LSD bằng phần mềm SPSS. So sánh mức độ tương đồng về chuỗi trình tự gen giữa mẫu *Neopetalotopsis* sp. gây bệnh cháy lá mai tại thành phố Hồ Chí Minh với một số mẫu loài gây bệnh cháy lá cây trồng ở các nước gần với Việt Nam bằng phần mềm MEGA X.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Khảo sát mức độ bệnh hại lá trên cây mai vàng tại thành phố Hồ Chí Minh

Kết quả khảo sát trên các vườn mai tại thành phố Hồ Chí Minh cho thấy, cháy và đốm lá là những bệnh hại chính trên lá mai (Hình 1a). Trong đó, cháy lá được nông hộ đánh giá là bệnh hại có sự ảnh hưởng nghiêm trọng nhất đến sinh trưởng và phát triển của cây mai trong cả mùa khô và mùa mưa. Kết quả phân lập các mẫu bệnh cháy lá mai đã xác định được 8 nhóm dạng hình tản nấm khác nhau. Các kết quả định danh hình thái sau đó đã xác định được chi

*Neopestalotiopsis* và *Colletotrichum* là những mầm bệnh chính gây ra bệnh cháy lá mai với tần suất hiện diện cùng là 22%. Sáu chi nấm khác chưa được định danh hiện diện với tần suất thấp, 8 - 16% (Hình 1b). Như vậy, cháy lá là bệnh hại rất quan trọng trên cây mai tại thành phố Hồ Chí Minh với thành phần tác nhân rất phong phú. Trong đó, *Neopestalotiopsis* sp. là mầm bệnh chính và mới gây ra triệu chứng cháy lá mai. Trước đó, *Pestalotia* sp. đã được đề cập là nguyên nhân gây ra bệnh cháy lá mai tại thành phố Hồ Chí Minh và tỉnh An Giang [3].



Hình 1. Mức độ bệnh hại lá và sự chiếm ưu thế của mầm bệnh cháy lá mai

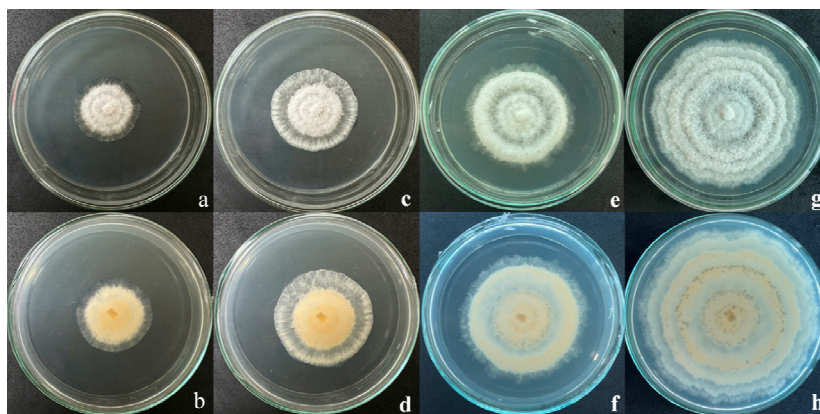
Ghi chú: a là tỷ lệ bệnh hại lá mai; b là tần suất bắt gặp của mầm bệnh chính gây bệnh cháy lá mai.

#### 3.2. Đặc điểm hình thái chính chi *Neopestalotiopsis* và kết quả định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử

##### 3.2.1. Hình thái chi *Neopestalotiopsis* trên môi trường PDA

Trên môi trường PDA, tản nấm phát triển theo các quảng tròn đồng tâm, rìa tản nấm gồ ghề. Tốc độ phát triển đạt 8 mm/ngày và tiến tới rìa đĩa petri

có đường kính 90 mm ở thời điểm 10 ngày sau cấy (NSC). Ở mặt trên thạch, hệ sợi mọc nổi, gợn sóng, dày, xốp, mịn và có màu trắng xám. Ở mặt dưới thạch, tản nấm cũng hình thành các quảng tròn đồng tâm, ban đầu có màu vàng sáng ở thời điểm 3 NSC, sau đó chuyển sang màu vàng nâu ở 4 NSC trước khi chuyển sang màu hồng nhạt từ 6 NSC (Hình 2).



$r = 17,15 \pm 0,40$  mm       $r = 22,45 \pm 0,60$  mm       $r = 29,30 \pm 1,10$  mm       $r = 40,10 \pm 1,00$  mm

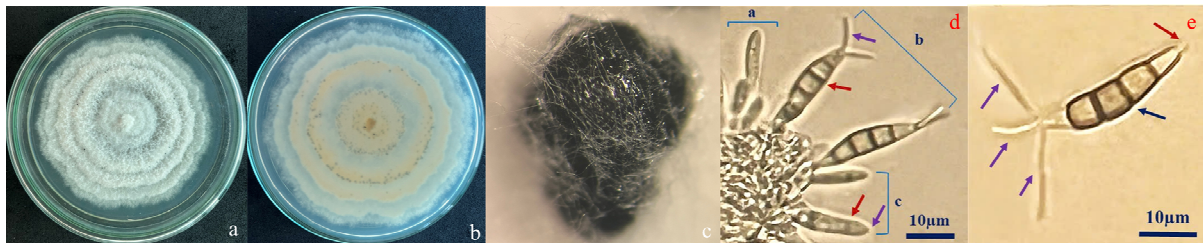
Hình 2. Hình thái và tốc độ tăng trưởng của *Neopestalotiopsis* sp. gây bệnh cháy lá mai trên môi trường PDA

Ghi chú: a, c, e và g là hệ sợi ở mặt trên thạch và b, d, f và h là mặt dưới của hệ sợi tương ứng tại thời điểm 3, 4, 6 và 9 NSC; r là giá trị trung bình của bán kính tản nấm  $\pm$  độ lệch chuẩn (SD: Standard deviation).



Các quả thể là các khối hình cầu khoảng 150 - 350  $\mu\text{m}$ , màu đen, ướt mềm bắt đầu xuất hiện trên quảng tròn đầu tiên ở 3 NSC (Hình 3 c). Sau đó, các quả thể tiếp tục hình thành theo quảng và lan dần ra phía ngoài. Đến thời điểm 9 NSC, các quả thể hình thành ban đầu đã khô cứng và các bào tử trưởng thành đã hiện diện (Hình 3 a, b, e). Bên trong quả thể, các đợt bào tử được hình thành liên tục trên các cành bào tử đã bị suy thoái mạnh. Bào tử non mới hình thành chưa có vách ngăn, màu trong suốt (Hình 3 d, cụm a). Sau đó, phát triển dần kích thước đồng thời các vách ngăn và phần phụ đỉnh cũng dần được hình thành (Hình 3 d, cụm c). Các bào tử tiền trưởng thành hình thoi, hơi cong ở giữa và đã hình thành đủ 4 vách ngăn, nhưng kích thước bào tử và chiều dài

các lông gai ở đỉnh (phần phụ đỉnh) chưa phát triển đầy đủ. Ba ngăn giữa của bào tử đã phình to, màu nâu nhạt, các lông gai ngắn (Hình 3 d, cụm b). Bào tử trưởng thành hình thoi, hơi cong, chiều dài và chiều rộng ở giữa của bào tử tương ứng là  $24,22 \pm 1,94 \mu\text{m}$  và  $7,13 \pm 0,72 \mu\text{m}$ . Bào tử có 5 ngăn rất rõ ràng, ngăn thứ nhất và thứ năm ở 2 đầu có màu trong suốt, 3 ngăn giữa có màu nâu sậm dài  $15,13 \pm 1,38 \mu\text{m}$ . Phần phủ đỉnh có 2 - 3 lông gai, không có vách ngăn và có màu trong suốt. Chiều dài lông gai gần tương đương với chiều dài bào tử,  $23,50 \pm 4,34 \mu\text{m}$ . Những đặc điểm này cho thấy, có nhiều sự tương đồng với mô tả về chi *Neopestalotiopsis* gây bệnh đốm lá trên dâu tây [15 - 17].



Hình 3. Hình thái của chi nấm *Neopestalotiopsis* sp. gây cháy lá mai tại thành phố Hồ Chí Minh

Ghi chú: a và b là tấn nấm *Neopestalotiopsis* sp. trên môi trường PDA ở mặt trước và sau tại thời điểm 9 NSC; c là quả thể; d là cụm cành bào tử (cụm a và c là bào tử non mới hình thành và bắt đầu hình thành vách ngăn, cụm b là bào tử tiền trưởng thành, mũi tên đỏ là vách ngăn, tím là phần phụ đỉnh); e là bào tử trưởng thành (mũi tên đỏ là cuống, xanh là vách ngăn, tím là lông gai). Độ phóng đại của d là 400 lần và e là 1.000 lần.

### 3.2.2. Định danh mầm bệnh cháy lá mai bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Kết quả giải trình tự gen vùng ITS với cặp môi ITS1/ITS4 được so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank tại NCBI với sự hỗ trợ của công cụ tìm

kiếm BLAST được ghi nhận ở bảng 1 cho thấy, mẫu KD có sự tương đồng với mẫu *Neopestalotiopsis* sp. NP - NS4, cao hơn so với với *Pestalotiopsis mangiferae* (mức tương đồng là 99,64% so với 98,88%, tương ứng).

Bảng 1. Kết quả tìm kiếm BLAST dựa trên trình tự vùng ITS của mẫu KD

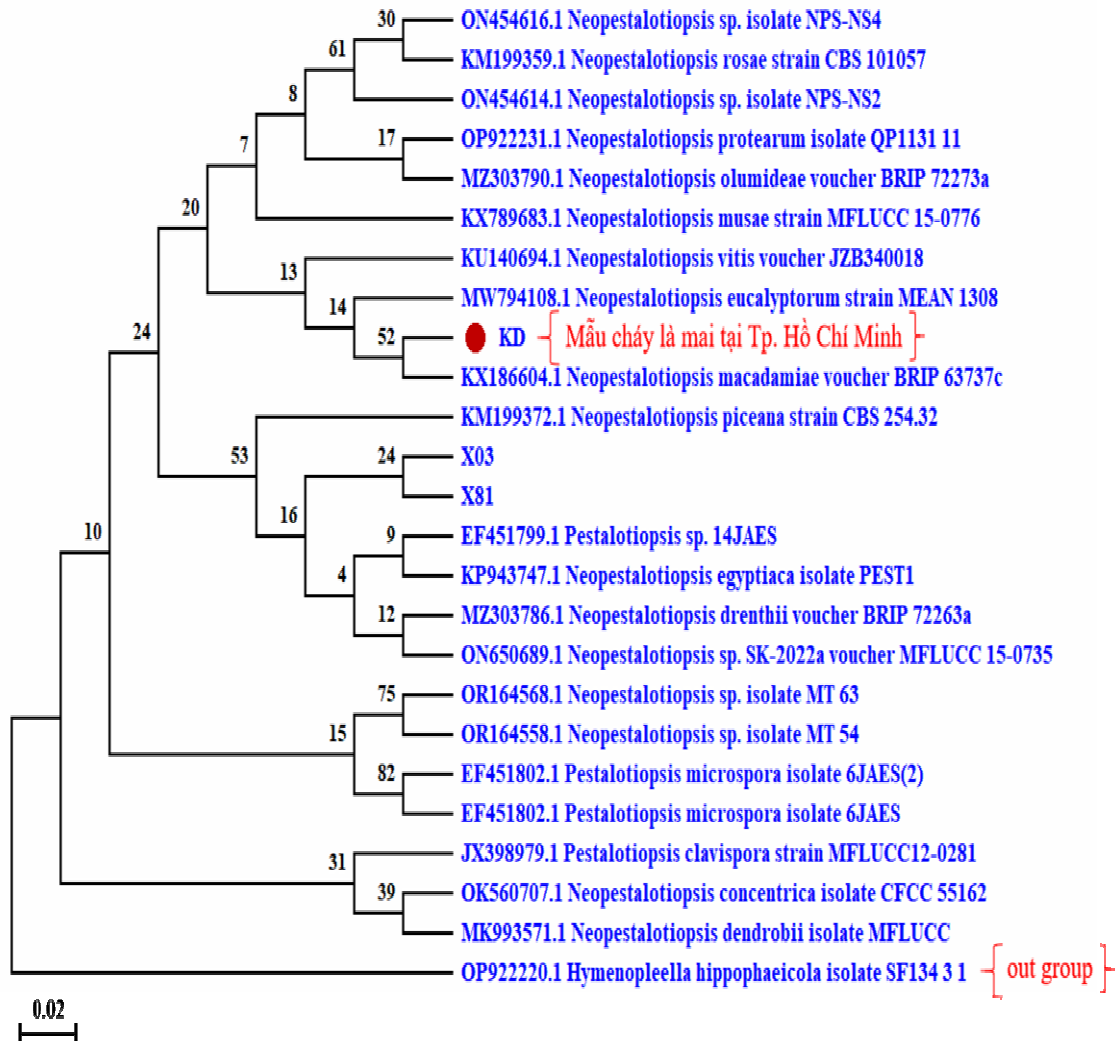
| Tên mẫu | Chi/loài                         | Chủng chuẩn | Phần trăm đoạn so sánh (%) | Mức đồng nhất (%) | Mã GenBank |
|---------|----------------------------------|-------------|----------------------------|-------------------|------------|
| KD      | <i>Neopestalotiopsis</i> sp.     | NP-NS4      | 100                        | 99,64             | ON454616.1 |
|         | <i>Pestalotiopsis mangiferae</i> | MM 102      | 100                        | 98,88             | GU722595.1 |

Kết quả so sánh trình tự gen vùng ITS của mẫu *Neopestalotiopsis* sp. gây cháy lá mai tại thành phố Hồ Chí Minh với một số chi nấm gây bệnh cháy lá, chết lá, khô bông cây trồng trong cùng họ Sporocadaceae đã được báo cáo ở các nước như: Trung Quốc, Thái Lan, Indonesia, Australia [18] và gây bệnh thối trái nhãn tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu [9]

được ghi nhận ở hình 4 cho thấy, mầm bệnh này nằm cùng cụm nhánh với các loài *Neopestalotiopsis* spp. gây bệnh cháy lá trên cây khuynh diệp, nho, chuối, hoa hồng và khô bông mắc ca tại các nước châu Á. Trong đó, mẫu mầm bệnh lá mai thuộc cùng phân nhánh gần nhất với loài *Neopestalotiopsis macadamiae* gây bệnh khô bông mắc ca tại bang

Queensland, Australia. Kết quả so sánh cũng cho thấy, mầm bệnh *Neopestalotiopsis* sp. gây cháy lá mai tại thành phố Hồ Chí Minh ở cụm phân nhánh khác với các loài *Pestalotiopsis* spp. gây bệnh thối trái nhãn Xuồng com vàng tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu

được Chu Trung Kiên và cs (2024) [9] báo cáo. Như vậy, các kết quả so sánh trình tự gen vùng ITS đã xác nhận *Neopestalotiopsis* sp. là nguyên nhân gây ra bệnh cháy lá mai tại thành phố Hồ Chí Minh.



Hình 4. So sánh trình tự vùng ITS giữa mẫu tác nhân gây bệnh cháy lá mai ở thành phố Hồ Chí Minh và tác nhân trong cùng họ Sporocadaceae gây triệu chứng cháy lá và thối trái cây trồng

Ghi chú: X03 và X81 là các loài *Pestalotiopsis* spp. gây bệnh thối trái nhãn tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu. Các mẫu còn lại gây bệnh cháy lá và chết lá trên các cây trồng khác ở châu Á.

### 3.2.3. Kiểm chứng *Neopestalotiopsis* sp. mẫu KD là tác nhân gây bệnh cháy lá mai tại thành phố Hồ Chí Minh theo quy trình Koch

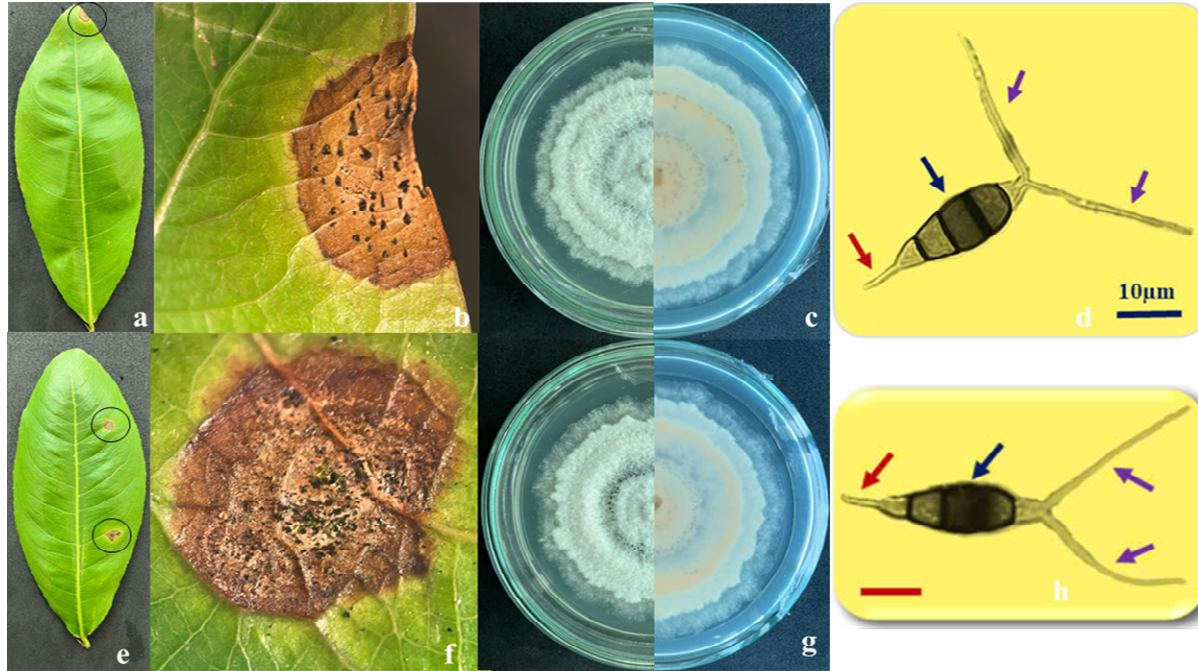
Triệu chứng bệnh trên lá mai được nhiễm với dung dịch bào tử *Neopestalotiopsis* sp. của mẫu KD trong quy trình Koch là đốm tròn màu nâu nhạt bắt đầu xuất hiện từ thời điểm 2 ngày sau nhiễm nấm. Sau đó, đốm bệnh phát triển dần và có màu nâu ở thời điểm 5 ngày sau khi triệu chứng xuất hiện (Hình 5 e). Đến thời điểm 10 ngày sau xuất hiện, đốm bệnh

có màu nâu đậm, khô, rìa gồ ghề với quang vàng nhạt. Trên vết bệnh xuất hiện các quả thể màu đen rải rác trên phần mô đã hoại tử ở vùng giữa của vết bệnh (Hình 5 f). Kết quả định danh hình thái mầm bệnh tái phân lập từ vết bệnh trong quy trình Koch đã xác nhận hệ sợi và bào tử là của *Neopestalotiopsis* sp. (Hình 5 g và h). Những đặc điểm triệu chứng vết bệnh và hình thái hệ sợi, bào tử *Neopestalotiopsis* sp. ghi nhận được trong quy trình Koch cũng rất tương đồng với vết bệnh ghi nhận được trên vườn (Hình 5 a

và b) và hình thái hệ sợi, bào tử của cùng mầm bệnh phân lập được từ mẫu bệnh cháy lá trên vườn (Hình 5 c và d).

Như vậy, các kết quả kiểm chứng mầm bệnh theo quy trình Koch đã xác nhận nấm

*Neopestalotiopsis* sp. là tác nhân gây ra triệu chứng cháy lá mai tại thành phố Hồ Chí Minh. Chi nấm này cũng được báo cáo là nguyên nhân gây ra triệu chứng cháy và đốm lá trên cây nho tại Trung Quốc, cây dâu tây tại Mỹ và cây cảnh tại Nhật Bản [10, 16, 19].



**Hình 5. Triệu chứng và hình thái hệ sợi, bào tử nấm *Neopestalotiopsis* sp. gây bệnh cháy lá mai tại thành phố Hồ Chí Minh**

Ghi chú: a-b là triệu chứng bệnh cháy lá trên vườn, c là hình thái tản nấm trên môi trường PDA ở thời điểm 8 ngày sau cấy và d là bào tử trưởng thành của nấm *Neopestalotiopsis* sp. phân lập từ mẫu bệnh trên vườn. e và f là triệu chứng bệnh trên lá mai ở thời điểm 5 và 10 ngày sau khi bệnh xuất hiện trong quy trình Koch, g và h là hình thái hệ sợi và bào tử mầm bệnh phân lập được trong quy trình Koch. Mũi tên đỏ, xanh và tím lần lượt là cuống bào tử, vách ngăn và lông gai. Thước ở hình d và h là 10  $\mu$ m.

### 3.3. Đánh giá khả năng ức chế bào tử *Neopestalotiopsis* sp. nảy mầm của vật liệu nano

Ag-CuNPs ở khoảng nồng độ 50 - 300 ppm (NT2-NT7) có khả năng làm giảm rất rõ ràng đến ức chế hoàn toàn sự nảy mầm của bào tử mầm bệnh

cháy lá mai so với đối chứng chỉ có nước cất (NT1) ở tất cả các thời điểm theo dõi. Trong đó, Ag-CuNPs ở nồng độ 250 ppm đã có khả năng ức chế hoàn toàn sự nảy mầm của bào tử *Neopestalotiopsis* sp. (Bảng 2).

**Bảng 2. Tỷ lệ bào tử *Neopestalotiopsis* sp. nảy mầm ở các nghiệm thức nhiễm Ag-CuNPs**

| Nghiệm thức | Nồng độ (ppm) | Tỷ lệ bào tử nảy mầm (%) ở các thời điểm |                    |                    |                    |
|-------------|---------------|------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|             |               | 6 giờ sau ủ                              | 9 giờ sau ủ        | 12 giờ sau ủ       | 15 giờ sau ủ       |
| NT1         | 0             | 17,33 <sup>a</sup>                       | 44,67 <sup>a</sup> | 67,33 <sup>a</sup> | 84,00 <sup>a</sup> |
| NT2         | 50            | 6,67 <sup>b</sup>                        | 23,33 <sup>b</sup> | 36,67 <sup>b</sup> | 50,00 <sup>b</sup> |
| NT3         | 100           | 4,00 <sup>bc</sup>                       | 5,33 <sup>c</sup>  | 19,33 <sup>c</sup> | 32,00 <sup>c</sup> |
| NT4         | 150           | 1,33 <sup>cd</sup>                       | 2,00 <sup>cd</sup> | 3,33 <sup>d</sup>  | 7,33 <sup>d</sup>  |

|        |     |                   |                    |                   |                   |
|--------|-----|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| NT5    | 200 | 0,67 <sup>d</sup> | 2,00 <sup>cd</sup> | 2,67 <sup>d</sup> | 4,67 <sup>d</sup> |
| NT6    | 250 | 0 <sup>d</sup>    | 0 <sup>d</sup>     | 0 <sup>e</sup>    | 0 <sup>e</sup>    |
| NT7    | 300 | 0 <sup>d</sup>    | 0 <sup>d</sup>     | 0 <sup>e</sup>    | 0 <sup>e</sup>    |
| CV (%) |     | 24,48             | 17,92              | 13,70             | 14,92             |

Ghi chú: Các giá trị trung bình của 3 lần nhắc lại được chuyển đổi sang  $(x + 0,5)^{1/2}$  trước khi xử lý thống kê. Trong cùng cột, các giá trị theo sau bởi cùng ký tự khác biệt không có ý nghĩa qua trắc nghiệm phân hạng LSD ở mức  $p = 0,01$ .

Như vậy, Ag-CuNPs ở các mức nồng độ thí nghiệm có khả năng kìm hãm sự nảy mầm của bào tử *Neopestalotiopsis* sp. là rất rõ ràng, nhất là ở các mức nồng độ  $\geq 250$  ppm. Kết quả này cũng tương đồng với

các nghiên cứu trên thế giới đã được báo cáo trước đó. Ag-CuNPs ở nồng độ 200 ppm có khả năng ức chế gần như hoàn toàn sự nảy mầm của bào tử nấm bệnh từ thời điểm 12 GSU [20, 21].

**Bảng 3. Tỷ lệ bào tử *Neopestalotiopsis* sp. nảy mầm ở các nghiệm thức nhiễm CuNPs**

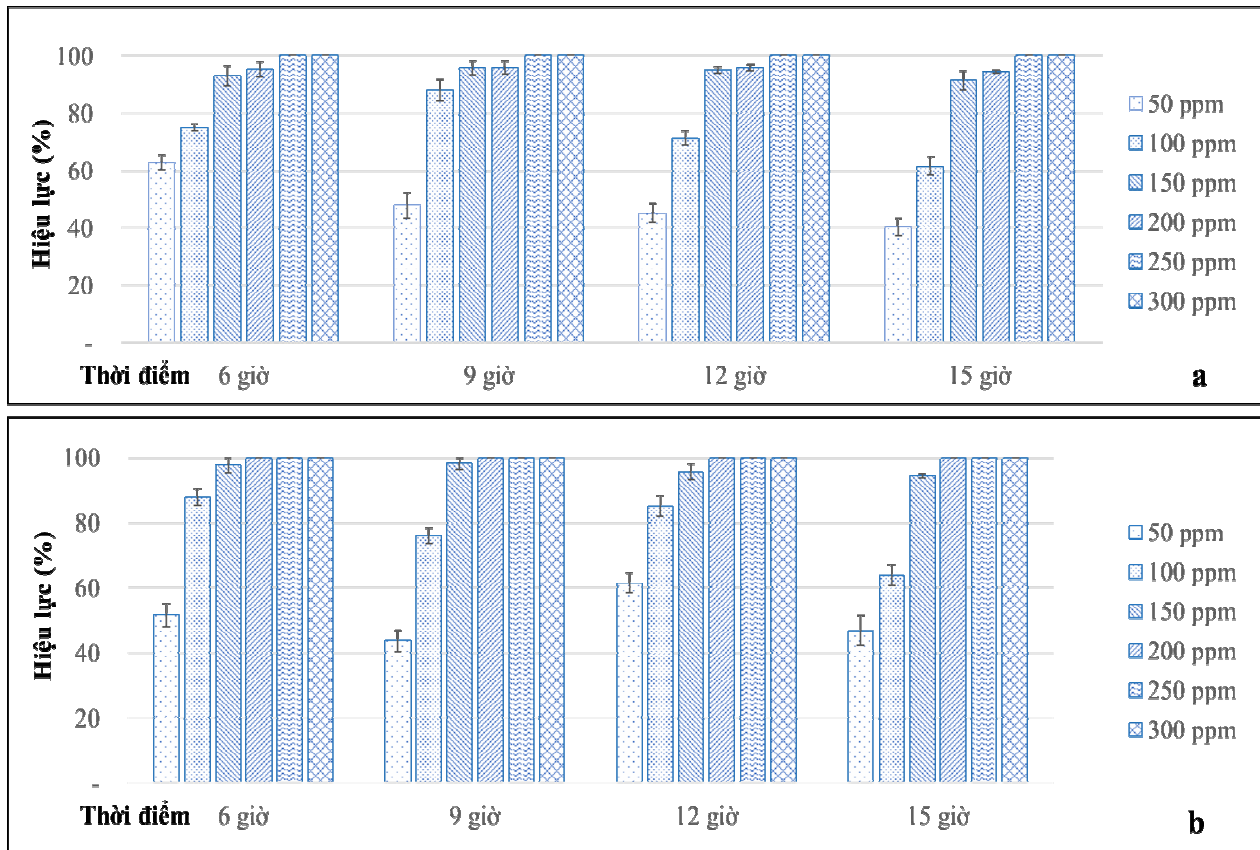
| Nghiệm thức | Nồng độ (ppm) | Tỷ lệ bào tử nảy mầm (%) ở các thời điểm |                    |                    |                    |
|-------------|---------------|------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|             |               | 6 giờ sau ủ                              | 9 giờ sau ủ        | 12 giờ sau ủ       | 15 giờ sau ủ       |
| NT1         | 0             | 24,67 <sup>a</sup>                       | 37,33 <sup>a</sup> | 76,00 <sup>a</sup> | 82,67 <sup>a</sup> |
| NT2         | 50            | 11,33 <sup>b</sup>                       | 20,67 <sup>b</sup> | 29,33 <sup>b</sup> | 44,00 <sup>b</sup> |
| NT3         | 100           | 2,67 <sup>c</sup>                        | 8,67 <sup>c</sup>  | 11,33 <sup>c</sup> | 30,00 <sup>c</sup> |
| NT4         | 150           | 0,67 <sup>cd</sup>                       | 0,67 <sup>d</sup>  | 3,33 <sup>d</sup>  | 4,67 <sup>d</sup>  |
| NT5         | 200           | 0 <sup>d</sup>                           | 0 <sup>d</sup>     | 0 <sup>e</sup>     | 0 <sup>e</sup>     |
| NT6         | 250           | 0 <sup>d</sup>                           | 0 <sup>d</sup>     | 0 <sup>e</sup>     | 0 <sup>e</sup>     |
| NT7         | 300           | 0 <sup>d</sup>                           | 0 <sup>d</sup>     | 0 <sup>e</sup>     | 0 <sup>e</sup>     |
| CV (%)      |               | 19,00                                    | 19,83              | 14,01              | 7,00               |

Ghi chú: Các giá trị trung bình của 3 lần nhắc lại được chuyển đổi sang  $(x + 0,5)^{1/2}$  trước khi xử lý thống kê. Trong cùng cột, các giá trị theo sau bởi cùng ký tự khác biệt không có ý nghĩa qua trắc nghiệm phân hạng LSD ở mức  $p = 0,01$ .

Ở cùng mức nồng độ thí nghiệm và thời điểm theo dõi, CuNPs cho thấy, có khả năng kìm hãm sự nảy mầm của bào tử *Neopestalotiopsis* sp. mạnh hơn so với Ag-CuNPs. Điều này được minh chứng khi CuNPs có khả năng ức chế hoàn toàn sự nảy mầm

của bào tử mầm bệnh này ở nồng độ 200 ppm thấp hơn mức 250 ppm của Ag-CuNPs (Bảng 3). Do đó, CuNPs đạt hiệu lực 100% ở nồng độ thấp hơn so với Ag-CuNPs (Hình 6). Điều này cũng tương tự như các kết quả nghiên cứu của Ahmed và cs (2021) [22].





Hình 6. Hiệu lực ức chế bào tử *Neopestalotiopsis* sp. nảy mầm của Ag-CuPNs (a) và CuNPs (b) ở các thời điểm 6, 9, 12, 15 giờ sau ủ

Như vậy, Ag-CuNPs và CuNPs đều có khả năng kiểm soát tốt sự nảy mầm của bào tử nấm *Neopestalotiopsis* sp. gây bệnh cháy lá mai tại thành phố Hồ Chí Minh. Điều này là do các hạt nano có khả năng phá vỡ màng tế bào, ức chế tổng hợp enzyme kích hoạt bào tử nảy mầm và gây rối loạn tổ chức nội bào [23]. Dẫn đến bào tử mầm bệnh bị suy giảm hoặc mất khả năng nảy mầm.

#### 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

##### 4.1. Kết luận

Nấm *Neopestalotiopsis* sp. là nguyên nhân gây ra bệnh cháy lá mai tại xã Bình Lợi, huyện Bình Chánh, thành phố Hồ Chí Minh.

CuNPs và Ag-CuNPs có khả năng ức chế hoàn toàn khả năng nảy mầm của bào tử *Neopestalotiopsis* sp. gây bệnh cháy lá mai ở thành phố Hồ Chí Minh ở nồng độ 200 - 250 ppm.

##### 4.2. Kiến nghị

Đánh giá hiệu lực phòng trừ bệnh cháy lá mai của Ag-CuNPs và CuNPs ở điều kiện vườn sản xuất.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Rendle, A. B. (1925) The classification of flowering plants. Vol. 2. University Press.
2. Trần Văn Mão và Nguyễn Thế Nhã (2004). Phòng trừ sâu hại cây cảnh. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
3. Nguyễn Thị Thái Sơn (2019). Khảo sát tình hình dịch hại trên cây mai tại An Giang. Tạp chí Khoa học quốc tế AGU, 25(2), 80 - 93.
4. Steyaert, R. L. (1949). Contribution à l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. et *Monochaetia* Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.). Bulletin du Jardin botanique de l'Etat, Bruxelles/Bulletin van den Rijksplantentuin, Brussel, 285 - 347.
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. Das, R., Chutia, M., Das, K. & Jha, D. K. (2010). Factors affecting sporulation of *Pestalotiopsis*

disseminata causing grey blight disease of *Persea bombycina* Kost., the primary food plant of muga silkworm. *Crop Protection*, 29(9), 963 - 968.

7. Kaur, H., Gelain, J., Marin, M. V., Peres, N. A. & Schnabel, G. (2023). Development of a molecular tool for identification of a new *Neopestalotiopsis* sp. associated with disease outbreaks on strawberry. *Plant Disease*, 107(5), 1544 - 1549.

8. Tiêu chuẩn Quốc gia Việt Nam TCVN 13268-6:2022: Điều tra sinh vật gây hại - Phần 6: Nhóm cây hoa, cây cảnh.

9. Chu Trung Kiên, Lê Phước Thanh và Nguyễn Đắc Khoa (2024). Khảo sát thành phần nấm gây bệnh thối trái nhãn tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 490, 51 - 61.

10. Abera, A., Lemessa, F. & Adunga, G. (2016). Morphological characteristics of *Colletotrichum* species associated with mango (*Mangifera indica* L.) in Southwest Ethiopia. *Food Sci. Qual. Manag*, 48, 106 - 115.

11. Nozawa, S., Seto, Y. & Watanabe, K. (2019). First report of leaf blight caused by *Pestalotiopsis chamaeropsis* and *Neopestalotiopsis* sp. in Japanese andromeda. *Journal of General Plant Pathology*, 85, 449 - 452.

12. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: A guide to methods and applications*, 18(1), 315 - 322.

13. Palma-Guerrero, J., Jansson, H. B., Salinas, J. & Lopez-Llorca, L. V. (2008). Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 541 - 553.

14. Abbott W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic entomology*, 18, 265.

15. Ayoubi, N. & Soleimani, M. J. (2016). Soleimani, strawberry fruit rot caused by *Neopestalotiopsis iranensis* sp. nov. and *N. mesopotamica*. *Current microbiology*, 72, 329 - 336.

16. Baggio, J. S., Forcelini, B. B., Wang, N. Y., Ruschel, R. G., Mertely, J. C. & Peres, N. A., (2021). Outbreak of leaf spot and fruit rot in Florida strawberry caused by *Neopestalotiopsis* spp. *Plant Disease*, 105(2), 305 - 315.

17. Rodrigues, F. A., Silva, I. T., Antunes Cruz, M. F. & Carré-Missio, V. (2014). The infection process of *Pestalotiopsis Longisetula* leaf spot on strawberry leaves. *Journal of Phytopathology*, 162(10), 690 - 692.

18. Cui, X., Hao, Z., Chen, M., Song, S., Zhang, J., Li, Y., Li, J., Liu, Y. & Luo, L. (2024). Identification and pathogenicity of *Pestalotioid* species on *Alpinia oxyphylla* in Hainan province, China. *J. Fungi*, 10(6), 371.

19. Jayawardena, R. S., Liu, M., Maharachchikumbura, S. S., Zhang, W., Xing, Q., Hyde, K. D., Nilthong, S., Li, X., Yan, J. (2016). *Neopestalotiopsis vitis* sp. nov. causing grapevine leaf spot in China. *Phytotaxa*, 258(1), 63 - 74.

20. Ghojavand, S., Madani, M. & Karimi, J. (2020). Green synthesis, characterization and antifungal activity of silver nanoparticles using stems and flowers of felty germander. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 30, 2987 - 2997.

21. Min, J. S., Kim, K. S., Kim, S. W., Jung, J. H., Lamsal, K., Kim, S. B., Jung, M. Y. & Lee, Y. S. (2009). Effects of colloidal silver nanoparticles on sclerotium-forming phytopathogenic fungi. *The Plant Pathology Journal*, 25(4), 376 - 380.

22. Ahmed, T., Ren, H., Noman, M., Shahid, M., Liu, M., Ali, M. A., Zhang, J., Tian, Y., Qi, X. & Li, B. (2021). Green synthesis and characterization of zirconium oxide nanoparticles by using a native *Enterobacter* sp. and its antifungal activity against bayberry twig blight disease pathogen *Pestalotiopsis versicolor*. *NanoImpact*, 21, 100281.

23. Nguyen, N. D., Nguyen, T. K. L., Nguyen, C. T., Le, A. Q., Cao, V. C. & Phan, P. T. (2024). Study on the preparation of bimetallic silver-copper nanoparticles by electron beam irradiation. *Nuclear Science and Technology*, 14(2), 34 - 39.



**IDENTIFICATION OF THE CAUSAL AGENT OF LEAF BLIGHT DISEASE ON *Ochna integerrima*  
AND EVALUATION OF NANO-MATERIALS FOR SPORE GERMINATION INHIBITION**

**Pham Thanh Vu<sup>1,2</sup>, Truong Vinh Hai<sup>1</sup>, Tran Minh Tri<sup>2</sup>, Chu Trung Kien<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Institute of Agricultural Sciences for Southern Vietnam*

*<sup>2</sup>Student of Nong Lam University - Ho Chi Minh city*

**Abstract**

Leaf blight is one of the most severe diseases affecting yellow apricot trees (*Ochna integerrima*) in the main cultivation areas of Ho Chi Minh city. The disease is also a significant factor leading to the overuse of chemical pesticides by farmers for prevention and treatment, posing a major threat to the ecological environment and public health. This study was conducted to identify the causal agent of leaf blight disease on *Ochna integerrima* in Ho Chi Minh city. To evaluate the effectiveness of Ag-Cu nanoparticles and copper nanoparticles in inhibiting the pathogen under laboratory conditions. Field surveys determined that leaf blight causing on 36% of the leaves on branches. Morphological identification combined with molecular biology techniques and pathogenicity confirmation via Koch's postulates identified *Neopestalotiopsis* sp. as the causal agent of the disease. Typical symptoms include circular, dark brown lesions with raised, irregular margins and a faint yellow halo. The infected tissue dries out but does not tear. Black fruiting bodies form and are scattered on the underside of the lesions. Under laboratory conditions, both Ag-Cu and Cu nanoparticles at concentrations of 250 ppm and 200 ppm respectively, completely inhibited the germination of *Neopestalotiopsis* sp. spores for up to 15 hours after incubation.

**Keywords:** *Ag-Cu nanoparticles, Cu nanoparticles, Leaf blight disease, Neopestalotiopsis sp., Ochna integerrima.*

**Ngày nhận bài:** 15/4/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 12/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 30/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 23/6/2025

# XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN TRÁI XOÀI TẠI TỈNH BÀ RỊA - VŨNG TÀU VÀ HIỆU LỰC KIỂM SOÁT MẦM BỆNH CỦA CHITOSAN VÀ NANO CHITOSAN

Phạm Minh Nhật<sup>1</sup>, Chu Trung Kiên<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Khoa học Ứng dụng HUTECH, Trường Đại học Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam

\*Email: kien.ct@iasvn.org

## TÓM TẮT

*Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư là nguyên nhân gây ra thiệt hại khoảng 30 - 60% sản lượng xoài trên thế giới. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định tác nhân gây bệnh thán thư trên trái xoài tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu và khả năng kiểm soát mầm bệnh *Colletotrichum gloeosporioides* trong điều kiện phòng thí nghiệm. Nghiên cứu gồm định danh tác nhân áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử và đánh giá hiệu lực ức chế nấm bệnh của chitosan và nano chitosan áp dụng kỹ thuật nhiễm độc môi trường. Kết quả nghiên cứu đã xác định được *C. gloeosporioides* là tác nhân gây ra bệnh thán thư trên trái xoài cát Hòa Lộc tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu. Chitosan và nano chitosan ở nồng độ 1.000 ppm có khả năng ức chế 100% số bào tử nảy mầm trong 6 giờ sau ủ. Hiệu lực ức chế sự phát triển hệ sợi *C. gloeosporioides* trên môi trường PDA của chitosan và nano chitosan ở nồng độ 2.500 ppm đạt tương ứng 49,51% và 100% ở thời điểm 5 ngày sau cấy. Nồng độ ức chế tối thiểu 90% (MIC<sub>90</sub>) số bào tử nảy mầm của chitosan và nano chitosan tương ứng là 799 ppm và 755 ppm ở thời điểm 6 giờ sau ủ. Trong khi đó, nồng độ ức chế tối thiểu 90% (MIC<sub>90</sub>) sự phát triển của đường kính tản nấm *C. gloeosporioides* của chitosan và nano chitosan, tương ứng là 4.267 ppm và 2.407 ppm ở thời điểm 5 ngày sau cấy.

**Từ khóa:** Bệnh thán thư, chitosan, *Colletotrichum gloeosporioides*, nano chitosan, trái xoài.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thán thư là một trong hai bệnh hại quan trọng trên cây xoài (*Mangifera indica*) ở cả giai đoạn trước và sau thu hoạch [1], gây thiệt hại khoảng 30 - 60% sản lượng xoài trên thế giới [2]. Bệnh được báo cáo do nhiều loài *Colletotrichum* spp. gây ra và gây hại trên rất nhiều cây trồng khác nhau ở vùng cận nhiệt đới và nhiệt đới [3]. Hiện nay, áp dụng các loại hóa chất trừ nấm để phòng trừ bệnh thán thư vẫn được thực hiện rất phổ biến trên thế giới. Việc lạm dụng thuốc trừ nấm không chỉ dẫn đến sự kháng thuốc mà còn gây tác động tiêu cực đến môi trường và sức khỏe con người [4]. Do đó, việc tìm kiếm các giải pháp kiểm soát sinh học an toàn hơn và hiệu quả đang được các nước trên thế giới quan tâm nghiên cứu.

Chitosan và nano chitosan là những hợp chất sinh học có tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát

bệnh hại thực vật nhờ khả năng kháng nấm, kháng khuẩn và kích hoạt miễn dịch thực vật. Ở nước ta, nano chitosan cũng đã được nghiên cứu sử dụng để áo trái thanh long sau thu hoạch nhằm quản lý bệnh thán thư do *C. gloeosporioides* gây ra [5]. Trước đó, nano chitosan bạc cũng được nghiên cứu sử dụng trong bảo quản trái xoài sau thu hoạch [6]. Gần đây, chitosan ở dạng nanocomposite cũng được nghiên cứu trong bảo quản trái xoài [7]. Nghiên cứu này nhằm xác định tác nhân gây bệnh thán thư trên trái xoài tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu và khả năng kiểm soát mầm bệnh *C. gloeosporioides* của vật liệu chitosan ở dạng khối và nano trong điều kiện phòng thí nghiệm.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Chitosan (CTS) điều chế theo phương pháp axit hữu cơ hóa chitin và nano chitosan (nCTS), có khối lượng phân tử trung bình và kích thước hạt 100 µm,

được điều chế theo phương pháp gel hóa ion. Các sản phẩm này được cung cấp bởi Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Nấm *C. gloeosporioides* được phân lập từ trái xoài cát Hoà Lộc bị bệnh thán thư tại xã Long Mỹ, huyện Đất Đỏ, tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu.

## **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

### **2.2.1. Phân lập và định danh tác nhân gây bệnh thán thư trái xoài**

**Phân lập mầm bệnh:** Mẫu trái xoài ở thời điểm thu hoạch có các đốm đen nhỏ rải rác ở mặt bên, thường có màu đen đậm và hơi lõm ở giữa vết bệnh được thu thập từ vườn xoài cát Hòa Lộc tại xã Long Mỹ, huyện Đất Đỏ, tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu. Mẫu được nuôi cấy trên đĩa môi trường PDA (potato dextrose agar) đặc nguội đã chuẩn bị trước và duy trì ở nhiệt độ  $28 \pm 3^\circ\text{C}$  trong thời gian 5 - 7 ngày. Các bước thực hiện từ cắt miếng mẫu bệnh đến hoàn thành việc cấy mẫu được thực hiện trong tủ cấy sinh học cấp II.

**Định danh chi nấm bệnh:** Hệ sợi nấm mọc ra từ các mẫu bệnh trên môi trường PDA được cấy truyền trên cùng môi trường để làm thuần và duy trì ở nhiệt độ  $28 \pm 3^\circ\text{C}$  cho đến 10 ngày. Quan sát, ghi nhận các đặc điểm hình thái, sự phát triển của hệ sợi và hình thái bào tử theo mô tả của Li và cs (2019) [8]. Xác định chi theo khóa phân loại của Sutton (1980) [9].

**Định danh loài mầm bệnh bằng kỹ thuật sinh học phân tử:** Chi *Colletotrichum* sp. đã xác định từ kết quả định danh hình thái được định danh đến loài bằng kỹ thuật sinh học phân tử như mô tả của Phạm Quang Huy và cs (2023) [10] với các bước sau:

- Tách chiết ADN nấm: Mỗi mẫu nấm lấy 20 g hệ sợi tươi ở trên mặt thạch PDA tại thời điểm 5 ngày sau cấy, cho vào một eppendorf 1,5 mL. Sau đó, 50  $\mu\text{L}$  dung dịch lysis buffer được thêm vào và nghiền trong 5 phút. Mẫu nghiền được ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút trước khi ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 10 phút để thu lấy phần dịch chiết bên trên. Thêm ethanol để kết tủa ADN, sau đó rửa ADN bằng cồn 70% và sấy khô chân không ở  $60^\circ\text{C}$  trong 8 - 10 phút. Sản phẩm ADN được bảo quản ở  $-20^\circ\text{C}$  với dung dịch đệm TE 0.1X cho đến khi thực hiện PCR.

- Thực hiện phản ứng PCR: Phản ứng PCR được thực hiện tại Bộ môn Công nghệ sinh học, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam với cặp mồi

ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAA CCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT GATATGC-3') [11]. Sản phẩm PCR được nhuộm bằng phẩm nhuộm loading dye và kiểm tra trên gel agarose 2%. Sản phẩm đạt yêu cầu là khi chỉ xuất hiện một băng duy nhất, băng sáng, rõ nét và đúng kích thước vùng ITS.

- Giải trình tự gen: Các sản phẩm PCR được gửi đến Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa để giải trình tự. Trình tự mẫu được so sánh với các chuỗi đã công bố trên GenBank với sự hỗ trợ của công cụ tìm kiếm BLAST tại NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) để xác định loài dựa trên mức độ tương đồng.

### **2.2.2. Lây nhiễm bệnh nhân tạo kiểm chứng tác nhân gây bệnh theo quy trình Koch [1]**

Mầm bệnh *Collectotrichum* sau khi đã xác định loài được nhiễm trên 3 trái xoài khỏe ở giai đoạn thu hoạch và đã vô trùng trong điều kiện phòng thí nghiệm với nhiệt độ  $28 \pm 3^\circ\text{C}$ . Quan sát, ghi nhận đặc điểm vết bệnh trên trái xoài ở thời điểm 24, 48, 72 giờ sau ủ. Trái xoài bị bệnh ở thời điểm 72 giờ sau ủ được tái phân lập và giám định hình thái để xác nhận mầm bệnh *C. gloeosporioides*. Mầm bệnh này tiếp tục được nhân nuôi duy trì để làm nguồn bệnh cho các thí nghiệm tiếp theo.

### **2.2.3. Đánh giá ảnh hưởng của CTS và nCTS đến sự nảy mầm và phát triển ống mầm bào tử nấm *C. gloeosporioides***

**Chuẩn bị mầm bệnh:** Nấm *C. gloeosporioides* được nhân sinh khối trên môi trường PDA và kiểm tra mật số bào tử bằng buồng đếm hồng cầu Neubauer (Đức) để xác định mật số.

**Bố trí thí nghiệm:** Thực hiện đồng thời 2 thí nghiệm tương ứng với hai loại chitosan, các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với cùng 6 nghiệm thức gồm 5 mức nồng độ từ 200 -1.000 ppm, mỗi mức chênh lệch là 200 ppm và 1 nghiệm thức đối chứng là nước cất tiệt trùng. Mỗi nghiệm thức gồm 2 ống eppendorf 1,5 mL có chứa 1 mL dung dịch thí nghiệm, tương ứng với 2 thời điểm theo dõi 6 và 12 giờ sau ủ.

**Phương pháp nhiễm bào tử vào dung dịch CTS và nCTS:** Bào tử *C. gloeosporioides* được nhiễm với CTS và nCTS theo phương pháp của Ogundana và cs (1970) [12] có cải tiến. Mỗi nghiệm thức được bố trí trong một bình tam giác 20 mL chứa 10 mL dung dịch CTS hoặc nCTS và bào tử (9 mL CTS hoặc nCTS

và 1 mL bào tử với mật số  $1 \times 10^6$  bào tử/mL) ở các nồng độ thí nghiệm. Nghiệm thức đối chứng là 9 mL nước cất và 1 mL dung dịch bào tử. Các chỉ tiêu theo dõi gồm: Tỷ lệ nảy mầm của bào tử (%), chiều dài của ống mầm ( $\mu\text{m}$ ), hiệu lực ức chế nảy mầm bào tử (%) và nồng độ ức chế tối thiểu 90% bào tử *C. gloeosporioides* nảy mầm ( $\text{MIC}_{90}$ ).

#### 2.2.4. Ảnh hưởng của CTS và nCTS đến đường kính tản nấm *C. gloeosporioides*

**Cơ sở xác định nồng độ thí nghiệm:** Các kết quả thí nghiệm ức chế sự nảy mầm của bào tử *C. gloeosporioides* đã xác định được  $\text{MIC}_{90}$  của CTS là 799 ppm và 1.135 ppm, nCTS là 755 ppm và 1.008 ppm, tương ứng ở thời điểm 6 giờ và 12 giờ sau ủ.

**Bố trí thí nghiệm:** Hai thí nghiệm được bố trí đồng thời theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), mỗi thí nghiệm gồm 6 nghiệm thức (5 mức nồng độ là 500, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500 ppm và 1 nghiệm thức đối chứng PDA thuần), lặp lại 5 lần nhắc lại tương ứng với 5 đĩa thạch 90 mm.

**Nhiễm CTS, nCTS vào môi trường PDA và cấy nấm:** Môi trường PDA (40 g/L) sau khi hấp diệt trùng được để nguội đến  $80^\circ\text{C}$  trước khi bổ sung CTS hoặc nCTS ở các mức nồng độ thí nghiệm. Tiến hành đo đường kính tản nấm trên các đĩa PDA thí nghiệm ở các thời điểm 5 và 10 ngày sau cấy nấm. Mỗi đĩa đo đường kính theo 2 đường vuông góc ở tâm đĩa.

**Các chỉ tiêu theo dõi:** Đường kính tản nấm (mm), hiệu lực ức chế sự phát triển của tản nấm (%) và nồng

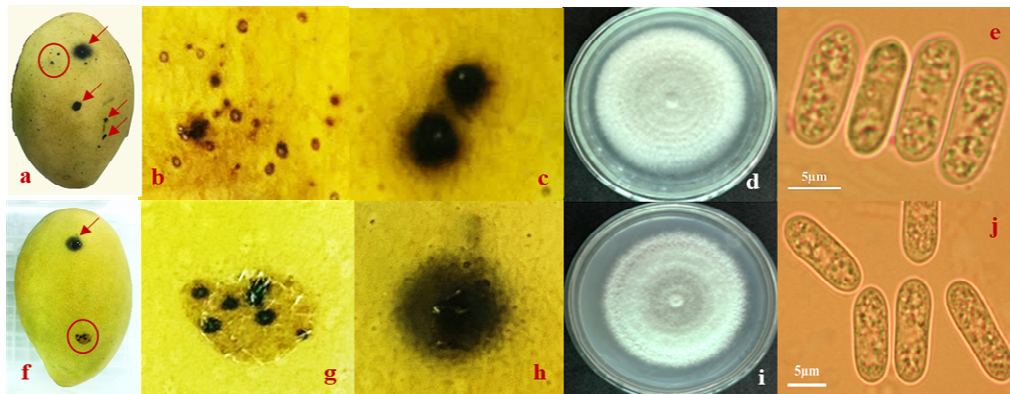
độ ức chế tối thiểu 90% đường kính tản nấm *C. gloeosporioides* ( $\text{MIC}_{90}$ ).

**Xử lý số liệu:** Các số liệu được phân tích biến lượng ANOVA và trắc nghiệm LSD ở mức ý nghĩa 99% bằng phần mềm R và biểu đồ được vẽ bằng phần mềm Excel 16.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Xác định loài mầm bệnh thán thư trái xoài cát Hòa Lộc tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu

Triệu chứng điển hình và hình thái chính của mầm bệnh thán thư trên trái xoài được ghi nhận ở hình 1 cho thấy, vết bệnh đặc trưng bởi các đốm đen hiện diện rải rác ở cả hai mặt bên của trái, màu đen đậm và hơi lõm ở giữa (Hình 1a). Vết bệnh ban đầu là các đốm nhỏ dưới 1 mm, xuất hiện rải rác, có màu nâu và phát triển chậm (Hình 1b). Sau đó, các vết bệnh phát triển nhanh dần thành các đốm tròn có màu đen đậm và hơi lõm ở giữa (Hình 1c). Triệu chứng vết bệnh trong quy trình Koch cũng rất tương đồng với ở mẫu trái thu được trên vườn (Hình 1f). Vết bệnh tại vị trí được gây vết thương bắt đầu xuất hiện từ thời điểm 30 giờ sau ủ, ban đầu là một đốm tròn màu đen. Sau đó, lan rộng đều ra xung quanh tạo thành một đốm tròn có đường kính 5 mm với tâm hơi lõm xuống ở thời điểm 48 giờ (Hình 1h). Trong khi đó, vết bệnh hình thành ở vị trí không gây tổn thương hiện diện chậm hơn 10 giờ, là các đốm nhỏ màu đen rời rạc có đường kính khoảng 1 mm ở thời điểm 48 giờ sau ủ (Hình 1g).



**Hình 1. Hình thái chính của bệnh thán thư trên trái xoài cát Hòa Lộc và mầm bệnh *Colletotrichum* sp. trên môi trường PDA**

**Ghi chú:** a-e: Triệu chứng bệnh thán thư và hệ sợi, bào tử *Colletotrichum* sp. từ mẫu trái xoài trên vườn; a là các giai đoạn phát triển của vết bệnh, b là vết bệnh ban đầu, c là vết bệnh xuất hiện được 3 ngày, d và e là hệ sợi và bào tử mầm bệnh trên PDA ở 10 ngày sau cấy. f-j: Triệu chứng và mầm bệnh tương ứng trong quy trình Koch. Mũi tên đen là các vết bệnh đang phát triển và vòng tròn đen là các vết bệnh mới hình thành. Thước ở hình e và f là  $5 \mu\text{m}$ .

Trên môi trường PDA, hệ sợi của mẫu Co.BR1 phân lập từ trái xoài thu thập trên vườn mọc nổi trên mặt thạch, ban đầu có màu trắng xám, xốp và mịn. Sau đó, tản nấm phát triển chậm theo các vòng tròn đồng tâm, hệ sợi chuyển dần sang màu xám từ vùng tâm đĩa thạch ra ngoài. Các sợi nấm tiến tới rìa đĩa petri 90 mm ở thời điểm 10 ngày sau cấy truyền (Hình 1d). Mặt sau của thạch nấm có màu xám đen ở tâm. Các bào tử có hình trụ, hai đầu tròn tù, không có

vách ngăn và màu trong suốt (Hình 1e và Bảng 1). Kích thước chiều dài trung bình là  $11,13 \pm 1,67 \mu\text{m}$  và chiều rộng là  $4,57 \pm 0,32 \mu\text{m}$  (Bảng 1). Mẫu mầm bệnh Co.BR2 được phân lập từ triệu chứng vết bệnh hình thành trong quy trình Koch có những đặc điểm hình thái hệ sợi và bào tử tương tự như mẫu Co.BR1 (Hình 1-j và bảng 1). Kích thước chiều dài trung bình là  $11,50 \pm 1,31 \mu\text{m}$  và chiều rộng là  $4,50 \pm 0,20 \mu\text{m}$  (Bảng 1).

**Bảng 1. Đặc điểm hình thái chính bào tử *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trái xoài cát Hòa Lộc tại huyện Đất Đỏ, tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu.**

| Mẫu    | Chiều dài ( $\mu\text{m}$ ) | Chiều rộng ( $\mu\text{m}$ ) | Số vách ngăn | Hình dạng            | Màu sắc    |
|--------|-----------------------------|------------------------------|--------------|----------------------|------------|
| Co.BR1 | $11,13 \pm 1,67$            | $4,57 \pm 0,32$              | 0            | Hình trụ, hai đầu tù | Trong suốt |
| Co.BR2 | $11,50 \pm 1,31$            | $4,50 \pm 0,20$              | 0            | Hình trụ, hai đầu tù | Trong suốt |

*Ghi chú: Co.BR1 là mẫu mầm bệnh phân lập được từ trái xoài bị bệnh thán thư thu thập trên vườn. Co.BR2 là mẫu mầm bệnh phân lập được từ trái xoài bị bệnh trong quy trình Koch. Giá trị trong cột là trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn.*

Những đặc trưng của vết bệnh trên trái xoài và đặc điểm hình thái chính của mẫu mầm bệnh Co.BR1 và Co.BR2 cho thấy, các mẫu nấm thu được trên quả xoài tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu thuộc về chi *Colletotrichum* gây bệnh thán thư theo khóa phân loại của Sutton (1980) [9] và kết quả nghiên cứu của Ayantu Tucho và cs (2014) [2] về triệu chứng như: Các đốm tròn màu đen đậm, tâm vết bệnh lõm, tròn hoặc không đồng đều và có màu xám. Về đặc điểm của nấm: Tản nấm có màu trắng xám đến xám đen ở giữa. Bào tử hình trụ, màu trong suốt và hai đầu tròn tù. Kích thước chiều dài và rộng tương ứng của mẫu

CGm-FR là  $12,3 \times 4,42 \mu\text{m}$  và mẫu CBK-FR là  $12,37 \times 5,75 \mu\text{m}$ .

Kết quả giải trình tự gen vùng ITS1-5.8S-ITS2 với cặp mồi ITS1/ITS4 được so sánh với cơ sở dữ liệu vùng ITS trên GenBank tại NCBI với sự hỗ trợ của công cụ tìm kiếm BLAST cho thấy, nấm bệnh ở mẫu Co.BR1 có mức tương đồng cao nhất với loài *C. gloeosporioides*, mẫu AUCG05 gây bệnh thán thư trên trái xoài tại Ấn Độ với mức đồng nhất trình tự 98,28% (Bảng 2). Kết quả này đã xác nhận, *C. gloeosporioides* là loài tác nhân gây ra bệnh thán thư trên trái xoài cát Hòa Lộc tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu.

**Bảng 2. Kết quả tìm kiếm BLAST dựa trên trình tự vùng ITS của mẫu Co.BR1**

| Tên mẫu | Loài                      | Chứng chuẩn | Phần trăm đoạn so sánh (%) | Mức đồng nhất trình tự (%) | Mã GenBank |
|---------|---------------------------|-------------|----------------------------|----------------------------|------------|
| Co.BR1  | <i>C. gloeosporioides</i> | AUCG05      | 99                         | 98,28                      | PQ801657.1 |
|         | <i>C. gloeosporioides</i> | F3          | 98                         | 98,08                      | MK787242.1 |
|         | <i>C. kahawae</i>         | XSD2        | 99                         | 98,15                      | MW202334.1 |

### 3.2. Đánh giá ảnh hưởng của CTS và nCTS đến sự nảy mầm và phát triển ống mầm của bào tử *C. gloeosporioides*

Kết quả thí nghiệm cho thấy, tỷ lệ bào tử nảy mầm ở các nghiệm thức nhiễm CTS và nCTS thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với ở nghiệm thức đối chứng chỉ nhiễm nước cất ở tất cả các thời điểm theo dõi. Trong

đó, CTS và nCTS ở nồng độ 600 - 1.000 ppm có khả năng ức chế rất tốt khả năng nảy mầm của bào tử mầm bệnh này trong khoảng 6 giờ sau ủ. Đến thời điểm 12 giờ sau ủ, các ống mầm của bào tử *C. gloeosporioides* ở các nghiệm thức nhiễm CTS và nCTS đã phát triển mạnh, nhất là ở các mức nồng độ thấp dưới 800 ppm (Bảng 3).

**Bảng 3. Ảnh hưởng của CTS và nCTS đến tỷ lệ nảy mầm và chiều dài ống mầm của bào tử *C. gloeosporioides***

| Nồng độ<br>(ppm)    | Chitosan            |                    |                        |                    | Nano chitosan      |                    |                        |                     |
|---------------------|---------------------|--------------------|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------|---------------------|
|                     | Tỷ lệ nảy mầm (%)   |                    | Chiều dài ống mầm (µm) |                    | Tỷ lệ nảy mầm (%)  |                    | Chiều dài ống mầm (µm) |                     |
|                     | 6 giờ               | 12 giờ             | 6 giờ                  | 12 giờ             | 6 giờ              | 12 giờ             | 6 giờ                  | 12 giờ              |
| 200                 | 26,67 <sup>b</sup>  | 80,00 <sup>b</sup> | 9,73 <sup>ab</sup>     | 18,87 <sup>b</sup> | 18,89 <sup>b</sup> | 68,89 <sup>b</sup> | 7,36 <sup>b</sup>      | 18,43 <sup>b</sup>  |
| 400                 | 18,89 <sup>bc</sup> | 66,67 <sup>b</sup> | 7,50 <sup>ab</sup>     | 18,05 <sup>b</sup> | 13,33 <sup>b</sup> | 54,44 <sup>c</sup> | 7,44 <sup>b</sup>      | 17,45 <sup>b</sup>  |
| 600                 | 8,89 <sup>cd</sup>  | 55,56 <sup>c</sup> | 7,11 <sup>ab</sup>     | 16,77 <sup>b</sup> | 5,56 <sup>c</sup>  | 33,33 <sup>d</sup> | 7,11 <sup>b</sup>      | 14,73 <sup>bc</sup> |
| 800                 | 3,33 <sup>de</sup>  | 31,11 <sup>d</sup> | 5,33 <sup>b</sup>      | 11,89 <sup>c</sup> | 3,33 <sup>c</sup>  | 25,56 <sup>d</sup> | 4,33 <sup>c</sup>      | 11,81 <sup>c</sup>  |
| 1.000               | 0 <sup>e</sup>      | 21,11 <sup>e</sup> | 0 <sup>c</sup>         | 9,98 <sup>c</sup>  | 0 <sup>d</sup>     | 12,22 <sup>e</sup> | 0 <sup>d</sup>         | 8,86 <sup>d</sup>   |
| Nước cất            | 51,11 <sup>a</sup>  | 98,89 <sup>a</sup> | 16,05 <sup>a</sup>     | 26,06 <sup>a</sup> | 51,11 <sup>a</sup> | 98,89 <sup>a</sup> | 16,05 <sup>a</sup>     | 26,06 <sup>a</sup>  |
| CV (%)              | 18,07               | 4,82               | 20,76                  | 4,13               | 8,71               | 4,20               | 3,70                   | 3,98                |
| LSD <sub>0,01</sub> | 1,73                | 0,93               | 1,41                   | 0,44               | 0,77               | 0,73               | 0,24                   | 0,42                |

Ghi chú: Giá trị của các lần nhắc lại được chuyển sang dạng  $(x + 0,5)^{1/2}$  trước khi xử lý thống kê. Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng ký tự khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua trắc nghiệm phân hạng LSD ở mức ý nghĩa 99%.

Hiệu lực ức chế bào tử *C. gloeosporioides* nảy mầm của CTS và nCTS trong khoảng nồng độ 800 - 1.000 ppm ở mức rất cao, 93,45 - 100% và cao hơn có ý nghĩa thống kê so với các mức nồng độ dưới 600 ppm trong 6 giờ sau khi ủ. Sau đó, hiệu lực đã giảm mạnh và ở mức thấp, nhất là ở các nghiệm thức nhiễm CTS và nCTS với nồng độ dưới 600 ppm (Bảng 4).

**Bảng 4. Hiệu lực ức chế bào tử *C. gloeosporioides* nảy mầm của CTS và nCTS**

| Nồng độ<br>(ppm)    | Hiệu lực của chitosan (%) |                     | Hiệu lực của nano chitosan (%) |                     |
|---------------------|---------------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|
|                     | 6 giờ sau ủ               | 12 giờ sau ủ        | 6 giờ sau ủ                    | 12 giờ sau ủ        |
| 200                 | 47,02 <sup>c</sup>        | 19,16 <sup>c</sup>  | 63,10 <sup>c</sup>             | 30,23 <sup>d</sup>  |
| 400                 | 62,80 <sup>bc</sup>       | 32,57 <sup>bc</sup> | 73,51 <sup>bc</sup>            | 44,98 <sup>c</sup>  |
| 600                 | 77,98 <sup>ab</sup>       | 43,79 <sup>b</sup>  | 84,82 <sup>b</sup>             | 66,25 <sup>b</sup>  |
| 800                 | 93,75 <sup>a</sup>        | 68,58 <sup>a</sup>  | 93,45 <sup>ab</sup>            | 74,14 <sup>ab</sup> |
| 1.000               | 100 <sup>a</sup>          | 78,66 <sup>a</sup>  | 100 <sup>a</sup>               | 87,62 <sup>a</sup>  |
| CV (%)              | 13,84                     | 13,37               | 6,32                           | 8,67                |
| LSD <sub>0,01</sub> | 24,12                     | 14,82               | 11,97                          | 12,00               |

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng ký tự khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua trắc nghiệm phân hạng LSD ở mức ý nghĩa 99%.

Như vậy, CTS và nCTS với nồng độ khoảng 800 - 1.000 ppm có khả năng ức chế rất hiệu quả sự nảy mầm và phát triển ống mầm của bào tử *C. gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên trái xoài tại



tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu. Hoạt tính kháng nấm của CTS thể hiện qua nhiều cơ chế khác nhau. Thứ nhất, CTS mang điện tích dương tiếp xúc với màng tế bào nấm mang điện tích âm đã tạo ra tương tác tĩnh điện, dẫn đến rò rỉ nội bào và gây chết tế bào nấm [5]. Hơn nữa, CTS còn có khả năng xâm nhập vào tế bào nấm và tạo liên kết với ADN, RNA, gây ra sự ức chế quá trình sao chép và phiên mã, ngăn chặn sự phát triển và sinh sản của nấm [13]. Trong khi đó, nCTS tồn tại dưới dạng kích thước nano giúp tăng diện tích bề mặt tiếp xúc, cải thiện hiệu quả tương tác với màng tế bào nấm, dẫn đến khả năng kháng nấm mạnh mẽ hơn [14].

### 3.3. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của CTS và nCTS đến sự phát triển hệ sợi của *C. gloeosporioides*

CTS có khả năng kìm hãm sự phát triển hệ sợi của *C. gloeosporioides*, do đó đường kính tán nấm ở các nghiệm thức nhiễm loại vật liệu này đã duy trì ở mức thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với trên môi trường PDA thuần đến thời điểm 10 ngày sau cấy nấm. Trong đó, CTS ở mức nồng độ 2.000 – 2.500 ppm có khả năng kìm hãm tốt hơn so với ở các mức nồng độ khác. Do đó, hiệu lực của các mức nồng độ này cao hơn có ý nghĩa thống kê so với ở các mức nồng độ thấp hơn (Bảng 5).

**Bảng 5. Ảnh hưởng của CTS đến sự phát triển hệ sợi của nấm *C. gloeosporioides***

| Nghiệm thức         | Đường kính tán nấm (mm) |                    | Hiệu lực ức chế (%) |                    |
|---------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
|                     | 5 NSC                   | 10 NSC             | 5 NSC               | 10 NSC             |
| PDA + CTS500        | 45,38 <sup>b</sup>      | 73,75 <sup>b</sup> | 10,57 <sup>e</sup>  | 11,55 <sup>d</sup> |
| PDA + CTS1000       | 41,87 <sup>c</sup>      | 63,13 <sup>c</sup> | 17,48 <sup>d</sup>  | 24,29 <sup>c</sup> |
| PDA + CTS1500       | 33,75 <sup>d</sup>      | 62,50 <sup>c</sup> | 33,48 <sup>c</sup>  | 25,04 <sup>c</sup> |
| PDA + CTS2000       | 27,63 <sup>e</sup>      | 60,25 <sup>d</sup> | 45,54 <sup>b</sup>  | 27,74 <sup>b</sup> |
| PDA + CTS2500       | 25,63 <sup>f</sup>      | 57,25 <sup>e</sup> | 49,51 <sup>a</sup>  | 31,33 <sup>a</sup> |
| PDA                 | 50,75 <sup>a</sup>      | 83,38 <sup>a</sup> |                     |                    |
| CV (%)              | 1,17                    | 0,55               | 2,78                | 2,33               |
| LSD <sub>0,01</sub> | 1,14                    | 0,95               | 1,98                | 1,27               |

*Ghi chú: CTS là chitosan, NSC là ngày sau cấy. Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng ký tự khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua trắc nghiệm phân hạng LSD ở mức ý nghĩa 99%.*

nCTS cho thấy có khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi *C. gloeosporioides* tốt hơn so với CTS ở cùng các mức nồng độ thí nghiệm. Ở mức nồng độ 2.000 - 2.500 ppm, nCTS đã ức chế rất mạnh sự phát triển của tán nấm *C. gloeosporioides* và hiệu lực ức chế

của vật liệu này ở mức cao hơn rất rõ ràng so với ở các mức nồng độ thấp hơn và CTS ở cùng nồng độ. Trong đó, nCTS ở nồng độ 2.500 ppm đạt hiệu lực 100% (Bảng 6).

**Bảng 6. Ảnh hưởng của nCTS đến sự phát triển hệ sợi của nấm *C. gloeosporioides***

| Nghiệm thức    | Đường kính tán nấm (mm) |                    | Hiệu lực ức chế (%) |                    |
|----------------|-------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
|                | 5 NSC                   | 10 NSC             | 5 NSC               | 10 NSC             |
| PDA + nCTS 500 | 41,25 <sup>b</sup>      | 69,88 <sup>b</sup> | 18,69 <sup>e</sup>  | 16,32 <sup>e</sup> |

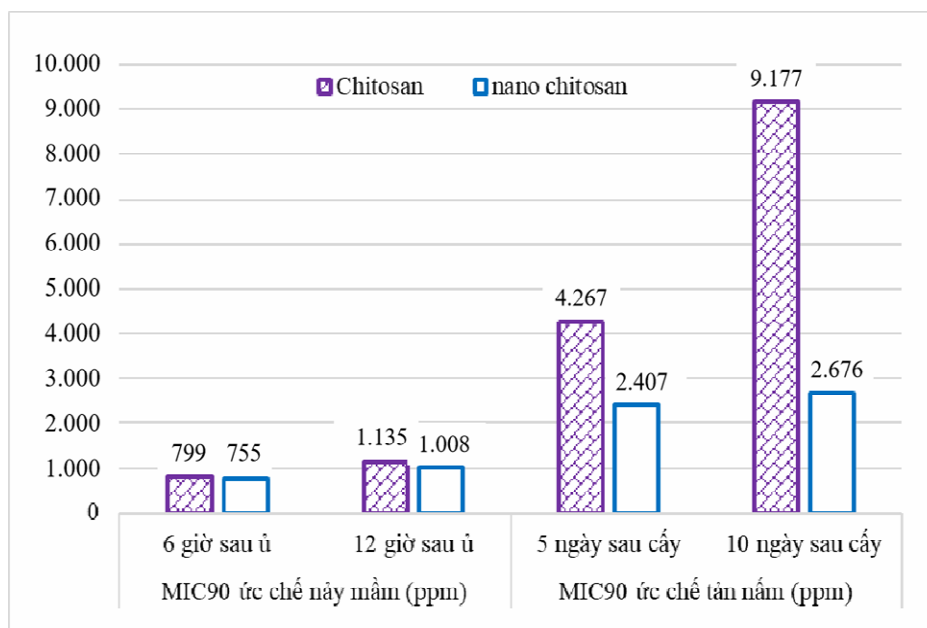
|                     |                    |                    |                    |                    |
|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| PDA + nCTS 1.000    | 32,88 <sup>c</sup> | 55,13 <sup>c</sup> | 35,22 <sup>d</sup> | 33,98 <sup>d</sup> |
| PDA + nCTS 1.500    | 25,50 <sup>d</sup> | 53,50 <sup>d</sup> | 49,74 <sup>c</sup> | 35,93 <sup>c</sup> |
| PDA + nCTS 2.000    | 16,00 <sup>e</sup> | 42,63 <sup>e</sup> | 68,47 <sup>b</sup> | 48,95 <sup>b</sup> |
| PDA + nCTS 2.500    | 0 <sup>f</sup>     | 0 <sup>f</sup>     | 100 <sup>a</sup>   | 100 <sup>a</sup>   |
| PDA                 | 50,75 <sup>a</sup> | 83,50 <sup>a</sup> |                    |                    |
| CV (%)              | 0,64               | 0,09               | 1,74               | 0,20               |
| LSD <sub>0,01</sub> | 0,08               | 0,02               | 2,16               | 0,21               |

Ghi chú: nCTS là nano chitosan, giá trị đường kính tán nấm của các lần nhắc lại được chuyển sang dạng  $(x + 0,5)^{1/2}$  trước khi xử lý thống kê. Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng ký tự khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua trắc nghiệm phân hạng LSD ở mức ý nghĩa 99%.

Như vậy, ở các mức nồng độ 2.000 - 2.500 ppm, nCTS cho thấy, có khả năng ức chế rất tốt sự phát triển của hệ sợi nấm bệnh *C. gloeosporioides* và cao hơn so với CTS. Một số nghiên cứu trên thế giới đã báo cáo rằng, trên cùng môi trường, CTS ở nồng độ 1.000 - 2.000 ppm đã ức chế được 9,10 - 45,55% đường kính tán nấm *C. gloeosporioides* [15]. Ở nồng độ 500 - 1.000 ppm, nCTS có khả năng ức chế 100% sự phát triển của nấm *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans* [16]. Các nghiên cứu trên sử dụng nCTS ở khối lượng phân tử thấp và kích thước hạt khoảng 40 - 70 nm nên hiệu lực ức chế cao hơn so với nCTS có

khối lượng phân tử trung bình và kích thước hạt 100 nm trong nghiên cứu này.

Phân tích nồng độ ức chế tối thiểu 90% (MIC<sub>90</sub>) cho thấy, nCTS có khả năng ức chế tốt hơn so với CTS, nhất là khả năng ức chế sự phát triển của hệ sợi nấm bệnh. Ngoài ra, CTS và nCTS gây ảnh hưởng đến quá trình nảy mầm của bào tử *C. gloeosporioides* tốt hơn so với ức chế sự phát triển của hệ sợi nấm (Hình 2). Như vậy, nghiên cứu này đã cho thấy, nCTS có khả năng kiểm soát tốt mầm bệnh *C. gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên trái xoài tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu.



Hình 2. Nồng độ ức chế tối thiểu 90% (MIC<sub>90</sub>) số bào tử nảy mầm và sự phát triển của đường kính tán nấm *C. gloeosporioides*

**4. KẾT LUẬN**

Loài *Colletotrichum gloeosporioides* là tác nhân gây ra bệnh thán thư trái xoài cát Hòa Lộc tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu.

Nano chitosan ở nồng độ 800 - 1.000 ppm có khả năng kiểm soát hiệu quả sự nảy mầm và phát triển ống mầm của bào tử *Colletotrichum gloeosporioides*.

Nồng độ nano chitosan ức chế tối thiểu 90% (MIC<sub>90</sub>) số bào tử *Colletotrichum gloeosporioides* nảy mầm trong 12 giờ sau ủ là 1.008 ppm và sự phát triển của hệ sợi trong 10 ngày sau cấy là 2.676 ppm.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Alam, A., Adhikary, S. K. and Ahmed, M. (2017). Morphological characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* identified from anthracnose of *Mangifera indica* L.. *Asian J. Plant Pathol*, 11: 102 - 117.
2. Ayantu Tucho, A. T., Fikre Lemessa, F. L. and Gezahegn Berecha, G. B. (2014). Distribution and occurrence of mango anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz and Sacc) in humid agro-ecology of southwest Ethiopia. *Plant Pathology Journal*, 13(4): 268 - 277.
3. Da Silva, C. d. F. B and Michereff, S. J. (2013). Biology of *Collectotrichum* spp. and epidemiology of the anthracnose in tropical fruit trees. *Revista Caatinga*, 26(4): 130 - 138.
4. Da Silva, D. D., Crous, P. W., Ades, P. K., Hyde, K. D. and Taylor, P. W. (2017). Life style of *Collectotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal biology reviews*, 31(3): 155 - 168.
5. Lê Hoàng Thanh Vy, Nguyễn Thị Xuân, Phan Thị Bảo Vy (2016). *Nghiên cứu khả năng ứng dụng màng nano chitosan trong bảo quản thanh long*. Đề tài nghiên cứu khoa học cấp Trường Cao đẳng nghề thành phố Hồ Chí Minh.
6. Nguyễn Hoàng Đình Tuấn (2014). Nghiên cứu chế tạo màng chitosan-nano bạc và bước đầu thử nghiệm trong bảo quản xoài cát Hòa Lộc. Luận án Tiến sĩ ngành Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ, 1 - 2.
7. Phạm Thị Lan, Phạm Thị Thanh Hương, Đỗ Thu Hương (2022). Nghiên cứu chế tạo lớp phủ nanocomposite từ chitosan ứng dụng bảo quản quả xoài. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 36: 18 - 26.
8. Li, Q., Bu J., Shu J., Yu Z., Tang L., Huang S., Guo T., Mo J., Luo S., Solangi G.S. and Hsiang T. (2019). *Colletotrichum* species associated with mango in Southern China. *Scientific reports*, 9(1): 1 - 10.
9. Sutton, B. C. (1980). *The coelomycetes: Fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK: 1 - 696.
10. Phạm Quang Huy, Hồ Mạnh Tường, Trần Thị Hoa, Nguyễn Thị Hồng Hà, Lê Văn Mạnh, Chu Hoàng Hà và Đỗ Tiến Phát (2023). *Phân lập và định danh nấm Collectotrichum gloeosporioides gây bệnh thán thư trên cây cam tại Cao Phong, Hoà Bình*. Hội thảo Quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam lần thứ 22: 163 - 170.
11. White, T., J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics. *PCR protocol: A guide to methods and application*, 18(1): 315 - 322.
12. Ogundana, S., Naqvi, S. and Ekundayo, J. (1970). Fungi associated with soft rots and yams (*Dioscorea* spp.) in storage in Nigeria. *Transactions of the British Mycological Society*, 54(3): 445 - 451.
13. Badawy, M., E. and Rabea, E., I. (2011). A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their application in crop protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 1: 1 - 30.
14. Dutta, P., Tripathi, S., Mehotta, G. and Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food application. *Food chemistry*, 114(4): 1173 - 1182.
15. Živković, S., Stevanović, M., Đurović, S., Ristić, D. and Stošić, S. (2018). Antifungal activity of chitosan against *Alternaria alternata* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Pesticidi i fitomedicina*, 33(3-4): 197 - 204.
16. El Mohamedya, R., Abd El-Aziz, M. and Kamel, S. (2019). Antifungal activity of chitosan nanoparticles against some plant pathogenic fungi *in vitro*. *Agric. Eng. Int. CRGRJ*, 21(4): 201 - 209.

IDENTIFICATION OF THE AGENT CAUSING ANTHRACNOSE DISEASE ON MANGO FRUIT  
IN BA RIA - VUNG TAU PROVINCE AND EFFICACY OF CHITOSAN  
AND CHITOSAN NANOPARTICLES AGAINST THE PATHOGEN

Pham Minh Nhut<sup>1</sup>, Chu Trung Kien<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Hutech Institute of Applied Sciences, HUTECH University*

<sup>2</sup>*Institute of Agricultural Sciences for Southern Vietnam*

**Abstract**

*Colletotrichum* spp. causing anthracnose disease are responsible for approximately 30 - 60% of global mango yield losses. This study aimed to identify the pathogen of anthracnose on mangoes in Ba Ria – Vung Tau province and to evaluate the efficacy of chitosan and chitosan nanoparticles against *Colletotrichum gloeosporioides* under laboratory conditions. The research contents consisted of species identification using molecular biology techniques and assessment of the antifungal activity of chitosan and chitosan nanoparticles through the medium toxicity method. The results confirmed *C. gloeosporioides* as the pathogen causing anthracnose symptom on Hoa Loc mango fruits in Ba Ria - Vung Tau province. Both chitosan and chitosan nanoparticles with a concentration of 1000 ppm completely inhibited spore germination within 6 hours of infection. Furthermore, at a concentration of 2500 ppm, chitosan and chitosan nanoparticles prevented 49.51% and 100% of mycelial growth on PDA medium at 5 days after culture, respectively. The minimum inhibitory concentration required to achieve 90% inhibition (MIC<sub>90</sub>) of spore germination was 799 ppm for chitosan and 755 ppm for chitosan nanoparticles. Regarding mycelial growth inhibition, the MIC<sub>90</sub> values for chitosan and chitosan nanoparticles, respectively, were 4267 ppm and 2407 ppm after 5 days of culture.

**Keywords:** *Anthraxnose disease, chitosan, chitosan nanoparticles, Colletotrichum gloeosporioides, mango fruit.*

**Ngày nhận bài:** 8/4/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 9/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 29/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 23/6/2025

# XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN GÂY BỆNH THỐI TRÁI MÍT VÀ BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ THUỐC HÓA HỌC PHÒNG TRỪ TÁC NHÂN GÂY BỆNH

Huỳnh Thị Thông<sup>1</sup>, Phạm Văn Lực<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thùy Dương<sup>1</sup>,

Đoàn Thị Kiều Tiên<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thu Nga<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Bảo vệ Thực vật, Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

\*Email: nttnga@ctu.edu.vn

## TÓM TẮT

Mít (*Artocarpus heterophyllus*) là cây ăn trái được trồng phổ biến ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới trên thế giới. Nghiên cứu thực hiện nhằm xác định chính xác tác nhân gây bệnh thối trái và bước đầu tìm ra thuốc hóa học trong ức chế tác nhân gây bệnh. Mít có triệu chứng thối trái được thu thập tại huyện Cái Bè, tỉnh Tiền Giang dựa vào hình thái và kỹ thuật sinh học phân tử khuếch đại vùng gen 18S với cặp mồi phổ thông ITS1/ITS4 xác định tác nhân gây bệnh là loài *Lasiodiplodia theobromae*. Bên cạnh đó, xác định được 8 loại trái cây (ổi Lê, ổi Nữ Hoàng, quýt đường, bơ sáp, chôm chôm, chuối già Nam Mỹ, đu đủ, xoài cát Hòa Lộc) là ký chủ của nấm *Lasiodiplodia theobromae*. Trong 13 loại thuốc thí nghiệm ghi nhận được 3 loại thuốc Dithane M45 80WP (mancozeb), Folicur 430SC (tebuconazol) và Dailora 25EC (prochloraz) có hiệu quả ức chế đối với nấm *Lasiodiplodia theobromae*.

**Từ khóa:** *Lasiodiplodia theobromae*, trái mít, thối trái, thuốc hóa học, cây ăn trái.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mít là cây ăn trái được phát triển mạnh và trồng phổ biến ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới như: Thái Lan, Việt Nam, Philippines, Indonesia, Malaysia, Bangladesh, Ấn Độ, Nepal, Sri Lanka, Trung Quốc, Myanmar, Úc, Canada, Nhật Bản, New Zealand và Hoa Kỳ [1, 2]. Theo Cục Trồng trọt đến năm 2020, diện tích cây mít ở ĐBSCL đã đạt trên 30.000 ha, tập trung ở Tiền Giang, Hậu Giang. Riêng tại Tiền Giang, gần đây địa phương này có diện tích trồng cây mít tăng mạnh. Hiện Tiền Giang có khoảng 15.000 ha đất trồng mít, trong đó cây đang trong thời kỳ kinh doanh là khoảng 11.000 ha [3]. Trong canh tác cây mít, sự xuất hiện của các tác nhân gây bệnh đã gây ảnh hưởng không nhỏ đến tuổi thọ và năng suất của cây mít, chúng gây ra các triệu chứng như: Cháy lá, đốm lá, cháy ngọn, nứt thân chảy nhựa và đặc biệt là thối trái. Tổng sản lượng mít bị suy giảm ở giai đoạn sau thu hoạch tại Bangladesh và Sri Lanka lần lượt là 38% và 70%, nguyên nhân chính gây suy giảm là do thối trái và đang được các nước trên thế giới ghi nhận là mầm bệnh quan trọng trên mít [4]. Tại Việt Nam, các nghiên cứu về tác nhân gây bệnh thối trái mít còn rất hạn chế. Từ đó cản trở không nhỏ cho công tác chẩn đoán bệnh và quản lý thành công bệnh hại này,

do đó nghiên cứu xác định tác nhân gây bệnh thối trái mít được thực hiện với mục đích xác định chính xác tác nhân gây bệnh thối trái mít và bước đầu tuyển chọn thuốc hóa học trong phòng trừ bệnh.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Xác định tác nhân gây bệnh thối trái mít

**Phân lập tác nhân gây bệnh:** Trái mít có triệu chứng thối điển hình thu thập tại huyện Cái Bè, tỉnh Tiền Giang được quan sát dưới kính hiển vi và ghi nhận triệu chứng, mầm bệnh. Phân lập theo phương pháp của Burgess và cs (2009) [5], mẫu bệnh được khử trùng bằng cồn 70°, cắt nơi tiếp giáp giữa mô bệnh và mô khỏe, nuôi cấy trên môi trường Potato Dextrose Agar (PDA). Quan sát sự phát triển của tơ nấm, tách dòng và trữ nguồn ở 4°C làm vật liệu cho nghiên cứu tiếp theo.

**Thực hiện quy trình Koch's:** Trái mít sạch bệnh ở giai đoạn trước thu hoạch 1 tuần được khử trùng bằng dung dịch chlorine 1%. Đặt 3 khoanh khuôn ty nấm (d = 4 mm) phân lập được trên môi trường PDA ở 3 ngày tuổi lên bề mặt vỏ trái vừa tạo vết thương, giữ ẩm mẫu trong bọc ni lông với 4 lần lặp lại và 2 lần đối chứng. Quan sát và ghi nhận triệu chứng bệnh hàng ngày, tái phân lập tác nhân gây bệnh trên môi trường thạch PDA, so sánh đặc điểm, hình thái so với

nguồn nấm bệnh chủng nhiễm ban đầu và so sánh triệu chứng lây nhiễm với mẫu nhiễm bệnh tự nhiên.

**Xác định tác nhân dựa vào hình thái:** Quan sát màu sắc, hình dạng bào tử và các đặc điểm phân loại khác dưới kính hiển vi và ghi nhận sự phát triển của sợi nấm qua các thời điểm 12, 24, 36 giờ.

**Xác định tác nhân dựa vào kỹ thuật sinh học phân tử.** Nấm bệnh được nuôi trong môi trường PDA lỏng 3 ngày, sau đó sợi nấm được thu và ly trích ADN bằng phương pháp CTAB của Doyle và Doyle (1987) [6]. Dựa trên nguyên tắc khuếch đại vùng 18S rDNA. Với mỗi xuôi ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTG CGG3') và mỗi ngược ITS4 (5'TCCTCCGCT TATT GATATGC3') theo chu trình nhiệt, 95°C trong 5 phút (1 chu kỳ); 95°C trong 30 giây; 58°C trong 30 giây và 72°C trong 30 giây (35 chu kỳ); 10°C trong vòng 20 phút (1 chu kỳ) và trữ sản phẩm PCR ở 4°C. Sản phẩm được giải trình tự nucleotide và trình tự được so sánh với trình tự trong cơ sở dữ liệu đã được công bố nhờ công cụ tìm kiếm BLAST tại NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Kết quả giải trình tự được thực hiện phân tích loài bằng phần mềm MEGA 11 [7], phân tích bằng Maximum Likelihood dưới mô hình tiến hóa Tamura - Nei với hệ số Bootstrap 1.000 của ADN [8].

**Đánh giá phổ ký chủ của mầm bệnh:** Tám loại trái cây (ổi Lê, ổi Nữ Hoàng, quýt đường, bơ sáp, chôm chôm, chuối già Nam Mỹ, đu đủ, xoài cát Hòa Lộc) trưởng thành được thu thập ở nhiều địa điểm khác nhau và tạo ba vết thương lên bề mặt mỗi trái. Đặt khoanh khuẩn ty nấm bệnh (d = 4 mm) nuôi cấy trên môi trường PDA ở 3 ngày tuổi vào vị trí vừa tạo vết thương trên bề mặt mỗi trái với 2 lần lặp lại. Quan sát triệu chứng và xác định sự tương thích ký chủ dựa trên khả năng gây hoại tử mô trái của nấm bệnh.

## 2.2. Đánh giá hiệu lực của một số loại thuốc hóa học đối với tác nhân gây bệnh thối trái mít điều kiện phòng thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố với 14 nghiệm thức tương ứng với 13 loại thuốc được thử nghiệm (Bảng 1) và 1 đối chứng trên môi trường PDA không có dung dịch thuốc với 4 lần lặp lại. Hòa thuốc trừ nấm theo khuyến cáo của nhà phân phối thuốc vào bình tam giác có chứa 100 mL môi trường PDA 1,5%, lắc đều. Đặt khoanh nấm bệnh (d = 4 mm) được nuôi cấy trên môi trường PDA ở 3 ngày vào tâm đĩa petri chứa 10 mL thạch hòa thuốc trừ nấm, theo dõi, ghi nhận đường kính nấm và hiệu suất ức chế (HSÚC) vào các thời điểm 1, 3, 5, 7 ngày sau khi cấy (NSKC).

**Bảng 1. Các loại thuốc dùng trong thí nghiệm**

| STT | Tên thuốc          | Hoạt chất                               | Liều lượng/100 ml |
|-----|--------------------|-----------------------------------------|-------------------|
| 1   | Nativo 750WG       | Tebuconazole<br>Trifloxystrobin         | 0,03 g            |
| 2   | Dithan M45 80WP    | Mancozeb                                | 0,33 g            |
| 3   | Metaxyl 500WP      | Metalaxyl                               | 0,10 g            |
| 4   | Coc 85WP           | Copper Oxychloride                      | 0,31 g            |
| 5   | Cabrio Top 600WG   | Metiram<br>Pyraclostrobin               | 0,30 g            |
| 6   | Polyram 800WG      | Metiram                                 | 0,31 g            |
| 7   | Amistar 250SC      | Azoxystrobin                            | 70 µl             |
| 8   | Daconil 50SC       | Chlorothalonil                          | 125 µl            |
| 9   | Score 250EC        | Difenoconazole                          | 70 µl             |
| 10  | Anvil 5SC          | Hexaconazole                            | 250 µl            |
| 11  | Folicur 430SC      | Tebuconazole                            | 50 µl             |
| 12  | Dailora 25EC       | Prochloraz                              | 275 µl            |
| 13  | Dung dịch Bordeaux | CuSO <sub>4</sub> , Ca(OH) <sub>2</sub> | 1%                |

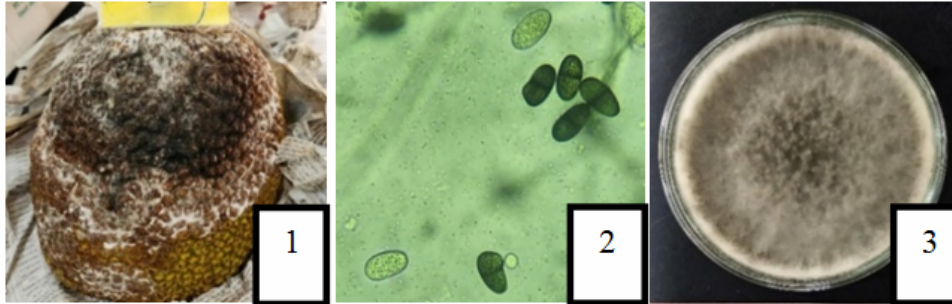


### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Xác định tác nhân gây bệnh thối trái mít

Trái bệnh khi thu về lúc đầu trên vỏ có nhiều vết bệnh màu nâu, được phủ bởi tơ nấm màu trắng, vết bệnh phát triển rất nhanh và lan ra xung quanh, tơ nấm phủ trên bề mặt dần chuyển từ màu trắng sáng màu xám và đen, quan sát dưới kính hiển vi có sự xuất hiện của bào tử nấm. Kết quả phân lập ghi nhận

được 1 chủng nấm (Hình 1). Ở thời điểm 3 ngày sau lây nhiễm (NSLN) bệnh bắt đầu phát triển, vùng xung quanh vết thương chuyển từ màu xanh sang màu vàng nâu, thời điểm 4 NSLN (Hình 2) trái có mùi chín, vết bệnh phát triển rộng hơn, tơ nấm phát triển dày đặc và lan rộng. Sau 7 NSLN bề mặt vết bệnh chuyển sang màu đen và quan sát thấy bào tử nấm.



Hình 1. Triệu chứng bệnh thối trái mít và hình thái nấm phân lập được từ vết bệnh

Ghi chú: (1): Triệu chứng thối trên trái, (2): Bào tử nấm quan sát được, (3): Hình thái nấm phân lập từ vết bệnh.

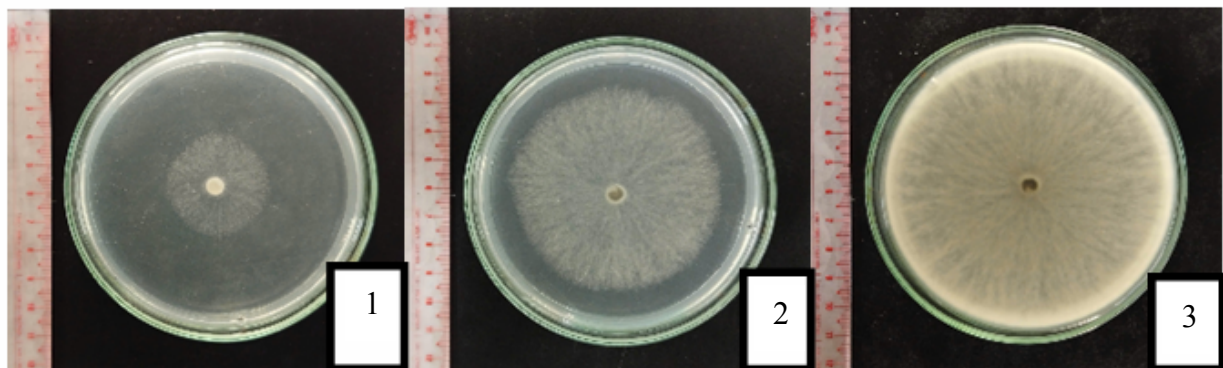


Hình 2. Triệu chứng trái mít nhiễm bệnh ở thời điểm 4 NSLN khi thực hiện quy trình Koch's và hình thái nấm tái phân lập trên môi trường PDA từ quy trình Koch's

Ghi chú: (1): Nghiệm thức đối chứng, (2): Nghiệm thức nhiễm bệnh, (3): Nấm chủng nhiễm ban đầu, (4): Nấm tái phân lập.

Trên môi trường thạch PDA, nấm bệnh được tái phân lập từ vết bệnh có màu trắng, xốp, mịn và dày. Các sợi nấm phát triển rất nhanh, trong 36 giờ sau khi cấy ở điều kiện phòng tơ nấm phát triển tiến tới

riêng đĩa thạch có kích thước 90 mm (Hình 3). Những đặc điểm trên rất tương đồng so với mẫu nấm được phân lập từ vết bệnh dùng thực hiện quy trình Koch's ban đầu.



Hình 3. Sự phát triển của nấm gây bệnh thối trái mít qua các thời điểm

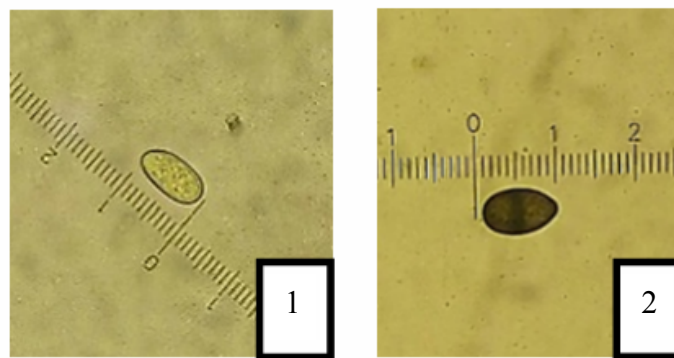
Ghi chú: (1): Thời điểm 12 giờ, (2): Thời điểm 24 giờ, (3): Thời điểm 36 giờ.

**Bảng 2. Đường kính nấm gây bệnh thối trái mít qua các thời điểm khảo sát**

| Thời gian      | Đường kính trung bình (mm) $\pm$ SD |
|----------------|-------------------------------------|
| 12 giờ sau cấy | $32 \pm 1,1$                        |
| 24 giờ sau cấy | $66 \pm 1,4$                        |
| 36 giờ sau cấy | $90 \pm 0,0$                        |

Ghi chú: Đường kính nấm được biểu diễn bằng trung bình của 5 lần lặp lại cộng trừ cho độ lệch chuẩn (SD).

Bào tử nấm bệnh được hình thành trong quả thể vô tính (pycnidium) sau 14 - 16 ngày nuôi cấy trên môi trường thạch PDA. Các bào tử chưa trưởng thành có hình elip đến oval, trong suốt, đơn bào không có vách ngăn, kích thước trung bình đo được của 50 bào tử chưa trưởng thành ngẫu nhiên dài  $24,6 \pm 1,27 \mu\text{m}$ , rộng  $13,3 \pm 1,18 \mu\text{m}$ , tỷ lệ dài/rộng là 1,85 lần. Bào tử trưởng thành hình elip đến oval tương tự như bào tử chưa trưởng thành, có màu nâu đến nâu đen, với một vách ngăn ở giữa, kích thước trung bình đo được của 50 bào tử trưởng thành ngẫu nhiên dài  $25,9 \pm 2,19 \mu\text{m}$ , rộng  $14,5 \pm 1,45 \mu\text{m}$ , tỷ lệ dài/rộng là 1,79 lần.

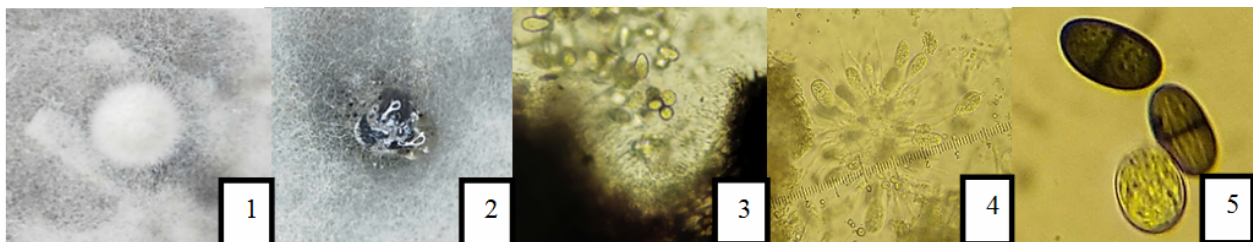


**Hình 4. Bào tử nấm gây bệnh thối trái mít quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 40X**

Ghi chú: (1) Bào tử chưa trưởng thành, (2): Bào tử trưởng thành.

Từ hình thái cho thấy, nấm gây bệnh thối trái mít rất tương đồng với chi *Lasiodiplodia* theo mô tả của Phillips và cs (2013) và Kee và cs (2019) [9], [10]. Chi *Lasiodiplodia* được mô tả với những đặc điểm như: Bào tử nấm vô tính (conidia) hình thành trong quả thể (pycnidium), bào tử chưa trưởng thành có màu trong suốt và không có các vân dọc, bào tử trưởng

thành có màu nâu. Tơ bên hoặc sợi kèm (paraphyses) mọc xen kẽ với các cành bào tử. Triệu chứng bệnh ghi nhận được cũng tương đồng với triệu chứng thối trái trên mít trong nghiên cứu của Ni và cs (2008); Bhure và cs (2023)...[11 - 13]. Từ đó, khẳng định đây là bệnh do chi nấm *Lasiodiplodia*.



**Hình 5. Một số đặc điểm hình thái của nấm gây bệnh thối trái mít**

Ghi chú: (1): Quả thể non, (2): Quả thể già, (3): Giải phóng bào tử, (4): Tơ bên hay sợi kèm (paraphyses), (5): Bào tử nấm bệnh.

Theo Sandra và cs (2021) [14], bào tử nấm *Lasiodiplodia theobromae* trưởng thành có tỷ lệ dài trên rộng (L/W) là từ 1,4 - 1,9. Mặc dù bào tử giữa các dòng nấm có sự khác biệt về tỷ lệ kích thước, nhưng chúng vẫn nằm trong phạm vi kích thước của

loài *Lasiodiplodia theobromae*. Sự khác biệt này có thể do điều kiện nuôi cấy và nguồn gốc của ký chủ. Bảng 3 cho thấy sự dao động về tỷ lệ kích thước này ở nghiên cứu của Alves và cs (2008) [15] và Sulaiman và cs (2012) [16] ghi nhận, tỷ lệ kích thước bào tử của

*Lasiodiplodia thebromae* là 1,9 và 1,86 lần, trong khi tỷ lệ dài trên rộng của bào tử của *Lasiodiplodia thebromae* được Wang và cs (2019) [17] ghi nhận là 1,7 lần, thấp hơn so với hai tỷ lệ đã được công bố

trước đó. Đối với dòng nấm *Lasiodiplodia* sp. gây bệnh thối trái mít đang nghiên cứu hiện tại, được ghi nhận với tỷ lệ là 1,79 lần, nằm trong khoảng dao động tỷ lệ kích thước bào tử của *Lasiodiplodia thebromae*.

**Bảng 3. Kích thước bào tử nấm *Lasiodiplodia theobromae* và bào tử nấm gây bệnh thối trái mít đã phân lập được**

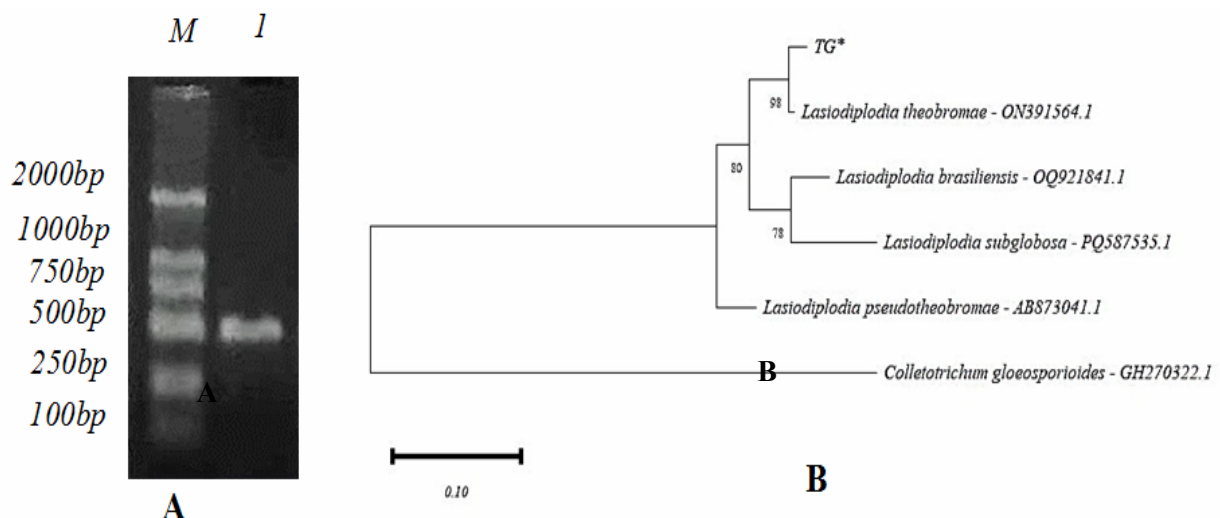
| TT | Kích thước bào tử (µm) |             |             | L/W  | Tài liệu tham khảo         |
|----|------------------------|-------------|-------------|------|----------------------------|
|    | Dài ± SD               | Rộng ± SD   | Trung bình  |      |                            |
| 1  | 25,9 ± 2,19            | 14,5 ± 1,45 | 25,9 × 14,5 | 1,79 | Dòng nấm đang nghiên cứu   |
| 2  | -                      | -           | 25,8 × 14,9 | 1,7  | Wang và cs (2019) [17]     |
| 3  | -                      | -           | 23,6 × 12,7 | 1,86 | Sulaiman và cs (2012) [16] |
| 4  | 26,2 ± 2,6             | 14,2 ± 1,2  | 26,2 × 14,2 | 1,9  | Alves và cs (2008) [15]    |

*Ghi chú:* Kích thước bào tử nấm được biểu diễn bằng trung bình các bào tử cộng trừ cho độ lệch chuẩn (SD). Dòng nấm đang nghiên cứu  $n = 50$ .

Từ triệu chứng gây hại và hình thái chứng minh mầm bệnh gây thối trái mít tại huyện Cái Bè, tỉnh Tiền Giang là do chi nấm *Lasiodiplodia* sp. theo khóa phân loại của Phillips và cs (2013) [9], theo kích thước bào tử và vách ngăn của các tơ bên hay sợi kèm (paraphyses) dòng nấm gây bệnh thối trái mít tại huyện Cái Bè, tỉnh Tiền Giang có thể là loài *Lasiodiplodia thebromae*. Tuy nhiên, để xác định đến mức độ loài tác nhân này cần thực hiện giải trình tự vùng ITS.

Kết quả sản phẩm PCR từ ADN của nấm gây bệnh thối trái mít được khếch đại bằng cặp mồi ITS1/ITS4 và thể hiện trên gen agarose 1,5% với băng có kích thước khoảng 500 bp (Hình 6A).

Kết quả so sánh chuỗi trình tự gen trên Genbank xác định mầm bệnh gây ra triệu chứng thối trái mít và loài *Lasiodiplodia thebromae* với mức tương đồng 95,51% tách thành một nhánh riêng biệt với hệ số bootstrap là 98% (Hình 6B). Từ đó kết luận được dòng nấm TG\* gây bệnh thối trái mít thuộc loài nấm *Lasiodiplodia thebromae*.



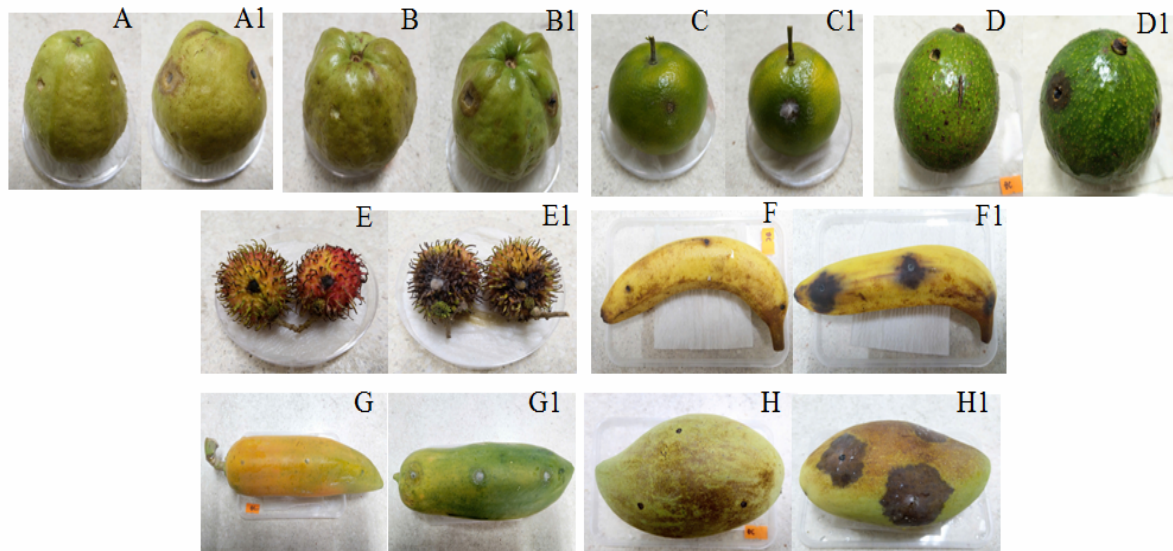
**Hình 6. (A) Kết quả điện di sản phẩm của chủng nấm TG\* với cặp mồi ITS1/ITS4 (Giếng M: Ladder 100 bp của Phusa genomics với 6 băng ADN tương ứng khối lượng 100, 250, 500, 750, 1.000, 2.000 bp.), giếng 1: Chủng nấm gây hại TG\*.** (B) Cây phát sinh loài của chi *Lasiodiplodia* gây bệnh thối trái mít



*Lasiodiplodia theobromae* (*Botryodiplodia theobromae*), có dạng hình thái hữu tính được phân loại là *Botryosphaeria rhodina*, là một loại nấm túi thuộc lớp Dothideomycetes, bộ Botryosphaeriales và họ Botryosphaeriaceae. *Lasiodiplodia theobromae* có thể được tìm thấy ở hầu hết mọi nơi trên thế giới, nhưng đặc biệt phổ biến ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, là một trong những loài thường gặp nhất trong *Botryosphaeriaceae*. *Lasiodiplodia theobromae* là tác nhân gây bệnh thực vật nội sinh không chuyên tính, xuất hiện trên nhiều loại cây trồng khác nhau, liên quan đến các loại bệnh như: Thối quả, thối rễ, chết cành và loét. Trên thực tế, *Lasiodiplodia theobromae* liên quan đến hơn 500 loại cây chủ khác nhau [18]. Do đó, một số loại trái cây được báo cáo trên thế giới là có liên quan đến bệnh thối trái do nấm *Lasiodiplodia theobromae* trồng phổ biến ở Việt Nam được thu thập nhằm xác định khả năng gây

hại của mầm bệnh.

Kết quả sau lây nhiễm nấm *Lasiodiplodia theobromae* với khoảng nấm ( $d = 4 \text{ mm}$ ) ghi nhận, tám loại trái cây với 2 lần lặp lại đều thể hiện triệu chứng thối trái ở thời điểm 1 - 2 ngày khi lây nhiễm (Hình 7). Vết thương trên bề mặt trái sau khi lây bệnh ban đầu xuất hiện một vết nâu nhạt, sau đó lan nhẹ ra và đậm màu hơn sau 1 ngày, tơ nấm phủ lên trên vết bệnh, sau 2 - 3 ngày trái có mùi chín, bệnh phát triển rất nhanh sau hai ngày biểu hiện triệu chứng, nấm bệnh làm trái thối nhanh chóng và hình thành quả thể trên bề mặt vết bệnh, quan sát dưới kính hiển vi ghi nhận được bào tử nấm bệnh. Kết quả tái phân lập nấm từ các vết bệnh lây nhiễm nhân tạo trên 8 loại quả đều là *Lasiodiplodia theobromae*. Như vậy, ổi Lê, ổi Nữ Hoàng, quýt đường, bơ sáp, chôm chôm, chuối già Nam Mỹ, đu đủ và xoài cát Hòa Lộc đều là ký chủ của *Lasiodiplodia theobromae*.



Hình 7. Triệu chứng của bệnh thối trái trên một số loại trái cây ở thời điểm 2 NSLN

Ghi chú: (A) Đối chứng ổi Lê. (A1) Ổi Lê lây bệnh. (B) Đối chứng ổi Nữ Hoàng. (B1) Ổi Nữ Hoàng lây bệnh. (C) Đối chứng quýt đường. (C1) Quýt đường lây bệnh. (D) Đối chứng bơ sáp. (D1) Bơ sáp lây bệnh. (E) Đối chứng chôm chôm. (E1) Chôm chôm lây bệnh. (F) đối chứng chuối già Nam Mỹ. (F1) Chuối già Nam Mỹ lây bệnh. (G) Đối chứng đu đủ. (G1) Đu đủ lây bệnh. (H) Đối chứng xoài cát Hòa Lộc. (H1) xoài cát Hòa Lộc lây bệnh.

### 3.2. Đánh giá hiệu lực của một số loại thuốc hóa học đối với tác nhân gây bệnh thối trái mít điều kiện phòng thí nghiệm

Kết quả đánh giá hiệu lực ức chế nấm *Lasiodiplodia theobromae* của 13 loại thuốc trừ nấm thông qua đường kính nấm ghi nhận được 9 loại thuốc có hiệu quả ức chế, trong đó có 3 loại thuốc là Dithane M45 80WP (mancozeb), Folicur 430SC (tebuconazole), Dailora 25EC (prochloraz) thể hiện

đường kính nấm thấp nhất so với các loại thuốc còn lại.

Kết quả đánh giá hiệu lực của các loại thuốc hóa học đối với nấm bệnh thông qua hiệu suất đối kháng cho kết quả tương tự như kết quả đường kính nấm, có 3 trong 9 loại thuốc thể hiện hiệu quả đối với nấm *Lasiodiplodia theobromae*, trong đó 2 loại thuốc là Dithane M45 80WP (mancozeb), Dailora 25EC (prochloraz) có hiệu quả ức chế hoàn toàn và Folicur 430SC (tebuconazole) có hiệu quả tương đương.

**Bảng 4. Hiệu lực ức chế sợi nấm ở phương pháp hòa thuốc vào môi trường của một số loại thuốc hóa học qua các thời điểm**

| STT         | Thuốc            | Đường kính nấm (cm) |        |        |        | Hiệu suất ức chế (%) 7 NSKC |
|-------------|------------------|---------------------|--------|--------|--------|-----------------------------|
|             |                  | 1 NSKC              | 3 NSKC | 5 NSKC | 7 NSKC |                             |
| 1           | Nativo 750WG     | 0,0 g               | 0,6 d  | 0,8 c  | 1,1 de | 88,3 bc                     |
| 2           | Dithane M45 80WP | 0,0 g               | 0,0 e  | 0,0 d  | 0,0 f  | 100,0 a                     |
| 3           | Metaxyl 500WP    | 3,5 b               | 9,0 a  | 9,0 a  | 9,0 a  | 00,0 f                      |
| 4           | Coc 85WP         | 2,9 c               | 9,0 a  | 9,0 a  | 9,0 a  | 00,0 f                      |
| 5           | Cabrio Top 600WG | 0,0 g               | 0,6 d  | 1,3 c  | 1,7 cd | 81,7 cd                     |
| 6           | Polyram 800WG    | 0,0 g               | 1,1 c  | 2,1 b  | 3,5 b  | 61,5 e                      |
| 7           | Amistar 250SC    | 2,7 d               | 8,8 a  | 9,0 a  | 9,0 a  | 00,0 f                      |
| 8           | Daconil 50SC     | 1,2 f               | 1,9 b  | 2,1 b  | 2,5 c  | 72,5 d                      |
| 9           | Score 250EC      | 0,0 g               | 0,0 e  | 1,0 c  | 2,4 c  | 73,1 d                      |
| 10          | Anvil 5SC        | 0,0 g               | 0,7 d  | 1,4 c  | 2,0 c  | 77,4 d                      |
| 11          | Folicur 430SC    | 0,0 g               | 0,0 e  | 0,0 d  | 0,5 ef | 94,4 ab                     |
| 12          | Dailora 25EC     | 0,0 g               | 0,0 e  | 0,0 d  | 0,0 f  | 100,0 a                     |
| 13          | Bordeaux 1%      | 1,9 e               | 9,0 a  | 9,0 a  | 9,0 a  | 00,0 f                      |
| 14          | PDA              | 4,2 a               | 9,0 a  | 9,0 a  | 9,0 a  | 00,0 f                      |
| Mức ý nghĩa |                  | **                  | **     | **     | **     | **                          |
| CV (%)      |                  | 7,59                | 3,98   | 8,98   | 9,85   | 8,57                        |

*Ghi chú: Trong cùng một cột, những chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 1% qua phép thử Duncan. \*\*: Khác biệt ở mức ý nghĩa 1%. NSKC: Ngày sau khi cấy.*

Theo Dianda và cs (2020) [19], hoạt chất diệt nấm tổng hợp mancozeb thử nghiệm trên *Lasiodiplodia theobromae* ở Burkina Faso ức chế hoàn toàn sự phát triển của sợi nấm. Ở nghiên cứu này cũng ghi nhận Dithan M45 80WP (mancozeb) có hiệu quả ức chế hoàn toàn đối với sự phát triển của nấm *Lasiodiplodia theobromae* với hiệu suất 100%, tương đồng với kết quả nghiên cứu của Dianda và cs (2020) [19]. Bên cạnh đó, Chen và cs (2024) [20] cũng ghi nhận mancozeb và 2 hoạt chất diệt nấm là tebuconazole, prochloraz có hoạt tính ức chế tốt và hiệu quả trong việc kiểm soát các bệnh sau thu hoạch. Tương tự, kết quả ở thí nghiệm hòa thuốc vào môi trường PDA ngoài Dithane M45 80WP (mancozeb) còn ghi nhận được 2 loại thuốc

Folicur 430SC (tebuconazole) và Dailora 25EC (prochloraz) ức chế hoàn toàn sợi nấm.

Từ kết quả thí nghiệm và các công bố thử nghiệm thuốc trên thế giới cho thấy, Dithan M45 80WP (mancozeb), Folicur 430SC (tebuconazole), Dailora 25EC (prochloraz) có triển vọng cao trong phòng trừ tác nhân gây bệnh thối trái do *Lasiodiplodia theobromae*.

#### 4. KẾT LUẬN

Tác nhân gây bệnh thối trái mít thu thập tại huyện Cái Bè, tỉnh Tiền Giang được xác định là loài *Lasiodiplodia theobromae*. Tám loại trái cây gồm: Ổi Lê, ổi Nữ Hoàng, quýt đường, bơ sáp, chôm chôm, đu đủ, chuối già Nam Mỹ và xoài cát Hòa Lộc là ký chủ của nấm *Lasiodiplodia theobromae*. Tuyển chọn được

3 loại thuốc là Dithane M45 80WP (mancozeb), Folicur 430SC (tebuconazole) và Dailora 25EC (prochloraz) có hiệu quả ức chế nấm *Lasiodiplodia theobromae*.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zhang, W., Groenewald, J. Z., Lombard, L., Schumacher, R. K., Phillips, A. J. L. & Crous, P. W. (2021). Evaluating species in *Botryosphaeriales*. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 46(1): 63 - 115.
2. Saha, S., Sarker, M., Haque, A. R., Nayeem, T. A. & Maukeeb, A. R. M. (2022). A review on tropical fruit: Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*). *Asian Journal of Advances in Research*, 5, 298 - 307.
3. Cổng thông tin Báo Nông Nghiệp - Môi trường. <https://nongnghiepmoitruong.vn/loi-thai-the-cay-mit-thai-o-dbscl-d301818.html>
4. Kaur, J., Singh, Z., Shah, H. M. S., Mazhar, M. S., Hasan, M. U. & Woodward, A. (2024). Insights into phytonutrient profile and postharvest quality management of jackfruit: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(19): 6756 - 6782.
5. Burgess L. W., Knight T. E., Tesoriero L. & Phan Thúy Hiền (2009). Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam. *Chuyên khảo ACIAR*, 129a: 105 - 115.
6. Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, 19(1): 11 - 15.
7. Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7): 3022 - 3027.
8. Tamura, K. & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3): 512 - 526.
9. Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z. & Crous, P. W. (2013). The *Botryosphaeriaceae*: Genera and species known from culture. *Studies in mycology*, 76(1): 51 - 167.
10. Kee, Y. J., Zakaria, L. & Mohd, M. H. (2019). *Lasiodiplodia* species associated with sansevieria trifasciata leaf blight in Malaysia. *Journal of General Plant Pathology*, 85, 66 - 71.
11. Ni, H. F., Chen, R. S., Chang, S. F. & Yang, H. R. (2008). First report of *Lasiodiplodia* fruit rot of jackfruit in Taiwan. *Plant Disease*, 92(7): 1137 - 1137.
12. Bhure, S. S., Patil, P. D., Pawar, H. D., Rite, S. C., Kadam, J. J., Joshi, M. S., Thorat, S. B. & Mahadik, S. G. (2023). Cultural, morphological and cross infectivity of *Lasiodiplodia theobromae* causing fruit rot of Jackfruit. *Journal of Plant disease sciences*, 18(1): 43 - 46.
13. Bhure, S. S., Patil, P. D., Pawar, H. D., Kadam, J. J., Joshi, M. S., Mahadik, S. G. & Thorat, S. B. (2023). Evaluation of fungicides, phytoextracts and germplasm screening against *Lasiodiplodia theobromae* causing fruit rot of Jackfruit. *Journal of Plant disease sciences*, 18(1): 26 - 30.
14. Sandra, F. K., Nurhasanah, Y. S., Mutaqin, K., Wiyono, S. & Tondok, E. T. (2021). Keragaman morfologi dan molekuler *Lasiodiplodia theobromae* dari tanaman jeruk, kakao, karet, manggis, dan pisang. *Journal Fitopatologi Indonesia*, 17(2): 58 - 66.
15. Alves, A., Crous, P. W., Correia, A. C. R. B. & Phillips, A. J. L. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal diversity*, 28(1): 1 - 13.
16. Sulaiman, R., Thanarajoo, S. S., Kadir, J. & Vadmalalai, G. (2012). First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing stem canker of jatropha curcas in Malaysia. *Plant Disease*, 96(5): 767.
17. Wang, Y., Lin, S., Zhao, L., Sun, X., He, W., Zhang, Y. & Dai, Y. C. (2019). *Lasiodiplodia* spp. associated with *Aquilaria crassna* in Laos. *Mycological Progress*, 18(5): 683 - 701.
18. Salvatore, M. M., Alves, A. & Andolfi, A. (2020). Secondary metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*: Distribution, chemical diversity, bioactivity and implications of their occurrence. *Toxins*, 12(7): 457.
19. Dianda, O. Z., Wonni, I., Diana, F., Traoré, O., Zombré, C. T. & Borro, F. (2020). In vitro efficacy of some plant aqueous extracts against two species of *Lasiodiplodia* associated to mango decline in Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 14(8): 2699 - 2712.
20. Chen, Y., Lan, X., He, R., Wang, M., Zhang, Y. & Yang, Y. (2024). Biological characteristics, pathogenicity, and sensitivity to fungicides of four species of *Lasiodiplodia* on avocado fruits. *Horticulturae*, 10(11): 1190.



**IDENTIFICATION OF THE CAUSATIVE AGENT OF FRUIT ROT ON JACKFRUIT AND PRIMARY  
EVALUATION OF FUNGICIDES IN CONTROLLING THE PATHOGEN**

**Huynh Thi Thong<sup>1</sup>, Pham Van Luc<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thuy Duong<sup>1</sup>,**

**Doan Thi Kieu Tien<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thu Nga<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Plant Protection Department, College of Agriculture, Can Tho University*

**Abstract**

Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) is a widely cultivated fruit tree in tropical and subtropical regions worldwide. This study aimed to identify the causal agent of fruit rot and explore chemical fungicides for inhibiting the pathogen. Jackfruit exhibiting symptoms of fruit rot were collected in Cai Be district, Tien Giang province. Based on morphology and molecular biology techniques amplifying the gene region 18S with universal primers ITS1/ITS4, the causal agent was identified as the species *Lasiodiplodia theobromae*. Additionally, eight fruit species (Le guava, Nu Hoang guava, Mandarin tangerine, Maluma avocado, rambutan, Cavendish banana, papaya and Hoa Loc mango) were confirmed as hosts of *Lasiodiplodia theobromae*. Among the 13 tested chemicals, three fungicides, Dithane M45 80WP (mancozeb), Folicur 430SC (tebuconazole) and Dailora 25EC (prochloraz) proved effective in inhibiting *Lasiodiplodia theobromae*.

**Keywords:** *Lasiodiplodia theobromae*, jackfruit, fruit rot, chemical fungicide, fruit tree.

**Ngày nhận bài:** 9/4/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 23/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 02/6/2025

**Ngày duyệt đăng:** 25/6/2025

# PHÒNG TRỪ SINH HỌC NẤM *Cryptosporiopsis eucalypti* GÂY BỆNH ĐỐM LÁ BẠCH ĐÀN BẰNG VI NẤM NỘI SINH

Đỗ Hoàng Yến<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Minh Hằng<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Loan<sup>2</sup>,

Trần Anh Tuấn<sup>2</sup>, Phạm Xuân Trường<sup>2</sup>, Trần Thanh Trăng<sup>2</sup>,

Nguyễn Minh Chí<sup>2</sup>, Hà Bích Hồng<sup>1</sup>, Nguyễn Mạnh Hà<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp

<sup>2</sup> Trung tâm Nghiên cứu Bảo vệ rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

\* Email: manhhafsiv@gmail.com

## TÓM TẮT

Bệnh đốm lá bạch đàn gây ra bởi nấm *Cryptosporiopsis eucalypti* (*C. eucalypti*) được xác định là một trong những loại bệnh nguy hiểm đối với rừng trồng bạch đàn ở Việt Nam. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm sàng lọc và tuyển chọn các chủng nấm nội sinh có tiềm năng kháng nấm *C. eucalypti* làm cơ sở để phát triển sản xuất chế phẩm vi sinh vật và thuốc bảo vệ thực vật sinh học. Các chủng nấm nội sinh được phân lập từ các cây bạch đàn lai ở cả cây chủ khỏe mạnh và cây chủ có triệu chứng bị bệnh. Sàng lọc các chủng có hoạt tính kháng nấm *C. eucalypti* bằng phương pháp nuôi cấy đối kháng. Các chủng nấm kháng nấm gây bệnh sau đó tiếp tục được sàng lọc hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp thử nghiệm dịch lọc nuôi cấy. Kết quả phân lập thu được 60 chủng nấm nội sinh, số lượng các chủng nấm nội sinh có sự khác nhau giữa các cây chủ và bộ phận của cây. Kết quả sàng lọc hoạt tính kháng nấm gây bệnh bằng phương pháp nuôi cấy đối kháng thu được 17 chủng có hoạt tính kháng nấm gây bệnh, với tỷ lệ ức chế nấm gây bệnh dao động từ 47,78 - 66,04%. Trong đó, 11 chủng phân lập được từ các cây chủ khỏe mạnh và 6 chủng phân lập được từ các cây chủ có triệu chứng bị bệnh. Đánh giá hoạt tính kháng nấm gây bệnh bằng thử nghiệm dịch lọc nuôi cấy cho thấy, 3 chủng BĐ7.07, BĐ3.06 và BĐ7.03 có hoạt tính kháng nấm mạnh nhất, với tỷ lệ ức chế lần lượt là 100%, 87,5% và 71,2%. Kết quả định danh 3 chủng nấm xác định được tên khoa học của các chủng nấm là *Penicillium sclerotiorum* (Chủng BĐ3.06), *Nigrospora aurantiaca* (chủng BĐ7.07) và *Diaporthe liquidambaris* (chủng BĐ7.03). Các chủng nấm này có tiềm năng ứng dụng làm tác nhân kiểm soát sinh học trong quản lý bệnh đốm lá bạch đàn ở Việt Nam.

**Từ khóa:** Bệnh đốm lá bạch đàn, *Cryptosporiopsis eucalypti*, kiểm soát sinh học, nấm nội sinh, *Nigrospora aurantiaca*.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm *Cryptosporiopsis eucalypti* (*C. eucalypti*) được ghi nhận gây bệnh đốm lá trên một số loài bạch đàn ở Úc, Ấn Độ và Mỹ [1]. Loài nấm này cũng gây ra bệnh đốm lá bạch đàn ở New Zealand [2]. Ngoài ra, nấm *C. eucalypti* còn gây bệnh đốm lá và khô ngọn bạch đàn ở Thái Lan, Việt Nam, Lào, Nhật Bản, Trung Quốc, Sri Lanka [3 - 5]. Loài nấm này sản sinh ra một lượng bào tử rất lớn từ túi bào tử dính trên các lá và ngọn cây bạch đàn bị bệnh và thường làm cho lá cây bị chết và rụng; trong một số trường hợp có thể làm cho ngọn cây hay ngọn cành bị chết. Hệ sợi nấm có thể tồn tại trong thân cây bạch đàn và gây bệnh loét thân trong những tháng khô hạn, đến khi độ ẩm không khí cao (trong và sau mùa mưa) và nhiệt độ thích hợp từ 20 - 25°C nó sẽ bùng phát trở lại và gây

bệnh cho lá và ngọn bạch đàn [4]. Bệnh đốm lá bạch đàn gây ra bởi nấm *C. eucalypti* được ghi nhận xuất hiện ở Việt Nam từ đầu những năm 1990 [5]. Bệnh này thường xuyên xảy ra đối với các rừng trồng bạch đàn ở Việt Nam, đặc biệt là ở các vùng Đông Nam bộ (các tỉnh Đồng Nai, Bình Dương, Bình Phước) và miền Trung (các tỉnh Quảng Nam, Đà Nẵng và Thừa Thiên Huế). Theo kết quả điều tra, diện tích rừng trồng bạch đàn ở Việt Nam bị bệnh lên tới 50% tổng diện tích với các mức độ khác nhau [5]. Nấm *C. eucalypti* được đánh giá là một trong những loài nấm bệnh gây hại nguy hiểm nhất đối với rừng trồng bạch đàn ở Việt Nam [6 - 7]. Đặc điểm hình thái của nấm *C. eucalypti* là quả thể hình chén màu nâu đen nằm trên các tổ chức bị bệnh. Quả thể nấm nằm sâu trong phần mô của lá, từ những thể quả

hình thành đám bào tử vô tính màu vàng nhạt hoặc trắng vàng. Bào tử vô tính hình trứng, một đầu bằng và một đầu hơi tròn. Kích thước bào tử nấm *C. eucalypti* dao động tương đối lớn, đường kính bào tử dao động từ 2,34 - 7,02  $\mu\text{m}$ , trong khi đó chiều dài bào tử dao động từ 7,02 - 21,06  $\mu\text{m}$ . Sợi nấm *C. eucalypti* lúc đầu có màu trắng, sau đó chuyển màu trắng ghi hoặc màu nâu trắng, một số mẫu chuyển màu nâu đen. Sau khi sợi nấm phủ kín bề mặt đĩa petri, môi trường chuyển từ màu trắng vàng sang màu nâu nhạt đến nâu đậm, một số mẫu chuyển sang màu nâu đen [6].

Loài nấm *C. eucalypti* được xác định là sinh vật gây bệnh hại chính ở các khu rừng trồng bạch đàn ở Việt Nam [8]. Nghiên cứu quản lý bệnh đốm lá bạch đàn đã được thực hiện bằng nhiều biện pháp khác nhau như sử dụng thuốc bảo vệ thực vật hóa học, nghiên cứu chọn tạo giống kháng nấm gây bệnh. Tuy nhiên, nghiên cứu các biện pháp sinh học phòng trừ loài nấm gây bệnh này vẫn còn hạn chế. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm sàng lọc được một số chủng nấm nội sinh tiềm năng có hoạt tính kháng nấm gây bệnh đốm lá bạch đàn, làm cơ sở để phát triển sản xuất chế phẩm vi sinh vật và thuốc bảo vệ thực vật sinh học, góp phần kiểm soát hiệu quả các nguồn nấm gây bệnh và phát triển bền vững rừng trồng bạch đàn ở Việt Nam.

## **2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Phương pháp phân lập các chủng nấm nội sinh**

Tiến hành điều tra khảo sát thực địa theo tuyến tại các khu rừng trồng bạch đàn lai để đánh giá tình hình bệnh hại và lựa chọn các cây chủ lấy mẫu. Cây bạch đàn lai được chọn trên các khu rừng trồng tại

huyện Phù Ninh, tỉnh Phú Thọ, nơi có các diện tích rừng trồng bạch đàn lai bị bệnh đốm lá gây hại. Các cây lấy mẫu được chọn ngẫu nhiên, bao gồm cả các cây khỏe và các cây có xuất hiện triệu chứng bị bệnh. Chọn 20 cây chủ để tiến hành thu mẫu và tiến hành thu các mẫu lá và cành non. Các mẫu được thu ngẫu nhiên từ các cây chủ đã lựa chọn. Các mẫu lá (ở giai đoạn bánh tẻ) và cành non được thu bằng kéo cắt cành. Mẫu sau khi thu được đựng trong túi ni lông gấp mép đã tiệt trùng và bảo quản ở 4°C.

Xử lý các mẫu bạch đàn lai trước khi tiến hành phân lập dựa theo phương pháp của các nghiên cứu trước đây [9, 10]. Các mẫu lá và cành non được rửa nhẹ nhàng dưới vòi nước máy. Sau đó, được khử trùng bề mặt trong dung dịch NaOCl 2% trong 3 phút, theo sau là dung dịch ethanol 70% trong 1 phút và được rửa lại bằng nước cất tiệt trùng 3 lần, mỗi lần 15 giây. Sau khi khử trùng bề mặt, mẫu được làm khô để tiến hành phân lập vi nấm nội sinh. Dung dịch nước cất tiệt trùng sau khi rửa mẫu được trang lên môi trường PDA để kiểm tra có hay không sự xuất hiện của nấm ngoại sinh. Cắt nhỏ các mẫu lá (5 x 5 mm), mẫu cành non (dài 5 mm), bằng dụng cụ vô trùng, sau đó đặt lên đĩa thạch chứa môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) có kháng sinh (100 mg/L streptomycin). Các đĩa thạch được ủ ở 25°C trong 7 - 10 ngày đến khi hệ sợi nấm bắt đầu mọc ra từ các mẫu. Nấm nội sinh được làm thuần bằng phương pháp cấy đỉnh sinh trưởng sợi nấm hoặc cấy đơn bào tử sang đĩa thạch PDA mới. Thực hiện cấy truyền nhiều lần đến khi thu được chủng nấm hoàn toàn thuần khiết. Các chủng nấm thuần khiết được mã hóa và bảo quản trong ống thạch nghiêng ở 4°C để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Triệu chứng bệnh đốm lá trên cây bạch đàn lai gây ra bởi nấm *C. eucalypti*

**2.2. Phương pháp sàng lọc các chủng nấm nội sinh có hoạt tính kháng nấm gây bệnh**

Hoạt tính kháng nấm gây bệnh của các chủng nấm nội sinh được sàng lọc theo phương pháp nuôi cấy đối kháng trên môi trường PDA [9]. Từng chủng nấm nội sinh và chủng nấm gây bệnh được cấy đối diện nhau trên đĩa thạch PDA, công thức đối chứng là đĩa thạch không có nấm nội sinh. Các đĩa thạch thí nghiệm được ủ trong tủ định ôn ở 25°C. Theo dõi sự phát triển của sợi nấm gây bệnh và đo đường kính sinh trưởng của hệ sợi nấm gây bệnh trên các đĩa thí nghiệm và đĩa đối chứng sau 10 ngày nuôi cấy. Mỗi chủng nấm nội sinh được tiến hành thí nghiệm với 5 lần lặp lại. Hiệu lực ức chế sự phát triển của nấm gây bệnh bởi nấm nội sinh được tính theo công thức sau:

$$MGI (\%) = \frac{R - r}{R} \times 100 \%$$

Trong đó: MGI là hiệu lực ức chế sự phát triển hệ sợi của nấm gây bệnh; R là bán kính xuyên tâm hệ sợi nấm gây bệnh ở đĩa đối chứng (mm); r là bán kính xuyên tâm hệ sợi nấm gây bệnh ở đĩa thử nghiệm (mm).

**2.3. Phương pháp đánh giá hiệu lực ức chế nấm gây bệnh của dịch nuôi cấy nấm nội sinh**

Hiệu lực ức chế nấm gây bệnh của dịch nuôi cấy nấm nội sinh được đánh giá theo phương pháp thử nghiệm dịch lọc nuôi cấy [9], cụ thể như sau:

Các chủng nấm nội sinh tiềm năng, có hiệu lực ức chế nấm gây bệnh cao trong thí nghiệm nuôi cấy đối kháng được nuôi cấy trên môi trường lỏng PDB (Potato Dextrose Broth) trong thời gian 2 tuần ở điều kiện 25°C và tốc độ lắc là 150 vòng/phút. Dung dịch huyền phù sau đó được lọc bằng màng lọc có đường kính 0,45 µm. Dịch lọc nuôi cấy nấm nội sinh được phối trộn với môi trường PDA theo tỉ lệ 1: 1 (sau khi PDA được hấp khử trùng và để nguội dưới 50°C), bổ sung 100 mg/L streptomycin sulfate vào hỗn hợp dung dịch trước khi chuyển vào các đĩa petri. Ở công thức đối chứng, dịch lọc nuôi cấy nấm được thay thế bằng nước cất tiệt trùng. Sau đó, tiến hành cấy các chủng nấm gây bệnh vào chính giữa các đĩa thạch và ủ ở 25°C trong thời gian 10 ngày. Mỗi chủng nấm nội sinh được tiến hành thí nghiệm với 5 lần lặp lại. Đánh giá hiệu lực ức chế sự phát triển hệ sợi của nấm gây bệnh bởi dịch lọc nuôi cấy của nấm nội sinh theo công thức được mô tả trong phần thí nghiệm nuôi cấy đối kháng.

**2.4. Phương pháp định danh các chủng nấm nội sinh có hoạt tính kháng nấm gây bệnh**

Nuôi cấy các chủng nấm nội sinh trên môi trường PDB, dung dịch nuôi cấy được lọc qua màng lọc Miracloth để thu hệ sợi nấm và tách chiết ADN của nấm. Giám định các chủng nấm nội sinh có hoạt tính kháng nấm gây bệnh dựa vào các kết quả giải trình tự gen internal transcribed spacer (ITS). Tách chiết bộ gen của nấm nội sinh bằng bộ kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo Research, Mỹ). Khuếch đại trình tự bằng phản ứng PCR với cặp mồi là: ITS1F (CTTGGTCATTTAGA GGAAGTAA), ITS4 (TCCTCCGC TTATTGATATGC) [11]. Phản ứng PCR được thực hiện trên thiết bị C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Mỹ) với chương trình nhiệt được thiết lập với pha biến tính ở 95°C trong 3 phút, tiếp đến là 35 chu kỳ nhiệt bao gồm: Giai đoạn biến tính ở 95°C trong 1 phút, giai đoạn bắt cặp của các mồi ở 58°C trong 30 giây và giai đoạn kéo dài đoạn khuếch đại ở 72°C trong 1 phút 30 giây. Quá trình khuếch đại được hoàn tất ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%, sau đó được giải trình tự hai chiều bằng kỹ thuật giải trình tự tự động theo nguyên lý Sanger. Các chuỗi ADN hoàn chỉnh được so sánh với cơ sở dữ liệu của GenBank đặt tại NCBI (<https://ncbi.nlm.nih.gov>), Mỹ thông qua công cụ tìm kiếm BLAST.

**2.5. Phương pháp phân tích, xử lý số liệu**

Hiệu lực ức chế nấm gây bệnh của các chủng nấm nội sinh được đánh giá bằng các phương pháp phân tích thống kê biến lượng (ANOVA) theo sau bởi hàm hậu kiểm định Tukey để so sánh các giá trị trung bình. Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) phiên bản 27 [12]. Cây quan hệ di truyền được xây dựng dựa trên phương pháp Maximum Likelihood, với hệ số lặp lại (bootstrap) 1000, trên phần mềm Mega 7 [13].

**3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN****3.1. Kết quả phân lập các chủng nấm nội sinh**

Tổng số cây chủ được lựa chọn để tiến hành phân lập nấm nội sinh là 10 cây bạch đàn lai, trong đó có 5 cây khỏe và 5 cây có triệu chứng bị bệnh đốm lá bạch đàn được trồng tại huyện Phù Ninh, tỉnh Phú Thọ. Kết quả phân lập các chủng nấm nội sinh và thông tin của các chủng nấm được thể hiện ở bảng 1.

Tổng số 60 chủng nấm nội sinh được phân lập từ các mẫu bạch đàn lai, trong đó số chủng nấm phân lập được từ các mẫu cành non là 27 chủng và số chủng nấm phân lập được từ các mẫu lá là 33 chủng. Số lượng các chủng nấm phân lập được có sự khác nhau giữa các cây chủ. Cây chủ khỏe phân lập được nhiều chủng nấm nội sinh nhất là cây số 3 với 9

chủng, trong khi số chủng nấm nội sinh phân lập được nhiều nhất từ cây chủ bị bệnh là 8 chủng (cây số 2). Cây chủ phân lập được ít nhất số chủng nấm nội sinh ở nhóm cây khỏe là cây số 1, với 3 chủng nấm và ở nhóm cây bị bệnh là cây chủ số 10 với 2 chủng nấm nội sinh (Bảng 1).

**Bảng 1. Danh sách các chủng nấm nội sinh phân lập được từ cây bạch đàn lai**

| TT | Kí hiệu chủng nấm nội sinh | Bộ phận của cây được chọn lấy mẫu | Số thứ tự cây thu mẫu | Tình trạng cây chủ |
|----|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------|--------------------|
| 1  | BĐ1.01                     | Cành non                          | Cây số 1              | Cây khỏe           |
| 2  | BĐ1.02                     | Lá                                | Cây số 1              | Cây khỏe           |
| 3  | BĐ1.03                     | Lá                                | Cây số 1              | Cây khỏe           |
| 4  | BĐ2.01                     | Cành non                          | Cây số 2              | Cây bị bệnh        |
| 5  | BĐ2.02                     | Cành non                          | Cây số 2              | Cây bị bệnh        |
| 6  | BĐ2.03                     | Cành non                          | Cây số 2              | Cây bị bệnh        |
| 7  | BĐ2.04                     | Cành non                          | Cây số 2              | Cây bị bệnh        |
| 8  | BĐ2.05                     | Lá                                | Cây số 2              | Cây bị bệnh        |
| 9  | BĐ2.06                     | Lá                                | Cây số 2              | Cây bị bệnh        |
| 10 | BĐ2.07                     | Lá                                | Cây số 2              | Cây bị bệnh        |
| 11 | BĐ2.08                     | Lá                                | Cây số 2              | Cây bị bệnh        |
| 12 | BĐ3.01                     | Cành non                          | Cây số 3              | Cây khỏe           |
| 13 | BĐ3.02                     | Cành non                          | Cây số 3              | Cây khỏe           |
| 14 | BĐ3.03                     | Cành non                          | Cây số 3              | Cây khỏe           |
| 15 | BĐ3.04                     | Cành non                          | Cây số 3              | Cây khỏe           |
| 16 | BĐ3.05                     | Cành non                          | Cây số 3              | Cây khỏe           |
| 17 | BĐ3.06                     | Lá                                | Cây số 3              | Cây khỏe           |
| 18 | BĐ3.07                     | Lá                                | Cây số 3              | Cây khỏe           |
| 19 | BĐ3.08                     | Lá                                | Cây số 3              | Cây khỏe           |

| TT | Kí hiệu chủng nấm<br>nội sinh | Bộ phận của cây được<br>chọn lấy mẫu | Số thứ tự cây thu<br>mẫu | Tình trạng cây chủ |
|----|-------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------|
| 20 | BĐ3.09                        | Lá                                   | Cây số 3                 | Cây khỏe           |
| 21 | BĐ4.01                        | Cành non                             | Cây số 4                 | Cây khỏe           |
| 22 | BĐ4.02                        | Cành non                             | Cây số 4                 | Cây khỏe           |
| 23 | BĐ4.03                        | Lá                                   | Cây số 4                 | Cây khỏe           |
| 24 | BĐ4.04                        | Lá                                   | Cây số 4                 | Cây khỏe           |
| 25 | BĐ4.05                        | Lá                                   | Cây số 4                 | Cây khỏe           |
| 26 | BĐ4.06                        | Lá                                   | Cây số 4                 | Cây khỏe           |
| 27 | BĐ4.07                        | Lá                                   | Cây số 4                 | Cây khỏe           |
| 28 | BĐ4.08                        | Lá                                   | Cây số 4                 | Cây khỏe           |
| 29 | BĐ5.01                        | Cành non                             | Cây số 5                 | Cây khỏe           |
| 30 | BĐ5.02                        | Cành non                             | Cây số 5                 | Cây khỏe           |
| 31 | BĐ5.03                        | Cành non                             | Cây số 5                 | Cây khỏe           |
| 32 | BĐ5.04                        | Lá                                   | Cây số 5                 | Cây khỏe           |
| 33 | BĐ5.05                        | Lá                                   | Cây số 5                 | Cây khỏe           |
| 34 | BĐ5.06                        | Lá                                   | Cây số 5                 | Cây khỏe           |
| 35 | BĐ6.01                        | Cành non                             | Cây số 6                 | Cây bị bệnh        |
| 36 | BĐ6.02                        | Cành non                             | Cây số 6                 | Cây bị bệnh        |
| 37 | BĐ6.03                        | Cành non                             | Cây số 6                 | Cây bị bệnh        |
| 38 | BĐ6.04                        | Lá                                   | Cây số 6                 | Cây bị bệnh        |
| 39 | BĐ6.05                        | Lá                                   | Cây số 6                 | Cây bị bệnh        |
| 40 | BĐ6.06                        | Lá                                   | Cây số 6                 | Cây bị bệnh        |
| 41 | BĐ6.07                        | Lá                                   | Cây số 6                 | Cây bị bệnh        |
| 42 | BĐ7.01                        | Cành non                             | Cây số 7                 | Cây khỏe           |
| 43 | BĐ7.02                        | Cành non                             | Cây số 7                 | Cây khỏe           |



| TT | Kí hiệu chủng nấm nội sinh | Bộ phận của cây được chọn lấy mẫu | Số thứ tự cây thu mẫu | Tình trạng cây chủ |
|----|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------|--------------------|
| 44 | BĐ7.03                     | Cành non                          | Cây số 7              | Cây khỏe           |
| 45 | BĐ7.04                     | Lá                                | Cây số 7              | Cây khỏe           |
| 46 | BĐ7.05                     | Lá                                | Cây số 7              | Cây khỏe           |
| 47 | BĐ7.06                     | Lá                                | Cây số 7              | Cây khỏe           |
| 48 | BĐ7.07                     | Lá                                | Cây số 7              | Cây khỏe           |
| 49 | BĐ8.01                     | Cành non                          | Cây số 8              | Cây bị bệnh        |
| 50 | BĐ8.02                     | Cành non                          | Cây số 8              | Cây bị bệnh        |
| 51 | BĐ8.03                     | Cành non                          | Cây số 8              | Cây bị bệnh        |
| 52 | BĐ8.04                     | Cành non                          | Cây số 8              | Cây bị bệnh        |
| 53 | BĐ8.05                     | Lá                                | Cây số 8              | Cây bị bệnh        |
| 54 | BĐ8.06                     | Lá                                | Cây số 8              | Cây bị bệnh        |
| 55 | BĐ8.07                     | Lá                                | Cây số 8              | Cây bị bệnh        |
| 56 | BĐ9.01                     | Cành non                          | Cây số 9              | Cây bị bệnh        |
| 57 | BĐ9.02                     | Lá                                | Cây số 9              | Cây bị bệnh        |
| 58 | BĐ9.03                     | Lá                                | Cây số 9              | Cây bị bệnh        |
| 59 | BĐ10.01                    | Cành non                          | Cây số 10             | Cây bị bệnh        |
| 60 | BĐ10.02                    | Lá                                | Cây số 10             | Cây bị bệnh        |

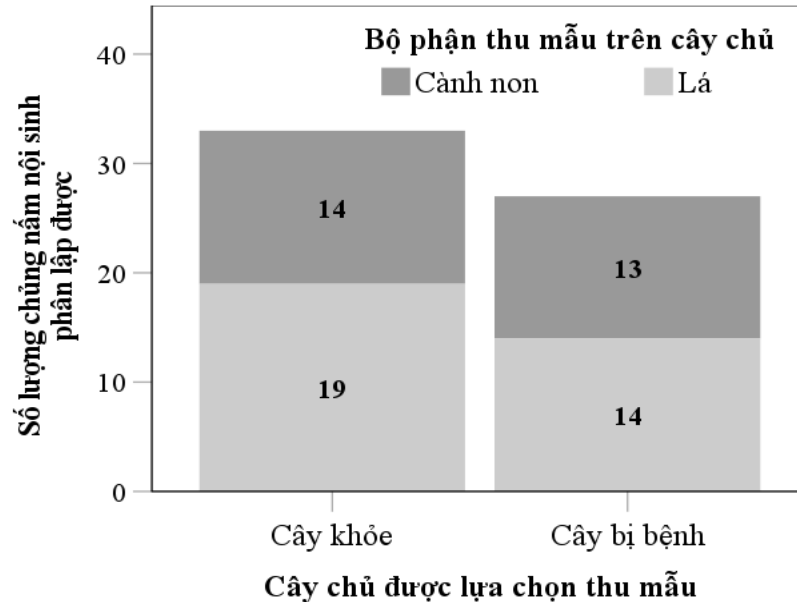
Tổng số chủng nấm nội sinh được phân lập từ cây khỏe lớn hơn so với cây bị bệnh với số chủng nấm lần lượt là 33 và 27 chủng (Hình 2). Số lượng các chủng nấm nội sinh phân lập được từ nhóm cây chủ khỏe lớn hơn số lượng các chủng nấm nội sinh phân lập được từ nhóm cây chủ bị bệnh ở cả mẫu cành non và mẫu lá (Hình 2).

Đa dạng các chủng nấm nội sinh cũng có sự khác nhau trên cây Dừa cạn và cây Bán chi liên và số lượng các chủng nấm nội sinh được phân bố khác nhau ở lá, cành non và rễ của cây chủ. Tổng số 48

chủng nấm nội sinh, trong đó 43 chủng nấm được phân lập từ cây Dừa cạn và 5 chủng nấm được phân lập từ cây Bán chi liên. Các chủng nấm này sau đó được định danh thuộc 4 loài nấm là: *Cladosporium colombiae*, *Cladosporium halotolerans*, *Corynespora cassicola* và *Albifimbria terrestris* [14]. Tỷ lệ phần trăm các chủng nấm nội sinh phân lập được từ 10 cây được liệt kê cũng có sự khác nhau. Cụ thể là, cây Bình vôi (6,67%), Đinh lăng (8,89%), Dây cóc (6,67%), Ngải bún (22,22%), Sung Mỹ (4,44%), Trâm ổi (20%), Sung Nhật (11,11%), Hà thủ ô đỏ (8,89%),

Cà gai leo (6,67%) và Hà thủ ô trắng (4,44%) [15]. Ngoài ra, số lượng các chủng nấm nội sinh phân lập được từ cây hồ tiêu cũng có sự khác biệt so với cây cao su [16, 17]. Do đó, đa dạng và sự phân bố của các chủng nấm nội sinh là rất khác nhau giữa các

loài cây chủ và giữa các bộ phận của cây chủ như lá, thân, cành và rễ. Sự khác biệt có thể dẫn đến hoạt tính sinh học của các chủng nấm nội sinh phân lập được cũng có sự khác nhau.



Hình 2. Phân bố các chủng nấm nội sinh theo cây chủ và bộ phận của cây

### 3.2. Kết quả sàng lọc các chủng nấm nội sinh có hoạt tính kháng nấm *Cryptosporiopsis eucalypti*

Hoạt tính kháng nấm gây bệnh của các chủng nấm nội sinh được trình bày ở bảng 2 và hình 3. Tổng số thu được 17 chủng nấm nội sinh có khả năng ức chế nấm *Cryptosporiopsis eucalypti*. Tỷ lệ ức chế nấm gây bệnh của các chủng nấm này dao động từ 47,78 - 66,04% và có sự khác biệt đáng kể giữa các chủng nấm ( $p < 0,05$ ). Chủng có tỷ lệ ức chế nấm gây bệnh cao nhất là BD3.06, trong khi chủng có tỷ lệ ức chế thấp nhất là BD8.02. Số chủng nấm có hoạt tính kháng nấm gây bệnh phân lập được từ cành non là 8

chủng và 9 chủng là số chủng nấm phân lập được từ lá của cây bạch đàn lai. Số chủng kháng nấm gây bệnh cũng có sự khác nhau giữa cây khỏe và cây bị bệnh, với 11 chủng phân lập được từ cây khỏe và 6 chủng phân lập được từ cây bị bệnh (Bảng 2). Có thể thấy rằng, 4 chủng nấm nội sinh có tỷ lệ ức chế nấm gây bệnh cao hơn 60% là các chủng BD3.06 (66,04%), BD3.02 (61,40%), BD9.02 (61,39%) và BD7.07 (60,58%); 11 chủng nấm nội sinh có tỷ lệ ức chế nấm gây bệnh cao hơn 50% và thấp hơn 60%; 2 chủng còn lại có tỷ lệ ức chế nấm gây bệnh thấp hơn 50% (Bảng 2 và hình 3).

Bảng 2. Tỷ lệ ức chế nấm *Cryptosporiopsis eucalypti* của các chủng nấm nội sinh phân lập được

| TT | Kí hiệu chủng | Tỷ lệ ức chế nấm gây bệnh* (%) | Độ lệch tiêu chuẩn (sd) | Bộ phận của cây được chọn lấy mẫu | Tình trạng cây chủ |
|----|---------------|--------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| 1  | BD1.02        | 52,61 <sup>abc</sup>           | 3,56                    | Cành non                          | Cây khỏe           |
| 2  | BD2.02        | 59,11 <sup>de</sup>            | 1,14                    | Cành non                          | Cây bị bệnh        |
| 3  | BD2.05        | 51,56 <sup>ab</sup>            | 5,65                    | Lá                                | Cây bị bệnh        |
| 4  | BD3.02        | 61,40 <sup>ef</sup>            | 3,34                    | Cành non                          | Cây khỏe           |

| TT | Kí hiệu chủng | Tỷ lệ ức chế nấm gây bệnh* (%) | Độ lệch tiêu chuẩn (sd) | Bộ phận của cây được chọn lấy mẫu | Tình trạng cây chủ |
|----|---------------|--------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| 5  | BĐ3.06        | 66,04 <sup>f</sup>             | 0,73                    | Lá                                | Cây khỏe           |
| 6  | BĐ4.03        | 54,41 <sup>bcd</sup>           | 2,39                    | Lá                                | Cây khỏe           |
| 7  | BĐ4.08        | 48,94 <sup>ab</sup>            | 3,51                    | Lá                                | Cây khỏe           |
| 8  | BĐ5.01        | 51,46 <sup>ab</sup>            | 0,84                    | Cành non                          | Cây khỏe           |
| 9  | BĐ5.04        | 50,72 <sup>ab</sup>            | 1,65                    | Lá                                | Cây khỏe           |
| 10 | BĐ5.05        | 51,43 <sup>ab</sup>            | 1,13                    | Lá                                | Cây khỏe           |
| 11 | BĐ6.02        | 52,91 <sup>abc</sup>           | 0,30                    | Cành non                          | Cây bị bệnh        |
| 12 | BĐ6.07        | 58,11 <sup>cde</sup>           | 3,13                    | Lá                                | Cây bị bệnh        |
| 13 | BĐ7.01        | 52,88 <sup>abc</sup>           | 1,50                    | Cành non                          | Cây khỏe           |
| 14 | BĐ7.03        | 54,36 <sup>bcd</sup>           | 0,89                    | Cành non                          | Cây khỏe           |
| 15 | BĐ7.07        | 60,58 <sup>ef</sup>            | 0,71                    | Lá                                | Cây khỏe           |
| 16 | BĐ8.02        | 47,78 <sup>a</sup>             | 1,24                    | Cành non                          | Cây bị bệnh        |
| 17 | BĐ9.02        | 61,39 <sup>ef</sup>            | 2,69                    | Lá                                | Cây bị bệnh        |

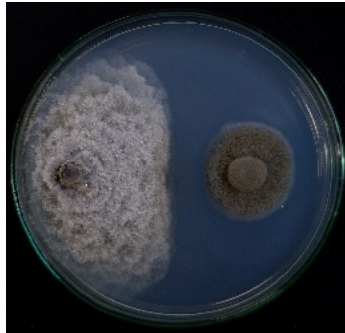
Ghi chú: Giá trị trung bình với các chữ cái khác nhau có sự khác biệt đáng kể ( $p < 0,05$ ).

Các chủng nấm nội sinh có hoạt tính kháng nấm được tìm thấy cả ở cành non và lá của cây khỏe và cây bị bệnh đốm lá. Điều này cho thấy, có thể phân lập được chủng kháng nấm gây bệnh khi cây chủ xuất hiện triệu chứng bị bệnh. Tuy nhiên số lượng chủng nấm kháng bệnh ở cây bị bệnh trong nghiên cứu này thì ít hơn số lượng chủng nấm kháng bệnh ở cây khỏe. Tần suất xuất hiện các chủng nấm nội sinh kháng nấm gây bệnh phân lập được ở lá (27,3%) thấp hơn ở cành non (29,6%). Tần suất xuất hiện các chủng nấm kháng bệnh ở cây khỏe là 34,4% và ở cây bị bệnh là 21,4%. Sự phân bố các chủng nấm nội sinh có hoạt tính kháng nấm gây bệnh có sự khác nhau giữa các bộ phận của cây chủ. Các loài nấm nội sinh chiếm ưu thế nhất từ cây thông (*Pinus densiflora*) là *Daldinia childiae* và tần suất xuất hiện ở cành cao hơn ở thân và lá [18]. Các loài nấm nội sinh chiếm ưu thế được phân lập từ nhân sâm (*Panax ginseng*) phụ

thuộc vào các bộ phận của cây chủ như: Rễ, thân, cuống lá và lá của cây sâm 3 tuổi và *Entrophospora* sp., *Phoma radicina*, *Alternaria alternate* và *Xylaria* sp. lần lượt là các loài nấm nội sinh chiếm ưu thế [19]. Số lượng chủng nấm nội sinh phân lập từ lá cây Tai tượng Ấn Độ cao hơn từ các cơ quan khác của cây [20]. Số lượng các chủng nấm nội sinh phân lập được từ lá của 6 loài Sồi khác nhau cao hơn so với cuống lá, thân và cành [18]. Tần suất xuất hiện của các chủng nấm nội sinh phân lập từ cây Dây thần thông (*Tinospora cordifolia*) cũng có nhiều nhất ở lá so với các mẫu ở thân và rễ [21]. Tần suất xuất hiện các chủng nấm nội sinh cao nhất trong lá được giải thích là do bề mặt diện tích lá lớn hơn để bắt các bào tử nấm so với các bộ phận khác của cây [22]. Tuy nhiên, nấm nội sinh trong một số loài cây thường không đồng nhất giữa các bộ phận của cây [23].



Đối chứng



BD1.02



BD2.02



BD2.05



BD3.02



BD3.06



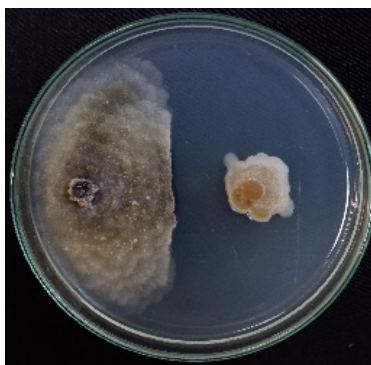
BD4.03



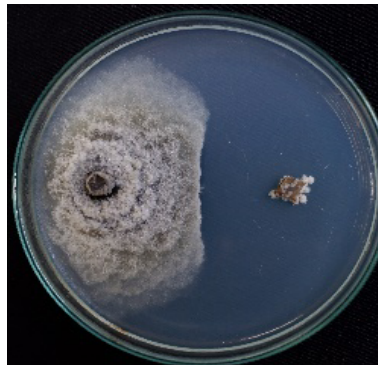
BD4.08



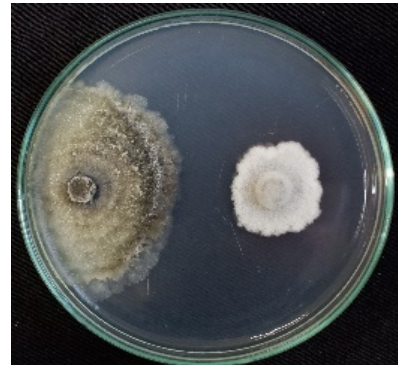
BD5.01



BD5.04

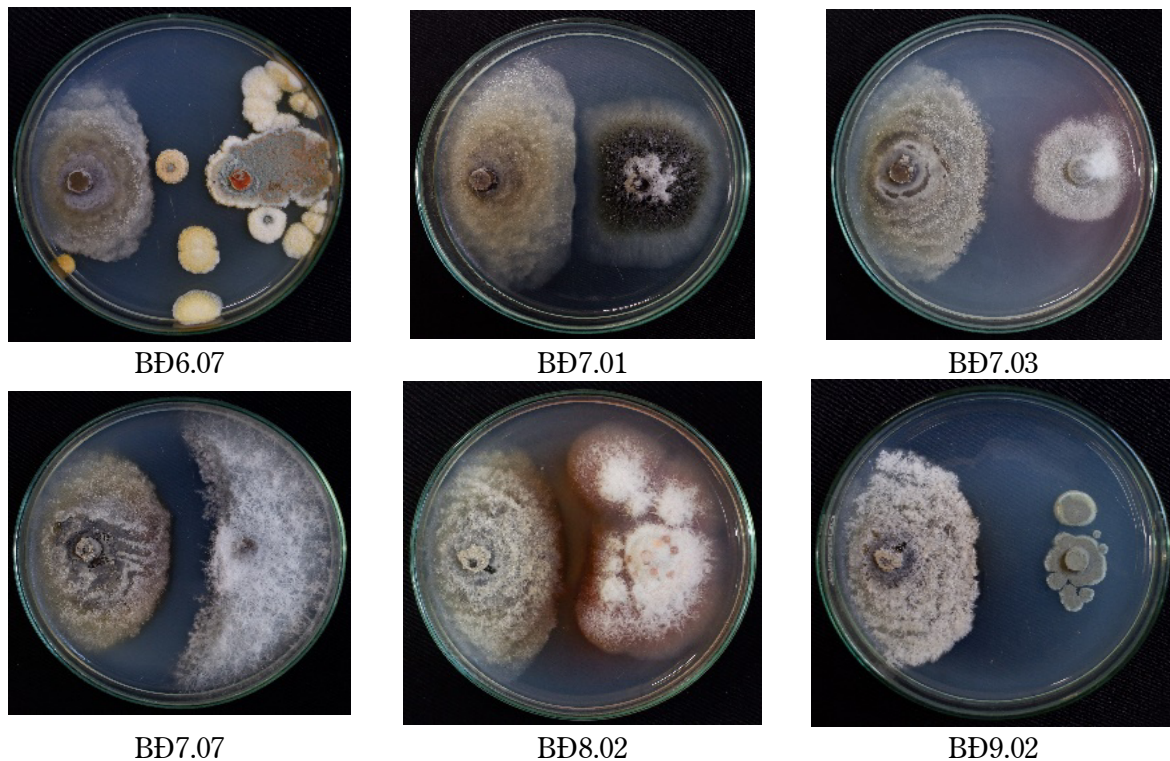


BD5.05



BD6.02



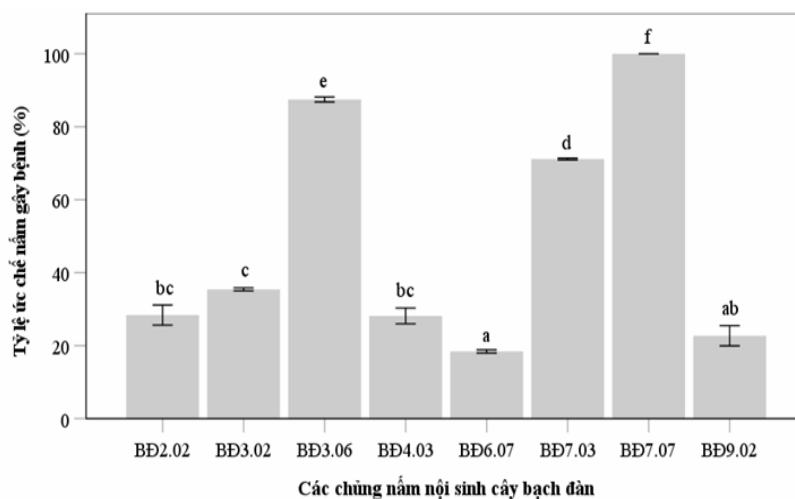


Hình 3. Sinh trưởng của hệ sợi nấm *Cryptosporiopsis eucalypti* (trái) trên môi trường PDA có chủng nấm nội sinh đối kháng (phải)

### 3.3. Kết quả đánh giá hiệu lực ức chế nấm gây bệnh của dịch nuôi cấy nấm nội sinh

Từ kết quả sàng lọc tại thí nghiệm nuôi cấy đối kháng, 8 chủng nấm nội sinh có hiệu lực ức chế

nấm gây bệnh mạnh nhất được chọn để nuôi cấy và thu dịch lọc nuôi cấy. Kết quả thí nghiệm đánh giá hiệu lực ức chế nấm gây bệnh của dịch nuôi cấy nấm nội sinh được trình bày ở hình 4.



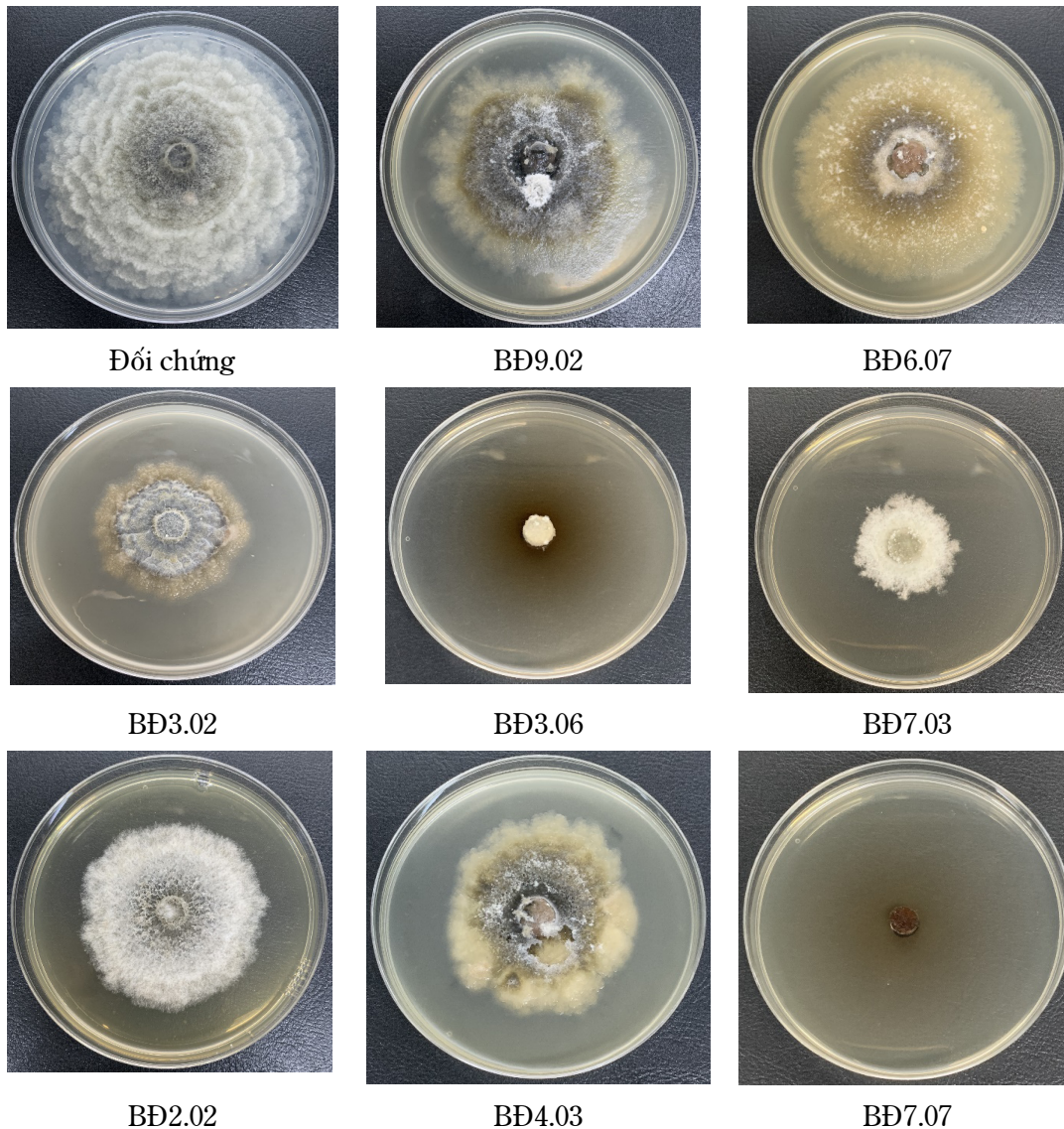
Hình 4. Tỷ lệ ức chế sinh trưởng hệ sợi nấm *Cryptosporiopsis eucalypti* bằng dịch lọc nuôi cấy nấm nội sinh sau 10 ngày nuôi cấy trong bóng tối tại 25°C. Các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) giữa các chủng nấm nội sinh.

Kết quả phân tích ở hình 3 cho thấy, dịch nuôi cấy của chủng nấm BD7.07 có khả năng ức chế hoàn toàn sự phát triển của hệ sợi nấm gây bệnh với hiệu lực ức chế đạt 100%. Chủng BD3.06 có hiệu lực ức chế cao thứ 2 với tỷ lệ là 87,5%, trong khi chủng có hiệu lực ức chế nấm gây bệnh cao thứ 3 là BD7.03 với

tỷ lệ ức chế là 71,2%. Các chủng BD3.02, BD2.02, BD4.03, BD9.02 và BD6.07 có hiệu lực ức chế thấp hơn và lần lượt đạt 35,5%, 28,4%, 28,2%, 22,7% và 18,4%. Các chủng có hiệu lực ức chế nấm gây bệnh mạnh nhất đều được phân lập từ cây khỏe là BD7.07, BD3.06 và BD7.03; trong đó 2 chủng được phân lập

từ lá (BĐ7.07, BĐ3.06) và 1 chủng được phân lập từ cành non (BĐ7.03). Hiệu lực ức chế nấm gây bệnh của dịch nuôi cấy 8 chủng nấm nội sinh có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) (Hình 3 và 4). Hiệu lực ức chế của 3 chủng BĐ3.02, BĐ2.02, BĐ4.03 không có sự khác biệt đáng kể mang ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Tương tự khi so sánh hiệu lực ức chế nấm gây bệnh của 2 chủng BĐ9.02 và BĐ6.07 cũng không có sự khác biệt đáng kể mang ý nghĩa thống

kê ( $p > 0,05$ ). Kết quả đánh giá cũng chỉ ra rằng, một số chủng có hiệu lực ức chế nấm gây bệnh cao ở thí nghiệm đối kháng, tuy nhiên khi sử dụng dịch lọc nuôi cấy của các chủng này thì hiệu lực ức chế đạt không cao như là chủng BĐ9.02 và BĐ6.07 (Hình 5). Điều này có thể giải thích rằng cơ chế kháng trong nuôi cấy đối kháng và thử nghiệm dịch lọc của các chủng nấm này là khác nhau.



**Hình 5. Sinh trưởng của hệ sợi nấm *Cryptosporiopsis eucalypti* trên môi trường có chứa các dịch lọc nuôi cấy nấm nội sinh khác nhau sau 10 ngày nuôi cấy trong bóng tối tại 25°C**

Quan sát hệ sợi nấm *Cryptosporiopsis eucalypti* mọc trên các đĩa petri có chứa dịch lọc nuôi cấy của các chủng nấm nội sinh cho thấy, đường kính khuẩn lạc, màu sắc hệ sợi nấm là rất khác nhau (Hình 5). Điều này có thể do các chủng nấm nội sinh khác nhau khi nuôi cấy trên môi trường PDB tạo ra các hợp chất thứ cấp khác nhau và ảnh hưởng đến sự

phát triển, màu sắc của hệ sợi nấm gây bệnh. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh vi sinh vật nội sinh là tác nhân kiểm soát sinh học của nhiều loài nấm gây bệnh trên thực vật. Trong đó, *Colletotrichum* spp. và *Alternaria* spp. cũng đã được xác định là thực vật nội sinh tiềm năng trong kiểm soát sinh học các mầm bệnh hại thực vật [24 - 26]. Các loài nấm nội sinh có



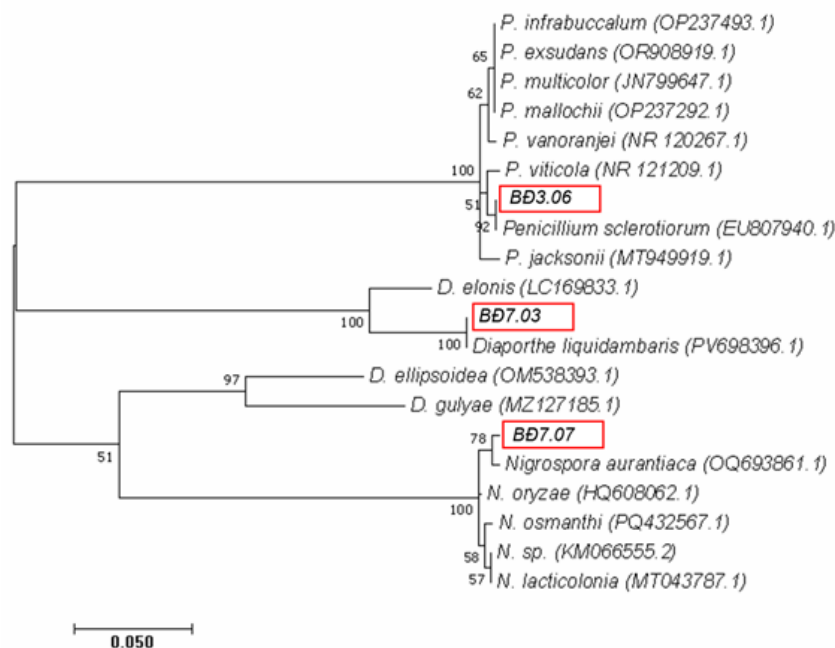
thể tạo ra các hợp chất kháng sinh trong môi trường nuôi cấy và có tác dụng ức chế mầm bệnh thực vật [27, 28]. Axit colletotric phân lập từ nấm nội sinh *Colletotrichum gloeosporioides* cho thấy, hoạt tính kháng khuẩn chống lại *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* và *Sarcina lutea* [27]. Một nhóm các hợp chất flavonoid, flavone ( $C_{15}H_{10}O_2$ ) được chiết xuất từ quá trình nuôi cấy chủng *Colletotrichum* sp. EG4 - một loại nấm nội sinh được phân lập từ lá bạch quả [29], trong khi hợp chất này đã được chứng minh là chất kháng khuẩn chống lại vi khuẩn Gram âm [30]. Monorden, một sản phẩm tự nhiên từ *Colletotrichum graminicola* đã cho thấy hoạt động kháng nấm chống lại mầm bệnh trên lá do *Alternaria alternata*, *Bipoleis zeicola* và *Curvularia lunata* gây ra [31]. Hai hợp chất, Alternariol monomethyl ether và 4S-a,b-dehydrocurvularin phân lập từ loài *Alternaria* có khả năng kháng nấm chống lại sự hình thành chất hấp phụ của *Magnaporthe grisea*, một loại mầm bệnh trên cây lúa [24]. Hợp chất 13-hydroxylmacro-phorin được phân

lập từ vi khuẩn nội sinh *Microdiplodia* sp. TT-12 được coi là chất kháng nấm ức chế *Raffaelea quercivora* gây bệnh héo cây sồi ở Nhật Bản [32]. Một mầm bệnh héo cây sồi khác ở Hoa Kỳ, *Ceratocystis fagacearum*, cũng bị ức chế bởi vi khuẩn nội sinh là *Bacillus pumilis*, *Pseudomonas denitrificans* và *Erwinia herbicola* [33]. Tuy nhiên, hiện nay chưa có nghiên cứu nào về hoạt tính kháng nấm *Cryptosporiopsis eucalypti* bằng vi nấm nội sinh. Do đó, những phát hiện trong nghiên cứu này có thể mở đường cho việc sử dụng nấm nội sinh làm tác nhân kiểm soát sinh học tiềm năng trong quản lý bệnh đốm lá bạch đàn ở Việt Nam. Tách chiết các chất chuyển hóa từ quá trình nuôi cấy nấm nội sinh và xác định các hợp chất có hoạt tính kháng nấm gây bệnh cũng như nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học kiểm soát bệnh đốm lá bạch đàn cần được tiến hành trong các nghiên cứu tiếp theo.

#### 3.4. Kết quả định danh các chủng nấm nội sinh có hoạt tính kháng nấm gây bệnh

**Bảng 3. Kết quả định danh các chủng nấm nội sinh có tiềm năng ức chế nấm gây bệnh đốm lá bạch đàn lai**

| Tên chủng | Tên loài gần nhất               | Điểm đạt cao nhất | Tổng điểm | Tỷ lệ trùng lặp (%) | Mã số GenBank tham chiếu |
|-----------|---------------------------------|-------------------|-----------|---------------------|--------------------------|
| BĐ3.06    | <i>Penicillium sclerotiorum</i> | 1.035             | 1.035     | 99,82               | EU807940.1               |
| BĐ7.03    | <i>Diaporthe liquidambaris</i>  | 822               | 822       | 100                 | PV698396.1               |
| BĐ7.07    | <i>Nigrospora aurantiaca</i>    | 977               | 977       | 99,08               | OQ693861.1               |



**Hình 6. Cây phát sinh chủng loại thể hiện quan hệ di truyền của 3 chủng BĐ3.06, BĐ7.03, BĐ7.07 và các loài có tên gần nhất dựa trên trình tự gen ITS**

**Bảng 4. Khoảng cách di truyền giữa 3 mẫu nấm nghiên cứu với các loài tương đồng trên GenBank**

|                                                  | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    | 20 |
|--------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 1 B7.07                                          |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 2 B7.03                                          | 0,413 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 3 B3.06                                          | 0,421 | 0,502 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 4 <i>Nigrospora aurantiaca</i> _(OQ693861.1)     | 0,006 | 0,424 | 0,421 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 5 <i>N. sp.</i> _(KM066555.2)                    | 0,012 | 0,421 | 0,419 | 0,012 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 6 <i>N. oryzae</i> _(HQ608062.1)                 | 0,009 | 0,416 | 0,414 | 0,009 | 0,003 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 7 <i>N. lacticolonia</i> _(MT043787.1)           | 0,012 | 0,421 | 0,419 | 0,012 | 0,000 | 0,003 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 8 <i>N. osmanthi</i> _(PQ432567.1)               | 0,015 | 0,430 | 0,411 | 0,015 | 0,003 | 0,006 | 0,003 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 9 <i>Diaporthe liquidambaris</i> _(PV698396.1)   | 0,413 | 0,000 | 0,502 | 0,424 | 0,421 | 0,416 | 0,421 | 0,430 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 10 <i>D. elonis</i> _(LC169833.1)                | 0,412 | 0,070 | 0,465 | 0,422 | 0,414 | 0,409 | 0,414 | 0,422 | 0,070 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 11 <i>D. ellipsoidea</i> _(OM538393.1)           | 0,299 | 0,380 | 0,391 | 0,312 | 0,301 | 0,296 | 0,301 | 0,295 | 0,380 | 0,347 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 12 <i>D. gulyae</i> _(MZ127185.1)                | 0,298 | 0,380 | 0,419 | 0,303 | 0,295 | 0,300 | 0,295 | 0,289 | 0,380 | 0,392 | 0,122 |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 13 <i>Penicillium sclerotiorum</i> _(EU807940.1) | 0,421 | 0,502 | 0,000 | 0,421 | 0,419 | 0,414 | 0,419 | 0,411 | 0,502 | 0,465 | 0,391 | 0,419 |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 14 <i>P. vanoranjei</i> _(NR_120267.1)           | 0,417 | 0,503 | 0,012 | 0,417 | 0,414 | 0,409 | 0,414 | 0,406 | 0,503 | 0,465 | 0,372 | 0,399 | 0,012 |       |       |       |       |       |       |    |
| 15 <i>P. viticola</i> _(NR_121209.1)             | 0,429 | 0,517 | 0,009 | 0,429 | 0,426 | 0,421 | 0,426 | 0,419 | 0,517 | 0,479 | 0,384 | 0,412 | 0,009 | 0,015 |       |       |       |       |       |    |
| 16 <i>P. mallochii</i> _(OP237292.1)             | 0,422 | 0,503 | 0,009 | 0,422 | 0,419 | 0,414 | 0,419 | 0,412 | 0,503 | 0,465 | 0,377 | 0,404 | 0,009 | 0,003 | 0,012 |       |       |       |       |    |
| 17 <i>P. multicolor</i> _(JN799647.1)            | 0,422 | 0,503 | 0,009 | 0,422 | 0,419 | 0,414 | 0,419 | 0,412 | 0,503 | 0,465 | 0,377 | 0,404 | 0,009 | 0,003 | 0,012 | 0,000 |       |       |       |    |
| 18 <i>P. jacksonii</i> _(MT949919.1)             | 0,422 | 0,503 | 0,015 | 0,422 | 0,419 | 0,414 | 0,419 | 0,412 | 0,503 | 0,465 | 0,382 | 0,409 | 0,015 | 0,015 | 0,012 | 0,012 | 0,012 |       |       |    |
| 19 <i>P. infrabuccalum</i> _(OP237493.1)         | 0,422 | 0,503 | 0,009 | 0,422 | 0,419 | 0,414 | 0,419 | 0,412 | 0,503 | 0,465 | 0,377 | 0,404 | 0,009 | 0,003 | 0,012 | 0,000 | 0,000 | 0,012 |       |    |
| 20 <i>P. exsudans</i> _(OR908919.1)              | 0,422 | 0,503 | 0,009 | 0,422 | 0,419 | 0,414 | 0,419 | 0,412 | 0,503 | 0,465 | 0,377 | 0,404 | 0,009 | 0,003 | 0,012 | 0,000 | 0,000 | 0,012 | 0,000 |    |

Các chủng nấm nội sinh tiềm năng được xác định là BD3.06, BD7.03 và BD7.07 có hiệu lực ức chế nấm gây bệnh cao hơn 70%. Ba chủng nấm này được định danh bằng phương pháp giải trình tự nucleotide vùng gen ITS. Kết quả đọc trình tự và so sánh với cơ sở dữ liệu của GenBank thông qua công cụ tìm kiếm BLAST được thể hiện ở bảng 3. Cây phát sinh chủng loại trên hình 6 cho thấy, cả ba chủng nấm được định danh đều có mối quan hệ di truyền gần nhất với ba loài trên GenBank trong bảng 3. Cụ thể, chủng BD3.06 được nhóm cùng với loài *P. sclerotiorum* với giá trị ủng hộ (bootstrap 92%), trong đó tỷ lệ tương đồng với loài *P. sclerotiorum* là 99,82% và khoảng cách di truyền là 0,0% (Bảng 4); chủng BD7.03 được nhóm cùng với loài *Diaporthe liquidambaris* với giá trị ủng hộ 100%, khoảng cách di truyền 0,0%; chủng BD7.07 được nhóm cùng với loài *Nigrospora aurantiaca* với giá trị ủng hộ 78% và khoảng cách di truyền là 0,6%. Kết quả so sánh và phân tích mối quan hệ di truyền chỉ ra ba chủng nấm nội sinh có hiệu lực ức chế nấm gây bệnh đốm lá bạch đàn lai được định danh đến

tên loài là *Penicillium sclerotiorum* (chủng BD3.06), *Nigrospora aurantiaca* (chủng BD7.07) và *Diaporthe liquidambaris* (chủng BD7.03), với độ tương đồng đạt lần lượt là 99,82%, 99,08% và 100%.

Khuẩn lạc của 3 chủng nấm *Penicillium sclerotiorum* (BD3.06), *Nigrospora aurantiaca* (BD7.07) và *Diaporthe liquidambaris* (BD7.03) được thể hiện ở hình 7. Chủng nấm *Penicillium sclerotiorum* có sợi nấm mịn, ban đầu màu trắng sau đó chuyển sang màu xanh có ánh vàng. Mặt dưới khuẩn lạc ban đầu màu trắng ngà, sau đó chuyển sang màu cam. Xung quanh khuẩn lạc có màu xanh. Chủng nấm *Nigrospora aurantiaca* có sợi nấm khô, màu trắng, khuẩn lạc dạng sợi bông có sợi nấm màu trắng sinh trưởng hướng lên từ bề mặt thạch. Mặt dưới khuẩn lạc ban đầu màu trắng, sau đó chuyển dần sang màu xám nâu. Chủng nấm *Diaporthe liquidambaris* có sợi nấm khô và mịn, khuẩn lạc ban đầu màu trắng, sau đó chuyển sang màu xám nhạt, ở giữa khuẩn lạc có màu xanh. Mặt dưới khuẩn lạc màu xám nhạt, ở giữa khuẩn lạc có màu xanh.



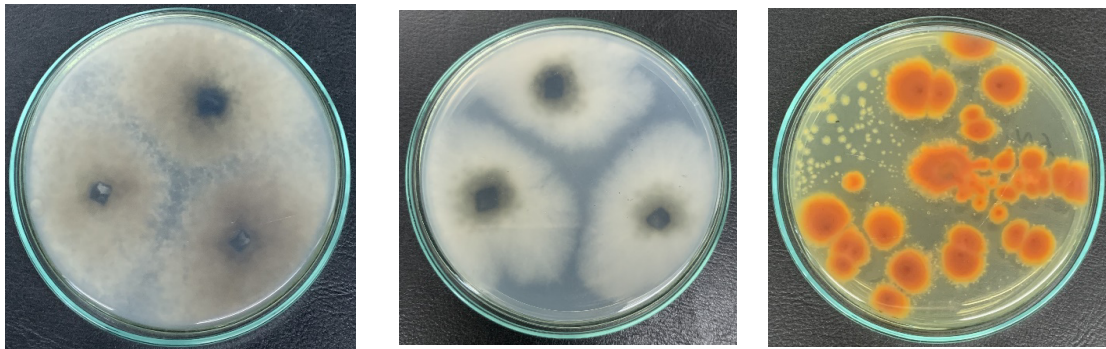
BD7.07



BD7.03



BD3.06



Hình 7. Hệ sợi nấm phát triển trên môi trường PDA của các chủng nấm nội sinh đã được định danh:  
Mặt trước (ảnh trên) và mặt sau (ảnh dưới)

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu sàng lọc được 17 chủng nấm nội sinh có hoạt tính kháng nấm gây bệnh đốm lá bạch đàn với tỷ lệ ức chế nấm gây bệnh dao động từ 47,78% đến 66,04%. Tỷ lệ ức chế nấm gây bệnh của các chủng nấm nội sinh có sự khác biệt đáng kể và tần suất xuất hiện các chủng nấm kháng bệnh có sự khác nhau giữa cây khỏe và cây bị bệnh. Dịch lọc nuôi cấy của các chủng nấm nội sinh có khả năng ức chế nấm gây bệnh và hiệu lực ức chế của các chủng nấm có sự khác biệt đáng kể. Xác định được 3 chủng nấm nội sinh tiềm năng kiểm soát sinh học nấm gây bệnh là BD7.07, BD3.06 và BD7.03, với hiệu lực ức chế lần lượt là 100%, 87,5% và 71,2%. Các chủng nấm nội sinh có tiềm năng được định danh tên loài là *Penicillium sclerotiorum*, *Diaporthe liquidambaris* và *Nigrospora aurantiaca*.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Nông nghiệp và PTNT qua đề tài “Nghiên cứu ứng dụng vi nấm nội sinh trong phòng trừ sinh học một số loài nấm bệnh gây hại keo lai và bạch đàn lai ở Việt Nam”, theo Quyết định số 2617/QĐ-BNN-KHCN, ngày 29/6/2023.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sankaran K. V., Sutton B. C. and Balasundaran M. (1995). *Cryptosporiopsis eucalypti* sp. nov., causing leaf spots of eucalypts in Australia, India and USA. *Mycological Research*, 99, 827 - 830.
2. Gadgil P. D. and Dick M. (1999). Fungi silvicolae novazelandiae: 2. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 29, 440 - 458.
3. Old K. M., Dudzinski M. J., Pongpanich K., Yuan Z. Q., Thu P. Q. and Nguyen N. T. (2002).

*Cryptosporiopsis* leaf spot and shoot blight of eucalypts. *Australasian Plant Pathology*, 31, 337.

4. Old K. M., Wingfield M. J. and Yuan Z. Q. (2003). *Cryptosporiopsis* leaf blight. A manual of diseases of eucalyptus in South-East Asia, *CIFOR and ACIAR*, Bogor, Indonesia.

5. Old K. M. and Yuan Z. Q. (1994). Foliar and stem diseases of eucalyptus in Vietnam and Thailand, Internal Report, CSIRO Division of Forestry and Australian Centre for Agricultural.

6. Phạm Quang Thu (2005). Bệnh đốm lá, khô ngọn bạch đàn do nấm *Cryptosporiopsis eucalypti* Sankaran & Sutton. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 8, 67 - 68.

7. Tran Thanh Trang (2007). Resistance screening to fungal diseases for plantation Eucalypts in Vietnam; Molecular tools to assist fungal detection and identification, Master Thesis, University of Tasmania, Australia.

8. Phạm Quang Thu (2016). *Danh mục sinh vật gây hại trên 17 loài cây lâm nghiệp ở Việt Nam*. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.

9. Nguyen M. H., Yong J. H., Sung H. J. and Lee J. K. (2020). Screening of endophytic fungal isolates against *Raffaelea quercus-mongolicae* causing oak wilt disease in Korea. *Mycobiology*, 48, 484 - 494.

10. Dang Q. N., Burgess T. I., Mc Comb J., Pham T. Q., Le B. V., Tran T. V. et al. (2023). Fungal and bacterial endophytes antagonistic to *Phytophthora* species causing root rot in *Cinnamomum cassia*. *Mycological Progress*, 22, 28.

11. 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. *Elsevier*, 315 - 322.

12. George D. and Mallery P. (2021). IBM SPSS statistics 27 step by step: A simple guide and reference, 17th Edition, Routledge, New York.

13. Kumar S., Stecher G. and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870 - 1874.

14. Giang T. T. H., Quan N. D., Linh D. A., Lan N. N., Huy L. Q., Lien N. T. K. *et al.* (2021). Isolation and identification of endophytic fungi from *Catharanthus roseus* and *Scutallaria barbata*. *Academia Journal of Biology*, 43, 1 - 10.

15. Nguyễn Phạm Tuấn, Bằng Hồng Lam và Huỳnh Cảnh Thủy Trang (2021). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn, nấm nội sinh có khả năng sản xuất Lovastatin, prodigiosin và enzyme phytase từ cây dược liệu. *Tạp chí Trường Đại học Tây Nguyên*, 47, 72 - 79.

16. Đàm Văn Toàn, Phạm Quang Thu, Đặng Như Quỳnh và Nguyễn Minh Chí (2018). Vi sinh vật nội sinh và sử dụng trong quản lý bệnh rụng lá mùa mưa cây cao su ở Đông Nam bộ. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 22, 25 - 32.

17. Trần Thị Phương Hạnh và Nguyễn Anh Dũng (2021). Tuyển chọn vi nấm nội sinh rễ cây Hồ tiêu tại Gia Lai có hoạt tính kháng tuyến trùng. *Tạp chí Trường Đại học Tây Nguyên*, 47, 21 - 28.

18. Yong J. H. (2019). Diversity analysis of endophytic fungi isolated from pine and oak trees in Korea, Master Thesis, Kangwon National University.

19. Park Y. H., Lee S. G., Ahn D. J., Kwon T. R., Park S. U., Lim H. S. *et al.* (2012). Diversity of fungal endophytes in various tissues of *Panax ginseng* Meyer cultivated in Korea. *Journal of Ginseng Research*, 36, 211 - 217.

20. Jayshree M. K. and Lakshman H. C. (2014). Diversity of the endophytic fungi isolated from *Acalypha indica* Linn - A promising medicinal plant. *International Journal of Scientific and Research Publication*, 4, 1 - 7.

21. Mishra A., Gond S. K., Kumar A., Sharma V. K., Verma S. K., Kharwar R. N. *et al.* (2012). Season and tissue type affect fungal endophyte communities of the Indian medicinal plant *Tinospora cordifolia*

more strongly than geographic location. *Microbial Ecology*, 64, 388 - 398.

22. Chareprasert S., Piapukiew J., Thienhirun S., Whalley A. J. S. and Sihanonth P. (2006). Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr.. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 481 - 486.

23. Huang W. Y., Cai Y. Z., Hyde K. D., Corke H. and Sun M. (2008). Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal diversity*, 33, 61 - 75.

24. Jeon Y. T., Ryu K. H., Kang M. K., Park S. H., Yun H., Pham Q. *et al.* (2009). Alternariol monomethyl ether and  $\alpha$ ,  $\beta$ -Dehydrocurvularin from endophytic fungi *Alternaria* spp. inhibit appressorium formation of *Magnaporthe grisea*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological and Chemistry*, 53, 39 - 42.

25. Cannon P. F., Damm U., Johnston P. R. and B.S. Weir B. S. (2012). Colletotrichum - current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73, 181 - 213.

26. Vasundhara M., Reddy M. S. and Kumar A. (2019). Secondary metabolites from endophytic fungi and their biological activities, in *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, 237 - 258.

27. Zou W. X., Meng J. C., Lu H., Chen G. X., Shi G. X., Zhang T. Y. *et al.* (2000). Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *Journal of Natural Products*, 63, 1529 - 1530.

28. Jeon Y. T., Jun E. M., Oh K. B., Pham Q. T. and Kim S. U. (2010). Identification of 12-Methyltetradecanoic acid from endophytic *Senotrophomonas maltophilia* as inhibitor of appressorium formation of *Magnaporthe oryzae*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53, 578 - 583.

29. Gunatilaka A. A. L. (2006). Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products*, 69, 509 - 526.

30. Kamlesh K., Sivakumar T. and Afroze A. (2017). Antimicrobial activity of flavone analogues. *Journal of Applied Pharmacy*, 9, 1000232.

31. Wicklow D. T., Jordan A. M. and Gloer J. B. (2009). Antifungal metabolites (monorden, monocillins I, II, III) from *Colletotrichum graminicola*, a systemic vascular pathogen of maize. *Mycological Research*, 113, 1433 - 1442.
32. Shiono Y., Koyama H., Murayama T. and Koseki T. (2015). New sesquiterpenes from the endophyte *Microdiplodia* sp. TT-12 and their antimicrobial activity. *Phytochemistry Letters*, 14, 143 - 147.
33. Brooks D. S., Gonzalez C. F., Appel D. N. and Filer T. H. (1994). Evaluation of endophytic bacteria as potential biological-control agents for oak wilt. *Biological Control*, 4, 373 - 381.

**BIOCONTROL OF *Cryptosporiopsis eucalypti* CAUSING LEAF SPOT OF EUCALYPTS USING ENDOPHYTIC FUNGI**

**Do Hoang Yen <sup>1</sup>, Nguyen Thi Minh Hang <sup>2</sup>, Nguyen Thi Loan <sup>2</sup>,  
Tran Anh Tuan <sup>2</sup>, Pham Xuan Truong <sup>2</sup>, Tran Thanh Trang <sup>2</sup>,  
Nguyen Minh Chi <sup>2</sup>, Ha Bich Hong <sup>1</sup>, Nguyen Manh Ha<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> College of Forestry Biotechnology, Vietnam National University of Forestry

<sup>2</sup> Forest Protection Research Centre, Vietnamese Academy of Forest Sciences

**Abstract**

Eucalyptus leaf spot disease, caused by *Cryptosporiopsis eucalypti*, is identified as a significant threat to eucalyptus forests in Vietnam. This study aimed to screen and select endophytic fungal isolates with potential antifungal activities against *C. eucalypti*, as a basis for developing microbial production and biocontrol agents. Endophytic fungi were isolated from *Eucalyptus hybrid* in both healthy trees and susceptible trees. The antifungal activity of endophytic fungi was assessed using a dual culture test. From the isolation process, 60 endophytic fungal isolates were obtained, with variations in their hosts across different tree organs. Results from the antifungal activity screening indicated that 17 isolates exhibited antifungal activities, with the inhibition rates against the fungal pathogen ranging from 47.78% to 66.04%. Specifically, 11 isolates were isolated from healthy trees, while 6 isolates originated from symptomatic trees. Further evaluation of antifungal activity using a culture filtrate test revealed that three isolates: BD7.07, BD3.06, and BD7.03 showed the most potent antifungal effects, with inhibition rates of 100%, 87.5% and 71.2%, respectively. Identification of these fungal isolates confirmed their scientific names as *Penicillium sclerotiorum* (BD3.06), *Nigrospora aurantiaca* (BD7.07) and *Diaporthe liquidambaris* (BD7.03). These endophytic fungi have potential as biocontrol agents for managing eucalyptus leaf spot disease in Vietnam.

**Keywords:** *Eucalyptus leaf spot*, *Cryptosporiopsis eucalypti*, *biocontrol*, *Endophytic fungi*, *Nigrospora aurantiaca*.

**Ngày nhận bài:** 15/5/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 20/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 24/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 27/6/2025

# PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG CỦA XẠ KHUẨN ĐỐI VỚI NẤM *Fusarium oxysporum* GÂY BỆNH HÉO VÀNG TRÊN CÂY ĐẬU NÀNH RAU

Quảng Khôi Ngô<sup>1</sup>, Lê Minh Tường<sup>2,\*</sup>

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

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

\*Email: lmtuong@ctu.edu.vn

## TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là tìm ra xạ khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo vàng trên cây đậu nành rau. Khả năng đối kháng của 26 chủng xạ khuẩn đối với nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo vàng trên cây đậu nành rau được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm, với 5 lần lặp lại. Kết quả cho thấy, 4 chủng xạ khuẩn: PT-AG9, CM-AG27, PT-AG16, CM-AG33 thể hiện khả năng đối kháng cao với bán kính vòng vô khuẩn lần lượt là 14,25 mm; 14,00 mm; 13,50 mm; 14,25 mm và hiệu suất đối kháng lần lượt là 76,39%; 71,99%; 68,86%, 68,33% ở thời điểm 9 ngày sau khi bố trí thí nghiệm. Khả năng tiết enzyme  $\beta$ -glucanase và chitinase của 4 chủng xạ khuẩn cũng được thực hiện trên môi trường  $\beta$ -glucan với 5 lần lặp lại. Kết quả cho thấy, chủng xạ khuẩn PT-AG16 có khả năng tiết enzyme  $\beta$ -glucanase cao nhất, với bán kính vòng phân giải là 12,88 mm ở thời điểm 14 ngày sau khi cấy. Bên cạnh đó, chủng xạ khuẩn CM-AG33 thể hiện khả năng phân giải chitin mạnh nhất, với vòng phân giải lần lượt 126,50 mm và 26,25 mm sau 7 ngày.

**Từ khóa:** Bệnh héo vàng trên đậu nành rau, chitin,  $\beta$ -glucan, *Fusarium oxysporum*, xạ khuẩn.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, bệnh héo vàng do nấm *Fusarium oxysporum* Schltdl gây ra đã trở thành một trong những tác nhân gây thiệt hại nghiêm trọng đối với cây đậu nành rau, ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất và chất lượng nông sản. Nấm *Fusarium oxysporum* là một trong những loại nấm gây bệnh từ đất và có thể gây ra bệnh thối rễ và héo trên cây đậu nành. Khi nấm tấn công cây đậu nành, rễ cái phía dưới và rễ bên chuyển sang màu nâu đến đen, cho thấy mạch dẫn có sự đổi màu. Nếu bệnh trở nên nghiêm trọng, đậu nành bị nhiễm bệnh có thể xuất hiện các triệu chứng trên lá bao gồm cả mép lá hoặc toàn bộ lá bị vàng, còi cọc, héo rũ và cuối cùng là rụng lá, chết cây [1].

Việc áp dụng biện pháp hóa học được nông dân ưu tiên sử dụng trong phòng trừ bệnh do mang lại hiệu quả cao và giải quyết kịp thời sự lây lan của mầm bệnh, tuy nhiên việc sử dụng nhiều và lạm dụng thuốc gây ra tác động tiêu cực đến môi trường và con người như: Ô nhiễm môi trường, làm mất sự cân bằng và đa dạng sinh học trong tự nhiên, tăng tính kháng thuốc của nhiều dịch hại, xuất hiện thêm nhiều loài dịch hại mới dẫn đến hiệu lực của thuốc bị hạn chế và giảm sút [2].

Ngày nay, một trong những biện pháp phòng trừ bệnh hại cây trồng thay thế thuốc hóa học đã và đang được nghiên cứu, biện pháp sử dụng vi sinh vật có lợi đang được quan tâm, trong đó xạ khuẩn là một trong những vi sinh vật có triển vọng trong phòng trừ bệnh hại cây trồng do chúng có khả năng tiết ra một số chất đối kháng với nấm bệnh như: Enzyme chitinase, enzyme glucanase... [3], tiết ra nhiều chất kháng sinh (streptomycin, validamycin, kasugamycin, gentamycin...) [4]. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm ra chủng xạ khuẩn có khả năng quản lý bệnh héo vàng trên cây đậu nành rau, làm cơ sở cho những nghiên cứu sau để tìm ra chế phẩm sinh học có nguồn gốc từ xạ khuẩn có khả năng quản lý bệnh héo vàng trên cây đậu nành rau nói riêng và bệnh có nguồn gốc từ đất nói chung vừa hiệu quả, vừa thân thiện với môi trường sống.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

**Nguồn nấm:** Dòng nấm *Fusarium oxysporum* (Fu.CM-AG6) do Phòng thí nghiệm Bệnh cây, Khoa Bảo vệ thực vật, Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ cung cấp. Dòng nấm này có khả năng gây hại nặng trong 20 dòng nấm được phân lập từ các



mẫu bệnh điển hình của bệnh héo vàng trên cây đậu nành rau tại huyện Chợ Mới, tỉnh An Giang.

**Nguồn xạ khuẩn:** Xạ khuẩn được phân lập từ đất trồng đậu nành rau cùng với địa điểm thu mẫu nấm gây bệnh. Mẫu đất được lấy xung quanh vùng rễ và cách mặt đất 10 - 20 cm, không lấy những mẫu đất trên bề mặt và xa vùng rễ. Mẫu đất cho vào túi nylon riêng lẻ, sau đó mang về Phòng thí nghiệm Bệnh cây và được phân lập theo phương pháp của Hsu và Lockwood (1975) [5].

## **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

### **2.2.1. Thu thập và phân lập xạ khuẩn**

Thu mẫu đất trên những ruộng trồng đậu nành rau có diện tích lớn hơn 1.000 m<sup>2</sup> ở một số tỉnh, thành phố ở đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) như: Cần Thơ, An Giang, Hậu Giang và Đồng Tháp. Chọn đất ở những cây khỏe và thu ở độ sâu từ 10 - 25 cm. Các mẫu đất được phân lập theo phương pháp của Hsu và Lockwood (1975) [5] như sau: Hòa 4 g đất vào 40 ml nước cất thanh trùng cho vào ống facol 50 ml. Lắc trong 30 phút. Pha loãng ở 4 nồng độ: 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>. Rút 50 µl huyền phù ở nồng độ 10<sup>-3</sup> và 10<sup>-4</sup> cho vào đĩa petri chứa môi trường ISP4 và chà đĩa. Đĩa được ủ trong 2 - 3 ngày, sau đó tách rỗng xạ khuẩn trên môi trường MS. Các chủng xạ khuẩn phân lập được tồn trữ ở 8°C để sử dụng cho các thí nghiệm.

**2.2.2. Đánh giá khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn với dòng nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo vàng trên cây đậu nành rau trong điều kiện phòng thí nghiệm.**

**Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 1 nhân tố, 26 nghiệm thức tương ứng với 26 chủng xạ khuẩn triển vọng, với 5 lần lặp lại.

**Tiến hành thí nghiệm:** Những chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong môi trường MS trong 6 ngày, xác định mật số và chuyển về huyền phù bào tử xạ khuẩn là 10<sup>8</sup> cfu/ml. Chủng nấm *Fusarium oxysporum* được nuôi cấy trong môi trường PDA trong 7 ngày.

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

xạ khuẩn bằng khoanh giấy thấm tẩm nước cất thanh trùng.

**Chỉ tiêu theo dõi:** Đo bán kính vòng vô khuẩn (BKVVK) ở các thời điểm 3, 5, 7, 9 ngày sau khi bố trí thí nghiệm. Mỗi đĩa petri được quan sát và đo khoảng cách (tính bằng mm) từ rìa khuẩn lạc xạ khuẩn đến rìa ngoài của vùng không có sự phát triển của nấm.

Tính hiệu suất đối kháng (HSDK) [6] ở các thời điểm 3, 5, 7, 9 ngày sau khi bố trí thí nghiệm.

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

Trong đó: BKTNđc là bán kính tán nấm phát triển về phía đối chứng; BKTNxk là bán kính tán nấm phát triển về phía xạ khuẩn.

**2.2.3. Khảo sát khả năng phân giải  $\beta$ -glucan của các chủng xạ khuẩn có triển vọng trên môi trường thạch.**

**Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 1 nhân tố, 4 nghiệm thức (gồm 4 chủng xạ khuẩn: PT-AG9, CM-AG27, PT-AG16, CM-AG33), với 5 lần lặp lại.

**Tiến hành thí nghiệm:** Những chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong môi trường MS trong 6 ngày, xác định mật số và chuyển về huyền phù bào tử xạ khuẩn là 10<sup>8</sup> cfu/ml.

**Cách thực hiện:** Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Renwick và cs (1991) [7]. Các chủng xạ khuẩn được cấy thành 3 điểm cách đều nhau trên đĩa petri chứa môi trường chứa cơ chế  $\beta$ -glucan. Các đĩa thí nghiệm được đặt ở điều kiện nhiệt độ phòng. Xác định hoạt tính enzyme  $\beta$ -glucanase ở từng thời điểm bằng cách tráng dịch congo - red 0,6% trên đĩa thạch, đổ bỏ phần dung dịch congo - red 0,6% thừa và tráng bề mặt agar với nước.

**Chỉ tiêu theo dõi:** Đo bán kính vòng phân giải  $\beta$ -glucan (mm) là vùng không bắt màu thuốc nhuộm ở các thời điểm 10, 12, 14 ngày sau khi cấy.

**2.2.4. Khảo sát khả năng phân giải chitin của các chủng xạ khuẩn có triển vọng trên môi trường thạch.**

**Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 1 nhân tố, 4 nghiệm thức (gồm 4 chủng xạ khuẩn: PT-AG9, CM-AG27, PT-AG16, CM-AG33), với 5 lần lặp lại.

**Tiến hành thí nghiệm:** Xạ khuẩn được nuôi trong môi trường MS trong 6 ngày xác định mật số và

chuyển về huyền phù với mật số xạ khuẩn cần dùng là  $10^8$  cfu/ml.

**Cách thực hiện:** Nhúng khoanh giấy thấm vô trùng (đường kính 5 mm) vào huyền phù từng chủng xạ khuẩn và đặt trên đĩa petri có chứa 10 ml môi trường chitin 4%. Các đĩa petri thí nghiệm được đặt ở điều kiện nhiệt độ phòng khoảng 28°C.

**Chỉ tiêu theo dõi:** Đo bán kính vòng phân giải chitin (mm) ở thời điểm 3, 5, 7 ngày sau khi bố trí thí nghiệm bằng cách nhuộm với dung dịch lugol (1 g  $I_2$  + 2 g KI + 100 ml nước cất). Ở mỗi thời điểm ghi nhận chỉ tiêu, tiến hành nhuộm đĩa bằng cách đổ thuốc nhuộm lugol lên bề mặt môi trường agar, để yên khoảng 10 phút, đổ bỏ phần dung dịch lugol thừa và tráng bề mặt môi trường agar lại với nước. Đo bán

kính vùng không bắt màu thuốc nhuộm là vòng phân giải chitin.

**Xử lý số liệu:** Các số liệu ghi nhận được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel và phân tích bằng phần mềm thống kê SPSS qua phép thử DUNCAN.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả thu thập và phân lập xạ khuẩn

Tổng cộng phân lập được 185 chủng xạ khuẩn: 75 chủng tại tỉnh An Giang, 40 chủng tại tỉnh Đồng Tháp và 70 chủng tại thành phố Cần Thơ. Sự phân bố các chủng xạ khuẩn theo địa điểm thu mẫu và phân lập được trình bày ở bảng 1.

**Bảng 1. Địa điểm và số lượng các chủng xạ khuẩn phân lập**

| STT       | Địa điểm thu mẫu xạ khuẩn                        | Số mẫu đất | Số chủng phân lập được |
|-----------|--------------------------------------------------|------------|------------------------|
| 1         | Thị trấn Chợ Mới, huyện Chợ Mới, tỉnh An Giang   | 15         | 45                     |
| 2         | Xã Phú Xuân, huyện Phú Tân, tỉnh An Giang        | 8          | 30                     |
| 3         | Xã Tân Long, huyện Thanh Bình, tỉnh Đồng Tháp    | 10         | 40                     |
| 4         | Xã Thới Thạnh, huyện Thới Lai, thành phố Cần Thơ | 12         | 40                     |
| 5         | Phường Thới Hòa, quận Ô Môn, thành phố Cần Thơ   | 7          | 30                     |
| Tổng cộng |                                                  | 52         | 185                    |

Trên môi trường nuôi cấy (môi trường MS), hình thái các chủng xạ khuẩn phân lập được rất đa dạng về màu sắc khuẩn ty cơ chất, màu sắc khuẩn ty khí sinh, sắc tố khuếch tán trên môi trường cũng như hình dạng khuẩn lạc. Nhìn chung, các chủng xạ khuẩn phát triển khá chậm, khoảng 2 - 4 ngày tùy theo chủng xạ khuẩn. Bề mặt khuẩn lạc khô ráo, không nhẵn bóng như vi khuẩn, hình dạng đa số tròn, một

số chủng tạo thành vòng đồng tâm. Màu sắc đa dạng như: Trắng, xám, nâu... Các chủng xạ khuẩn có khả năng khuếch tán sắc tố trên môi trường (Hình 1). Ngoài ra, các hệ sợi của xạ khuẩn có khả năng ăn sâu vào môi trường. Các đặc điểm quan sát trên tương tự với mô tả về xạ khuẩn trong kết quả nghiên cứu của Nguyễn Lâm Dũng và cs (2002) [8]; Naidenova và Vladimirova (2002) [9].



**Hình 1. Khuẩn lạc của các chủng xạ khuẩn phân lập trên môi trường MS**

#### 3.2. Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo vàng trên cây đậu nành rau trong điều kiện phòng thí nghiệm

Khả năng đối kháng với nấm *Fusarium oxysporum* của các chủng xạ khuẩn được đánh giá thông qua chỉ tiêu BKVVK (Bảng 2) và HSDK (Bảng 3).

##### 3.2.1. BKVVK

Kết quả phân lập được 185 chủng xạ khuẩn từ đất ruộng trồng đậu nành rau ở một số tỉnh, thành ở ĐBSCL. Bằng phương pháp đánh giá nhanh khả năng đối kháng của 185 chủng xạ khuẩn phân lập với nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo vàng trên đậu nành rau, đã chọn được 26 chủng xạ khuẩn thực sự có khả năng đối kháng, từ đó tiếp tục đánh giá khả

năng đối kháng nấm *Fusarium oxysporum* trong điều kiện phòng thí nghiệm với 5 lần lặp lại. Kết quả đánh giá khả năng đối kháng thông qua BKVVK và HSDK của các chủng xạ khuẩn thí nghiệm được trình bày ở bảng 2 và 3.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, ở thời điểm 3 ngày sau khi bố trí thí nghiệm (NSBT), chủng xạ khuẩn CM-AG27 thể hiện khả năng đối kháng mạnh với BKVVK là 17,75 mm, tuy không khác biệt với 4 chủng xạ khuẩn: PT-AG9 (17,50 mm), PT-AG16 (17,50 mm), CM-AG33 (17,25 mm), OM-CT12 (15,75 mm), nhưng lớn hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại. Ở thời điểm 5 NSBT, chủng xạ khuẩn CM-AG33 có BKVVK cao là 16,50 mm, không khác biệt với 3 chủng xạ khuẩn: PT-AG16 (16,25 mm), PT-AG9 (16,25 mm), CM-AG27 (16,00 mm), nhưng cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức thí nghiệm còn lại. Đến thời điểm 7 NSBT, 4 chủng xạ khuẩn: PT-AG16, PT-AG9, CM-AG33, CM-AG27 có BKVVK cao, lần lượt là 14,75 mm; 14,75 mm; 14,50 mm; 14,00 mm, tuy không khác biệt ý nghĩa thống kê với nhau nhưng cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại. Ở thời điểm 9 NSBT, khả năng đối

kháng của các chủng xạ khuẩn có xu hướng giảm, tuy nhiên 4 chủng xạ khuẩn: CM-AG33, PT-AG9, CM-AG27, PT-AG16 vẫn thể hiện khả năng đối kháng cao với BKVVK, lần lượt là 14,25 mm; 14,25 mm; 14,00 mm; 13,50 mm, cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại (Hình 2).

Nhìn chung, khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn với nấm *Fusarium oxysporum* có khuynh hướng giảm dần theo thời gian. Theo Phạm Văn Kim (2006) [10], xạ khuẩn và nấm bệnh phát triển trên cùng một đĩa petri nên có sự cạnh tranh về dinh dưỡng trong quá trình phát triển của nấm bệnh cũng như xạ khuẩn. Những chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng yếu sẽ bị nấm *Fusarium oxysporum* phát triển mạnh hơn, bao phủ lên trên khuẩn lạc của xạ khuẩn và song song đó có những chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng mạnh thì sợi nấm hầu như bị chặn đứng không phát triển thêm nhiều. Một số kết quả nghiên cứu cũng cho rằng, xạ khuẩn có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Fusarium solani* gây bệnh vàng lá thối rễ trên cây tiêu [11], xạ khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo rũ hại cây khoai lang [12].

**Bảng 2. BKVVK của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo vàng trên cây đậu nành rau trong điều kiện phòng thí nghiệm**

| Xạ khuẩn | BKVVK (mm) qua các thời điểm khảo sát |             |             |           |
|----------|---------------------------------------|-------------|-------------|-----------|
|          | 3 NSBT                                | 5 NSBT      | 7 NSBT      | 9 NSBT    |
| CM-AG4   | 15,25 cdef                            | 14,25 bcd   | 12,00 bc    | 10,50 cd  |
| CM-AG7   | 14,50 def                             | 12,50 defg  | 9,75 cdefg  | 9,00 cde  |
| CM-AG11  | 14,75 def                             | 13,75 de    | 10,75 cdef  | 9,25 cde  |
| CM-AG20  | 14,75 def                             | 13,75 de    | 11,75 bc    | 11,25 bc  |
| CM-AG27  | 17,75 a                               | 16,00 abc   | 14,00 ab    | 14,00 a   |
| CM-AG33  | 17,25 abc                             | 16,50 a     | 14,50 a     | 14,25 a   |
| CM-AG36  | 13,50 def                             | 10,25 h     | 8,00 g      | 7,00 ef   |
| CM-AG39  | 15,00 def                             | 14,00 cde   | 12,00 bc    | 10,25 cd  |
| CM-AG44  | 14,25 def                             | 13,00 def   | 11,00 cde   | 10,00 cde |
| PT-AG2   | 14,75 def                             | 13,50 de    | 9,75 cdefg  | 8,75 cdef |
| PT-AG4   | 15,25 cdef                            | 13,75 de    | 11,75 bc    | 11,00 bc  |
| PT-AG9   | 17,50 ab                              | 16,25 ab    | 14,75 a     | 14,25 a   |
| PT-AG16  | 17,50 ab                              | 16,25 ab    | 14,75 a     | 13,50 ab  |
| PT-AG23  | 14,00 def                             | 13,00 def   | 10,50 cdefg | 9,00 cde  |
| TB-ĐT1   | 15,50 bcde                            | 13,50 de    | 10,50 cdefg | 9,50 cde  |
| TB-ĐT5   | 15,25 cdef                            | 13,50 de    | 10,00 cdefg | 8,25 cdef |
| TB-ĐT21  | 13,25 ef                              | 12,25 defgh | 9,75 cdefg  | 8,50 cdef |

|             |            |            |            |           |
|-------------|------------|------------|------------|-----------|
| TB-ĐT22     | 13,00 f    | 10,75 gh   | 8,25 fg    | 7,75 def  |
| TL-CT8      | 15,25 cdef | 12,75 defg | 8,50 efg   | 6,00 f    |
| TL-CT13     | 13,75 def  | 11,00 fgh  | 8,75 defg  | 7,00 ef   |
| TL-CT22     | 15,25 cdef | 14,25 bcd  | 12,00 bc   | 11,00 bc  |
| TL-CT37     | 15,00 def  | 13,50 de   | 11,00 cde  | 9,50 cde  |
| TL-CT38     | 15,50 bcde | 14,25 bcd  | 11,25 cd   | 10,00 cde |
| OM-CT12     | 15,75 abcd | 14,25 bcd  | 11,25 cd   | 9,50 cde  |
| OM-CT17     | 15,25 cdef | 13,50 de   | 11,50 bc   | 10,25 cd  |
| OM-CT30     | 14,25 def  | 11,75 efgh | 9,75 cdefg | 9,00 cde  |
| Mức ý nghĩa | **         | **         | **         | **        |
| CV (%)      | 6,7        | 7,73       | 11,06      | 13,52     |

*Ghi chú: Các giá trị ở cùng một cột được theo sau bởi cùng một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 1% qua phép thử Duncan. \*\*: Khác biệt ở mức ý nghĩa 1%. BKKVK: Bán kính vòng vô khuẩn. NSBT: Ngày sau bố trí thí nghiệm.*

### 3.2.2. HSDK

HSDK của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Fusarium oxysporum* được thể hiện ở bảng 2. Ở thời điểm 3 NSBT, chủng PT-AG16 thể hiện khả năng đối kháng cao nhất với HSDK là 49,57%, tuy không biệt với 3 chủng xạ khuẩn: CM-AG33 (47,74%), PT-AG9 (47,50%), CM-AG27 (46,96%) nhưng cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại. Tại thời điểm 5 NSBT, 4 chủng xạ khuẩn: PT-AG9, CM-AG27, CM-AG33, PT-AG16 có HSDK cao tương đương với nhau, với HSDK lần lượt là 64,37%; 65,30%; 62,72%; 63,46%, nhưng cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn còn lại. Sang thời điểm 7 NSBT, chủng xạ khuẩn PT-AG9 có HSDK cao là 73,92%, tuy không biệt với 3

chủng xạ khuẩn: CM-AG27 (68,01%), PT-AG16 (66,68%), CM-AG33 (67,47%) nhưng cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn còn lại. Ở thời điểm 9 NSBT, 4 chủng xạ khuẩn: PT-AG9, CM-AG27, PT-AG16, CM-AG33 tiếp tục thể hiện khả năng đối kháng cao với HSDK, lần lượt là 76,39%; 71,99%; 68,86%; 68,33%, lớn hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại.

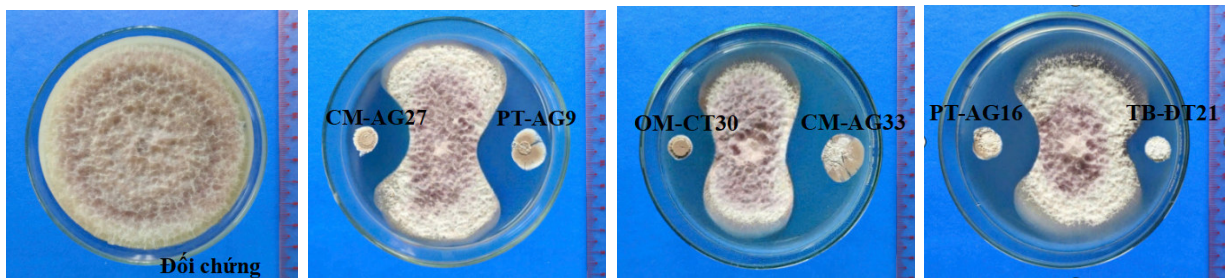
Nhìn chung, qua kết quả ở bảng 2 và 3 cho thấy, 4 chủng: PT-AG9, CM-AG27, PT-AG16, CM-AG33 thể hiện khả năng đối kháng cao với nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo vàng trên cây đậu nành rau, với BKKVK cao (Bảng 2), HSDK cao (Bảng 3) và kéo dài đến thời điểm 9 NSBT. Do đó, 4 chủng xạ khuẩn này được sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

**Bảng 3. HSDK của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo vàng trên đậu nành rau ở các thời điểm khảo sát**

| Xạ khuẩn | HSDK (%) ở các thời điểm |          |            |           |
|----------|--------------------------|----------|------------|-----------|
|          | 3 NSBT                   | 5 NSBT   | 7 NSBT     | 9 NSBT    |
| CM-AG4   | 20,73 c                  | 41,76 c  | 55,49 cd   | 55,18 bc  |
| CM-AG7   | 20,45 c                  | 40,83 c  | 46,97 cdef | 53,80 bc  |
| CM-AG11  | 32,23 bc                 | 44,20 c  | 47,47 cdef | 47,87 bcd |
| CM-AG20  | 27,58 c                  | 42,92 c  | 59,05 bc   | 57,90 b   |
| CM-AG27  | 46,96 ab                 | 65,30 a  | 68,01 ab   | 71,99 a   |
| CM-AG33  | 47,74 ab                 | 62,72 ab | 67,47 ab   | 68,33 a   |
| CM-AG36  | 31,34 bc                 | 48,33 bc | 48,25 cdef | 47,72 bcd |
| CM-AG39  | 28,40 c                  | 45,10 c  | 47,50 cdef | 50,04 bcd |
| CM-AG44  | 28,15 c                  | 41,70 c  | 42,33 ef   | 47,00 cd  |
| PT-AG2   | 29,10 c                  | 46,70 c  | 52,77 cde  | 52,09 bcd |
| PT-AG4   | 25,80 c                  | 46,88 c  | 43,32 def  | 45,95 cd  |
| PT-AG9   | 47,50 ab                 | 64,37 a  | 73,92 a    | 76,39 a   |

|             |          |          |            |           |
|-------------|----------|----------|------------|-----------|
| PT-AG16     | 49,57 a  | 63,46 ab | 66,68 ab   | 68,86 a   |
| PT-AG23     | 32,11 bc | 43,01 c  | 48,87 cdef | 48,07 bcd |
| TB-ĐT1      | 22,82 c  | 35,05 c  | 49,33 cde  | 54,42 bc  |
| TB-ĐT5      | 26,70 c  | 42,31 c  | 48,50 cdef | 50,93 bcd |
| TB-ĐT21     | 15,28 c  | 31,87 c  | 36,52 f    | 42,11 d   |
| TB-ĐT22     | 25,63 c  | 39,08 c  | 45,50 def  | 51,33 bcd |
| TL-CT8      | 31,29 bc | 46,11 c  | 46,79 cdef | 50,41 bcd |
| TL-CT13     | 23,89 c  | 38,26 c  | 47,49 cdef | 52,40 bcd |
| TL-CT22     | 31,96 bc | 41,49 c  | 48,61 cdef | 47,53 bcd |
| TL-CT37     | 23,68 c  | 38,05 c  | 47,28 cdef | 51,13 bcd |
| TL-CT38     | 19,51 c  | 35,04 c  | 49,39 cde  | 53,64 bc  |
| OM-CT12     | 23,86 c  | 43,69 c  | 43,14 def  | 53,35 bc  |
| OM-CT17     | 23,36 c  | 41,14 c  | 43,40 def  | 53,46 bc  |
| OM-CT30     | 27,27 c  | 43,10 c  | 53,85 cde  | 57,98 b   |
| Mức ý nghĩa | **       | **       | **         | **        |
| CV (%)      | 28,09    | 17,49    | 10,96      | 8,76      |

Ghi chú: Các số trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống thì không khác biệt qua phép kiểm định Duncan. \*\*: Khác biệt ở mức ý nghĩa 1%. HSDK: Hiệu suất đối kháng. NSBT: Ngày sau bố trí thí nghiệm.



Hình 2. Khả năng đối kháng của một số chủng xạ khuẩn đối với nấm *Fusarium oxysporum* ở thời điểm 9 ngày sau khi bố trí thí nghiệm

### 3.3. Khả năng tiết enzyme $\beta$ -glucanase phân giải $\beta$ -glucan của các chủng xạ khuẩn có triển vọng

Khả năng phân giải  $\beta$ -glucan của các chủng xạ khuẩn được trình bày ở bảng 4. Kết quả ghi nhận, cả 5 chủng xạ khuẩn đều có khả năng tiết enzyme  $\beta$ -glucanase phân giải  $\beta$ -glucan. Vào thời điểm 10 ngày sau khi cấy (NSKC), các chủng xạ khuẩn đều cho thấy khả năng phân giải  $\beta$ -glucan với bán kính vòng phân giải dao động từ 1,00 - 1,13 mm và chưa có khác biệt thống kê giữa các chủng xạ khuẩn với nhau. Đến

thời điểm 12 NSKC, bán kính vòng phân giải của 5 chủng xạ khuẩn đều tăng, trong đó chủng xạ khuẩn PT-AG16 có khả năng phân giải  $\beta$ -glucan cao, với bán kính vòng phân giải là 7,88 mm, cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với 3 chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại. Ở thời điểm 14 NSKC, chủng xạ khuẩn PT-AG16 có bán kính vòng phân giải cao nhất là 12,88 mm, cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại (Hình 3).

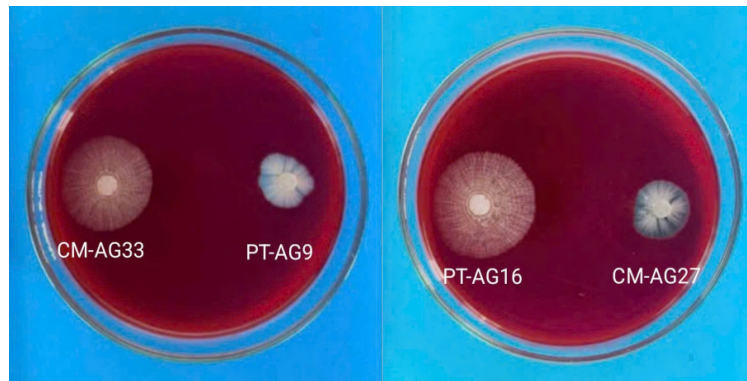
Bảng 4. Bán kính vòng phân giải  $\beta$ -glucan ở các thời điểm 10, 12, 14 NSBT của các chủng xạ khuẩn có triển vọng

| Xạ khuẩn | Bán kính vòng phân giải (mm) $\beta$ -glucan qua các thời điểm khảo sát |         |         |
|----------|-------------------------------------------------------------------------|---------|---------|
|          | 10 NSKC                                                                 | 12 NSKC | 14NSKC  |
| PT-AG16  | 1,13                                                                    | 7,88 a  | 12,88 a |
| CM-AG33  | 1,13                                                                    | 6,38 b  | 10,75 b |



|             |       |        |         |
|-------------|-------|--------|---------|
| PT-AG9      | 1,00  | 5,13 b | 9,75 b  |
| CM-AG27     | 1,00  | 5,38 b | 10,63 b |
| Mức ý nghĩa | ns    | **     | **      |
| CV (%)      | 16,57 | 10,69  | 7,82    |

Ghi chú: Các số trong cùng một cột được theo sau bởi 1 hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt qua phép kiểm định Duncan. \*\*: Khác biệt ở mức ý nghĩa 1%. NSKC: Ngày sau khi cấy. ns: Khác biệt không có ý nghĩa thống kê.



Hình 3. Khả năng phân giải  $\beta$ -glucan ở thời điểm 14 ngày sau khi cấy của các chủng xạ khuẩn có triển vọng

### 3.4. Khả năng tiết enzyme chitinase phân giải chitin của các chủng xạ khuẩn có triển vọng

Khả năng phân giải chitin của các chủng xạ khuẩn có triển vọng được đánh giá thông qua bán kính vòng phân giải chitin qua các thời điểm 3, 5, 7 ngày sau khi cấy (NSKC) và được trình bày ở bảng 5.

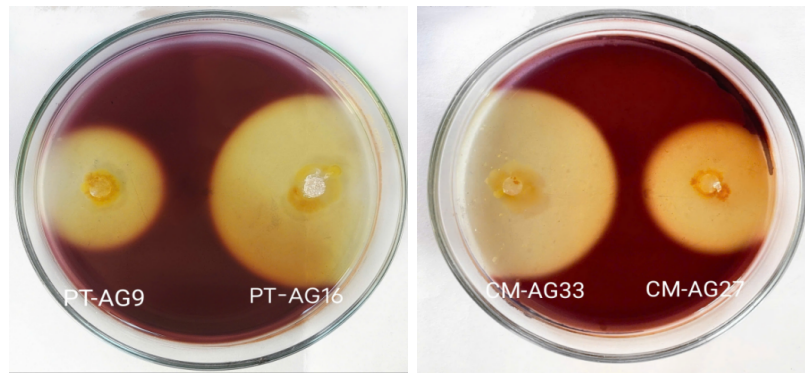
Ở thời điểm 3 NSKC, tất cả các chủng xạ khuẩn đều cho thấy khả năng phân giải chitin với bán kính vòng phân giải dao động từ 5,63 - 5,75 mm và chưa có khác biệt thống kê giữa các chủng xạ khuẩn với nhau. Vào thời điểm 5 NSKC, tất cả chủng xạ khuẩn đều có bán kính vòng phân giải tăng. Trong đó,

chủng xạ khuẩn PT-AG16 có bán kính vòng phân giải là 21,00 mm, tuy không khác biệt với chủng CM-AG33 có bán kính vòng phân giải là 20,50 mm nhưng có khác biệt ý nghĩa thống kê với các chủng còn lại. Đến thời điểm 7 NSKC, bán kính vòng phân giải của 5 chủng xạ khuẩn tiếp tục tăng, dao động từ 20,50 – 26,50 mm. Trong đó, chủng PT-AG16 có bán kính vòng phân giải cao nhất là 26,50 mm và khác biệt nhưng không ý nghĩa thống kê so với chủng CM-AG33 có bán kính vòng phân giải là 26,25 mm, nhưng cao hơn và khác biệt ý nghĩa so với các chủng còn lại (Hình 4).

Bảng 5. Bán kính vòng phân giải chitin ở các thời điểm 3, 5, 7 NSKC của các chủng xạ khuẩn có triển vọng

| Xạ khuẩn    | Bán kính vòng phân giải (mm) chitin qua các thời điểm khảo sát |         |         |
|-------------|----------------------------------------------------------------|---------|---------|
|             | 3 NSKC                                                         | 5 NSKC  | 7 NSKC  |
| PT-AG16     | 5,75                                                           | 21,00 a | 26,50 a |
| CM-AG33     | 5,75                                                           | 20,50 a | 26,25 a |
| PT-AG9      | 5,63                                                           | 19,00 b | 21,25 b |
| CM-AG27     | 5,63                                                           | 18,75 b | 20,50 b |
| Mức ý nghĩa | ns                                                             | **      | **      |
| CV (%)      | 9,32                                                           | 9,19    | 9,74    |

Ghi chú: Các số trong cùng một cột được theo sau bởi 1 hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt qua phép kiểm định Duncan. \*\*: Khác biệt ở mức ý nghĩa 1%. NSKC: Ngày sau khi cấy. ns: Khác biệt không có ý nghĩa thống kê.



Hình 4. Khả năng phân giải chitin ở thời điểm 7 NSKC của các chủng xạ khuẩn có triển vọng

### 3.5. Thảo luận

Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn thí nghiệm có thể có liên quan đến việc các chủng này tiết ra một số chất có khả năng ức chế sự tăng trưởng của sợi nấm, chẳng hạn như enzyme chitinase, glucanase... Xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* có khả năng đối kháng cao với nấm gây hại cây trồng do chúng tiết ra các enzyme như: Cellulase, chitinase và glucanase [13, 14]) làm phân hủy vách tế bào nấm bệnh. Theo Nagpure và cs (2014) [15], chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. MT7 có khả năng kiểm soát mầm bệnh gây hại cây trồng do tiết ra enzyme chitinase. Theo Nguyễn Văn Tập (2022) [12], các chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng cao với nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo rũ hại cây khoai lang do chúng có khả năng tiết ra enzyme chitinase và  $\beta$ -glucanase.

Trong nghiên cứu này, 4 chủng xạ khuẩn (PT-AG9, CM-AG27, PT-AG16, CM-AG33) phân lập từ đất trồng đậu nành rau thể hiện khả năng đối kháng cao với nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo vàng trên đậu nành rau. Kết quả từ thí nghiệm enzyme cho thấy, cả 4 chủng đều có khả năng tiết enzyme chitinase và  $\beta$ -glucanase, thể hiện qua bán kính vòng phân giải trên môi trường chứa chitin và  $\beta$ -glucan (Bảng 3 và 4). Điều này cho thấy, mối liên hệ chặt chẽ giữa khả năng tiết enzyme và hiệu quả đối kháng, là cơ sở khoa học cho việc nghiên cứu phát triển các sản phẩm sinh học có nguồn gốc từ các chủng xạ khuẩn này trong quản lý bệnh héo vàng trên đậu nành rau nói riêng và bệnh hại cây trồng nói chung.

### 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Phân lập được 185 chủng xạ khuẩn từ đất trồng đậu nành rau từ 52 mẫu đất, trong đó 4 chủng xạ

khuẩn được tuyển chọn: PT-AG9, CM-AG27, PT-AG16, CM-AG33 luôn thể hiện khả năng đối kháng cao với nấm *Fusarium oxysporum* đến thời điểm 9 NSBT.

Cả 4 chủng xạ khuẩn có triển vọng đều có khả năng tiết enzyme phân giải  $\beta$ -glucan và chitin, trong đó 2 chủng PT-AG16 và CM-AG33 có khả năng phân giải cao nhất.

Đề xuất đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh héo vàng trên đậu nành rau của 2 chủng xạ khuẩn PT-AG16 và CM-AG33 ở điều kiện nhà lưới.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Rahman M. Tahmidur, M. Tanbir Rubayet, Abu Ashraf Khan and M. Khurshed Alam Bhuiyan, (2020). Integrated management of *Fusarium* root rot and wilt disease of soybean caused by *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Biosciences*, 17(2): 83 - 96.
2. Backman, P. A., M. Wilson and J. F. Murphy (1997). Bacteria for biological control of plant diseases. In: Rechcigl N. A. and J. E. Rechcigl, environmentally safe approaches to crop diseases control. Lewis Publishers, Baco Raton, Florida, 95 - 109.
3. Lê Minh Tường, Đinh Hồng Thái, Lý Văn Giang và Trần Vũ Phấn (2016). *Xạ khuẩn và vai trò của xạ khuẩn trong quản lý bệnh hại cây trồng. "Quản lý dịch hại cây trồng thân thiện môi trường"*. Chủ biên: Nguyễn Thị Thu Cúc và Lê Văn Vàng. Nxb Đại học Cần Thơ. 301 trang.
4. Doumbou C. L., M. K. H. Salove, C. Crawford, D. L. Beaulieu (2001). Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection*, 82(3): 85 - 102.

5. Hsu, S. C and J. L. Lockwood (1975). Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Applied microbiology. USA* 29(3): 422 - 426.
6. Palaniyandi, P., Tae-Hyung Yang, Woon-Woo Suh and Chang-Jin Park (2013). Biological control of plant pathogens by antagonistic bacteria isolated from Rhizosphere in Korea. *Journal of Phytopathology*, 161(7 - 8): 433 – 440.
7. Renwick A., R. Campbel and S. Coe (1991). Assessment of *in vitro* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology*, 40, 524 - 532.
8. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyến và Phạm Văn Ty (2002). *Vĩ sinh vật học*. Nxb Giáo dục, trang 523.
9. Naidenova, M. and D. Vladimirova (2002). Isolation and taxonomic investigation of actinomycetes from specific biotopes in Bulgaria. *Journal of Culture Collection*, 3, 15 – 24.
10. Phạm Văn Kim (2006). *Giáo trình: Phòng trị sinh học bệnh hại cây trồng*. Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng. Nxb Đại học Cần Thơ. 185 trang.
11. Phạm Thành Quốc và Lê Minh Tường (2021). Đánh giá khả năng đối kháng của một số chủng xạ khuẩn đối với nấm *Fusarium solani* gây bệnh vàng lá, thối rễ hại tiêu. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 4: 21 – 27.
12. Nguyễn Văn Tập (2022). Nghiên cứu và ứng dụng xạ khuẩn trong phòng trị bệnh héo rũ do nấm *Fusarium oxysporum* trên khoai lang. Luận án Tiến sĩ ngành Bảo vệ thực vật. Trường Đại học Cần Thơ. 185 trang.
13. Jaradat Z., A. Dawagreh, Q. Ababneh and I. Saadoun (2008). Influence of culture conditions on cellulase production by *Streptomyces* sp. (strain J2). *Jordan Journal of Biological Sciences* 1(4): 141 - 146.
14. Valois, D., K. Fayad, T. Barasubiye and M. Garon (1996). Glucanolytic actinomyces antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Applied and environmental microbiology*, 62(5): 1630 - 1635.
15. Nagpure, A., B. Choudhary, S. Kumar and R. K. Gupta (2014). Isolation and characterization of chitinolytic *Streptomyces* sp. MT7 and its antagonism towards wood-rotting fungi. *Annals of Microbiology*, 64: 531 - 541.

**ISOLATION AND EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY  
OF ACTINOMYCETES ISOLATES ON *Fusarium oxysporum* CAUSING YELLOW WILT DISEASE ON  
VEGETABLE SOYBEAN**

**Quang Khoi Ngo<sup>1</sup>, Le Minh Tuong<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Master student in Plant Protection major, Can Tho University

<sup>2</sup>College of Agriculture, Can Tho University

**Abstract**

This study aimed to examine the antagonistic ability of actinomycetes against *Fusarium oxysporum*, which causes yellow wilt disease on soybean. Among 26 isolates tested, four isolates (PT-AG9, CM-AG27, PT-AG16, CM-AG33) showed strong inhibition with inhibition zones ranging from 13.50 mm to 14.25 mm and antagonistic efficacy from 68.33% to 76.39% after 9 days. These isolates also produced  $\beta$ -glucanase and chitinase enzymes. PT-AG16 had the highest  $\beta$ -glucanase activity with a lysis halo of 12.88 mm at 14 days, while PT-AG16 and CM-AG33 showed the strongest chitinolytic activity with halo diameters of 26.50 mm and 26.25 mm at 7 days.

**Keywords:** *Actinomycetes*,  $\beta$ -glucan, chitin, yellow wilt disease on soybean, *Fusarium oxysporum*.

**Ngày nhận bài:** 14/4/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 15/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 26/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 23/6/2025

# ĐỊNH DANH VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SẢN SINH ENZYME, ĐỐI KHÁNG CỦA *Bacillus* sp. VỚI *Phytophthora palmivora* GÂY BỆNH NÚT THÂN XÌ MỦ MÍT TẠI HUYỆN CHỢ MỚI, TỈNH AN GIANG

Nguyễn Phú Dũng<sup>1,\*</sup>, Văn Viễn Lương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thái Sơn<sup>1</sup>,  
Phạm Thị Bé Thi<sup>2</sup>, Phan Quý Quát<sup>2</sup>, Lưu Vĩnh Trí<sup>3</sup>, Nguyễn Trương Hồng Công<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Khoa Nông nghiệp - Tài nguyên thiên nhiên, Trường Đại học An Giang,

Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Học viên cao học, Khoa học cây trồng K7, Khoa Nông nghiệp - Tài nguyên thiên nhiên,

Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

<sup>3</sup>Học viên cao học, Khoa học cây trồng K8, Khoa Nông nghiệp - Tài nguyên thiên nhiên,

Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

<sup>4</sup>Học viên cao học, Khoa học cây trồng K9, Khoa Nông nghiệp - Tài nguyên thiên nhiên,

Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

\* Email: npdung@agu.edu.vn

## TÓM TẮT

Những năm gần đây, bệnh xì mủ thân do *Phytophthora* spp. gây ra đã trở thành mối đe dọa lớn đối với sản xuất mít. Trong nghiên cứu này, từ 12 mẫu đất được thu thập tại các vườn mít ở huyện Chợ Mới, tỉnh An Giang đã tiến hành phân lập, định danh và đánh giá khả năng tiết enzyme phân giải của vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng đối kháng với *Phytophthora palmivora* gây bệnh nứt thân xì mủ mít trong điều kiện *in vitro*. Kết quả đã phân lập được 4 dòng vi khuẩn (CM1, CM2, CM3 và CM4) có đặc điểm hình thái (khuẩn lạc tròn, màu trắng đến trắng đục, bề mặt khô nhẵn, nhô cao, rìa dạng răng cưa), sinh hóa đặc trưng của *Bacillus* sp., đều là vi khuẩn Gram dương, phản ứng catalase dương tính (sủi bọt), âm tính với KOH 3% (không tạo nhớt) và có khả năng đối kháng với nấm gây bệnh. Trong đó, chủng được định danh là *Bacillus velezensis* CM1 cho hiệu quả đối kháng cao nhất (16,2 - 67,0%), đồng thời tiết enzyme cellulase (31,2 - 60,0 mm),  $\beta$ -glucanase (37,7 - 63,7 mm) và protease (42,9 - 62,0 mm) mạnh nhất từ 3 - 9 ngày sau cấy. Chủng *Bacillus velezensis* CM1 được đánh giá là tác nhân sinh học tiềm năng trong quản lý bệnh xì mủ mít.

**Từ khóa:** Bệnh nứt thân xì mủ mít, *Bacillus velezensis* CM1, cellulase,  $\beta$ -glucanase, protease.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mít (*Artocarpus heterophyllus*) là cây đa dụng quan trọng ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, đặc biệt tại Nam Á và Đông Nam Á. Ở Việt Nam, mít được trồng rộng rãi nhờ giá trị dinh dưỡng cao, khả năng tăng thu nhập và tiềm năng kinh tế lớn, góp phần quan trọng vào sinh kế của người dân [1]. Trong những năm gần đây, bệnh nứt thân xì mủ do nấm *Phytophthora palmivora* gây ra là loài ký sinh cây trồng nhiệt đới nguy hiểm và phân bố rộng rãi trên thế giới, đồng thời là mối đe dọa nghiêm trọng với cây trồng nếu không được phát hiện và xử lý kịp thời [2]. Việc phòng trừ dịch hại chủ yếu dựa vào thuốc hóa học nhưng gây kháng thuốc, ô nhiễm môi

trường... Để hướng đến nông nghiệp bền vững, các biện pháp sinh học, đặc biệt là sử dụng vi sinh vật đối kháng, đang được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi do có khả năng tiết kháng sinh, enzyme ngoại bào, cạnh tranh hoặc ký sinh mầm bệnh [3]. Trong đó, vi khuẩn đối kháng vùng rễ, đặc biệt là chi *Bacillus*, nổi bật nhờ khả năng kích thích sinh trưởng, sản sinh hợp chất sinh học và ức chế mầm bệnh trên nhiều cây trồng [4]. Các loài phổ biến như: *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. pasteurii*, *B. pumilus*, *B. mycoides*, *B. sphaericus* còn có khả năng kích kháng, giúp giảm thiểu bệnh hại [5]. Một số kháng sinh do *B. subtilis*, *B. lentus*, *B. circulans* sản sinh như: Polymycin, difficidin, subtilin, kanosamine,

mycobacillin cho thấy, tiềm năng ứng dụng cao [6, 7]. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm hướng đến ứng dụng chế phẩm sinh học đối kháng nấm gây bệnh trên mít, góp phần thay thế dần thuốc bảo vệ thực vật.

## **2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Chuẩn bị nguồn vật liệu nghiên cứu**

Nguồn nấm *Phytophthora palmivora* gây bệnh nứt thân xì mù mít đã được nghiên cứu chi tiết về đặc điểm sinh học, định danh kế thừa từ kết quả của Phan Quý Quá (2024) [8]. Các dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. CM1, CM2, CM3 và CM4 được phân lập trên đất trồng mít ở huyện Chợ Mới, tỉnh An Giang theo phương pháp trải đĩa petri ở các nồng độ đã pha loãng trên môi trường Luria Bertani (LB) - agar, mô tả theo định danh của Logan và De Vos (2009) [9], Lawrence (2012) [10] và Abdulkadir và Waliyu (2012) [11]; làm thuần và lưu giữ giống trên môi trường LB. Các nguồn vật liệu này được cung cấp và lưu giữ tại phòng thí nghiệm bệnh cây, Khoa Nông nghiệp - Tài nguyên thiên nhiên, Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

### **2.2. Khả năng đối kháng của các dòng vi khuẩn với nấm gây bệnh**

Bốn dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. (CM1, CM2, CM3 và CM4) được nuôi 72 giờ trên môi trường LB có bổ sung 10% huyền phù vi khuẩn ( $10^6$  cfu/ml), lắc 200 vòng/phút. Dịch nuôi được ly tâm (10.000 vòng/phút, 10 phút) để thu dịch chiết thô vi khuẩn. Nấm gây bệnh được nuôi trên môi trường MPA, điều chỉnh mật độ nấm về  $10^8$  cfu/ml. Thí nghiệm đối kháng thực hiện bằng cách nhỏ 100 ml nấm lên đĩa petri, thêm 100  $\mu$ l dịch chiết thô vi khuẩn vào giếng thạch (0,5 cm), ủ 30°C trong 24 giờ. Hiệu suất đối kháng (HSDK) tính theo công thức của Han và cs (2015) [12]:  $H = [(R-r)/R] \times 100$ , trong đó: H là hiệu suất đối kháng của vi khuẩn; R là bán kính khuẩn lạc nấm ở phía đối diện vị trí đặt khoanh vi khuẩn, r là bán kính khuẩn lạc nấm ở phía đặt khoanh vi khuẩn, đánh giá tại các thời điểm 2, 4, 6, 8, 10 ngày. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 5 lần lặp lại, 3 đĩa/chủng, xử lý số liệu bằng Excel và SAS.

### **2.3. Định danh dòng vi khuẩn đối kháng bằng biện pháp sinh học phân tử**

Dòng vi khuẩn đối kháng tốt nhất được chọn và gửi định danh tại Công ty TNHH DNA Sequencing, Cần Thơ. Vùng 16S rDNA được khuếch đại bằng

PCR từ ADN tổng số được tách chiết bằng phương pháp của Heiko Packeiser và cs (2013) [13] với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG- 3') và 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'). Trình tự nucleotide của chủng được so sánh với các trình tự đã có trên Genbank, sử dụng công cụ BLAST trong NCBI và cây phả hệ được phân tích từ các mô hình trích xuất từ phần mềm Mega 11.

### **2.4. Đánh giá khả năng sản sinh enzyme đối kháng của *Bacillus* sp.**

**2.4.1. Khảo sát khả năng phân giải Catalase, phản ứng KOH, nhuộm Gram:** Quan sát vi khuẩn với dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) lên lame cho phản ứng dương tính với catalase sẽ có hiện tượng sủi bọt khí và ngược lại [14]. Khảo sát độ dính của vi khuẩn với giọt KOH 3% lên lam kính, nếu thấy có độ dính là vi khuẩn Gram âm, không có độ kết dính là vi khuẩn Gram dương [15]. Độ thuần và hình thái của các chủng vi khuẩn được quan sát bằng tiêu bản nhuộm Gram theo phương pháp Lawrence (2012) [16].

**2.4.2. Khảo sát khả năng tiết enzyme cellulase (CMC):** Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức là một dòng vi khuẩn. Theo phương pháp Ertugrul và cs (2007) [17], vi khuẩn *Bacillus* sp. được nuôi 6 ngày trên môi trường LB, điều chỉnh mật số về  $10^8$  cfu/mL. Giấy thấm (5 mm) tẩm vi khuẩn được cấy 3 điểm trên môi trường CMC agar. Đường kính vòng phân giải cellulose được đo vào ngày 3, 5, 7 và 9 bằng thuốc nhuộm lugol 1%, với vòng phân giải là vùng không bắt màu.

**2.4.3. Khảo sát khả năng tiết enzyme  $\beta$ -glucanase:** Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức là một dòng vi khuẩn. Theo phương pháp của Renwich và cs (1991) [18], vi khuẩn *Bacillus* sp. được nuôi 6 ngày trên môi trường LB, điều chỉnh mật số về  $10^8$  cfu/mL. Giấy thấm (5 mm) tẩm vi khuẩn được cấy 3 điểm trên môi trường chứa  $\beta$ -glucan. Đường kính vòng phân giải  $\beta$ -glucan (vùng trong suốt) được đo vào ngày 3, 5, 7 và 9 bằng thuốc thử Lugol 1%.

**2.4.4. Khảo sát khả năng tiết enzyme phân giải protease:** Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức là một dòng vi khuẩn, gồm 3 đĩa petri/nghiệm thức. Theo phương pháp của Mitra và Chakrabartty (2005) [19], vi khuẩn *Bacillus* sp. được nuôi 6 ngày trên môi trường LB,

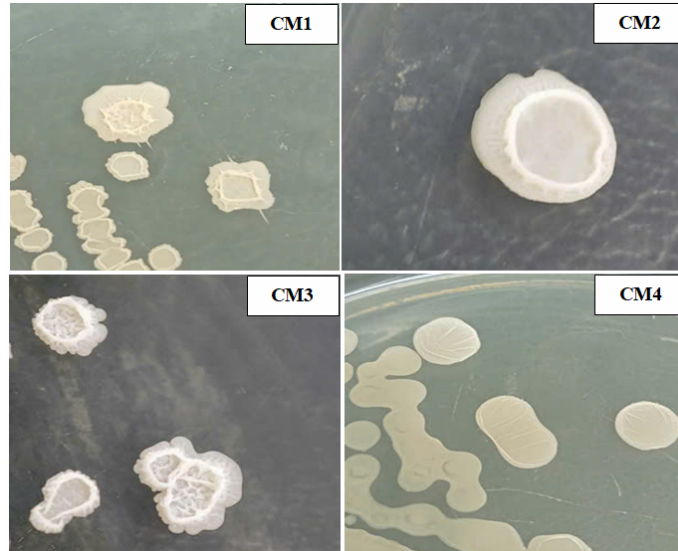


điều chỉnh mật số về  $10^8$  cfu/mL. Giấy thấm (5 mm) tẩm vi khuẩn được cấy 3 điểm trên môi trường chứa casein. Hoạt tính protease được xác định bằng cách tráng TCA 10% trong 30 giây. Vòng phân giải protein (vùng không bắt màu với TCA) được đo vào ngày 3, 5, 7 và 9.

2.4.5. *Xử lý số liệu*: Số liệu được phân tích bằng SAS, sử dụng ANOVA và kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 5% để so sánh trung bình các nghiệm thức.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Phân lập và định danh hình thái dòng vi khuẩn đối kháng



**Hình 1. Khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng với *Phytophthora* sp.**

Các mẫu đất (12 mẫu) thu thập vườn mít tại huyện Chợ Mới, tỉnh An Giang, đã phân lập được 4 dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. (CM1, CM2, CM3 và CM4). Hình thái khuẩn lạc xác định dưới kính hiển vi quang học theo mô tả định danh của Vaseeharan và Ramasamy (2003) [20]; Logan và De Vos (2009) [9] đều mang đặc trưng của vi khuẩn *Bacillus* trên môi trường LB với khuẩn lạc tròn, màu trắng đến trắng đục, bề mặt khô nhẵn, nhô cao, rìa dạng răng cưa hoặc chia thùy. Tế bào hình que, hai đầu tròn, bắt màu Gram dương, sắp xếp đơn lẻ hoặc thành chuỗi

ngắn. Tất cả đều phản ứng catalase dương tính (sủi bọt) và âm tính với KOH 3% (không tạo nhót), xác định là vi khuẩn Gram dương (Hình 1 và bảng 1).

Với các đặc trưng về hình dạng khuẩn lạc, hình dạng tế bào, sự bắt màu và các phản ứng sinh hóa của các dòng vi khuẩn phân lập được hoàn toàn phù hợp với mô tả về đặc điểm hình thái của vi khuẩn *Bacillus* trong nghiên cứu của Đỗ Trung Hải (2008) [21], Madigan và cs (2018) [22] và Trần Kim Hạnh (2024) [23].

**Bảng 1. Đặc điểm hình thái và sinh hóa của các dòng vi khuẩn *Bacillus* spp.**

| Dòng vi khuẩn | Catalase | KOH 3% | Gram | Hình thái | Đặc điểm khuẩn lạc |                    |              |                              |                        |
|---------------|----------|--------|------|-----------|--------------------|--------------------|--------------|------------------------------|------------------------|
|               |          |        |      |           | Hình dạng          | Màu sắc            | Rìa          | Độ nổi                       | Kích thước tế bào (μm) |
| CM1           | +        | -      | +    | Que       | Tròn               | Trắng ngà          | Răng cưa     | Lồi nhẵn bóng, tâm lõm xuống | 3,3 - 4,4              |
| CM2           | +        | -      | +    | Que       | Tròn               | Trắng sữa          | Hoi gợn sóng | Lồi nhẵn bóng                | 3,5 - 4,1              |
| CM3           | +        | -      | +    | Que       | Tròn               | Trắng kem          | Răng cưa     | Lồi                          | 3,3 - 4,2              |
| CM4           | +        | -      | +    | Que       | Tròn               | Trắng đục hoặc kem | Gợn sóng     | Lồi nhẵn bóng                | 3,1 - 4,3              |

Ghi chú: có: +; không có: -; Gram dương: +.

### 3.2. Khả năng đối kháng của các dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. với *Phytophthora* sp. gây bệnh ở điều kiện phòng thí nghiệm

Hiệu suất đối kháng (HSDK) được dùng để đánh giá khả năng ức chế nấm gây nứt thân xì mũ mọt của các dòng vi khuẩn phân lập. Thí nghiệm đối kháng trực tiếp trên môi trường PDA cho thấy, HSDK dao động từ 9,3 - 67,0% (Bảng 2 và hình 2) có sự khác biệt thống kê 1% từ 2 - 10 ngày sau xử lý (NSXL). Cụ thể, HSDK của các dòng vi khuẩn biến động theo thời gian và khác biệt có ý nghĩa thống kê 1%. Ở 2 NSXL, CM1 đạt HSDK cao nhất (16,2%), thấp nhất là CM2

(9,3%). Từ 4 - 6 NSXL, HSDK tăng lên, trong đó CM1 vẫn cao nhất (48,7 - 67,0%), tiếp theo là CM4 (40,9 - 61,1%), thấp nhất vẫn là CM2 và CM3 (25,8 - 53,1%). Kể từ 8 - 10 NSXL, HSDK giảm nhẹ nhưng CM1 vẫn giữ mức cao nhất (64,3 - 65,6%), trong khi CM2 và CM3 thấp nhất (48,2 - 50,0%), điều này thể hiện qua quan sát thấy, khuẩn ty nấm phát triển nhanh, lấn át và làm suy yếu khả năng ức chế của vi khuẩn, có thể do cạnh tranh dinh dưỡng giảm dần. Tuy nhiên, kết quả vẫn cho thấy, CM1 luôn có khả năng đối kháng cao nhất, còn CM2 và CM3 thấp nhất trong suốt quá trình theo dõi.

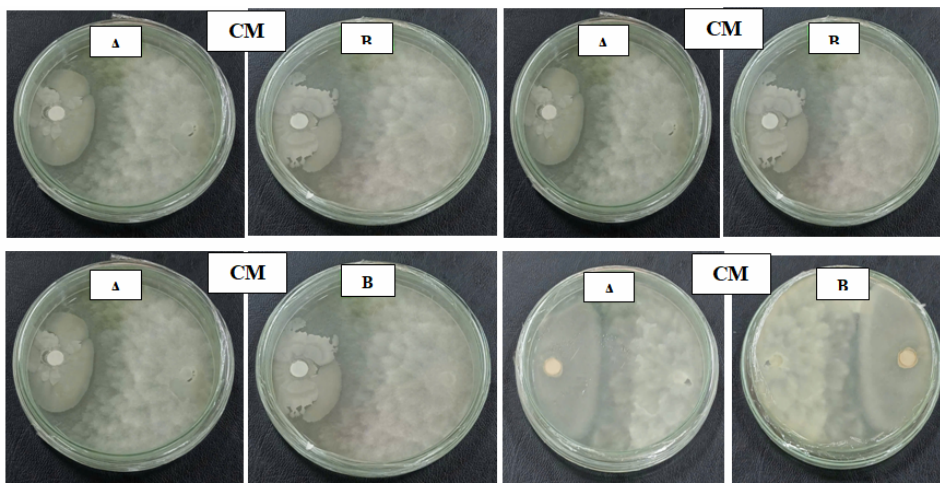
**Bảng 2. Khả năng đối kháng của các dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. với nấm *Phytophthora***

| Thí nghiệm  | Hiệu suất đối kháng (%) của các dòng vi khuẩn |                   |                   |                   |                   |
|-------------|-----------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|             | 2 NSXL                                        | 4 NSXL            | 6 NSXL            | 8 NSXL            | 10 NSXL           |
| CM1         | 16,2 <sup>a</sup>                             | 48,7 <sup>a</sup> | 67,0 <sup>a</sup> | 65,6 <sup>a</sup> | 64,3 <sup>a</sup> |
| CM2         | 9,3 <sup>c</sup>                              | 25,8 <sup>c</sup> | 50,9 <sup>c</sup> | 50,0 <sup>c</sup> | 49,1 <sup>c</sup> |
| CM3         | 10,4 <sup>b</sup>                             | 31,9 <sup>c</sup> | 53,1 <sup>c</sup> | 50,0 <sup>c</sup> | 48,2 <sup>c</sup> |
| CM4         | 10,4 <sup>b</sup>                             | 40,9 <sup>b</sup> | 61,2 <sup>b</sup> | 61,1 <sup>b</sup> | 59,8 <sup>b</sup> |
| CV (%)      | 17,7                                          | 10,6              | 3,6               | 3,6               | 2,9               |
| Mức ý nghĩa | **                                            | **                | **                | **                | **                |

Ghi chú: Các số trong cùng một cột được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 1% qua phép kiểm định Duncan. (\*\*): khác biệt ở mức ý nghĩa 1%; NSXL là ngày sau xử lý.

Kết quả cho thấy, dòng vi khuẩn CM1 có hiệu quả đối kháng cao nhất từ 2 - 10 NSXL. Điều này phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Thị Liên và cs (2023) [24], trong đó chủng *Bacillus siamensis* (CT7) có khả năng ức chế nấm *Phytophthora palmivora* mạnh nhất (36,5 - 59,7%). Tương tự, Nguyễn Thu Trang và cs (2018) [25] cũng đã phân lập được nhiều dòng vi khuẩn nội sinh từ rễ hồ tiêu có khả năng sinh IAA, siderophore, phân giải phosphate và đối kháng *Phytophthora capsici*, nổi bật là *Bacillus sonorensis*

LĐ18. Phạm Hồng Hiền và cs (2020) [26], cũng đã chứng minh hiệu quả của *Bacillus siamensis* có khả năng ức chế cao đối với nấm *Phytophthora citrophthora* 18PMS trong đất và trong rễ cây cam sau 45 ngày xử lý. Theo Quách Hồng Thúy (2018) [27], vi khuẩn *Bacillus* được chứng minh có khả năng đối kháng với nhiều loại nấm như: *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora* và một số vi khuẩn khác nhờ vào khả năng sinh ra các chất kháng sinh.

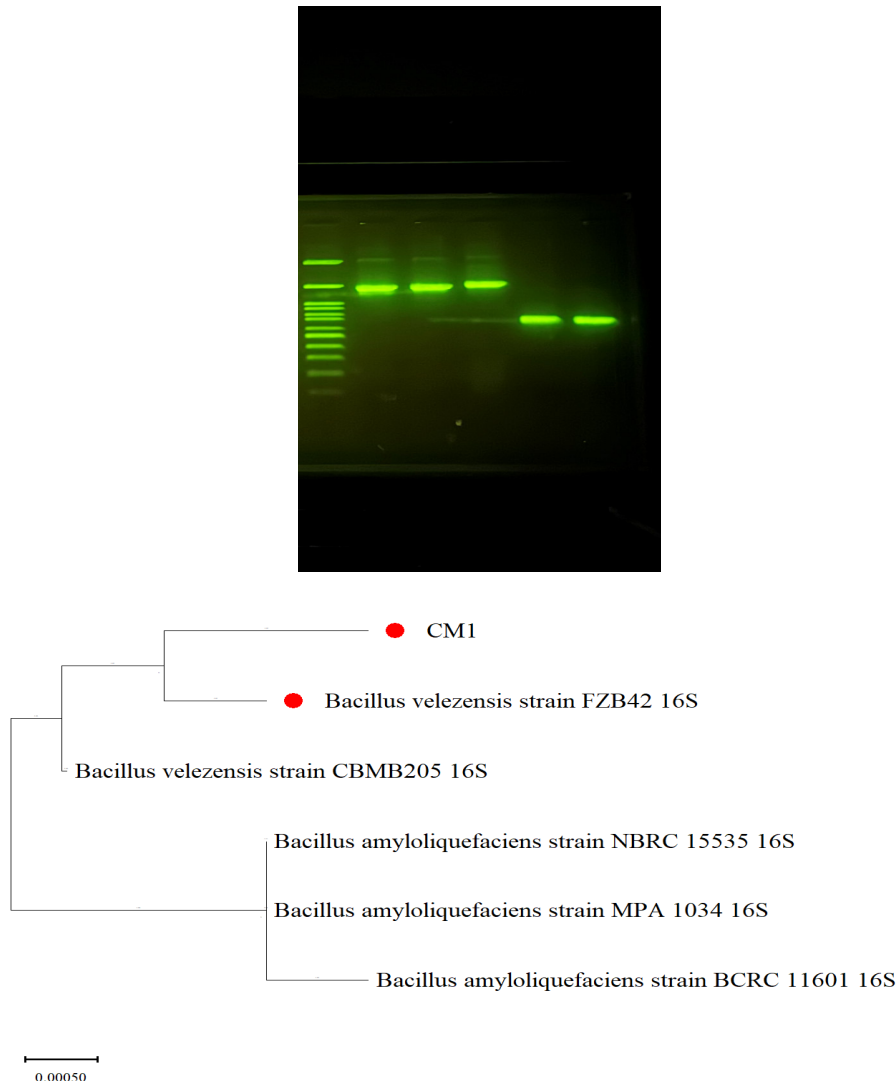


**Hình 2. Hiệu quả đối kháng ở thời điểm 6 NSXL (A: mặt trước của đĩa petri; B: mặt sau của đĩa petri)**

### 3.2. Định danh dòng vi khuẩn đối kháng

Dòng vi khuẩn CM1 có hiệu quả đối kháng cao nhất được lựa chọn đại diện để định danh loài qua giải trình tự gen. Kết quả kích thước của dòng vi khuẩn đối kháng CM1 (1.407 nucleotide), các sản phẩm được phân tích trình tự và so sánh với gen 16S RNA của các dòng vi khuẩn khác trên NCBI - Blast cho thấy, dòng vi khuẩn CM1 có độ tương đồng 99,64

- 99,79% (Hình 3) với trình tự gen của 5 loài trong chi *Bacillus* (*Bacillus velezensis* strain FZB42 (NR075005.2)), *Bacillus amyloliquefaciens* strain NBRC15535 (NR041455.1), *Bacillus velezensis* strain CBMB295 (NR116240.1), *Bacillus amyloliquefaciens* MPA1034 (NR117946.1) và *Bacillus amyloliquefaciens* strain NBRC15535 (NR112685.1).



**Hình 3. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR và cây phả hệ của loài vi khuẩn *Bacillus velezensis***

Do các chủng *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens* có sự tương đồng rất cao về mặt di truyền, vì vậy kết quả định danh xác định chủng CM1 thuộc dòng *Bacillus* sp. Theo Rabbee và cs (2019) [28], *Bacillus velezensis* FZB42 sản xuất bacilysin có khả năng làm tổn hại sợi nấm *Phytophthora sojae* (gây bệnh thối rễ ở đậu nành), cho thấy *Bacillus* sp. là tác nhân sinh học tiềm năng để kiểm soát mầm bệnh trong đất. Do dòng vi khuẩn đối kháng CM1 có

quan hệ chặt với chủng *Bacillus velezensis* FZB42 với độ tương đồng cao 99,79% nên được đặt tên là *Bacillus velezensis* CM1.

### 3.3. Khảo sát một số đặc tính của các dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. đối kháng có triển vọng

#### 3.3.1. Khảo sát khả năng tiết enzyme phân giải cellulase

Khả năng tiết enzyme cellulase của các dòng vi khuẩn được đánh giá trên môi trường CMC qua

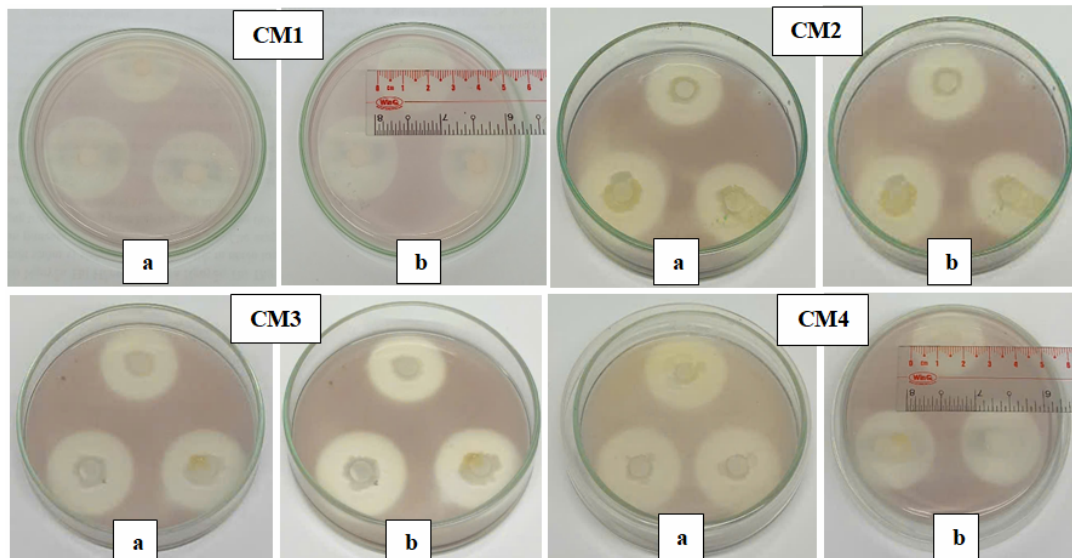
đường kính vòng phân giải (ĐKVPG), khác biệt có ý nghĩa thống kê 1% từ 3 - 9 ngày sau khi cấy (NSKC) (Bảng 3 và hình 4). Chuồng CM1 (*Bacillus velezensis* CM1) luôn cho ĐKVPG lớn nhất (31,2 - 43,8 mm), thể hiện hoạt tính cellulase mạnh nhất kể từ thời điểm 3 - 5 NSKC và thấp nhất ở CM2 với ĐKVPG (28,1 - 37,9 mm). Hai chủng CM1 và CM4 có ĐKVPG tương đương nhau 53,8 - 54,1 mm ở thời

điểm 7 NSKC cao nhất và khác biệt với 2 chủng CM2 và CM3 với ĐKVPG cũng tương đương nhau 51,2 - 52,1 mm, nhưng đến 9 NSKC, ĐKVPG của CM3 có gia tăng lên 59,3 mm và tương đương với 2 chủng CM1 và CM4 (59,7 - 60,0 mm) và thấp nhất ở CM2 với ĐKVPG đạt 58,2 mm. Kết quả phù hợp với xu hướng hiệu suất đối kháng trước đó.

**Bảng 3. Khả năng sản sinh enzyme cellulase của các dòng vi khuẩn *Bacillus* spp.**

| Nghiệm thức | ĐKVPG (mm) enzyme cellulase ở các ngày sau khi cấy |                    |                   |                   |
|-------------|----------------------------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
|             | 3 NSKC                                             | 5 NSKC             | 7 NSKC            | 9 NSKC            |
| CM1         | 31,2 <sup>a</sup>                                  | 43,8 <sup>a</sup>  | 54,1 <sup>a</sup> | 60,0 <sup>a</sup> |
| CM2         | 28,1 <sup>d</sup>                                  | 37,9 <sup>c</sup>  | 51,2 <sup>b</sup> | 58,2 <sup>b</sup> |
| CM3         | 29,6 <sup>c</sup>                                  | 38,9 <sup>bc</sup> | 52,1 <sup>b</sup> | 59,3 <sup>a</sup> |
| CM4         | 30,5 <sup>b</sup>                                  | 40,5 <sup>b</sup>  | 53,8 <sup>a</sup> | 59,7 <sup>a</sup> |
| CV (%)      | 1,5                                                | 4,4                | 2,4               | 1,9               |
| Mức ý nghĩa | **                                                 | **                 | **                | **                |

Ghi chú: Các số trong cùng một cột được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 1% qua phép kiểm định Duncan. (\*\*): khác biệt ở mức ý nghĩa 1%; NSKC là ngày sau khi cấy; ĐKVPG là đường kính vòng phân giải.



**Hình 4. Kết quả khả năng tiết enzyme cellulase của các dòng vi khuẩn ở 3 NSKC**

(a: Mặt trên đĩa petri; b: Mặt dưới đĩa petri)

Việc so sánh khả năng tiết cellulase của dòng vi khuẩn CM1 cho thấy, không chỉ có hiệu suất đối kháng cao mà còn phân giải cellulose mạnh nhất, trong khi các dòng vi khuẩn còn lại có hoạt tính yếu hơn và không khác biệt rõ đặc biệt ở thời điểm 3 - 5 NSKC. Điều này cho thấy, mối liên hệ chặt chẽ giữa hoạt tính cellulase và hiệu quả đối kháng. Kết quả phù hợp với nghiên cứu của Phạm Thị Ái Niệm và cs

(2024) [29], trong đó chủng *Bacillus* sp. KL6 có hiệu suất ức chế nấm *Fusarium* sp. cao nhất, đồng thời thể hiện hoạt tính enzyme mạnh, đặc biệt là protease, cellulase và chitinase.

### 3.3.2. Khảo sát khả năng tiết enzyme phân giải $\beta$ -glucanase

Tương tự enzyme cellulase,  $\beta$ -glucanase đóng vai trò quan trọng trong cơ chế đối kháng bằng cách phá

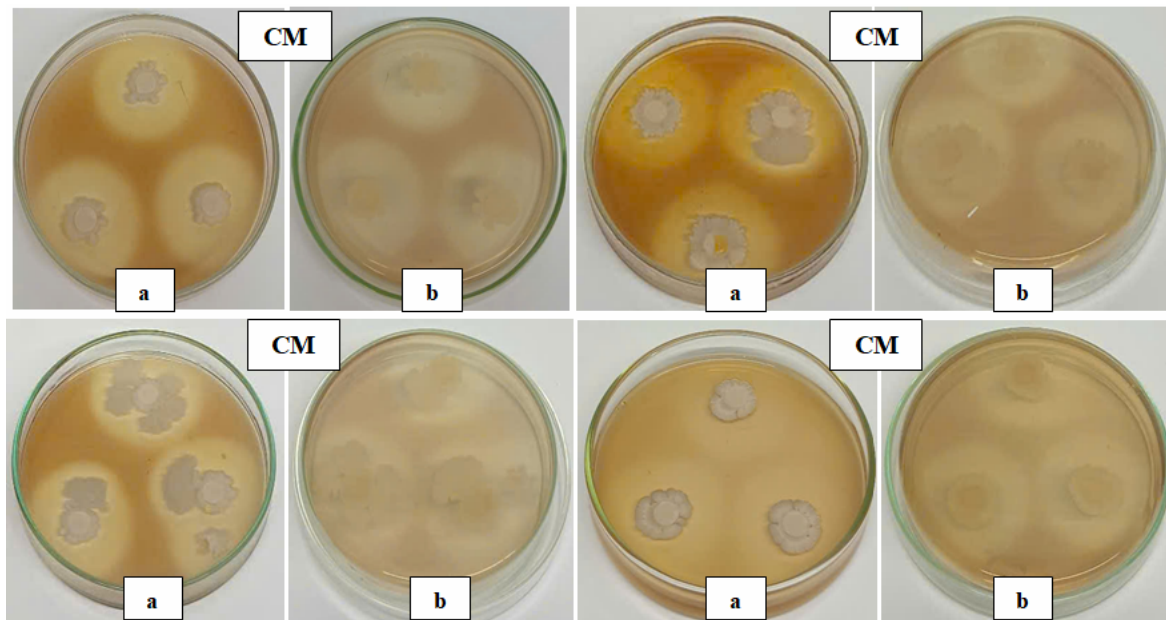


hủy thành tế bào nấm và cung cấp nguồn các-bon cho vi khuẩn. Kết quả khảo sát cho thấy, cả 3 dòng vi khuẩn đều tiết  $\beta$ -glucanase với ĐKVPG tăng dần từ 3 - 7 ngày sau khi cấy và khác biệt có ý nghĩa thống kê 1% (Bảng 4 và hình 5).

**Bảng 4. Khả năng sản sinh enzyme  $\beta$ -glucanase của các dòng vi khuẩn *Bacillus* spp.**

| Nghiệm thức | ĐKVPG (mm) enzyme $\beta$ -glucanase ở các ngày sau khi cấy |                   |                   |
|-------------|-------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|
|             | 3 NSKC                                                      | 5 NSKC            | 7 NSKC            |
| CM1         | 37,7 <sup>a</sup>                                           | 50,8 <sup>a</sup> | 63,7 <sup>a</sup> |
| CM2         | 32,3 <sup>c</sup>                                           | 46,0 <sup>d</sup> | 53,2 <sup>d</sup> |
| CM3         | 31,7 <sup>c</sup>                                           | 48,2 <sup>c</sup> | 56,2 <sup>c</sup> |
| CM4         | 34,2 <sup>b</sup>                                           | 49,6 <sup>b</sup> | 60,5 <sup>b</sup> |
| CV (%)      | 1,7                                                         | 1,8               | 1,2               |
| Mức ý nghĩa | **                                                          | **                | **                |

Ghi chú: Các số trong cùng một cột được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 1% qua phép kiểm định Duncan. (\*\*): khác biệt ở mức ý nghĩa 1%; NSKC là ngày sau khi cấy; ĐKVPG là đường kính vòng phân giải.



**Hình 5. Kết quả khả năng tiết enzyme  $\beta$ -glucanase của các dòng vi khuẩn ở 3 NSKC**

(a: Mặt trên đĩa petri; b: Mặt dưới đĩa petri)

Dòng vi khuẩn CM1 (*Bacillus velezensis* CM1) có ĐKVPG cao nhất (37,7 - 63,7 mm), vượt trội so với các dòng vi khuẩn còn lại, tiếp đến dòng vi khuẩn CM4 có ĐKVPG đạt từ 34,2 - 60,5 mm, tiếp theo CM3 có ĐKVPG đạt từ 31,7 - 56,2 mm và thấp nhất ở CM2 với ĐKVPG đạt từ 32,3 - 53,2 mm. Kết quả này cho thấy, dòng vi khuẩn CM1 có khả năng tiết enzyme mạnh và ổn định, phù hợp với hiệu suất đối kháng đã ghi nhận. Kết quả cũng khá tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Huyền và cs (2024) [30] cho thấy, hai chủng *Bacillus* sp. 4 và 41 có khả năng

sinh  $\beta$ -glucanase và đối kháng hiệu quả với nấm *Colletotrichum fructicola* gây bệnh thán thư trên ớt. *Bacillus* sp. 41 đạt hoạt tính enzyme cao nhất (1,202 U/mL sau 12 giờ), vượt trội so với *Bacillus* sp. 4 (0,854 U/mL sau 15 giờ), với hiệu quả kiểm soát nấm đạt lần lượt 57,39% và 50,73%. Các loài *Bacillus* khác như *B. circulans*, *B. amyloliquefaciens* và *B. subtilis* cũng được chứng minh có khả năng kiểm soát sinh học nấm nhờ  $\beta$ -1,3-glucanase [31 - 33].

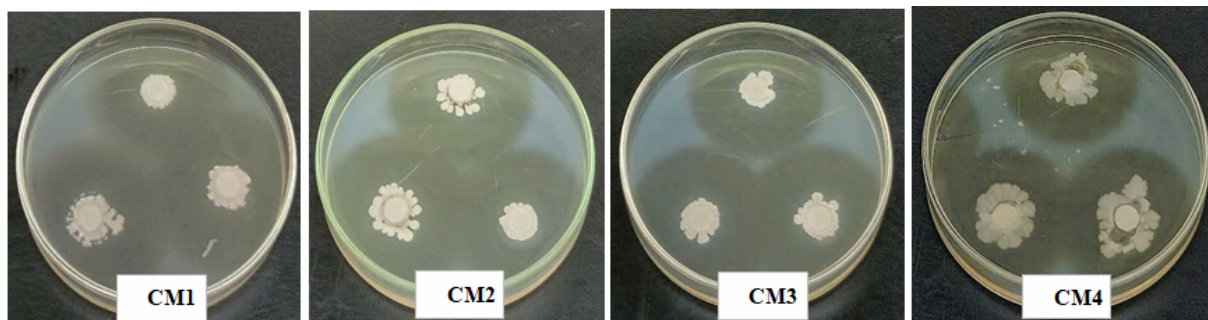
3.3.3. Khảo sát khả năng tiết enzyme phân giải protease



**Bảng 5. Khả năng sản sinh enzyme protease của các dòng vi khuẩn *Bacillus* spp.**

| Nghiệm thức | ĐKVPG (mm) enzyme protease ở các ngày sau cấy |                   |                   |         |
|-------------|-----------------------------------------------|-------------------|-------------------|---------|
|             | 3 NSKC                                        | 5 NSKC            | 7 NSKC            | 9 NSKC  |
| CM1         | 42,9 <sup>a</sup>                             | 53,8 <sup>a</sup> | 62,0 <sup>a</sup> | Đầy đĩa |
| CM2         | 43,3 <sup>a</sup>                             | 54,2 <sup>a</sup> | 59,3 <sup>b</sup> | 63,2    |
| CM3         | 43,9 <sup>a</sup>                             | 54,9 <sup>a</sup> | 59,9 <sup>b</sup> | 63,8    |
| CM4         | 39,7 <sup>b</sup>                             | 52,2 <sup>b</sup> | 58,9 <sup>c</sup> | 62,7    |
| CV (%)      | 4,1                                           | 2,6               | 3,5               |         |
| Mức ý nghĩa | **                                            | **                | **                |         |

*Ghi chú: Các số trong cùng một cột được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 1% qua phép kiểm định Duncan. (\*\*): Khác biệt ở mức ý nghĩa 1%; NSKC là ngày sau khi cấy; ĐKVPG là đường kính vòng phân giải.*



**Hình 6. Khả năng tiết enzyme protease của 4 dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. ở 3 NSKC**

Kết quả ở bảng 5 và hình 6 cho thấy, khả năng tiết enzyme protease của 4 dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. tại các thời điểm 3 - 7 NSKC có sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1%, với ĐKVPG enzyme dao động từ 39,7 - 62,0 mm. Cụ thể, ở giai đoạn 3 - 5 NSKC: Các chủng CM1, CM2 và CM3 có ĐKVPG cao hơn (42,9 - 54,9 mm) so với CM4 (39,7 - 52,2 mm). Ở giai đoạn 7 NSKC: CM1 đạt ĐKVPG cao nhất (62,0 mm), vượt trội so với CM2 và CM3 (59,3 - 59,9 mm), trong khi CM4 thấp nhất (58,9 mm). Dòng vi khuẩn CM1 (*Bacillus velezensis* CM1) thể hiện tốc độ phát triển mạnh nhất đến 7 NSKC và bao phủ hoàn toàn đĩa môi trường ở ngày thứ 9, vượt trội so với các dòng vi khuẩn khác. Ngược lại, CM4 tiết enzyme chậm nhất. Các vi sinh vật có khả năng tiết các enzyme ngoại bào để hạn chế khả năng gây bệnh của các dòng vi khuẩn gây bệnh.

Enzyme ngoại bào giúp hạn chế vi khuẩn gây bệnh và hỗ trợ tiêu hóa, do đó là tiêu chí quan trọng trong chọn lọc probiotic. Kết quả phù hợp với nghiên cứu của Lee và cs (2012) [34] và Altan (2004) [35], trong đó các chủng *Bacillus* sp. T4, *Bacillus* sp. JSP1 và *Bacillus licheniformis* cũng thể hiện hoạt tính protease.

#### 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

##### 4.1. Kết luận

Kết quả đã phân lập được 4 dòng vi khuẩn: CM1, CM2, CM3 và CM4 mang đặc trưng của *Bacillus* trên môi trường LB: Tế bào hình que, bắt Gram dương, khuẩn lạc trắng đến trắng đục, khô nhăn, 2 đầu tròn, rìa gợn sóng hoặc răng cưa. Tất cả đều phản ứng catalase dương và KOH 3% âm, xác nhận là vi khuẩn Gram dương.

Cả 4 dòng đều có khả năng đối kháng nấm gây bệnh xì mủ mít trong điều kiện phòng thí nghiệm. Trong đó, dòng vi khuẩn được định danh là *Bacillus velezensis* CM1 cho hiệu quả đối kháng cao nhất (16,2 - 67,0%) và tiết mạnh các enzyme phân giải như cellulase (31,2 - 60,0 mm),  $\beta$ -glucanase (37,7 - 63,7 mm) và protease (42,9 - 62,0 mm) từ ngày 3 - 9 sau cấy. Vi khuẩn *B. velezensis* CM1 là tác nhân sinh học triển vọng trong kiểm soát bệnh xì mủ mít.

#### 4.2. Kiến nghị

Tiếp tục nghiên cứu, thử nghiệm vi khuẩn CM1 *Bacillus velezensis* CM1 đối kháng với nấm *Phytophthora palmivora* ở vườn mít qua nhiều vụ và trên diện rộng để có thể sử dụng là tác nhân sinh học phòng chống bệnh nứt thân xì mủ mít.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ kinh phí từ nhiệm vụ khoa học và công nghệ của Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh trong khuôn khổ Đề tài mã số 23.03.KT.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Hùng Cường (2019). *Lịch sử nghiên cứu và phát triển cây mít*. Nxb Nông nghiệp Hà Nội. 200 trang.
2. Tri M V., Van Hoa N., Minh Chau N, Pane A., Faedda R., De Patrizio A., Schena L., Olsson C H., Wright S A., Ramstedt M., Cacciola SO. (2015). *Decline of jackfruit (Artocarpus heterophyllus) incited by Phytophthora palmivora in Vietnam*. *Phytopathologia Mediterranea*, 275 - 280.
3. Đinh Thị Ngọc (2022). *Khảo sát khả năng phòng trị bệnh thối rễ trên cây mít (Artocarpus heterophyllus) do Phytophthora của các chủng xạ khuẩn*. Luận văn tốt nghiệp Thạc sĩ ngành Bảo vệ Thực vật, Trường Đại học Cần Thơ, 78 trang.
4. Nguyễn Xuân Vũ (2022). *Nghiên cứu sử dụng chế phẩm vi khuẩn có ích bacillus trong sản xuất lạc ở Quảng Nam*. Luận án tiến sĩ khoa học cây trồng, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh.
5. Kloepper, J. W., Ryu, C-M., Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94, 59 - 66.
6. Gnanamanickam, S. S. (2009). Biological control of rice diseases (*Progress in Biological Control vol. 8*), Springer Science Business Media B. V., 67 - 78.
7. Todar, K. (2011). *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Dept. of Bacteriology.
8. Phan Quý Quà (2024). *Tuyển chọn xạ khuẩn đối kháng nấm Phytophthora gây bệnh nứt thân, xì mủ trên mít siêu sớm ở điều kiện in vitro và nhà lưới*. Luận văn thạc sĩ khoa học cây trồng. Trường Đại học An Giang. Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
9. Logan, N. A., De Vos P (2009). *Genus I. Bacillus* Cohn 1872, 174AL. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes 3* (January), 31 - 34.
10. Lawrence A. Lacey (2012). *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Elsevier's Science & Technology Rights Department. 513 pages, [https:// www.elsevierdirect.com](https://www.elsevierdirect.com), truy cập ngày 3/6/2025.
11. Abdulkadir, M. and S. Waliyu (2012). Screening and isolation of the soil bacteria for ability to produce antibiotics. *European Journal of Applied Sciences*, 4(5), 211 - 215.
12. Han, J. H., Shim, H., Shin, J. H & Kim, K. S. (2015). Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. *The plant pathology journal*, 31(2), 165 - 175. [https://doi: 10.5423/PPJ.OA.03.2015.0036](https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2015.0036).
13. Heiko Packeiser, Chanyuen Lim, Balaji Balagurunathan, Jinchuan Wu, Hua Zhao. (2013). An extremely simple and effective colony PCR procedure for bacteria, yeasts, and microalgae. *Appl Biochem Biotechnol*, 169(2), 695 - 700. [https://doi: 10.1007/s12010-012-0043-8](https://doi.org/10.1007/s12010-012-0043-8).
14. Phạm Thị Tuyết Ngân, Vũ Hùng Hải, Vũ Ngọc Út và Huỳnh Trường Giang (2021). Phân lập và tuyển chọn một số chủng xạ khuẩn có khả năng phân hủy chất hữu cơ và kháng khuẩn ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 57(Chuyên đề Thủy sản), 99 - 106, <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2021.069>.
15. Nguyễn Thị Thuý Nga (2015). Nghiên cứu tạo chế phẩm đa chủng vi sinh vật và đánh giá hiệu quả của chế phẩm đối với sản xuất cây con thông nhựa (*Pinus merkusii*) ở vườn ươm. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, 3, 3960 - 3968.

16. Lawrence A. Lacey. (2012). *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Elsevier's Science & Technology Rights Department. 513 pages. [www.elsevierdirect.com](http://www.elsevierdirect.com).
17. Ertugrul, S., G. Donmez & Takac, S. (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*, 149(3), 720 - 724.
18. Renwick, A., Campbell, R. & Coe, S. (1991). Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology*, 40(4), 524 - 532.
19. Mitra, P. & Chakrabartty, P. (2005). An extracellular protease with depilation activity from *Streptomyces nogalator*. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64(12), 978 - 983.
20. Vaseeharan, C., & Ramasamy, K. (2003). The impact of culture on organizational performance. *Journal of Management Studies*, 40(1), 123 - 145.
21. Đỗ Trung Hải (2008). *Giáo trình vi sinh vật học*. Nxb Giáo dục.
22. Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., và Stahl, D. A. (2018). *Brock Biology of Microorganisms (15th ed.)*. Pearson Education.
23. Trần Kim Hạnh (2024). Phân lập tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* sp. từ đất vùng rễ xoài có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên xoài. Luận văn thạc sĩ sinh học. Học viện Khoa học và Công nghệ, thành phố Hồ Chí Minh.
24. Nguyễn Thị Liên, Lê Nguyễn Quỳnh Nga, Kim Tuấn Kiệt, Lê Thị Cẩm Tiên, Liễu Bảo Trâm và Nguyễn Tăng Phú (2023). Đánh giá khả năng đối kháng với nấm *Phytophthora palmivora* của vi khuẩn phân lập từ đất vùng rễ cây sầu riêng. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Thái Nguyên*, 228(13), 391 - 398.
25. Nguyễn Thu Trang, Trần Thị Thúy Hà, Nguyễn Xuân Trường và Nguyễn Văn Giang (2018). Phân lập và khảo sát một số đặc điểm sinh học của các dòng vi khuẩn nội sinh từ rễ cây hồ tiêu. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 10(95), 85 - 90.
26. Phạm Hồng Hiền, Nguyễn Thị Chúc Quỳnh, Phùng Quang Tùng, Bạch Thị Diệp, Vũ Thị Hiền, Phạm Thị Minh Thắng và Nguyễn Xuân Cảnh (2020). Nấm *Phytophthora* gây bệnh cây mít tại tỉnh Đắk Lắk và Tiền Giang. *Tạp chí Học viện Nông nghiệp Việt Nam*, 1, 10 - 14.
27. Quách Hồng Thúy (2018). *Phân lập và tuyển chọn các chủng Bacillus ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp*. Đồ án tốt nghiệp. Trường Đại học Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh.
28. Rabbee, M. F., Ali, S., Baek, K. (2019). Endophyte *Bacillus velezensis* isolated from citrus spp. controls streptomycin-resistant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* that causes citrus bacterial canker. *Agronomy*, 9(470): 1 - 15. <https://doi.org/10.3390/agronomy9080470>.
29. Phạm Thị Ái Niệm, Nguyễn Xuân Đồng, Trần Tuấn Anh, Võ Thị Minh Thảo, Nguyễn Minh Khánh, Nguyễn Ngọc Phi, Trần Ngọc Quốc Tường, Nguyễn Lê Huy Khanh, Phan Thị Hồng Thanh, Nguyễn Tử Minh (2024). *Đánh giá khả năng đối kháng của vi khuẩn bacillus sp. với nấm fusarium sp. được phân lập từ cây quýt hồng Citrus Reticulata Blanco bị bệnh vàng lá thối rễ tại huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp*. Hội nghị khoa học toàn quốc về công nghệ sinh học 2024, 1081 - 1088.
30. Nguyễn Thị Thanh Huyền, Nguyễn Đức Huy, Nguyễn Bảo Hùng, Lê Thị Nhật Ánh, Nguyễn Thị Minh Nga và Trần Quốc Dũng (2024). Khả năng đối kháng bệnh thán thư do *Colletotrichum fruticola* CL5 trên trái ổi của 1,3- $\beta$ -glucanase sinh tổng hợp từ *Bacillus* spp. *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế*, tập 133, 3A, 49 - 60.
31. Magnin-Robert, M., Trotel-Aziz, P., Quantinet, D., Biagianti, S., Aziz, A. (2007). Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase activities under field conditions. *Eur J Plant Pathol*, 118, 43 - 57.
32. Otsuka, Y., Sato, K., Yano, S., Kanno, H., Suyotha, W., Konno, H., Taira, T. (2022). GH-16 type  $\beta$ -1, 3-glucanase from *Lysobacter* sp. MK9-1 enhances antifungal activity of GH-19 type chitinase, and its glucan-binding domain binds to fungal cell-wall. *J Appl Glycosci*, 69(3), 49 - 56.
33. Duy, L. (2023). Evaluation of antifungal activity against *Corynespora cassiicola* by bacteria isolated from soil in the root zone of cucumber plants. *Biodiversitas*, 24(12), 6584 - 6591.

34. Lee, J., Park, I., Choi, Y., & Cho, J. (2012). *Bacillus strains as feed additives: In vitro evaluation of its potential probiotic properties*. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 25, 577 - 585.
35. Altan, A. (2004). *Isolation and molecular characterization of extracellular lipase and pectinase producing bacteria from olive oil mills*. MS Thesis, University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Helsinki. Izmir Institute of Technology Izmir, Turkey.

**IDENTIFICATION AND ASSESSMENT OF THE ENZYME-BASED, ANTAGONISTIC POTENTIAL OF *Bacillus* sp. AGAINST *Phytophthora palmivora* CAUSING GUMMOSIS TRUNK CANER DISEASE ON JACKFRUIT IN CHO MOI DISTRICT, AN GIANG PROVINCE**

**Nguyen Phu Dung<sup>1</sup>, Van Vien Luong<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thai Son<sup>1</sup>,  
Pham Thi Be Thi<sup>2</sup>, Phan Quy Qua<sup>2</sup>, Luu Vinh Tri<sup>3</sup>, Nguyen Truong Hong Cong<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Faculty of Agriculture & Natural Resources,

An Giang University - Vietnam National University Ho Chi Minh city, Vietnam

<sup>2</sup> Master students of Crop science K7, Faculty of Agriculture & Natural Resources,

An Giang University - Vietnam National University Ho Chi Minh city, Vietnam

<sup>3</sup> Master students of Crop science K8, Faculty of Agriculture & Natural Resources,

An Giang University - Vietnam National University Ho Chi Minh city, Vietnam

<sup>4</sup> Master students of Crop science K9, Faculty of Agriculture & Natural Resources,

An Giang University - Vietnam National University Ho Chi Minh city, Vietnam

**Abstract**

In recent years, gummosis trunk canker disease caused by *Phytophthora palmivora* has become a major threat to jackfruit production. In this study, 12 soil samples were collected from jackfruit fields in Cho Moi district, An Giang province, for the isolation, identification and evaluation of enzyme-secreting activity of *Bacillus* sp. strains with antagonistic potential against *Phytophthora palmivora* causing gummosis trunk canker disease on jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) *in vitro* conditions. The results indicated that four bacterial strains (CM1, CM2, CM3, and CM4) were isolated, exhibiting morphological characteristics typical of *Bacillus* sp. (round colonies, white to opaque white color, dry wrinkled surface, elevated, serrated edges) and biochemical properties characteristic of *Bacillus* species. All were gram-positive bacteria, catalase-positive (bubble formation), negative with 3% KOH (no mucous formation) and showed antagonistic activity against the pathogenic fungus. Among them, the strain identified as *Bacillus velezensis* CM1 exhibited the best antagonistic effect (16.2 - 67.0%) and the strongest production of cellulase (31.2 - 60.0 mm),  $\beta$ -glucanase (37.7 - 63.7 mm), and protease (42.9 - 62.0 mm) from 3 to 9 days after inoculation. *Bacillus velezensis* CM1 was considered a promising biocontrol agent for managing stem canker disease in jackfruit.

**Keywords:** Gummosis trunk canker disease, jackfruit, *Bacillus velezensis* CM1, cellulase,  $\beta$ -glucanase, protease.

**Ngày nhận bài:** 18/4/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 12/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 30/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 25/6/2025

# HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM *Fusarium sambucinum* FG2 GÂY THỐI CUỐNG CHUỐI CỦA *Bacillus amyloliquefaciens* HGG10 PHÂN LẬP TỪ VÙNG RỄ CHUỐI

Nguyễn Thị Liên <sup>1,\*</sup>, Phạm Thị Phước Nhi <sup>1</sup>, Nguyễn Lam Minh <sup>1</sup>, Nguyễn Tăng Phú <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

\*Email: ntlien@ctu.edu.vn

## TÓM TẮT

Bệnh thối cuống chuối do nấm *Fusarium sambucinum* FG2 là một trong những bệnh sau thu hoạch phổ biến nhất, gây thiệt hại lớn về sản lượng và chất lượng chuối. Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục tiêu đánh giá hoạt tính kháng nấm *in vitro* của vi khuẩn phân lập từ vùng rễ chuối chống lại nấm *Fusarium sambucinum* FG2 gây thối cuống chuối. Tổng số 25/92 chủng vi khuẩn phân lập từ vùng rễ chuối cho thấy, hoạt tính đối kháng với nấm *Fusarium sambucinum* FG2 trong thử nghiệm cấy kép. Tỷ lệ ức chế sự phát triển của sợi nấm dao động từ 28,2 - 60,3%. Chủng vi khuẩn HGG10 với hoạt tính kháng nấm cao nhất được xác định là *Bacillus amyloliquefaciens*. Chủng vi khuẩn HGG10 có khả năng sản sinh các enzyme phân hủy nấm bệnh ( $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase và protease) và siderophore giúp cạnh tranh sắt. Ngoài ra, chủng vi khuẩn HGG10 còn mang các gen tổng hợp lipopeptide kháng nấm là bacillomycin, fengycin và surfactin. Các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi và dịch nổi vô bào thu nhận từ chủng vi khuẩn HGG10 cũng cho thấy, khả năng ức chế mạnh nấm *Fusarium sambucinum* FG2. Chủng vi khuẩn HGG10 cho thấy, tiềm năng trong nghiên cứu để ngăn ngừa và điều trị bệnh thối cuống chuối.

**Từ khóa:** Chuối, hoạt tính kháng nấm, thối cuống, vi khuẩn vùng rễ.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chuối (*Musa* spp.) là một trong những loại cây ăn quả nhiệt đới quan trọng nhất trên thế giới, đóng góp đáng kể vào an ninh lương thực, thu nhập của người nông dân và nền kinh tế của nhiều quốc gia [1]. Tuy nhiên, sản xuất chuối phải đối mặt với nhiều thách thức, trong đó bệnh hại là một trong những nguyên nhân chính gây thất thoát năng suất cả trong quá trình canh tác [2]. Trong quá trình canh tác, cây chuối thường bị tấn công bởi nhiều mầm bệnh là nấm, vi khuẩn và virus [3], trong khi đó sự tấn công của nấm bệnh là một trong những vấn đề nghiêm trọng nhất ở giai đoạn sau thu hoạch [4].

Bệnh thối cuống trên chuối là một bệnh phức tạp với sự xâm nhiễm của nhiều tác nhân gây bệnh khác nhau, gây thiệt hại lớn về chất lượng và giá trị thương mại của chuối [5]. Trong đó, nấm *Fusarium* spp. là tác nhân được phát hiện gây thối cuống chuối với tỷ lệ cao nhất [5 - 7]. Trong thực tiễn sản xuất, việc kiểm soát bệnh thối cuống hiện chủ yếu dựa vào các loại thuốc hóa học [8]. Tuy nhiên, phương pháp này tiềm ẩn nhiều rủi ro, bao gồm tác động tiêu cực đến sức khỏe con người, ô nhiễm môi trường và sự hình thành các chủng nấm kháng thuốc [8]. Do đó, việc

nghiên cứu và phát triển các biện pháp thay thế an toàn và hiệu quả hơn đang trở thành xu hướng tất yếu và cấp thiết trong bối cảnh canh tác bền vững.

Kiểm soát sinh học đã được nghiên cứu như một phương pháp tiềm năng thay thế cho thuốc hóa học trong việc kiểm soát bệnh thối cuống chuối [9 - 10]. Vi sinh vật đối kháng thu hút sự quan tâm trong lĩnh vực kiểm soát sinh học nhờ vào tính hiệu quả và thân thiện với môi trường của chúng [11 - 12]. Vi khuẩn vùng rễ, đặc biệt là *Bacillus* spp., đã được chứng minh về khả năng kiểm soát sinh học hiệu quả thông qua các cơ chế như: Cạnh tranh chất dinh dưỡng, sản sinh chất kháng nấm và kích thích sinh trưởng cây trồng [13 - 15]. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục tiêu phân lập, tuyển chọn và đánh giá hoạt tính kháng nấm *Fusarium sambucinum* FG2 của vi khuẩn vùng rễ chuối. Chủng vi khuẩn đối kháng mạnh có thể sử dụng như vật liệu cho các nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh thối cuống chuối.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Chủng nấm *Fusarium sambucinum* FG2 được phân lập từ mẫu chuối già bị thối cuống và cho thấy,



khả năng gây bệnh khi xử lý chủng bệnh nhân tạo theo quy trình Koch. Chủng nấm *Fusarium sambucinum* FG2 được lưu trữ tại Phòng Thí nghiệm Vi sinh vật, Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ. Mười mẫu đất từ vùng rễ chuối được thu thập ở các tỉnh An Giang, Hậu Giang và Lâm Đồng.

## **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

### **2.2.1. Phân lập vi khuẩn từ các mẫu đất vùng rễ cây chuối**

Thu thập mẫu đất vùng rễ chuối: Tại các vị trí thu mẫu, tiến hành đào đất quanh gốc chuối, sau đó dùng dụng cụ thu lấy phần đất quanh phần thân hành của cây chuối. Các mẫu đất được chứa trong túi nylon vô trùng, dán nhãn ghi thông tin như: Giống chuối, thời gian và địa điểm lấy mẫu.

Phân lập vi khuẩn từ mẫu đất thu thập được: Mẫu đất (10 g) được thêm vào 90 mL nước cất vô trùng và khuấy đều trong 15 phút, sau đó để lắng trong khoảng 30 phút. Phần dịch trong sau lắng được pha loãng đến nồng độ  $10^{-5}$ . Mỗi nồng độ pha loãng (50  $\mu$ L) được trải trên các đĩa NA và các đĩa được ủ ở 30°C. Các khuẩn lạc có đặc điểm hình thái khác nhau được cấy chuyển sang các đĩa NA mới đến khi thu được các khuẩn lạc đồng nhất. Độ thuần của các chủng vi khuẩn cũng được kiểm tra bằng cách quan sát trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1.000 lần.

### **2.2.2. Khảo sát hoạt tính đối kháng của các chủng vi khuẩn phân lập với chủng nấm *Fusarium sambucinum* FG2**

Các chủng vi khuẩn phân lập được nuôi cấy trên các đĩa môi trường NA và ủ ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ. Dịch huyền phù vi khuẩn được chuẩn bị trong dung dịch NaCl 0,85% vô trùng và điều chỉnh độ đục về bằng độ đục chuẩn 0,5 McFarland.

Các khối thạch nấm (đường kính 6 mm) được lấy từ rìa đang phát triển của khuẩn lạc chủng nấm *Fusarium sambucinum* FG2. Các khối thạch nấm được cấy vào tâm đĩa petri chứa môi trường PDA và ủ ở 30°C trong 24 giờ. Sau đó, dịch huyền phù vi khuẩn đã chuẩn bị được nhỏ vào ba điểm đối xứng xung quanh khuẩn lạc nấm *Fusarium sambucinum* FG2 với thể tích 3  $\mu$ L/điểm. Một điểm đối chứng được nhỏ với 3  $\mu$ L dung dịch NaCl 0,85% vô trùng. Sau 5 ngày ủ ở 30°C, quan sát sự hình thành vùng ức chế nấm và tính tỷ lệ ức chế sự phát triển của nấm bởi vi khuẩn theo công thức sau:

Tỷ lệ ức chế sự phát triển sợi nấm (%) =  $(1 - \text{TD/CD}) \times 100$

Trong đó: TD và CD lần lượt là khoảng cách giữa tâm và rìa của khuẩn lạc nấm *Fusarium sambucinum* FG2 ở nghiệm thức xử lý vi khuẩn và nghiệm thức đối chứng [16].

### **2.2.3. Định danh chủng vi khuẩn đối kháng mạnh với nấm *Fusarium sambucinum* FG2**

Chủng vi khuẩn HGG10 có hoạt tính kháng cao nhất đối với chủng *Fusarium sambucinum* FG2 trong thử nghiệm đồng nuôi cấy trên đĩa thạch. ADN tổng số của chủng vi khuẩn HGG10 đã được ly trích bằng phương pháp mô tả bởi Chen và Kuo (1993) [17]. Chất lượng của ADN ly trích được đánh giá bằng phương pháp đo Nanodrop. Phản ứng khuếch đại vùng 16S rRNA đã được thực hiện với các primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGCTACCTTGTACGTA-3') [18]. Phản ứng PCR được thực hiện với thể tích 25  $\mu$ L chứa 15,75 nước cất hai lần vô trùng, 5  $\mu$ L MyTaq DNA Polymerase buffer 5X (Bioline, Anh), 1  $\mu$ L mỗi primer 27F và 1492R, 0,25  $\mu$ L MyTaq DNA Polymerase (Bioline, Anh), 2  $\mu$ L ADN. Phản ứng PCR được thực hiện với máy ABI 9800, với chu kỳ nhiệt như sau: 94°C - 5 phút, 35 chu kỳ gồm 94°C - 1 phút, 55°C - 1 phút và 72°C - 2 phút và bước kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm khuếch đại được giải trình tự tại Công ty TNHH ADN Sequencing. Trình tự thu nhận được so sánh với cơ sở dữ liệu NCBI bằng công cụ BLASTn. Trình tự một phần vùng gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn HGG10 được sử dụng để xây dựng cây phát sinh loài với các loài vi khuẩn có độ tương đồng cao với phương pháp Neighbor-joining, thuật toán Jukes-Cantor model, độ lặp lại 2.000 lần với phần mềm Molecular Evolution Genetics Analysis (MEGA) phiên bản 6.0.6.

### **2.2.4. Khảo sát khả năng sản xuất enzyme thủy phân và siderophore của chủng vi khuẩn HGG10**

$\beta$ -1,3-glucanase: Chủng vi khuẩn HGG10 được nuôi cấy trong 10 mL môi trường LB lỏng trong 48 giờ trên máy lắc (120 vòng/phút) ở 30°C, sau đó ly tâm trong 5 phút ở 10.000 vòng/phút ở 4°C. Phần dịch nổi được sử dụng để xác định hoạt tính  $\beta$ -1,3-glucanase. Phần dịch nổi (100  $\mu$ L) được thêm vào 900  $\mu$ L laminarin (0,05% trong đệm natri acetate, pH 5,2) và trộn đều. Sau 30 phút ủ ở 37°C, nồng độ đường khử trong hỗn hợp được ước tính bằng

phương pháp 3,5-dinitrosalicylic axit (DNS). Glucose (0 - 10  $\mu$ M) được sử dụng làm chất chuẩn cho thử nghiệm.

**Chitinase:** Chủng vi khuẩn HGG10 được nuôi cấy trong 10 mL môi trường chứa: 5 g/L tryptone, 1 g/L glucose, 5 g/L chiết xuất nấm men, 1 g/L  $K_2HPO_4$  và 5 g/L NaCl, 10 g/L keo chitin, pH 7,2. Các ống thử nghiệm được ủ ở 30°C trong 48 giờ trên máy lắc ngang ở tốc độ 120 vòng/phút. Phần dịch nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Hỗn hợp gồm 1 mL dịch nổi và 1 mL keo chitin (10% trong đệm natri phosphate 0,2 M, pH 7,0) được ủ trong 10 phút ở 50°C. Phản ứng được dừng lại bằng cách thêm 1 mL NaOH 1% và lắc đều. Sau đó, ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi được sử dụng để xác định lượng đường khử bằng phương pháp DNS. N-acetylglucosamine (0 - 10  $\mu$ M) được sử dụng làm chất chuẩn cho thử nghiệm.

**Protease:** Chủng vi khuẩn HGG10 được nuôi cấy trong 10 mL môi trường LB lỏng trong 48 giờ trên máy lắc (120 vòng/phút) ở 30°C, sau đó ly tâm trong 5 phút ở 10.000 vòng/phút ở 4°C. Dịch nổi (100  $\mu$ L) được trộn với 400  $\mu$ L casein (1% pha trong đệm sodium citrate 0,1 M, pH 7). Hỗn hợp được ủ ở 30°C trong 1 giờ. Dung dịch trichloroacetic axit (TCA) 5% (500  $\mu$ L) được thêm vào hỗn hợp và để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó, hỗn hợp được ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút, trong 5 phút. Sau đó, 100  $\mu$ L phần dịch nổi được trộn đều với 500  $\mu$ L thuốc thử kiểm hóa (thêm 1 mL dung dịch sodium potassium tartrate 2,7% và 1 mL dung dịch đồng sulfate 1,0% vào 98 mL dung dịch sodium carbonate 2,0%) và trộn đều. Sau 10 phút, 50  $\mu$ L thuốc thử Folin-Ciocalteu-phenol 1 N được thêm vào hỗn hợp và giữ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Giá trị quang phổ hấp thụ của sản phẩm màu xanh trong mẫu được xác định ở bước sóng 660 nm. Tyrosine (0 - 10  $\mu$ M) được sử dụng như chất chuẩn.

**Siderophore:** Chủng HGG10 được nuôi cấy trong 10 mL môi trường LB lỏng và ủ ở 30°C trên máy lắc trong 48 giờ. Dịch vi khuẩn (2 mL) được ly tâm ở 10.000 vòng, 10 phút ở 4°C. Dịch nổi sau ly tâm (1 mL) được trộn đều với thuốc thử CAS (1 mL) và ủ tối ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Thuốc thử CAS được chuẩn bị theo mô tả của Schwyn và Neilands (1987) [19]. Giá trị quang phổ hấp thụ của hỗn hợp được xác định ở bước sóng 630 nm. Hoạt tính siderophore

được tính toán theo công thức mô tả bởi Senthilkumar và cs (2020) [20].

$$\text{Khả năng sản sinh siderophore (\%)} = \frac{(Ar - As) \times 100}{Ar}$$

Trong đó: Ar là độ hấp thụ quang của đối chứng (thuốc thử CAS + môi trường LB); As là độ hấp thụ quang của mẫu (thuốc thử CAS + dịch nổi sau ly tâm).

#### 2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của các hợp chất dễ bay hơi (volatile organic compound - VOC) sản sinh bởi chủng vi khuẩn HGG10 đến sự phát triển của nấm *Fusarium sambucinum* FG2

Huyền phù chủng vi khuẩn HGG10 (100  $\mu$ L) được trải lên các đĩa NA bằng tăm bông vô trùng. Đối với thử nghiệm ức chế sợi nấm *Fusarium sambucinum* FG2, các đĩa PDA được cấy với các khối thạch nấm của nấm *Fusarium sambucinum* FG2 (đường kính 6 mm) ở tâm đĩa. Đối với thử nghiệm ức chế nảy mầm bào tử, 50  $\mu$ L huyền phù bào tử nấm *Fusarium sambucinum* FG2 ( $10^5$  bào tử/mL) được trải lên các đĩa PDA. Sau đó, đáy đĩa petri được cấy nấm *Fusarium sambucinum* FG2 được đặt lên trên các đáy đĩa petri đã trải với chủng vi khuẩn HGG10. Các đáy đĩa petri có cấy vi khuẩn và nấm *Fusarium sambucinum* FG2 được quấn lại bằng parafilm và ủ ở 28°C trong 5 ngày. Các đĩa môi trường NA không có vi khuẩn đối kháng được sử dụng làm đối chứng. Tỷ lệ ức chế sự phát triển của sợi nấm *Fusarium sambucinum* FG2 và tỷ lệ ức chế sự nảy mầm của bào tử nấm *Fusarium sambucinum* FG2 được tính theo công thức mô tả bởi Zhang và cs (2020) [21].

$$\text{Tỷ lệ ức chế sự phát triển của sợi nấm (\%)} = (D_{CK} - D_T) \times 100 / D_{CK}$$

$$\text{Tỷ lệ ức chế nảy mầm của bào tử (\%)} = (C_{CK} - C_T) \times 100 / C_{CK}$$

Trong đó:  $D_{CK}$  là đường kính tán nấm ở nghiệm thức đối chứng;  $D_T$  là đường kính tán nấm ở nghiệm thức có vi khuẩn;  $C_{CK}$  là số khuẩn lạc nấm ở nghiệm thức đối chứng;  $C_T$  là số khuẩn lạc ở nghiệm thức có vi khuẩn.

#### 2.2.6. Khảo sát ảnh hưởng của dịch nổi vô bào (cell-free supernatant - CFS) thu nhận từ chủng vi khuẩn HGG10 đến sự phát triển của nấm *Fusarium sambucinum* FG2

Chủng vi khuẩn HGG10 được nuôi cấy trong 20 mL môi trường LB lỏng và ủ ở 30°C trên máy lắc (120

vòng/phút) trong 48 giờ. Dịch vi khuẩn được ly tâm ở 10.000 vòng/phút, 10 phút ở 4°C. Phần dịch nổi được lọc qua màng lọc vi khuẩn 0,22 µm, sau đó trộn với môi trường PDA nóng với nhiệt độ khoảng 50°C để đạt nồng độ cuối cùng 20% (v/v). Đĩa đối chứng được trộn với một lượng tương đương môi trường LB. Các khối thạch nấm nấm *Fusarium sambucinum* FG2 (đường kính 6 mm) được cấy vào trung tâm các đĩa petri chứa môi trường thử nghiệm. Trong thử nghiệm ức chế sự nảy mầm của bào tử, 50 µL huyền phù bào tử nấm *Fusarium sambucinum* FG2 được trải đều trên các đĩa môi trường thử nghiệm. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 ngày đối với thử nghiệm ức chế bào tử và 5 ngày đối với thử nghiệm ức chế sợi nấm. Sau khi ủ, hoạt tính kháng nấm của CFS thu nhận từ chủng vi khuẩn HGG10 được tính theo công thức như đã mô tả ở thí nghiệm ức chế bằng VOC.

#### 2.2.7. Khảo sát sự hiện diện của một số gene tổng hợp lipopeptide ở chủng vi khuẩn HGG10

Chủng vi khuẩn HGG10 đã được kiểm tra sự hiện diện của các gen tham gia mã hóa lipopeptide mạch vòng bacillomycin L (*bmyB*), bacilysin (*bacA*), fengycin (*fenD*), iturin A (*ituC*) và surfactin (*srfAA*) với các đoạn môi đặc hiệu được mô tả bởi Mora và cs (2011) [22]. Các điều kiện chu kỳ để khuếch đại tất cả các mục tiêu như sau: 95°C trong 4 phút, 40 chu kỳ 94°C trong 1 phút, nhiệt độ gắn mỗi trong 1 phút và 72°C trong 1 phút. Bước kéo dài cuối cùng ở 70°C

trong 5 phút tiếp theo là ngâm ở 4°C. Nhiệt độ gắn mỗi được đặt ở 58°C đối với các môi khuếch đại gen *fenD*, *ituC*, *srfAA*, *bacA* và 55°C đối với gen *bmyB*. Sản phẩm PCR và thang chuẩn HyperLadder 100 bp (Bioline, Anh) được điện di trên gel agarose 1,5%. Bản gel được quan sát dưới ánh sáng UV trên hệ thống chụp gen Bio-Rad UV 200 (Hoa Kỳ).

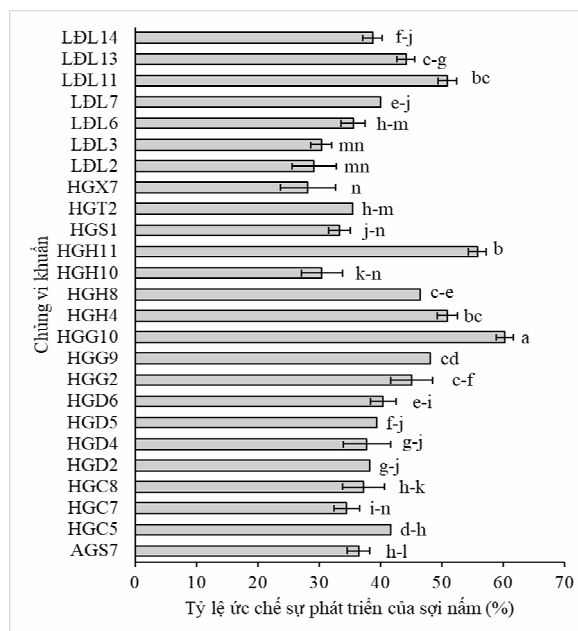
#### 2.2.8. Phân tích dữ liệu

Dữ liệu thu thập được trong các thí nghiệm được xử lý bằng chương trình Microsoft Excel 2016. Mặt khác, dữ liệu thu thập được phân tích thống kê bằng chương trình Minitab 16 với phương pháp phân tích phương sai ANOVA một chiều kiểm định Tukey ở mức ý nghĩa 95%.

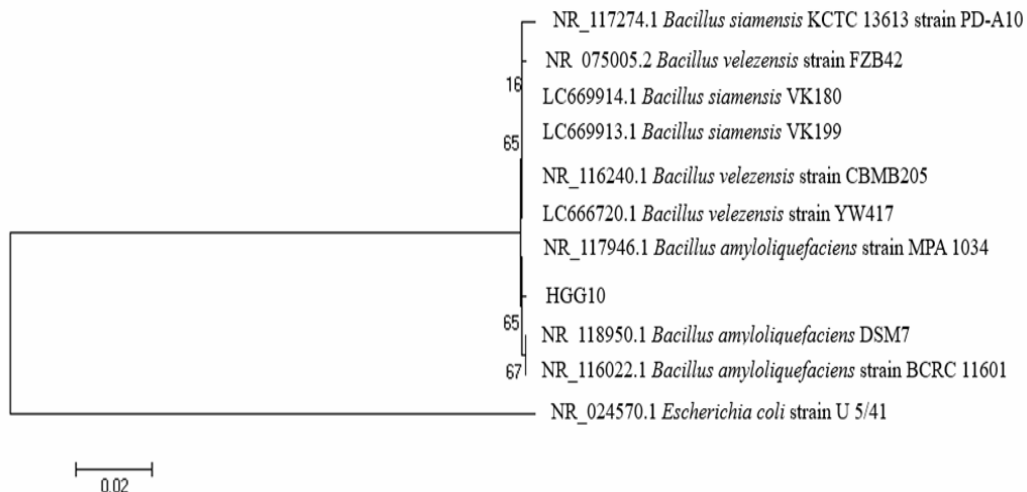
### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng

Chín mươi hai chủng vi khuẩn đã được phân lập từ 10 mẫu đất rễ cây chuối. Trong đó, 25 chủng cho thấy, khả năng ức chế sự lan rộng của sợi nấm chủng FG2. Tỷ lệ ức chế sự phát triển của sợi nấm dao động từ 28,2 - 60,3% (Hình 1), với chủng HGG10 cho thấy, tỷ lệ ức chế tăng trưởng cao nhất ở mức 60,3% ( $p < 0,05$ ). Kết quả trên cho thấy, tiềm năng của vi khuẩn vùng rễ trong ức chế nấm *Fusarium sambucinum* FG2 gây thối cuống chuối trong quá trình bảo quản sau thu hoạch



Hình 1. Tỷ lệ ức chế sự phát triển của sợi nấm nấm *Fusarium sambucinum* FG2 của các chủng vi khuẩn đối kháng



**Hình 2. Cây phát sinh loài của chủng vi khuẩn HGG10 với các loài có độ tương đồng cao dựa trên phân tích neighbor-joining của trình tự một phần vùng gen 16S rRNA**

Bên cạnh đó, kết quả trình tự một phần của vùng gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn HGG10 có mức độ tương đồng cao (> 99%) với các loài *Bacillus siamensis*, *Bacillus velezensis* và *Bacillus amyloliquefaciens*. Kết quả xây dựng cây phát sinh loài chỉ ra chủng HGG10 cùng nhóm với loài *Bacillus amyloliquefaciens* (Hình 2). Trong phòng trị bệnh trên chuối, *Bacillus* được báo cáo là một chi vi khuẩn tiềm năng trong phòng trừ nhiều bệnh hại trong quá trình canh tác và sau thu hoạch. Alvindia và cs (2009) [23] đã báo cáo, *Bacillus amyloliquefaciens* phân lập từ bề mặt quả chuối có khả năng đối kháng với nhiều loài nấm gây hại chuối và chuối được xử lý vi khuẩn có tỷ lệ thối cuống giảm xuống đáng kể. Ngoài ra, nhiều chủng vi khuẩn *Bacillus* từ vùng rễ chuối như: *Bacillus licheniformis* CSR - D4 [24], *Bacillus subtilis* KY - 21 [25], *Bacillus amyloliquefaciens* CCIBP - A5 [11] cũng được ghi nhận về khả năng ức chế *Fusarium* gây hại trên chuối.

*Bacillus amyloliquefaciens* HGG10 cho thấy khả năng ức chế cao nhất với nấm *Fusarium sambucinum* FG2 gây thối cuống chuối. Việc xác định cơ chế đối kháng của các chủng vi khuẩn HGG10 là cần thiết, nhằm tạo cơ sở cho nghiên cứu biện pháp sử dụng hiệu quả các chủng vi khuẩn đối kháng trong phòng trừ bệnh thối cuống trên chuối. Một số cơ chế đối kháng của *Bacillus* với *Fusarium* đã được ghi nhận như: Phân hủy thành tế bào nấm, ức chế sự hình thành bào tử, tổng hợp nhiều chất chuyển hóa kháng nấm (Iturin, fengycin, surfactin và bacillomycin) và tăng cường hoạt động của các enzyme phòng vệ ( $\beta$ -

1,3-glucanase, peroxidase, chitinase, polyphenol oxidase và phenyl-alanine ammonium lyase) ở thực vật [11 - 25].

### 3.2. Kết quả khảo sát các đặc tính của chủng vi khuẩn HGG10 trong điều kiện *in vitro*

Chủng vi khuẩn HGG10 cho thấy, khả năng sản sinh  $\beta$ -1,3-glucanase (0,115 U/mL), chitinase (2,39 U/mL), protease (0,09 U/mL) và siderophore (68,1%). Chủng vi khuẩn HGG10 có khả năng sản sinh  $\beta$ -1,3-glucanase và chitinase mạnh, có thể thấy tác động ức chế nấm bệnh chịu ảnh hưởng mạnh bởi hai enzyme này. Glucan, chitin và protein là những thành phần quan trọng trong cấu trúc của thành tế bào nấm, cũng như các hoạt động sống của chúng [26 - 27]. Khả năng sản xuất enzyme thủy phân của chủng HGG10 có thể phá hủy sợi nấm và ức chế sự nảy mầm của bào tử nấm. Tương tự, khả năng sản sinh enzyme thủy phân của vi khuẩn đối kháng với *Fusarium* cũng được báo cáo trong một số nghiên cứu trước đây. Chitinase và glucanase trong CFS thu được từ chủng *Serratia marcescens* ITBB B5-1 góp phần vào khả năng ức chế bệnh héo rũ do nấm *Fusarium* ở chuối [28]. Li và cs (2009) [29] đã báo cáo rằng, một loại protease được sản xuất từ *Bacillus subtilis* B29 thể hiện hoạt tính ức chế sự phát triển của sợi nấm và bào tử của nấm *Fusarium oxysporum*.

Bên cạnh đó, chủng vi khuẩn HGG10 cũng thể hiện khả năng sản sinh siderophore, một cơ chế hỗ trợ vi khuẩn cạnh tranh sắt với mầm bệnh. Khả năng sản sinh siderophore của chủng vi khuẩn HGG10 có thể làm giảm lượng sắt tại vị trí xâm nhiễm, từ đó giảm khả năng phát triển của nấm bệnh. *Bacillus*

*siamensis* Gxun-6 được xác định có khả năng sản xuất siderophore và có khả năng ức chế nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 với tỷ lệ ức chế là 68,8% [30]. Siderophore của vi khuẩn có ái lực cao với sắt, vì vậy vi khuẩn sản xuất siderophore có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của mầm bệnh [31].

Các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi và dịch nổi vô bào thu nhận từ chủng vi khuẩn HGG10 cho thấy hiệu quả ức chế đối với cả sợi nấm và bào tử của nấm *Fusarium sambucinum* FG2. Phần trăm ức chế sự phát triển sợi nấm của VOC và CFS từ chủng vi khuẩn HGG30 được ghi nhận lần lượt là 46,9% và 38,5%. Phần trăm ức chế sự nảy mầm của bào tử của VOC và CFS từ chủng vi khuẩn HGG10 được ghi nhận lần lượt là 69,2% và 64,1%. So sánh với đối chứng, VOC và CFS từ chủng vi khuẩn HGG10 có tác dụng ức chế sự lan rộng của khuẩn lạc nấm, sợi nấm khí sinh kém phát triển, khả năng sản sinh sắc tố bị hạn chế. Từ các kết quả trên cho thấy, khả năng tác động đa chiều của các hợp chất chuyển hoá của chủng HGG10 giúp đưa đến hoạt tính ức chế nấm bệnh. Hiệu quả ức chế nấm *Fusarium sambucinum* FG2 của VOC và CFS của các chủng vi khuẩn đối kháng cũng đã được báo cáo trong một số nghiên cứu trước đây. VOC thu được từ *Bacillus* sp. LPPC170 (axit acetic, axit propanoic, axit butanoic, axit valeric và axit isovaleric) cho thấy, khả năng ức chế mạnh sự phát triển của nấm *Fusarium kalimantanense* gây héo chuối [32]. Moussaid và cs (2025) [33] đã ghi nhận, CFS thu nhận từ các vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus siamensis* và *Bacillus subtilis* có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của nấm *F. oxysporum* và *Alternaria alternata*.

Bên cạnh đó, chủng vi khuẩn HGG10 cho thấy, sự hiện diện của các gen tham gia sinh tổng hợp lipopeptide là *fenD*, *bmyB*, *srfAA*. Kết quả trên giúp củng cố thêm về khả năng sản sinh các hợp chất kháng nấm mạnh như: Fengycin, bacillomycin và surfactin của chủng HGG10. Kết quả nghiên cứu của Yadav và cs (2021) [24] cho thấy, các lipopeptide như: Iturin, fengycin, surfactin và bacillomycin sản sinh bởi *Bacillus licheniformis* CSR-D4 được ghi nhận về khả năng ức chế sự phát triển của *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4 gây héo rũ trên chuối.

Từ các kết quả trên cho thấy, vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* là một tác nhân kiểm soát sinh học

tiềm năng trong phòng trừ *Fusarium sambucinum* FG2 gây thối cuống chuối. Khả năng ức chế nấm bệnh của cả tế bào sống và các hợp chất chuyển hoá từ chủng vi khuẩn HGG10 giúp nâng cao tiềm năng ứng dụng thực tiễn của chủng vi khuẩn này theo hướng thân thiện môi trường, hướng tới quản lý bệnh bền vững trong nông nghiệp.

#### **4. KẾT LUẬN**

Tổng số 25/92 chủng phân lập cho thấy hoạt tính kháng *Fusarium sambucinum* FG2 gây thối cuống chuối. Chủng vi khuẩn đối kháng mạnh *Bacillus amyloliquefaciens* HGG10 cho thấy, khả năng sản xuất  $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase, protease, siderophore và có các mang các gen tổng hợp lipopeptide. Các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi và dịch nổi vô bào từ chủng HGG10 có hoạt tính ức chế nấm *Fusarium sambucinum* FG2 cao. Chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* HGG10 là đề xuất tiềm năng cho sản xuất chế phẩm phòng trừ bệnh thối cuống chuối.

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Ploetz R. C. (2015). *Fusarium* wilt of banana. *Phytopathology*, 105(12), 1512 - 1521.
2. Jalaluddin, N. S. M. & Othman, R. Y. (2022). Perceptions on the challenges of banana cultivation and bio-based technology use among Malaysian smallholder farmers. *Asian Journal of Agriculture and Development*, 19(2), 25 - 34.
3. Narayanan, K. L., Krishnan, R. S., Robinson, Y. H., Julie, E. G., Vimal, S., Saravanan, V. & Kaliappan, M. (2022). Banana plant disease classification using hybrid convolutional neural network. *Computational intelligence and neuroscience*, 9153699. <https://doi.org/10.1155/2022/9153699>.
4. Zoier, H. A. E. R., Zahaby, H. M. E., Ziedan, E. S. H. & Maswada, H. F. (2017). Etiology and ecology of fungi causing postharvest diseases of banana fruits in Egypt. *Plant archives*, 17(2), 1463 - 1468.
5. Kamel, M. A. M., Cortesi, P. & Saracchi, M. (2016). Etiological agents of crown rot of organic bananas in Dominican Republic. *Postharvest biology and technology*, 120, 112 - 120. doi:10.1016/j.postharvbio.2016.06.002
6. Waliullah, S., Fonsah, E. G., Brock, J., Li, Y. & Ali, M. E. (2022). First report of crown rot of banana caused by *Fusarium proliferatum* in Georgia, U.S.A. *Plant disease*, 106(5), 1526.



7. Silva, E. G., Silva, J. A., Barros, A. P. O., Santos, A. K. V., Michereff, S. J. & Correia, K. C. (2023). *Fusarium kalimantanense* causing crown rot on banana in Brazil. *Journal of Plant pathology*, 105, 1199. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01401-5>
9. Lassois, L., de Lapeyre de Bellaire, L. & Jijakli, M. H. (2008). Biological control of crown rot of bananas with *Pichia anomala* strain K and *Candida oleophila* strain O. *Biological control*, 45, 410 - 418. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.013>
10. Sangeetha, G., Thangavelu, R., Usha Rani, S., Muthukumar, A. & Udayakumar, R. (2010). Induction of systemic resistance by mixtures of antagonist bacteria for the management of crown rot complex on banana. *Acta physiologiae plantarum*, 32, 1177 - 1187. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0513-y>
11. Cruz-Martin, M., Leyva, L., Acosta-Suárez, M., Pichardo, T., Bermúdez-Caraballoso, I. & Alvarado-Capó, Y. (2021). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1. *Artículo científico*, 32(2), 466 - 478.
12. Shen, N., Li, S., Li, S., Zhang, H. & Jiang M. (2022). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus siamensis* Gxun-6, has an antifungal activity against *Fusarium oxysporum* and promotes the growth of banana. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(34), 5047.
13. Xue, C., Penton, C. R., Shen, Z., Zhang, R., Huang, Q., Li, R., Ruan, Y. & Shen, Q. (2015). Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. *Scientific reports*, 5, 11124.
14. Fan, H., He, P., Xu, S., Li, S., Wang, Y., Zhang, W., Li, X., Shang, H., Zeng, L. & Zheng, S. J. (2023). Banana disease-suppressive soil drives *Bacillus* assembled to defense *Fusarium* wilt of banana. *Frontiers in microbiology*, 14, 1211301.
15. Liu, S., Yang, W., Yang, X., Gong, R., Xiang, D. & Li, C. (2024). Integrated control of *Fusarium* wilt in banana by *Bacillus velezensis* EB1 and potassium sorbate. *BMC microbiology*, 24(1), 457. <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03549-1>
16. Han, J. H., Shim, H., Shin, J. H. & Kim, K. S. (2015). Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. *The plant pathology Journal*, 31(2), 165 - 175.
17. Chen, W. P. & Kuo, T. T. (1993). A simple and rapid method for the preparation of Gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic acids research*, 21(9), 2260. <https://doi.org/10.1093/nar/21.9.2260>
18. Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. (Eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (pp. 115 - 175). New York: Wiley.
19. Schwyn, B. & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47 - 56.
20. Senthilkumar, M., Amaresan, N. & Sankaranarayanan, A. (2020). *Plant-microbe interactions: Laboratory techniques*. New York: Humana New York.
21. Zhang, D., Yu, S., Yang, Y., Zhang, J., Zhao, D., Pan, Y., Fan, S., Yang, Z. & Zhu, J. (2020). Antifungal effects of volatiles produced by *Bacillus subtilis* against *Alternaria solani* in potato. *Frontiers in microbiology*, 11, 1196. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01196>.
22. Mora, I., Cabrefiga, J. & Montesinos, E. (2011). Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *International microbiology: The official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 14(4), 213 - 223. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.151>.
23. Alvindia, D. G. & Natsuaki, K. T. (2009). Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. *Crop protection*, 28(3), 236 - 242. [doi:10.1016/j.cropro.2008.10.011](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.10.011).
24. Yadav, K., Damodaran, T., Dutt, K., Singh, A., Muthukumar, M., Rajan, S., Gopal, R. & Sharma, P. C. (2021). Effective biocontrol of banana *Fusarium* wilt tropical race 4 by a *Bacillus* rhizobacteria strain with antagonistic secondary metabolites. *Rhizosphere*, 18, 100341.
25. Sun, J. B., Peng, M., Wang, Y. G., Zhao, P. J. & Xia, Q. Y. (2019). Isolation and characterization of antagonistic bacteria against *Fusarium* wilt and induction of defense related enzymes in banana. *Advanced Journal of Microbiology Research*, 13(1), 1 - 7.

26. Yamagishi, D., Otani, H. & Kodama, M. (2006). G protein signaling mediates developmental processes and pathogenesis of *Alternaria alternata*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 19(11), 1280 - 1288.
27. Latgé, J. P. (2007). The cell wall: A carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular microbiology*, 66(2), 279 - 290.
28. Tan, D., Fu, L., Han, B., Sun, X., Zheng, P. & Zhang, J. (2015). Identification of an endophytic antifungal bacterial strain isolated from the rubber tree and its application in the biological control of banana *Fusarium* wilt. *PLoS ONE*, 10(7), e0131974.
29. Li, J., Yang, Q., Zhao, L. H., Zhang, S. M., Wang, Y. X. & Zhao, X. Y. (2009). Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 10(4), 264 - 272.
30. Shen, N., Li, S., Li, S., Zhang, H. & Jiang M. (2022). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus siamensis* Gxun-6, has an antifungal activity against *Fusarium oxysporum* and promotes the growth of banana. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32, 34, <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00533-7>.
31. Sharma, A. & Johria, B. N. (2003). Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiological Research*, 158(3), 243 - 248.
32. Santos, J. E. Á., de Brito, M. V., Pimenta, A. T. Á., da Silva, G. S., Zocolo, G. J., Muniz, C. R., de Medeiros, S. C., Grangeiro, T. B., Lima, M. A. S. & da Silva, C. F. B. (2022). Antagonism of volatile organic compounds of the *Bacillus* sp. against *Fusarium kalimantanense*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 39(2), 60, <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03509-9>.
33. Moussaid, F. Z., Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N. & Housseini, A. I. (2025). Isolation, characterization and antifungal activity of *Bacillus* antagonistic bacteria from decomposing solid organic waste against *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*. *Journal of Natural pesticide research*, 12, 100124. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2025.100124>.

# ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *Bacillus amyloliquefaciens* HGG10 ISOLATED FROM BANANA RHIZOSPHERE AGAINST *Fusarium sambucinum* FG2 CAUSING CROWN ROT IN BANANA

Nguyen Thi Lien<sup>1</sup>, Pham Thi Phuoc Nhi<sup>1</sup>, Nguyen Lam Minh<sup>1</sup>, Nguyen Tang Phu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University*

## Abstract

Crown rot of banana caused by *Fusarium* species is among the most prevalent postharvest diseases, leading to significant losses in both yield and fruit quality. This study aimed to evaluate the *in vitro* antifungal activity of bacteria isolated from the banana rhizosphere against *Fusarium sambucinum* FG2, the pathogen responsible for banana crown rot. Out of 92 bacterial isolates, 25 exhibited antagonistic activity against *Fusarium sambucinum* FG2 in dual culture assays, with inhibition rates ranging from 28.2% to 60.3%. The most effective strain, designated HGG10, was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. Strain HGG10 was capable of producing fungal cell wall-degrading enzymes ( $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase and protease) and siderophores involved in iron competition. Genetic analysis revealed the presence of biosynthetic genes for antifungal lipopeptides including bacillomycin, fengycin and surfactin. Both volatile organic compounds (VOCs) and cell-free culture supernatants from strain HGG10 showed strong inhibitory effects on *Fusarium sambucinum* FG2. These results suggest that *Bacillus amyloliquefaciens* HGG10 is a promising biocontrol agent for the prevention and management of banana crown rot.

**Keywords:** *Antifungal activity, banana, crown rot, rhizobacteria.*

**Ngày nhận bài:** 13/5/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 15/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 24/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 23/6/2025

# TUYỂN CHỌN CÁC VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG KIỂM SOÁT VI KHUẨN *Ralstonia solanacearum* GÂY BỆNH HÉO XANH TRÊN CÂY CÀ CHUA

Võ Thị Ngọc Hà <sup>1,\*</sup>, Huỳnh Thanh Hùng <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh

\* Email: ha.vothingoc@hcmuaf.edu.vn

## TÓM TẮT

*Bacillus* và *Pseudomonas* là các vi khuẩn tiềm năng ứng dụng trong quản lý các loại dịch hại cây trồng nói chung và bệnh héo xanh do vi khuẩn nói riêng. Trong nghiên cứu này, các vi khuẩn *Bacillus* spp. và *Pseudomonas* spp. được phân lập từ vùng đất canh tác cà chua tại tỉnh Lâm Đồng, sau đó được khảo sát khả năng đối kháng với *R. solanacearum* CXT3 thông qua phương pháp khuếch tán giếng thạch. Các vi khuẩn tiềm năng được đánh giá khả năng phòng và trừ bệnh héo xanh trên hạt trong điều kiện *in vitro*, nhà lưới và đồng ruộng. Các vi khuẩn được khảo sát đều có khả năng đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3, trong đó *Pseudomonas* spp. ĐHT1, ĐXT1; *Bacillus* spp. ĐXT6, CC-LĐ2.2, có khả năng đối kháng mạnh, với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là 16,7; 16,6; 14,7; 13,6 mm. Hiệu lực kiểm soát bệnh héo xanh trong điều kiện *in vitro* của 4 vi khuẩn *Pseudomonas* spp. ĐHT1, ĐXT1; *Bacillus* spp. ĐXT6, CC-LĐ2.2 đạt từ 69,2 - 95,7% ở thí nghiệm phòng bệnh và từ 61,6 - 92,4% ở thí nghiệm trừ bệnh. Dựa trên trình tự vùng gen 16S-rRNA, ĐXT1 được xác định là *Pseudomonas fluorescens* và ĐXT6 là *Bacillus amylolyquefaciens*. Hai vi khuẩn *B. amylolyquefaciens* ĐXT6 và *P. fluorescens* ĐXT1 giảm tỷ lệ bệnh, chỉ số bệnh, cho hiệu lực ở thời điểm 28 ngày sau trồng trong điều kiện nhà lưới 76,7% và 65,3%, tăng chiều cao cây, chiều dài rễ, khối lượng tươi và khối lượng khô của cây. Trong điều kiện đồng ruộng, chế phẩm NLHX lượng 3 kg/ha cho hiệu lực đạt 70,9%, chứng minh tiềm năng của chế phẩm vi sinh từ các vi khuẩn *B. amylolyquefaciens* ĐXT6 và *P. fluorescens* ĐXT1 trong kiểm soát bệnh héo xanh cà chua.

**Từ khóa:** Bệnh héo xanh, *Ralstonia solanacearum*, vi khuẩn đối kháng, kiểm soát sinh học.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh héo xanh trên cây trồng nói chung và cây cà chua nói riêng do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*) gây ra là một trong những bệnh hại nguy hiểm và gây thiệt hại lớn nhất cho sản xuất cà chua tại Việt Nam, đặc biệt ở các vùng có khí hậu nhiệt đới nóng ẩm [1]. Các giải pháp phòng trừ hiện nay vẫn chủ yếu tập trung vào các loại thuốc hóa học giúp hạn chế lây lan khi phát hiện bệnh sớm. Tuy nhiên, trong bối cảnh hướng tới sản xuất nông nghiệp an toàn bền vững, việc sử dụng các thuốc bảo vệ thực vật hóa học cần được hạn chế, các vi khuẩn đối kháng đã và đang thể hiện tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát bệnh hại cây trồng [2 - 4].

*Bacillus* và *Pseudomonas* là các tác nhân sinh học tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát bệnh héo xanh. *B. subtilis* R31 ức chế trực tiếp vi khuẩn *R. solanacearum*, làm giảm 67% mật độ *R. solanacearum* trong mô thân sau 14 ngày xử lý, đồng thời còn điều hòa axit salicylic, axit jasmonic và ethylene, cũng như

hoạt động của các enzyme chủ chốt trong cơ chế phòng thủ thực vật như peroxidase và phenylalanine ammonia-lyase [2]. *B. velezensis* A1 thể hiện khả năng kích thích sinh trưởng thực vật, làm giảm tỷ lệ bệnh đến 40% so với đối chứng [5]. *P. fluorescens* CHA0 ức chế *R. solanacearum* qua khả năng tiết các enzyme ngoại bào như chitinase và  $\beta$ -1,3-glucanase [3], *P. fluorescens* VSMKU3054 cũng thể hiện khả năng ức chế cao vi khuẩn *R. solanacearum* trong điều kiện *in vitro* và nhà lưới [6].

Tại Việt Nam, một số chủng *Pseudomonas* spp. tiềm năng có khả năng ức chế mạnh vi khuẩn *R. solanacearum* trong điều kiện phòng thí nghiệm đã được phân lập [7], các chủng vi khuẩn *B. subtilis* CX5 và *P. fluorescens* PX1 có khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum*, hiệu lực phòng trừ đạt 66,64% và 71,31% đối với bệnh héo xanh cây vừng, đạt 74,41% và 61,3% đối với bệnh héo xanh cây lạc [8]. Từ các chủng vi khuẩn *B. subtilis* ĐKB1 có khả năng sinh IAA, phân giải kitin, sinh siderophore và *P.*

*fluorescens* ĐKP1 có khả năng sinh siderophore, đã sản xuất được chế phẩm HX có khả năng hạn chế 89,82% bệnh héo xanh cây ớt [9] và 89,39% bệnh héo xanh cây lạc [4] trong điều kiện đồng ruộng, song đến nay, sản phẩm HX chưa được tiếp tục phát triển.

Hiện nay, có hai chế phẩm vi sinh có thành phần là *Bacillus subtilis* kiểm soát bệnh héo xanh vi khuẩn có nguồn gốc ngoại nhập và một chế phẩm có thành phần là *Pseudomonas fluorescens* [10]. Song, vi khuẩn trong chế phẩm nhập khẩu thường gặp khó khăn trong việc thích nghi với điều kiện sinh thái, khí hậu, thổ nhưỡng và hệ vi sinh bản địa tại Việt Nam, làm giảm hiệu quả sinh học của chế phẩm [11]. Đồng thời, chế phẩm ở dạng đơn vi khuẩn cũng cho hiệu quả kiểm soát bệnh thấp do phổ tác động với tác nhân gây bệnh thường hạn chế [12]. Bên cạnh đó, các nghiên cứu về khả năng kiểm soát bệnh héo xanh từ giai đoạn hạt của các chế phẩm vi sinh còn hạn chế. Do vậy, việc tìm kiếm các chủng vi khuẩn đối kháng tiềm năng từ khu vực canh tác để kiểm soát vi khuẩn gây bệnh héo xanh với định hướng phát triển thành chế phẩm vi sinh phục vụ sản xuất cà chua nói riêng và cây trồng nói chung là cần thiết.

## **2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu nghiên cứu**

Các thiết bị gồm: Nồi hấp khử trùng (MC40L, ALP, Nhật Bản), tủ cấy khử trùng (IIAC2 - 4E8, Esco, Singapore), cân điện tử (PX224, Ohaus, Mỹ), bếp điện, máy lắc (SSL1, Stuart, Anh), kính hiển vi (CX23, Olympus, Nhật Bản), máy lắc Vortex - ZX3 (Velp, Ý), máy Nanovue Plus (Anh).

Môi trường sử dụng: Môi trường KBA (King'B Agar) thành phần cho 1L gồm: Peptone 20 g, glycerol 10 g,  $K_2HPO_4$  1,5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1,5 g, agar 15 g, nước cất 1.000 mL. Môi trường LB (thành phần 1L gồm: Nước cất 1.000 mL, peptone 10 g, NaCl 10 g, cao nấm men 5 g, pH 7,0, agar 20 g). Bộ kit QIAamp DNA-Micro kit, cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'); 1492R (5'-ACGGCTACCTGTTACGACTT-3'); DreamTaq Red PCR MasterMix (Thermo Scientific Inc., Mỹ) và nước tinh khiết.

Vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3 được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Bệnh cây, Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh. Hạt giống cà chua F1 PN - 209, giống cà chua Rita của cơ sở giống Phú Nông.

### **2.2. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3 trong điều kiện phòng thí nghiệm**

Thu thập các mẫu đất từ các vùng canh tác cà chua có ghi nhận xuất hiện bệnh héo xanh gây hại trước đó tại tỉnh Lâm Đồng và phân lập vi khuẩn đối kháng theo phương pháp của Lê Thị Thanh Thủy (2014) [9]. Chọn lọc vi khuẩn thuộc hai chi *Bacillus* và *Pseudomonas* thông qua các đặc điểm sinh hóa gồm: Phản ứng nhuộm Gram, nhuộm nội bào tử, enzyme oxidase, enzyme catalase, phản ứng thủy phân tinh bột, nuôi cấy trong môi trường yếm khí và quan sát khả năng phát huỳnh quang dưới tia UV [13].

Vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3 và các vi khuẩn đối kháng được nuôi lắc 240 vòng/phút trên môi trường LB lỏng trong 48 giờ, ở nhiệt độ  $28 \pm 2^\circ C$  và đưa mật độ vi khuẩn về  $10^6$  CFU/mL. Sau đó tiến hành thí nghiệm theo phương pháp khuếch tán giếng thạch [14] trên môi trường KBA. Xác định kích thước vòng đối kháng (KTVĐK) =  $D - d$  [15]. Trong đó: D là KTVĐK (mm), d là đường kính lỗ giếng (mm). Tính đối kháng được biểu hiện khi kích thước vòng đối kháng lớn hơn 2 mm. KTVĐK < 5 mm: Tính kháng yếu, KTVĐK từ 5 - 10 mm: Tính kháng trung bình, KTVĐK > 10 mm: Tính kháng mạnh [15].

### **2.3. Đánh giá khả năng phòng trừ của một số vi khuẩn đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3 trên hạt trong điều kiện phòng thí nghiệm**

Các thí nghiệm phòng và trừ bệnh do vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3 gây ra trên cà chua được thực hiện theo phương pháp mô tả của Sun và cs (2023) [2] có cải tiến. Hạt giống F1 PN - 209 được ngâm trong cồn 70° trong 30 giây sau đó rửa hạt lại bằng nước cất. Ủ hạt trên giấy thấm vô trùng được làm ẩm trong đĩa petri đến khi hạt nảy mầm. Với thí nghiệm phòng bệnh, hạt đã nảy mầm được ngâm vào huyền phù tảo vi khuẩn đối kháng *Pseudomonas* spp. ĐXT1, ĐHT1 và *Bacillus* spp. ĐXT6, CC-LĐ2.2 trong 30 phút, sau đó được để khô tự nhiên trên giấy thấm vô trùng và ngâm vào huyền phù vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3 trong 30 phút. Hạt sau đó được làm khô trên giấy thấm vô trùng và cấy hạt trên môi trường WA (mỗi đĩa 10 hạt) trên một đường thẳng, đặt đĩa ở nhiệt độ phòng.

Với thí nghiệm trừ bệnh: Hạt đã nảy mầm được ngâm vào huyền phù vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3

30 phút, đợi khô tự nhiên trên giấy thấm vô trùng và sau đó được ngâm trong huyền phù các vi khuẩn đối kháng. Mỗi thí nghiệm gồm 5 nghiệm thức, tương ứng với ngâm lần lượt 4 vi khuẩn trước và sau khi ngâm vi khuẩn gây bệnh và 1 nghiệm thức đối chứng chỉ ngâm vi khuẩn gây bệnh. Mỗi nghiệm thức là 3 lần lặp lại (L L L), mỗi L L L của một nghiệm thức là 1 đĩa petri gồm 10 hạt. Ngoài ra, bố trí thêm 1 nghiệm thức xử lý nước cất và 4 nghiệm thức chỉ ngâm các vi khuẩn đối kháng để xác định độc tính của các vi khuẩn đối kháng đối với cây cà chua.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ bệnh (%) tính theo công thức (1) = (số cây bệnh × 100) / tổng số cây lây nhiễm của nghiệm thức. Hiệu lực (%) được tính theo công thức: (2) HL (%) = [(C - T) / C] × 100, trong đó: C là tỷ lệ bệnh ở nghiệm thức chỉ lây nhiễm bệnh T là tỷ lệ bệnh ở nghiệm thức thí nghiệm.

#### 2.4. Đánh giá khả năng kiểm soát bệnh héo xanh của một số vi khuẩn đối kháng trong điều kiện nhà lưới

Các thí nghiệm nhà lưới được bố trí trong nhà lưới JICA 1.000 m<sup>2</sup> tại Trại thực nghiệm, Khoa Nông học, Trường Đại học Nông lâm thành phố Hồ Chí Minh, với điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày, ẩm độ 75 - 80%, nhiệt độ 28 - 32°C. Giá thể trồng cây gồm: Đất, xơ dừa và phân bò được trộn theo tỷ lệ 2: 1: 1 và được hấp khử trùng ướt hai lần ở nhiệt độ 121°C, 20 phút và cho vào các chậu nhựa: Đường kính mặt × đường kính đáy × chiều cao = 15 × 12 × 12 cm. Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3 và các vi khuẩn đối kháng *Pseudomonas* spp. ĐXT1, ĐHT1; *Bacillus* spp. ĐXT6, CC-LĐ2.2 trong môi trường LB lỏng đạt mật độ 10<sup>7</sup> CFU/mL.

Hạt giống cà chua được xử lý theo thí nghiệm phòng bệnh ở mục 2.3 và gieo vào các chậu có giá thể đã được chuẩn bị ở trên. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên đơn yếu tố, với 10 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại (L L L), một L L L của 1 nghiệm thức là 10 chậu, mỗi chậu 5 cây cà chua. Tiến hành lấy chỉ tiêu khi bệnh bắt đầu xuất hiện ở nghiệm thức 5 - chỉ xử lý vi khuẩn gây bệnh *R. solanacearum* CXT3. Tính tỷ lệ bệnh theo công thức (1), hiệu lực theo công thức (2).

Chỉ số tích lũy bệnh theo thời gian (AUDPC):  

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} [(V_{i+1} + V_i) / 2] \times (t_{i+1} - t_i)$$

Trong đó: i là lần theo dõi bệnh thứ i; n là tổng số lần theo dõi bệnh; Y là tỷ lệ bệnh (%); t là số ngày đánh giá bệnh.

Chỉ số bệnh (%) = (4n<sub>4</sub> + 3n<sub>3</sub> + 2n<sub>2</sub> + n<sub>1</sub>) / 4N. Trong đó: N là tổng số cây trong nghiệm thức; n<sub>4</sub> là số cây bị nhiễm bệnh cấp 4; n<sub>3</sub> là số cây bị nhiễm bệnh cấp 3; n<sub>2</sub> là số cây bị nhiễm bệnh cấp 2; n<sub>1</sub> là số cây bị nhiễm bệnh cấp 1. Cấp bệnh được đánh giá theo thang đánh giá như sau: Cấp 1 - có 1 lá héo rũ; cấp 2 - có 2 - 3 lá héo rũ; cấp 3 - có 4 lá trở lên héo rũ; cấp 4 - cây chết.

Đồng thời, ghi nhận các chỉ tiêu sinh trưởng gồm: Chiều dài thân (mm) đo từ gốc đến ngọn; chiều dài rễ (mm) đo từ gốc đến đỉnh rễ của rễ cọc; khối lượng tươi (mg), cân khối lượng tất cả 10 cây; khối lượng khô (mg), cân khối lượng khô của cây sau khi sấy, cho đến khi đạt khối lượng không đổi.

#### 2.5. Định danh các chủng vi khuẩn đối kháng tiềm năng bằng trình tự 16S-rRNA

Hai chủng vi khuẩn *Pseudomonas* spp. ĐXT1 và *Bacillus* spp. ĐXT6 được nuôi trên môi trường dinh dưỡng LB lỏng trong 48 giờ ở 28°C và chiết xuất ADN bằng bộ kit QIAamp AND Micro kit. Sau đó, thực hiện phản ứng PCR khuếch đại với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'); 1492R (5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3') [16] tương ứng của vùng gen 16S-rRNA. Sản phẩm PCR sau đó được gửi đi giải trình tự tại Công ty TNHH GenLab. Các trình tự được phân tích bằng phần mềm Bioedit và kiểm tra mức độ tương đồng của các dòng vi khuẩn này với các chủng đã được công bố trên cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST. Tiếp theo điều chỉnh thủ công sử dụng thông qua chương trình căn chỉnh ClustalW. Các trình tự đã được phân tích được dùng để xây dựng cây phát sinh loài với hệ số bootstrap 1.000 theo phương pháp khoảng cách sử dụng phép nối lân cận (Neighbor-Joining) trong phần mềm MEGA 11 [17] và định danh đến loài.

#### 2.6. Đánh giá hiệu quả kiểm soát bệnh héo xanh trên cây cà chua của các vi khuẩn đối kháng trong điều kiện đồng ruộng.

Vi khuẩn *P. fluorescens* ĐXT1 được nhân sinh khối trong môi trường gồm: Cám bắp 80%, cám gạo 20%, MgSO<sub>4</sub> 5 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 g/L, pH - 7, nhiệt độ 30°C, thời gian 60 giờ đạt mật số ≥ 10<sup>9</sup> CFU/mL. Vi khuẩn *B. amilolyquefaciens* ĐXT6 được nhân sinh khối trong môi trường gồm cám bắp: 70% và cám gạo 30%, NaCl 5 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 g/L, pH - 7, nhiệt độ



30°C, thời gian 48 giờ đạt mật số  $\geq 10^9$  CFU/mL. Sinh khối các vi khuẩn sau khi ủ xong được sấy ở nhiệt độ 35 - 40°C đưa độ ẩm về 15 - 20% và nghiền thành bột, rồi phối trộn với chất mang (humic 20%, bột talc 10%, bột cao lanh 10%, bột  $\text{CaCO}_3$  10%) theo tỷ lệ 25% ĐXT1: 25% ĐXT6: 50% chất mang thu được chế phẩm NLHX đảm bảo đạt mật số  $\geq 10^8$  CFU/g.

Thí nghiệm đồng ruộng được thực hiện dựa trên TCCS 456:2016/BVTV [18]. Bố trí thí nghiệm diện hẹp theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên đơn yếu tố gồm 4 nghiệm thức là hai mức nồng độ của chế phẩm NLHX (2,5 kg/ha và 3 kg/ha), một nghiệm thức sử dụng Biobac 500 WP liều dùng 2 kg/ha và đối chứng sử dụng nước lã. Mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại của một nghiệm thức là một ô cơ sở 30 m<sup>2</sup>, khoảng cách giữa các ô thí nghiệm là 1 hàng cà chua. Chế phẩm NLHX pha với nước và tưới ướt đều toàn bộ cây cà chua, với lượng nước 600 lít/ha, tưới hai lần cách nhau 7 ngày, lần đầu khi tỷ lệ bệnh đạt 5,3 - 6,0%. Ghi nhận tỷ lệ cây bị bệnh (%) và tỷ lệ cây chết (%) trước mỗi lần tưới chế phẩm và 7, 14 ngày sau tưới chế phẩm lần 2. Mỗi ô chọn 5 điểm trên 2 đường chéo góc, mỗi điểm chọn 10 cây cố định, đếm số lượng cây bị bệnh và cây bị chết. Tính tỷ lệ bệnh theo công thức (1) và tỷ lệ cây bị chết (%) = (Số cây bị chết/Tổng số cây điều tra)  $\times$  100. Số cây bị bệnh bao

gồm số cây bị nhiễm bệnh và số cây bị chết. Số liệu được cộng dồn cho các lần điều tra sau.

Hiệu lực của thuốc được hiệu đính bằng công thức Henderson-Tilton: Hiệu lực (%) =  $(1 - \frac{Ta \times Cb/Tb \times Ca}{Cb/Tb \times Ca}) \times 100$  trong đó: Ta là tỷ lệ cây bị bệnh ở công thức xử lý sau xử lý; Tb là tỷ lệ cây bị bệnh ở công thức xử lý trước xử lý; Ca là tỷ lệ cây bị bệnh ở công thức đối chứng sau xử lý; Cb là tỷ lệ cây bị bệnh ở công thức đối chứng trước xử lý.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Tuyển chọn vi khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3

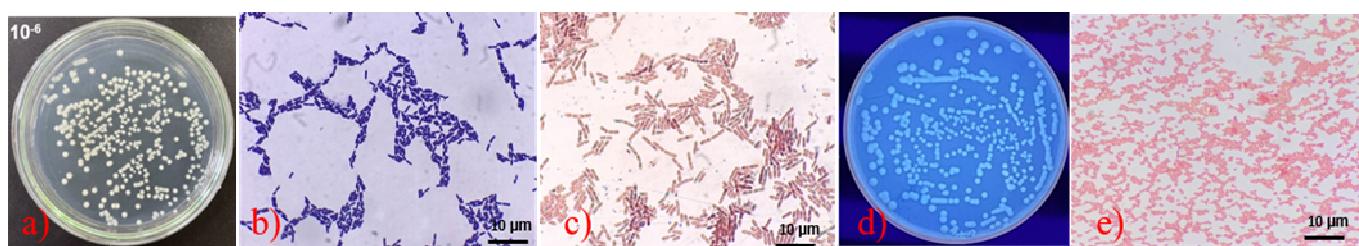
Từ các mẫu đất thu thập được, phân lập được tổng số 13 chủng vi khuẩn, trong đó có 4 chủng ĐXT6, ĐNH3, ĐKaĐ2, CC-LĐ2.2 là *Bacillus* spp. có đặc trưng là vi khuẩn Gram dương (Hình 1b), có nội bào tử (Hình 1c), phản ứng âm tính với oxidase, dương tính với catalase, có khả năng thủy phân tinh bột. Có 9 chủng ĐXT1, ĐHT1, ĐHT3, ĐHA1, ĐHA2, ĐHA3, ĐKaĐ1, ĐQL1, ĐQL2 là *Pseudomonas* spp. có đặc trưng là vi khuẩn Gram âm (Hình 1e), có khả năng phát huỳnh quang dưới tia UV (Hình 1d), phản ứng dương tính với oxidase và catalase, có thủy phân tinh bột. Cả 13 chủng vi khuẩn này đều có khả năng đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3 theo phương pháp khuếch tán giếng thạch.

**Bảng 1. Đường kính vòng vô khuẩn và khả năng đối kháng của các vi khuẩn với *R. solanacearum* CXT3 trong điều kiện phòng thí nghiệm**

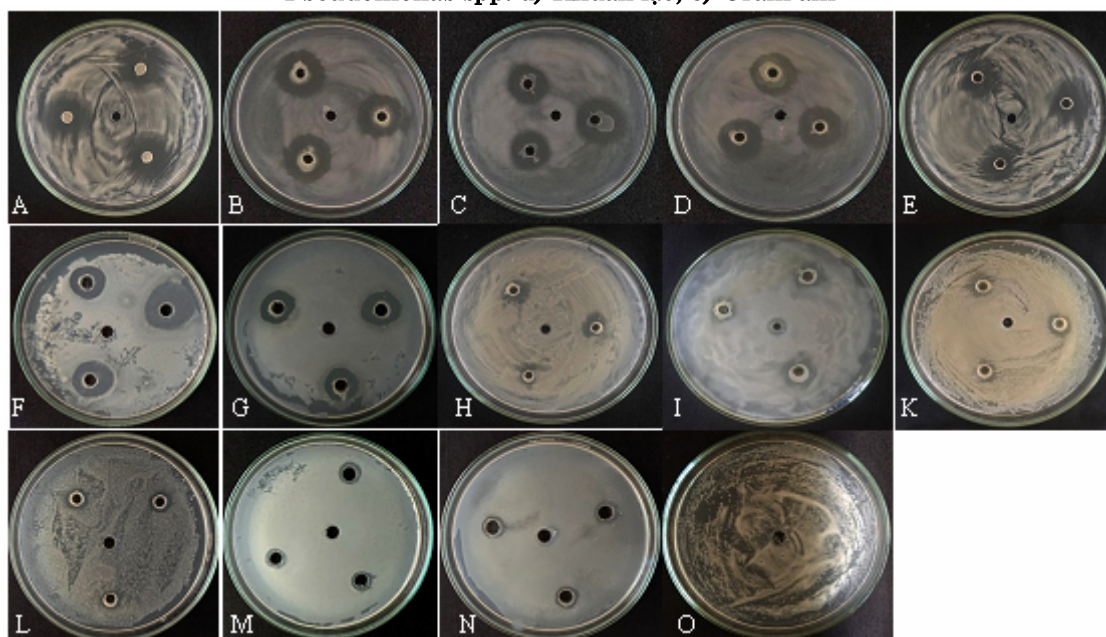
| Vi khuẩn | Đường kính vòng vô khuẩn, mm | Khả năng đối kháng |
|----------|------------------------------|--------------------|
| ĐHT1     | 16,7 a                       | Mạnh               |
| ĐXT1     | 16,6 a                       | Mạnh               |
| ĐXT6     | 14,7 a                       | Mạnh               |
| CC-LĐ2.2 | 13,6 a                       | Mạnh               |
| ĐNH3     | 12,7 b                       | Mạnh               |
| ĐHA3     | 12,5 b                       | Mạnh               |
| ĐKaĐ2    | 10,0 c                       | Mạnh               |
| ĐHT3     | 3,7 e                        | Yếu                |

|           |         |     |
|-----------|---------|-----|
| ĐHA2      | 3,7 d   | Yếu |
| ĐQL1      | 3,7 d   | Yếu |
| ĐHA1      | 3,5 d   | Yếu |
| ĐQL2      | 2,4 e   | Yếu |
| ĐKaĐ1     | 2,0 e   | Yếu |
| Đối chứng | 0,0 f   |     |
| CV(%)     | 3,6     |     |
| Giá trị P | < 0,001 |     |

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 ở mức  $\alpha = 0,01$ .



Hình 1. Một số đặc trưng hình thái của *Bacillus* spp. a) Khuẩn lạc; b) Gram dương; c) Nội bào tử và *Pseudomonas* spp. d) Khuẩn lạc; e) Gram âm



Hình 2. Khả năng đối kháng của các vi khuẩn với *R. solanacearum* CXT3

Ghi chú: A) ĐHT1, B) ĐXT1, C) ĐXT6, D) CC-LĐ2.2, E) ĐNH3, F) ĐHA3, G) ĐKaĐ2, H) ĐHT3, I) ĐHA2, K) ĐQL1, L) ĐHA1, M) ĐQL2, N) ĐKaĐ1, O) Đối chứng.

Các vi khuẩn *Pseudomonas* spp. ĐHT1, ĐXT1; *Bacillus* spp. ĐXT6, CC-LĐ2.2, ĐNH3, và *Pseudomonas* sp. ĐHA3, có khả năng đối kháng mạnh với vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3, với đường kính vòng kháng khuẩn trung bình lần lượt là 16,7; 16,6; 14,7; 13,6; 12,7; 12,5; 10 mm. Trong đó, các vi khuẩn *Pseudomonas* spp. ĐHT1, ĐXT1; *Bacillus* spp. ĐXT6, CC-LĐ2.2 có khả năng đối kháng cao hơn *Bacillus* sp. ĐNH3, và *Pseudomonas* sp. ĐHA3, khác biệt có ý nghĩa thống kê (Bảng 1, hình 2). Các vi khuẩn còn lại thể hiện khả năng đối kháng kém với vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3, với đường kính vòng vô khuẩn từ 2,0 - 3,7 mm (Bảng 1).

Kích thước vòng kháng khuẩn từ 10 - 18 mm cũng được ghi nhận ở các vi khuẩn có khả năng đối kháng mạnh trong kết quả nghiên cứu của Lê Vũ Khánh Trang và Lý Hải Triều (2020) [7], Lê Như Kiều và cs (2010) [8] và Lê Thị Thanh Thủy (2014) [9]. Kích thước vòng kháng khuẩn cao có thể là do khả năng sinh ra các enzyme ngoại bào như protease hoặc các lipopeptides ức chế trực tiếp hoạt động của vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3 [2]. Kích thước vòng kháng khuẩn cao là đặc trưng ban đầu cho thấy tiềm năng kiểm soát vi khuẩn gây bệnh của các vi khuẩn đối kháng, do vậy trong thí nghiệm tiếp theo sử dụng các vi khuẩn *Pseudomonas* spp. ĐHT1, ĐXT1; *Bacillus* spp. ĐXT6, CC-LĐ2.2 để đánh giá tiềm năng

kiểm soát *R. solanacearum* CXT3 trên hạt và trong điều kiện nhà lưới.

### 3.2. Khả năng kiểm soát bệnh héo xanh của các vi khuẩn đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3 gây bệnh trên hạt trong điều kiện phòng thí nghiệm

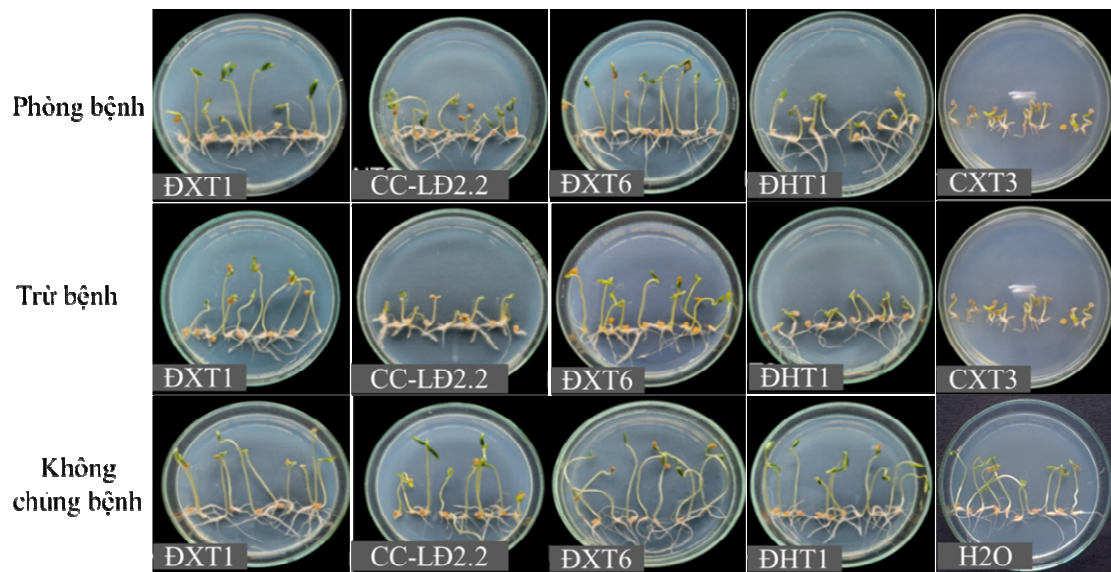
Ở nghiệm thức chỉ ngâm hạt với vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3, tỷ lệ bệnh ở thí nghiệm phòng bệnh và trừ bệnh đều đạt 86,7% (Bảng 2) ở thời điểm 7 ngày sau xử lý, điều này cho thấy, vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3 có độc lực tương đối cao. Ở các nghiệm thức chỉ ngâm hạt với nước hoặc vi khuẩn đối kháng không ghi nhận cây bị bệnh, điều này cho thấy, các vi khuẩn đối kháng không gây độc cho cây cà chua và không có sự lây nhiễm chéo trong quá trình thực hiện thí nghiệm (Bảng 2, hình 3).

Tỷ lệ bệnh ở các nghiệm thức ngâm vi khuẩn đối kháng trước hoặc sau khi ngâm vi khuẩn bệnh dao động từ 3,3 - 26,7% ở thí nghiệm phòng bệnh và 6,7 - 33,3% (Bảng 2) ở thí nghiệm trừ bệnh, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức chỉ chủng vi khuẩn gây bệnh. Trong đó, vi khuẩn *Bacillus* sp. ĐXT6 thể hiện khả năng kiểm soát *R. solanacearum* CXT3 cao hơn so với 3 vi khuẩn còn lại, khác biệt có ý nghĩa thống kê, tiếp sau đó là vi khuẩn *Pseudomonas* sp. ĐXT1.

**Bảng 2. Hiệu quả phòng bệnh của một số vi khuẩn đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3 trên hạt và tác động đến cây trong phòng thí nghiệm**

| Nghiệm thức | Thí nghiệm phòng bệnh |              | Thí nghiệm trừ bệnh |              |
|-------------|-----------------------|--------------|---------------------|--------------|
|             | Tỷ lệ bệnh (%)        | Hiệu lực (%) | Tỷ lệ bệnh (%)      | Hiệu lực (%) |
| ĐXT1        | 10,0 bcd              | 88,5 ab      | 16,7 c              | 80,8 b       |
| CC-LĐ2.2    | 23,3 bc               | 73,1 b       | 23,3 bc             | 73,7 b       |
| ĐXT6        | 3,3 cd                | 95,7 a       | 6,7 d               | 92,4 a       |
| ĐHT1        | 26,7 b                | 69,2 c       | 33,3 b              | 61,5 c       |
| CXT3        | 86,7 a                | -            | 86,7 a              | -            |
| CV (%)      | 42,9                  | 11,9         | 26,3                | 7,8          |
| Giá trị P   | < 0,001               | < 0,001      | < 0,001             | < 0,001      |

Ghi chú: Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các số có cùng kí tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức  $\alpha = 0,01$ .



**Hình 3. Cây con cà chua trên đĩa petri ở thí nghiệm phòng, trừ bệnh và không chủng bệnh**

Hiệu lực kiểm soát bệnh héo xanh do *R. solanacearum* CXT3 gây ra trên hạt của các vi khuẩn đối kháng đạt từ 69,2 - 95,7% ở thí nghiệm phòng bệnh và từ 61,6 - 92,4% ở thí nghiệm trừ bệnh (Bảng 2). Trong đó, nghiệm thức xử lý *Bacillus* sp. ĐXT6 có hiệu lực phòng và trừ lần lượt là 95,7% và 92,4%, khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức xử lý vi khuẩn *Pseudomonas* sp. ĐXT1 (88,5% và 80,8%) nhưng khác biệt rất có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 2).

Quan sát cây con cho thấy, hạt cà chua khi được ngâm với huyền phù các vi khuẩn *Pseudomonas* spp. ĐHT1, ĐXT1; *Bacillus* spp. ĐXT6, CC-LĐ2.2 đều phát triển tốt hơn so với chỉ ngâm nước (Hình 3), thể hiện ở chiều cao cây, chiều dài rễ. Hạt cà chua được ngâm với vi khuẩn đối kháng trước khi ngâm với vi khuẩn gây bệnh đã làm giảm tỷ lệ bệnh của cây cà chua con, giảm khả năng xâm nhập ban đầu của vi khuẩn gây bệnh vào cây con, do vậy tăng hiệu lực kiểm soát bệnh. Trong thực tế, các loại thuốc bảo vệ thực vật

phần lớn được khuyến cáo sử dụng trên cây con hoặc cây đã trưởng thành, tuy nhiên theo kết quả này, nếu cây con được xử lý với vi khuẩn đối kháng trước sẽ tăng khả năng chống chịu với sự xâm nhập và gây hại của tác nhân gây bệnh. Do vậy, trong thí nghiệm ở nhà lưới bố trí thí nghiệm phòng bệnh và các nghiệm thức chỉ xử lý vi khuẩn đối kháng nhằm đánh giá ảnh hưởng của các vi khuẩn đối kháng đến sinh trưởng và phát triển của cây cà chua.

### 3.3. Khảo sát khả năng kiểm soát bệnh héo xanh của các vi khuẩn đối kháng trong điều kiện nhà lưới

Trong điều kiện thí nghiệm nhà lưới, vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3 thể hiện độc tính tương đối cao với cây cà chua, khi lây nhiễm bằng cách ngâm hạt tỷ lệ bệnh đạt 10% và 83,3% tương ứng ở 14 và 28 ngày sau trồng (NST). Khi xử lý bằng vi khuẩn *Bacillus* sp. ĐXT6 tỷ lệ bệnh đạt 18,9%, thấp nhất và khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 3).

**Bảng 3. Tỷ lệ bệnh, chỉ số bệnh và hiệu lực kiểm soát bệnh héo xanh của các vi khuẩn đối kháng trong điều kiện nhà lưới**

| Vi khuẩn | Tỷ lệ bệnh (%) |         |        | AUDPC    | Chỉ số bệnh (%) |        |        | Hiệu lực (%) |         |         |
|----------|----------------|---------|--------|----------|-----------------|--------|--------|--------------|---------|---------|
|          | 14 NST         | 21 NST  | 28 NST |          | 14 NST          | 21 NST | 28 NST | 14 NST       | 21 NST  | 28 NST  |
| ĐXT1     | 3,3 bc         | 8,9 c   | 28,9 d | 350,2 c  | 1,1 b           | 4,2 c  | 16,1 d | 66,7 ab      | 63,6 ab | 65,3 b  |
| CC-LĐ2.2 | 7,8 ab         | 14,5 bc | 35,5 c | 505,7 bc | 3,1 a           | 6,7 bc | 22,8 c | 22,3 c       | 40,8 bc | 57,3 bc |

|           |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| ĐXT6      | 1,1 c   | 3,3 d   | 18,9 e  | 186,6 d | 0,3 b   | 1,1 d   | 11,7 e  | 89,0 a  | 86,4 a  | 76,7 a  |
| ĐHT1      | 7,8 ab  | 18,9 ab | 43,3 b  | 622,5 b | 3,3 a   | 9,7 b   | 29,4 b  | 22,0 bc | 22,6 d  | 48,0 d  |
| CXT3      | 10,0 a  | 24,4 a  | 83,3 a  | 995,3 a | 5,0 a   | 15,3 a  | 75,6 a  | -       | -       | -       |
| CV (%)    | 58,1    | 26,9    | 8,5     | 12,1    | 51,3    | 26,4    | 7,6     | 25,9    | 11,1    | 2,8     |
| Giá trị P | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |

Ghi chú: Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các số có cùng kí tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức  $\alpha = 0,01$ , AUDPC: Chỉ số tích lũy gây bệnh, NST: Ngày sau trồng.

Chỉ số tích lũy bệnh (AUDPC) khi xử lý vi khuẩn đối kháng *Pseudomonas* sp. ĐXT1 (350,2), *Bacillus* sp. CC-LĐ2.2 (505,7), *Bacillus* sp. ĐXT6 (186,6) và *Pseudomonas* sp. ĐHT1 (622,5) đều thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức xử lý vi khuẩn gây bệnh *R. solanacearum* CXT3 (995,3) (Bảng 3). Điều này cho thấy, các vi khuẩn đối kháng được thí nghiệm đều hạn chế được sự phát triển của vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3 gây bệnh héo xanh ở điều kiện nhà lưới.

Bảng 3 cho thấy, chỉ số bệnh cao nhất ở giai đoạn 28 NST là nghiệm thức xử lý vi khuẩn *Pseudomonas* sp. ĐHT1 (29,4%), cao hơn các nghiệm thức xử lý các vi khuẩn còn lại và thấp hơn so với nghiệm thức xử lý vi khuẩn gây bệnh *R. solanacearum* CXT3 (75,6%), khác biệt rất có ý nghĩa thống kê. Nghiệm thức có chỉ số bệnh thấp nhất là 11,7% khi xử lý bằng vi khuẩn *Bacillus* sp. ĐXT6, tiếp sau đó là vi khuẩn *Pseudomonas* sp. ĐXT là 116,1% và *Bacillus* sp. CC-LĐ2.2 (22,8%).

Hiệu lực kiểm soát bệnh héo xanh trên cây cà chua đạt ở thời điểm 28 ngày sau trồng đạt cao nhất là 76,7% ở nghiệm thức xử lý vi khuẩn *Bacillus* sp. ĐXT6, khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại, theo sau đó là *Pseudomonas* sp. ĐXT1 (65,3%) và *Bacillus* sp. CC-LĐ2.2 (57,3%) (Bảng 3).

Ở nghiệm thức chỉ ngâm hạt với vi khuẩn gây bệnh *R. solanacearum* CXT3, các chỉ số chiều cao cây, chiều dài rễ, khối lượng tươi và khối lượng khô của cây đều thấp hơn so với các nghiệm thức ngâm hạt với vi khuẩn đối kháng, và nghiệm thức chỉ ngâm hạt với nước cất. Điều này cho thấy, rằng vi khuẩn gây bệnh *R. solanacearum* CXT3 đã ức chế sự sinh trưởng và phát triển của cây cà chua. Vi khuẩn *Bacillus* sp. ĐXT6 và *Pseudomonas* sp. ĐXT1 có tác động tích cực đến các chỉ số sinh trưởng và phát triển của cây cà chua, cho chiều cao cây cao nhất ở các thời điểm đánh giá, đạt lần lượt 19,9 và 18,3 cm tại thời điểm 28 NST, giảm xuống 15,4 và 13,5 cm khi ngâm với vi khuẩn gây bệnh *R. solanacearum* CXT3 (Bảng 4).

**Bảng 4. Chỉ tiêu sinh trưởng của cây cà chua sau khi xử lý vi khuẩn đối kháng**

| Nghiệm thức     | Chiều cao cây, cm |          |         | Chiều dài rễ, cm | Khối lượng tươi, g | Khối lượng khô, g |
|-----------------|-------------------|----------|---------|------------------|--------------------|-------------------|
|                 | 14 NST            | 21 NST   | 28 NST  | 28 NST           | 28 NST             | 28 NST            |
| ĐXT1 - CXT3     | 8,4 cd            | 11,7 cbd | 13,5 cd | 12,8 a           | 66,7 c             | 24,4 bcd          |
| CC-LĐ2.2 - CXT3 | 6,8 de            | 8,1 ef   | 10,0 de | 9,4 c            | 40,0 de            | 19,1 cd           |
| ĐXT6 - CXT3     | 11,2 b            | 13,4 b   | 15,4 bc | 10,2 bc          | 110,0 b            | 31,6 b            |
| ĐHT1 - CXT3     | 6,1 e             | 9,3 de   | 9,7 de  | 8,7 c            | 53,3 cd            | 20,8 cd           |



|                |         |          |         |         |         |         |
|----------------|---------|----------|---------|---------|---------|---------|
| CXT3           | 5,1 e   | 6,7 f    | 7,9 e   | 7,7 c   | 26,7 e  | 15,8 d  |
| Xử lý nước cất | 6,9 de  | 11,5 bcd | 13,2 cd | 9,3 c   | 130,0 b | 32,4 b  |
| ĐXT1           | 10,2 bc | 12,9 bc  | 18,3 ab | 12,9 a  | 147,6 a | 45,8 a  |
| CC-LĐ2.2       | 7,1 de  | 10,6 cd  | 11,3 de | 9,9 c   | 70,0 c  | 21,1 cd |
| ĐXT6           | 13,9 a  | 16,4 a   | 19,9 a  | 12,5 ab | 153,3 a | 48,8 a  |
| ĐHT1           | 6,2 de  | 10,7 cd  | 11,9 cd | 9,5 c   | 73,3 c  | 27,8 bc |
| CV (%)         | 10,7    | 9,2      | 11,6    | 9,9     | 13,3    | 12,0    |
| Giá trị P      | <0,001  | <0,001   | <0,001  | <0,001  | <0,001  | <0,001  |

*Ghi chú: Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các số có cùng kí tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức  $\alpha = 0,01$ , NST: Ngày sau trồng.*

Chủng *B. subtilis* ĐKB1 trong chế phẩm HX được chứng minh có khả năng kích thích cây Ớt sinh trưởng và phát triển, tăng chiều cao cây và tăng khả năng kháng bệnh và góp phần tăng năng suất [4]. Điều này chứng tỏ khả năng thúc đẩy sinh trưởng của vi khuẩn *Bacillus* sp. ĐXT6 và *Pseudomonas* sp. ĐXT1 đã giúp cây cà chua phát triển tốt, làm tăng khả năng chống chịu với sự xâm nhập và gây hại của vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3, làm giảm tỷ lệ bệnh, chỉ số bệnh và hiệu lực kiểm soát bệnh.

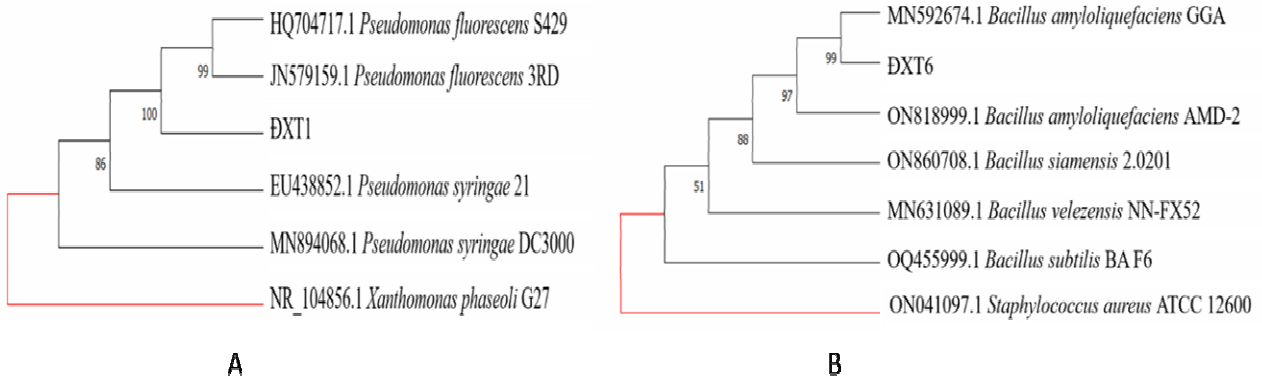
Các vi khuẩn *Bacillus* spp. được chứng minh có khả năng sinh ra các chất kháng khuẩn trực tiếp như: Iturin A, surfactin [2], macrolactin và heptanone [19] làm ức chế sinh trưởng vi khuẩn trong mô rễ, mô thân, trong khi đó *Pseudomonas* spp. có khả năng tổng hợp 2,4-diacetylphloroglucinol [20], là một chất kháng sinh phổ rộng ức chế vi khuẩn và nấm gây hại. Ngoài ra, cả hai nhóm vi khuẩn này đều có khả năng tổng hợp các enzyme ngoại bào như: Chitinase và protease [2, 21], hoặc siderophore để tranh giành sắt, hạn chế dinh dưỡng của *R. solanacearum* [20]. Khả năng thúc đẩy sinh trưởng thực vật thông qua tổng hợp auxin ở vùng rễ, phân giải lân, cố định đạm [2, 20, 21] cũng là các yếu tố quan trọng góp phần giúp hai loại vi khuẩn này được ứng dụng nhiều hơn trong thực tế. Do đó, hai vi khuẩn *Bacillus* sp. ĐXT6 và *Pseudomonas* sp. ĐXT1 được lựa chọn để định danh

đến loài và kết hợp tạo ra chế phẩm dạng bột (NLHX) để đánh giá hiệu lực phòng trừ bệnh héo xanh trên cà chua ở điều kiện đồng ruộng.

#### 3.4. Kết quả định danh các vi khuẩn đối kháng

Trình tự vùng gen 16S-rRNA của các chủng vi khuẩn đã được khuếch đại thành công với cặp mồi 27F và 1492R, sản phẩm PCR có kích thước trong khoảng 1.400 - 1.500 bp. Các sản phẩm PCR được tinh sạch và gửi đi giải trình tự tại Công ty TNHH Genlab.

So sánh trình tự vùng gen 16S-rRNA của các mẫu vi khuẩn được nghiên cứu với các trình tự có sẵn trên ngân hàng gen bằng công cụ BLAST cho thấy, vi khuẩn ĐXT1 có mức độ tương đồng đạt 97,94% so với các chủng *Pseudomonas fluorescens* trên Ngân hàng gen gồm chủng *P. fluorescens* S429 (mã số HQ704717.1), chủng 3RD (mã số JN579159.1) với mức độ bao phủ đạt từ 95%. Sử dụng các chủng này và các chủng *Pseudomonas syringae* 21 (mã số EU438852.1), DC3000 (mã số MN894068) để vẽ cây phát sinh loài, chủng *Xanthomonas phaseoli* G27 (mã số NR104856.1) dùng làm nhóm ngoài, hệ số bootstrap 1.000 lần. Cây phát sinh loài có độ tin cậy cao, vì tỷ lệ bootstrap trên các nhánh đạt từ 86 - 100% (Hình 4A), trong đó ĐXT1 nằm cùng nhánh với *P. fluorescens* S429 và 3RD với hệ số 100%, điều này cho phép xác định vi khuẩn ĐXT1 là *Pseudomonas fluorescens*.



Hình 4. Cây phát sinh loài vùng gen 16S-rRNA của A) ĐXT1 và B) ĐXT6.

Hệ số bootstrap 1.000 lần được biểu diễn dưới dạng %.

Trình tự vùng gen 16S rRNA của chủng ĐXT6 có mức độ tương đồng đạt 98,85% với chủng *Bacillus amyloliquefaciens* GGA (MN592674.1), 98,76% với chủng *B. amyloliquefaciens* AMD-2 (ON818999.1) với độ bao phủ 97%. Phân tích cây phát sinh loài có sử dụng *Bacillus siamensis* 2.0201 (mã số ON860708.1), chủng *Bacillus subtilis* BA F6 (mã số OQ455999.1), chủng *Bacillus velezensis* NN-FX52 (mã số MN631089.1), nhóm ngoài chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 (mã số ON041097.1), có độ tin cậy cao với hệ số bootstrap từ 51 - 99% (Hình 3B), trong đó chủng ĐXT6 nằm cùng nhóm với chủng *B. amyloliquefaciens* GGA với hệ số bootstrap 99%, điều này cho phép xác định ĐXT6 là *Bacillus amyloliquefaciens*.

### 3.5. Khả năng kiểm soát bệnh héo xanh của các vi khuẩn đối kháng trong điều kiện đồng ruộng

Bệnh héo xanh bắt đầu xuất hiện trên ruộng canh tác vào giai đoạn trưởng thành, chuẩn bị ra hoa. Trước khi tưới chế phẩm vi sinh lần 1 không ghi nhận cây chết ở tất cả các nghiệm thức thí nghiệm.

Nghiệm thức đối chứng (tưới nước lã) ghi nhận tỷ lệ cây bị bệnh cao nhất, đặc biệt là ở các mốc thời gian 7 ngày và 14 ngày sau khi tưới chế phẩm vi sinh lần thứ hai (NSLL2) với tỷ lệ cây bệnh lần lượt là 19,3% và 40,7%. Điều này cho thấy, bệnh gây hại nặng và việc áp dụng biện pháp quản lý là cần thiết.

Các nghiệm thức sử dụng chế phẩm sinh học với hàm lượng 2,5 kg/ha hoặc 3,0 kg/ha có hiệu quả khá cao, tỷ lệ cây bị bệnh tương ứng là 16,7% và 13,3% tại thời điểm 14 NSLL2, thấp hơn đối chứng, khác biệt có ý nghĩa thống kê, tương đương với nghiệm thức sử dụng chế phẩm Biobac 500WP (12,7%) (Bảng 5). Sau 7 ngày từ lần tưới chế phẩm vi sinh thứ hai (7 NSL2), đối chứng tiếp tục có tỷ lệ cây chết tăng cao nhất (8,0%) và tăng lên đạt 20,7% ở thời điểm 14 NSL2, điều này chứng tỏ bệnh héo xanh gây hại nhanh. Các nghiệm thức sử dụng chế phẩm sinh học NLHX 3 kg/ha duy trì tỷ lệ cây chết thấp hơn đáng kể, đạt 4,7%, tương đương chế phẩm Biobac 500WP ở mức 2,7%, thấp hơn so với đối chứng, khác biệt có ý nghĩa thống kê (Bảng 5).

Bảng 5. Tỷ lệ cây bị bệnh, tỷ lệ cây bị chết và hiệu lực của chế phẩm NLHX

| Nghiệm thức | Liều lượng, kg/ha | Tỷ lệ cây bị bệnh, % |        |        |         | Tỷ lệ cây bị chết, % |        |        |         | Hiệu lực, % |        |         |
|-------------|-------------------|----------------------|--------|--------|---------|----------------------|--------|--------|---------|-------------|--------|---------|
|             |                   | TL1                  | TL2    | 7 NSL2 | 14 NSL2 | TL1                  | TL2    | 7 NSL2 | 14 NSL2 | TL2         | 7 NSL2 | 14 NSL2 |
| NLHX        | 2,5               | 5,3                  | 9,3 ab | 12,7 b | 16,7 b  | 0,0                  | 2,7 ab | 4,7 b  | 7,3 b   | 39,1 b      | 34,5 b | 59,0 b  |
| NLHX        | 3,0               | 6,0                  | 8,0 b  | 10,7 b | 13,3 b  | 0,0                  | 2,0 b  | 2,7 c  | 4,7 bc  | 53,6 a      | 51,0 a | 70,9 a  |

|              |   |      |        |        |        |     |       |       |        |        |        |        |
|--------------|---|------|--------|--------|--------|-----|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| Biobac 500WP | 2 | 6,0  | 7,3 b  | 10,0 b | 12,7 b | 0,0 | 1,3 b | 2,0 c | 2,7 c  | 57,5 a | 54,0 a | 72,3 a |
| Đối chứng    | - | 5,3  | 15,3 a | 19,3 a | 40,7 a | 0,0 | 5,3 a | 8,0 a | 20,7 a | -      | -      | -      |
| CV (%)       |   | 25,6 | 31,1   | 18,4   | 16,4   | -   | 19,1  | 10,1  | 10,9   |        |        |        |
| Giá trị P    |   | ns   | <0,01  | <0,01  | <0,01  | -   | <0,01 | <0,01 | <0,01  |        |        |        |

Ghi chú: TL: Trước tưới vi sinh lần; NSL2: Ngày sau tưới vi sinh lần 2; ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê mức  $\alpha = 0,05$ ; trong cùng một cột, các giá trị trung bình có cùng ký tự kèm theo khác biệt không có ý nghĩa thống kê mức  $\alpha = 0,05$ .

Cả hai liều lượng chế phẩm NLHX đều có hiệu lực kiểm soát bệnh héo xanh vi khuẩn ở liều lượng 3 kg/ha tại thời điểm 14 NSL2 chế phẩm NLHX cho hiệu lực đạt 70,9%, tương đương nghiệm thức sử dụng Biobac 500WP (72,3%), khác biệt không có ý nghĩa thống kê (Bảng 5). Điều này cho thấy, chế phẩm NLHX có tiềm năng phát triển thành chế phẩm sinh học ứng dụng kiểm soát bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây cà chua.

#### 4. KẾT LUẬN

Phân lập được tổng số 13 chủng vi khuẩn thuộc *Bacillus* spp. và *Pseudomonas* spp. có khả năng đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum* CXT3, trong đó các vi khuẩn *Pseudomonas* spp. ĐHT1, ĐXT1; *Bacillus* spp. ĐXT6, CC-LĐ2.2, có khả năng đối kháng mạnh với đường kính vòng kháng khuẩn trung bình lần lượt là 16,7; 16,6; 14,7; 13,6 mm. Bốn vi khuẩn *Pseudomonas* spp. ĐHT1, ĐXT1; *Bacillus* spp. ĐXT6, CC-LĐ2.2 có khả năng làm giảm tỷ lệ bệnh, cho hiệu lực kiểm soát bệnh héo xanh trong điều kiện *in vitro* đạt từ 69,2 - 95,7% ở thí nghiệm phòng bệnh và từ 61,6 - 92,4% ở thí nghiệm trừ bệnh. Dựa trên trình tự vùng gen 16S-rRNA, ĐXT1 được xác định là *Pseudomonas fluorescens* và ĐXT6 là *Bacillus amyloliquefaciens*. Trong điều kiện nhà lưới, *B. amyloliquefaciens* ĐXT6 và *P. fluorescens* ĐXT1 làm giảm tỷ lệ bệnh, chỉ số bệnh, cho hiệu lực kiểm soát bệnh héo xanh trên cây cà chua đạt ở thời điểm 28 NST đạt lần lượt 76,7% và 65,3%, tác động tích cực đến chiều cao cây, chiều dài rễ, khối lượng tươi và khối lượng khô của cây. Trong điều kiện đồng ruộng, chế phẩm vi sinh NLHX có hiệu lực kiểm soát bệnh héo xanh đạt 70,9% với liều lượng 3 kg/ha, thể hiện tiềm năng của chế phẩm.

#### LỜI CẢM ƠN

Công trình này là một phần kết quả trong nhiệm vụ khoa học và công nghệ thuộc Nghị định thư “Nghiên cứu sử dụng vi sinh vật có ích phòng trừ một số bệnh hại chính trên rau họ cà (*Solanaceae*)”, mã số NĐT/HU/22/20.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Caldwell D., Kim B. S., Iyer-Pascuzzi A. S. (2017). *Ralstonia solanacearum* differentially colonizes roots of resistant and susceptible tomato plants. *Phytopathology*, 107(5): 528 - 536. doi: 10.1094/PHYTO-09-16-0353-R.
2. Sun, Y., Su, Y., Meng, Z., Zhang, J., Zheng, L., Miao, S., Qin, D., Ruan, Y., Wu, Y., Xiong, L., Yan, X., Dong, Z., Cheng, P., Shao, M. & Yu, G. (2023). Biocontrol of bacterial wilt disease in tomato using *Bacillus subtilis* strain R31. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1281381. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1281381>.
3. Clough S. E., Jousset A., Elphinstone J. G., Friman V. P. (2022). Combining *in vitro* and *in vivo* screening to identify efficient *Pseudomonas* biocontrol strains against the phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. *Microbiology*, 11(2): e1283. doi: 10.1002/mbo3.1283.
4. Lê Thị Thanh Thủy, Lê Như Kiều (2016). Đánh giá hiệu quả của chế phẩm vi sinh HX đối với bệnh héo xanh ớt tại Mê Linh, Hà Nội. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 4(65), 73 - 78.
5. Shah S. S., Shan W., Wang Y., Zheng Z., Feng S., Wang L., Hu X., Li L. (2025). Eco-friendly

Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* and plant growth promotion in tobacco using garbage enzyme and *Bacillus velezensis* A1. *Molecular Biotechnology*. PMID: 40180693, doi: 10.1007/s12033-025-01412-w.

6. Suresh P., Varathraju G., Shanmugaiah V., Almaary K. S., Elbadawi Y. B., Mubarak A. (2021). Partial purification and characterization of 2, 4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens* VSMKU3054 against bacterial wilt disease of tomato. *Saudi Journal of Biological Science*. 28(4), 2155 - 2167. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.02.073.

7. Lê Vũ Khánh Trang và Lý Hải Triều (2020). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Pseudomonas* sp. có khả năng kháng vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh ở cây cà chua. Kỷ yếu hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc năm 2020.

8. Lê Như Kiều, Trần Quang Minh, Lê Thị Thanh Thủy và Nguyễn Văn Huân (2010). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh lác và vòm. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 48(3), 33 - 42.

9. Lê Thị Thanh Thủy (2014). Nghiên cứu, tuyển chọn vi sinh vật đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh cây trồng. Tóm tắt Luận án tiến sĩ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

10. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2024). Thông tư số 25/2024/TT-BNNPTNT của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn về Ban hành Danh mục thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng tại Việt Nam và Danh mục thuốc bảo vệ thực vật cấm sử dụng tại Việt Nam.

11. Nguyễn Thị Thúy Nga (2015). Nghiên cứu tạo chế phẩm đa chủng vi sinh vật và đánh giá hiệu quả của chế phẩm đối với sản xuất cây con thông nhựa (*Pinus merkusii*) ở vườn ươm. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam*, 3, 3960 - 3968.

12. Moreno-Velandia, C. A., Izquierdo-García, L. F., García-Arias, F. L., Patiño-Moscoso, M. A. (2024). Bacterial consortium based on *Pseudomonas fluorescens*, *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Bacillus velezensis* reduces clubroot disease in broccoli. *European Journal of Plant Pathology*, 169, 171 - 186. <https://doi.org/10.1007/s10658-024-02817-0>.

13. Schaad N. W., Jones J. B., Chun W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, third edition, APS Press.

14. Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S. & Kundu, B. (2017). Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(3), 308 - 313.

15. Azman, N. A., Sijam, K., Hata, E. M., Othman, R. & Saud, H. M. (2017). Screening of bacteria as antagonist against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the causal agent of bacterial leaf blight of paddy and as plant growth promoter. *Journal of Experimental Agriculture International*, 16(4), 1 - 15.

16. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697 - 703.

17. Kumar S., Tamura K. and Stecher G. (2021). MEGA 11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027, <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

18. Tiêu chuẩn cơ sở TCCS 456:2016/BVTV về Khảo nghiệm trên đồng ruộng hiệu lực phòng trừ bệnh héo xanh, héo rũ hại cây họ cà của các thuốc trừ bệnh

19. Sui, X. H., Xiaobin C., Jianmin L., Yiqiang Y., Yuan G., Jianyu Z., Yanfen M., Chen Z. (2022). Biocontrol potential of *Bacillus velezensis* EM-1 associated with suppressive rhizosphere soil microbes against tobacco bacterial wilt. *Frontiers in Microbiology*. 13:940156. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.940156>.

20. Chandrasekaran, M., Subramanian, D., Yoon, E., Kwon, T. & Chun, S. C. (2016). Meta-analysis reveals that the genus *pseudomonas* can be a better choice of biological control agent against bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. *The plant pathology Journal*, 32(3), 216 - 227. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.11.2015.0235>.

21. Hyakumachi, M., Nishimura, M., Arakawa, T., Asano, S., Yoshida, S., Tsushima, S. & Takahashi,

H. (2013). *Bacillus thuringiensis* suppresses bacterial expression in tomato. *Microbes and environments*, wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* with 28(1), 128 - 134. [https://doi.org/10.1264/jsme2.systemic\\_induction\\_of\\_defense-related\\_gene\\_me12162](https://doi.org/10.1264/jsme2.systemic_induction_of_defense-related_gene_me12162).

## **SELECTION OF ANTAGONISTIC BACTERIA FOR THE BIOCONTROL OF *Ralstonia solanacearum* CAUSING BACTERIAL WILT IN TOMATO**

**Vo Thi Ngoc Ha<sup>1</sup>, Huynh Thanh Hung<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Faculty of Agronomy, Nong Lam University - Ho Chi Minh city*

### **Abstract**

*Bacillus* and *Pseudomonas* are potential bacteria for application in the management of plant diseases in general and bacterial wilt in particular. In this study, *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. were isolated from tomato-cultivated soils in Lam Dong province and assessed for their antagonistic activity against *Ralstonia solanacearum* strain CXT3 using the agar well diffusion method. The potential strains were subsequently evaluated for their efficacy in controlling bacterial wilt *in vitro*, greenhouse and field conditions. All tested bacterial strains demonstrated antagonistic activity against *R. solanacearum* CXT3. Among them, *Pseudomonas* spp. ĐHT1, ĐXT1 and *Bacillus* spp. ĐXT6, CC-LĐ2.2 exhibited strong antagonistic effects, with inhibition zones of 16.7, 16.6, 14.7, and 13.6 mm, respectively. The *in vitro* preventive efficacy of the four bacterial strains (*Pseudomonas* spp. ĐHT1, ĐXT1; *Bacillus* spp. ĐXT6, CC-LĐ2.2) ranged from 69.2% to 95.7% and control efficacy from 61.6% to 92.4%. Based on 16S-rRNA gene sequencing, ĐXT1 was identified as *Pseudomonas fluorescens* and ĐXT6 as *Bacillus amyloliquefaciens*. *B. amyloliquefaciens* ĐXT6 and *P. fluorescens* ĐXT1 significantly reduced disease incidence and disease index, showing control efficiencies of 76.7% and 65.3%, respectively, at 28 days after planting under greenhouse conditions. They also promoted plant height, root length, fresh weight and dry weight. In field trials, the biological product NLHX at a rate of 3 kg/ha achieved a control efficacy of 70.9%, demonstrating the potential for developing biological products from *B. amyloliquefaciens* ĐXT6 and *P. fluorescens* ĐXT1 to manage bacterial wilt in tomatoes.

**Keywords:** *Bacterial wilt, Ralstonia solanacearum, antagonistic bacteria, biological control.*

**Ngày nhận bài:** 16/5/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 20/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 24/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 27/6/2025



# ĐÁNH GIÁ ĐẶC ĐIỂM HÓA SINH, KHẢ NĂNG KHÁNG BỆNH VÀ KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG CỦA CHỦNG *Klebsiella variicola* BR12 ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ ĐẤT VÙNG RỄ CÂY CAM

Lê Văn Mạnh<sup>1</sup>, Hồ Mạnh Tường<sup>3</sup>, Phạm Quang Huy<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Hồng Hà<sup>1</sup>, Trần Thị Hoa<sup>1</sup>, Phan Quyền<sup>1</sup>, Lê Thị Thảo Linh<sup>1</sup>,  
Chu Hoàng Hà<sup>1,2</sup>, Đỗ Tiến Phát<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Viện 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>Bộ môn Công nghệ sinh học, Khoa Hóa và Môi trường, Trường Đại học Thủy lợi

\*Email: dtphat@ibt.ac.vn

## TÓM TẮT

Cây cam (*Citrus sinensis* L.) được biết đến với giá trị dinh dưỡng cao và mang lại giá trị kinh tế lớn cho người dân tại huyện Cao Phong, tỉnh Hòa Bình. Tuy nhiên, việc lạm dụng phân bón vô cơ và thuốc bảo vệ thực vật trong canh tác dẫn đến tình trạng chai cứng đất, gây mất cân bằng dinh dưỡng trong đất, làm nghèo vi sinh vật và gia tăng sự xuất hiện sâu, bệnh hại. Do đó, việc bổ sung vi khuẩn thuộc nhóm PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) được xem là giải pháp tiềm năng để cải thiện chất lượng đất, thúc đẩy khả năng sinh trưởng của cây cam và phòng chống bệnh hại. Trong nghiên cứu này, đặc điểm hóa sinh, khả năng kích thích sinh trưởng và kháng vi sinh vật gây bệnh của chủng vi khuẩn *Klebsiella variicola* có nguồn gốc phân lập từ đất vùng rễ cây cam tại huyện Cao Phong, tỉnh Hòa Bình được sử dụng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng BR12 có khả năng cố định đạm, phân giải lân, kali, canxi, sinh tổng hợp EPS (exopolysaccharides) và ức chế vi khuẩn gây bệnh đốm lá *Pseudomonas syringae*. Thử nghiệm trong điều kiện nhà lưới, cây cam lây nhiễm chủng BR12 có chiều cao và số lá tăng lần lượt 1,21 lần và 1,24 lần so với cây đối chứng sau 4 tháng thí nghiệm. Ngoài ra, khối lượng tươi, khối lượng khô của thân và rễ cây cam có xử lý với chủng khuẩn BR12 cao hơn so với cây đối chứng từ 56,62 - 93,63%. Các phân tích cho thấy, chủng *Klebsiella variicola* BR12 có tiềm năng trong kích thích sinh trưởng và phòng trừ bệnh trên cây cam. Kết quả của nghiên cứu này là cơ sở để phát triển tiếp các sản phẩm sinh học có bổ sung vi khuẩn *K. variicola* để phòng chống bệnh đốm lá, tăng cường sinh trưởng của cây cam và các cây trồng khác.

**Từ khóa:** Cam, Cao Phong, Hòa Bình, *Klebsiella variicola*, PGPR.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây cam (*Citrus sinensis* L.) là một trong những cây trồng ăn quả có giá trị thương mại cao. Các sản phẩm từ cam đóng một vai trò quan trọng trong chế độ dinh dưỡng của con người, đây là loại quả được biết tới với hàm lượng cao các chất như: Vitamin C, folate, kali, khoáng chất, flavonoid,  $\beta$ -caroten, lomonoid và chất xơ [1]. Theo nghiên cứu của Phạm Hồng Hiền và cs (2021), tổng diện tích cây có múi trên cả nước là 221,216 ha. Tại phía Bắc, trong 10 năm từ 2009 - 2019, tốc độ tăng trưởng cây có múi bình quân là 10%/năm về diện tích (tương ứng 7.300 ha/năm), 12,5%/năm về sản lượng (tương ứng 69.400 tấn/năm) [2]. Cam được trồng phổ biến tại nhiều

vùng nhưng trong đó nổi bật nhất là cam ở huyện Cao Phong, tỉnh Hòa Bình với chất lượng và giá trị thương mại cao. Tuy nhiên, sau nhiều năm canh tác, các vườn cam đã bị thoái hóa, bệnh hại gia tăng, đất đai chai cứng do lạm dụng thuốc bảo vệ thực vật và phân bón hóa học, dẫn đến năng suất giảm sút nghiêm trọng. Do đó, việc cải tạo và phục hồi các vùng cam chuyên canh này đang nhận được sự quan tâm của các nhà khoa học và người nông dân.

Gần đây, các hướng bổ sung chế phẩm vi sinh để cải tạo đất, cân bằng dinh dưỡng và thúc đẩy cây cam phát triển bền vững đang được xem là giải pháp triển vọng [3]. PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) là nhóm vi khuẩn có lợi cho thực vật,

chủ yếu cư trú trong và trên bề mặt rễ cây, có khả năng thúc đẩy sự sinh trưởng của cây trồng qua các cơ chế trực tiếp và gián tiếp. Những cơ chế này bao gồm khả năng cố định đạm, hòa tan các chất khó tan và tăng cường khả năng chống chịu của cây đối với các yếu tố bất lợi của môi trường [4]. Trong những năm gần đây, nhiều chủng vi khuẩn thuộc nhóm PGPR đã được phát hiện, nghiên cứu và ứng dụng, điển hình là các chi như: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Serratia* [5]. Hiện nay, chưa có nhiều công bố về khả năng thúc đẩy phát triển của vi khuẩn thuộc nhóm PGPR trên cây cam tại Việt Nam. Chính vì vậy, nghiên cứu đánh giá đặc điểm hóa sinh, khả năng kháng bệnh và kích thích sinh trưởng của chủng *Klebsiella variicola* BR12 được phân lập từ đất vùng rễ cây cam là cần thiết.

## **2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu**

Các chủng vi khuẩn tiềm năng được phân lập từ mẫu đất vùng rễ cây cam ở huyện Cao Phong, tỉnh Hòa Bình. Chủng khuẩn được lưu giữ trong glycerol 20% ở điều kiện -80°C. Cây cam thí nghiệm được gieo từ hạt giống cam ở huyện Cao Phong, tỉnh Hòa Bình.

Chung nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên cam [6] và chủng khuẩn *Pseudomonas syringae* gây bệnh đốm lá vi khuẩn trên cây có múi được phân lập từ mẫu bệnh và được định danh trong các nghiên cứu trước đây tại Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hóa chất, thiết bị và môi trường sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp từ Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

### **2.2. Phương pháp**

#### **2.2.1. Phân lập vi khuẩn từ vùng rễ**

Phân lập vi khuẩn từ vùng rễ cây được thực hiện qua các bước sau: Cắt rễ cây khỏe mạnh và rửa sạch bằng dung dịch xà phòng, sau đó khử trùng bằng cồn 70%. Tiếp theo, cắt rễ thành các đoạn nhỏ, nghiền và chuyển vào ống nghiệm chứa nước cất khử trùng rồi vortex để giải phóng vi khuẩn. Mẫu được

pha loãng và cấy trang đều trên đĩa thạch có môi trường nuôi cấy LB. Đĩa được giữ trong tủ ẩm ở nhiệt độ 28°C trong 24 - 48 giờ. Sau đó, quan sát, chọn các khuẩn lạc riêng biệt để cấy chuyển sang đĩa môi trường LB khác, bước này được lặp lại đến khi thu nhận được chủng vi sinh vật thuần khiết [7].

#### **2.2.2. Sàng lọc và đánh giá khả năng phân giải K khó tan**

Khả năng phân giải kali (K) từ môi trường được định tính thông qua kết quả phân giải  $\text{AlK}_2\text{O}_6\text{Si}_2$  có trong môi trường Alexandrov sau 7 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C. Chỉ số phân giải K được tính toán bằng công thức [8]:

$$SI = \frac{D}{d}$$

Trong đó: SI là chỉ số phân giải, D là đường kính của vòng phân giải (cm) và d là đường kính của vòng khuẩn (cm).

#### **2.2.3. Định danh vi khuẩn**

ADN vi khuẩn được tách chiết bằng phương pháp Alkaline lysis buffer [9]. Định danh chủng vi khuẩn dựa vào trình tự gen 16S rRNA sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-ACGGCTACCTTGTTA-3'). Phản ứng PCR được thực hiện trong tổng thể tích 25 µL, bao gồm 12,5 µL MasterMix của Thermo Fisher Scientific, 1 µL mỗi loại mồi 27F/1492R (10 pM), 1 µL ADN khuôn và 9,5 µL nước. Chu trình nhiệt PCR được tiến hành trên máy PCR BIO RAD T100TM Thermal Cycler. Sản phẩm PCR (khoảng 1.465 bp) của gen 16S rRNA được giải trình tự tại LOBI Vietnam Company. So sánh trình tự ADN thu được trên cơ sở dữ liệu NCBI GenBank bằng công cụ BLAST và sử dụng phần mềm MEGA X [9].

#### **2.2.4. Định tính một số đặc điểm hóa sinh vi khuẩn trong điều kiện in vitro**

Khả năng phân giải phosphate khó tan (P) được xác định bằng kết quả hình thành vòng phân giải  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  trên môi trường PKO (Pikovskaya's agar) sau 7 ngày nuôi cấy ở 28°C [10]. Khả năng phân giải canxi (Ca) được định tính bằng vòng phân giải  $\text{CaCO}_3$  trên môi trường CDB's (8 g agar) sau 7 ngày nuôi cấy ở cùng nhiệt độ [11]. Chỉ số phân giải đối với các nguyên tố P, Ca được tính toán bằng công thức SI trong báo cáo kết quả nghiên cứu của

Nguyễn Văn Giang và cs (2018) [8]. Khả năng cố định đạm của vi khuẩn được đánh giá bằng môi trường Ashby. Việc quan sát sự hình thành khuẩn lạc trên bề mặt thạch sau 7 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C sẽ giúp đánh giá khả năng cố định đạm của vi khuẩn, từ đó đưa ra kết luận về khả năng này [12]. Khả năng sinh Exopolysaccharide (EPS) của vi khuẩn được phân tích thông qua phương pháp nuôi cấy trên môi trường giàu đường YEM để kích thích sinh tổng hợp EPS [13].

#### 2.2.5. Định tính khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh trong điều kiện in vitro

Khả năng kháng khuẩn *Pseudomonas syringae* được đánh giá bằng phương pháp đục lỗ trên môi trường thạch. Cụ thể, 100 µl hỗn dịch vi khuẩn gây bệnh với nồng độ  $10^8$  CFU/ml (trùng ứng với giá trị  $OD_{600} = 0,1$ ) được trải đều lên bề mặt đĩa thạch LB chuẩn bị sẵn. Sau đó, các lỗ có đường kính 7 mm được đục đều trên thạch, 100 µl dịch nuôi cấy của chủng vi sinh vật tiềm năng được nhỏ trực tiếp vào mỗi lỗ thạch. Các đĩa sau đó được ủ trong điều kiện tối, ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 24 giờ. Sau thời

gian ủ, các vòng trong suốt xung quanh lỗ thạch – gọi là vùng ức chế – sẽ được đo bằng thước chính xác [14]. Công thức chỉ số đối kháng khuẩn:

$$\text{Chỉ số đối kháng khuẩn} = \frac{\text{Đường kính vòng kháng khuẩn}}{\text{Đường kính lỗ thạch}}$$

Khả năng kháng nấm bệnh *Colletotrichum gloeosporioides* được đánh giá bằng phương pháp cấy ria. Vi khuẩn được nuôi trong môi trường LB qua đêm ở điều kiện 30°C, không có ánh sáng. Môi trường cần chuẩn bị để cấy từ công thức môi trường PDA với thành phần 200 g/l dịch chiết khoai tây và 20 g/l Glucose. Bằng phương pháp cấy ria, vi khuẩn được vạch thành các đường là cạnh của tam giác đều trong đĩa, các cạnh cách tâm 3 cm, giữa tâm của tam giác được cấy chủng nấm hại gây bệnh. Kết quả thu sau 7 ngày và đánh giá khả năng kháng nấm bệnh của vi khuẩn [15]. Chỉ số đối kháng nấm được tính bằng cách đo khoảng cách nấm phát triển so với đường vạch sinh trưởng một vi sinh vật khác trên môi trường nuôi cấy. Công thức để tính chỉ số đối kháng nấm như sau:

$$\text{Chỉ số đối kháng nấm (\%)} = \frac{\text{Đường kính từ tâm đĩa tới đường vạch khuẩn} - \text{Đường kính nấm mọc}}{\text{Đường kính từ tâm đĩa tới đường vạch khuẩn}} \times 100$$

#### 2.2.6. Đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng của vi khuẩn trên cây cam ở điều kiện nhà lưới

Vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng, nhiệt độ 28°C, sau 24 giờ và cây cam giống 2 tháng tuổi. Cây con được trồng vào bầu đất (đường kính 5 cm chứa giá thể với thành phần đất phù sa, trấu hun và xơ dừa theo tỉ lệ 1: 1: 1. Hai công thức sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: Mock - cây cam không bổ sung dung dịch khuẩn: Mock + 100 ml BR12 - cây cam được bổ sung dung dịch khuẩn [16]. Cây cam được theo dõi sinh trưởng và phát triển trong 4 tháng trong điều kiện nhà lưới. Các chỉ tiêu số lá, chiều cao cây cam được theo dõi 2 tháng/lần, khối lượng tươi khô của thân và rễ cây cam cũng được thu thập sau 4 tháng kể từ ngày xử lý bằng dung dịch khuẩn.

#### 2.2.7. Xử lý thống kê

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Sự khác biệt có ý nghĩa của các giá trị trung bình được xác nhận bằng kiểm định Duncan.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Sàng lọc chủng vi sinh vật có khả năng phân giải K từ mẫu rễ cam

Khả năng phân giải kali từ các hợp chất khó tan trong đất là yếu tố quan trọng, giúp cây có thể tiếp cận và hấp thụ kali. Trong các thí nghiệm thực nghiệm, khả năng hòa tan kali khó tan ( $AlK_2O_6Si_2$ ) được xác định thông qua sự hình thành vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc trên môi trường thạch (Bảng 1). Trong nghiên cứu này, với trên 90 chủng vi khuẩn phân lập được từ mẫu rễ cam tại huyện Cao Phong, tỉnh Hòa Bình được tiến hành đánh giá khả năng phân giải K khó tiêu trên môi trường Alexandrov. Kết quả sàng lọc cho thấy, 16 chủng vi khuẩn phân lập từ rễ cây có khả năng phân giải kali, với chỉ số phân giải SI dao động từ 1,12 - 2,25 (Bảng 1). Trong đó, chủng BR12 có chỉ số phân giải kali cao vượt trội so với các chủng còn lại ( $SI = 2,25 \pm 0,08$ ) và được lựa chọn trong đánh giá các đặc tính sinh hóa và kích thích sinh trưởng trong các thí nghiệm tiếp theo.

**Bảng 1. Khả năng phân giải K của các chủng khuẩn tuyển chọn**

| STT | Kí hiệu chủng | Chỉ số phân giải K (SI) | STT | Kí hiệu chủng | Chỉ số phân giải K (SI) |
|-----|---------------|-------------------------|-----|---------------|-------------------------|
| 1   | BR1           | 1,12 ± 0,02             | 9   | BR9           | 1,19 ± 0,02             |
| 2   | BR2           | 1,23 ± 0,02             | 10  | BR10          | 1,15 ± 0,02             |
| 3   | BR3           | 1,13 ± 0,03             | 11  | BR11          | 1,94 ± 0,12             |
| 4   | BR4           | 1,54 ± 0,02             | 12  | BR12          | 2,25 ± 0,08             |
| 5   | BR5           | 1,32 ± 0,05             | 13  | BR13          | 1,25 ± 0,12             |
| 6   | BR6           | 1,23 ± 0,10             | 14  | BR14          | 1,13 ± 0,01             |
| 7   | BR7           | 1,17 ± 0,01             | 15  | BR15          | 2,05 ± 0,12             |
| 8   | BR8           | 1,21 ± 0,12             | 16  | BR16          | 1,12 ± 0,01             |

### 3.2. Kết quả phân loại chủng BR12

Dựa trên hình thái khuẩn lạc và một số đặc điểm sinh hóa cơ bản của chủng vi khuẩn BR12, cũng như kết quả PCR có thể xác định chủng vi khuẩn đã phân lập thuộc chi *Klebsiella*. Kết quả nhân dòng giải trình tự gen 16S rRNA ghi nhận sản phẩm với kích thước 1.492 bp, tỷ lệ GC là 54,53%. Trình tự này sau đó được phân tích và so sánh với trình tự 16S rRNA của một số chủng vi sinh vật đã công bố trên ngân hàng gen

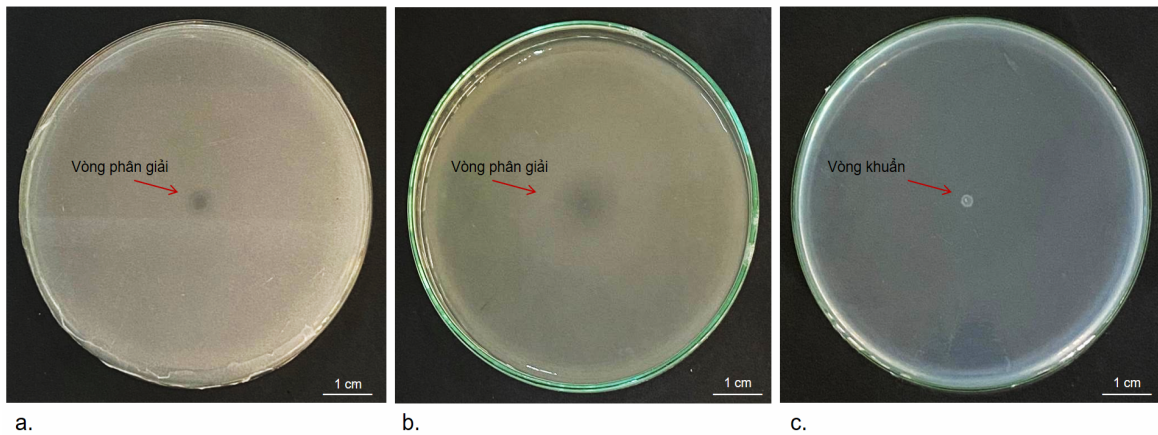
NCBI. Kết quả xây dựng cây phân loại di truyền dựa trên trình tự gen 16S rRNA được thể hiện trên hình 1 với các thông số bootstrap trên các nhánh. Cây phân loại cho thấy, chủng BR12 có độ tương đồng cao với các loài thuộc chi *Klebsiella*. Trong đó, chủng BR12 có mức độ tương đồng cao nhất (99,53%) với loài *Klebsiella variicola*. Do đó, dựa trên kết quả so sánh trình tự 16S rRNA có thể kết luận rằng chủng khuẩn này khả năng cao thuộc loài *Klebsiella variicola*.



**Hình 1. Cây phát sinh chủng loại của chủng BR12**



### 3.3. Kết quả đánh giá một số đặc điểm hóa sinh *in vitro*



Hình 2. Khả năng phân giải P, K, N của chủng BR12; phân giải P (a); phân giải K (b); cố định đạm (c); Scale = 2 cm

Bảng 2. Đặc tính hóa sinh trong điều kiện *in vitro* của chủng BR12

| STT | Chỉ tiêu hóa sinh trong điều kiện <i>in vitro</i> | Kết quả            |
|-----|---------------------------------------------------|--------------------|
| 1   | Khả năng cố định N (mm)                           | $4,67 \pm 0,03$    |
| 2   | Phân giải P (Chỉ số SI)                           | $1,33 \pm 0,05$    |
| 3   | Phân giải K (Chỉ số SI)                           | $2,25 \pm 0,08$    |
| 4   | Phân giải Ca (Chỉ số SI)                          | $1,24 \pm 0,05$    |
| 5   | Sinh tổng hợp EPS (g/ml)                          | $0,0323 \pm 0,025$ |

Trong kết quả phân tích khả năng phân giải lân đã ghi nhận chủng BR12 chỉ số phân giải P (SI) ở mức  $1,33 \pm 0,05$  (Hình 2a; bảng 2). Tương tự trong nghiên cứu của Duran và cs (2021) [17] chủng vi khuẩn *Klebsiella variicola* từ thành phố Đại Khánh, tỉnh Hắc Long Giang, Trung Quốc cho thấy, khả năng phân giải lân đạt 146,08% trong mẫu đất chứa vi khuẩn so với mẫu đất đối chứng. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Bhanja và cs (2021) cho thấy, nhóm gen *pqqA-F*-cụm gen tổng hợp cofactor pyrroloquinoline quinone (PQQ) cần thiết để enzyme glucose dehydrogenase (Gcd) hoạt động để phân giải phosphate không hòa tan  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  về P dễ tan của chủng vi khuẩn này [18]. Kết quả trên chỉ ra *Klebsiella variicola* có một trong những đặc tính nổi bật của nhóm vi khuẩn PGPR, giúp tăng cường dinh dưỡng và hỗ trợ hiệu quả cho sự phát triển của cây trồng.

Một số chủng khuẩn vùng rễ có thể phân giải được canxi khó tan về dạng dễ tan cho cây hấp thụ, đặc biệt là  $\text{CaCO}_3$  và  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  tồn tại nhiều trong đất.

Ở khả năng phân giải canxi (Ca), chỉ số SI của chủng BR12 đạt  $1,24 \pm 0,05$  (Hình 2b; bảng 2). Kết quả nghiên cứu của Biswas và cs (2023) [19] cho thấy, chi *Klebsiella* có khả năng phân giải Ca nhưng ở mức thấp so với chi *Bacillus*.

Với khả năng cố định đạm, chủng BR12 được nuôi cấy trên môi trường Ashby không chứa đạm và ghi nhận sự phát triển của khuẩn lạc với đường kính khuẩn lạc  $4,67 \pm 0,03$  (mm) (Hình 2c; bảng 2). Điều này cho thấy, chủng BR2 có khả năng tự cố định đạm, đây là tiêu chí quan trọng với các chủng vi khuẩn nhóm PGPR. Kết quả nghiên cứu của Naik và cs (2023) [20] cho thấy, các nhóm vi khuẩn vùng rễ, như: *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Diazotrophicus*, *Cyanobacter*, đều được ghi nhận có khả năng cố định đạm (N) và cung cấp nguồn đạm quan trọng cho cây trồng. Nghiên cứu của Wang và cs (2022) [21] cho thấy, khả năng cố định đạm là một đặc điểm nổi bật của loài *Klebsiella variicola*. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Duran và cs (2021) cho thấy, genomic xác nhận các chủng *K. variicola* đều mang cụm 20 gen *nif* biểu hiện chức năng hỗ trợ trao đổi và cố định đạm [17]. Do đó, kết quả nghiên cứu này một lần nữa khẳng định tiềm năng kích thích sinh trưởng đối với cây trồng của của chi *Klebsiella* thông qua đặc tính cố định đạm.

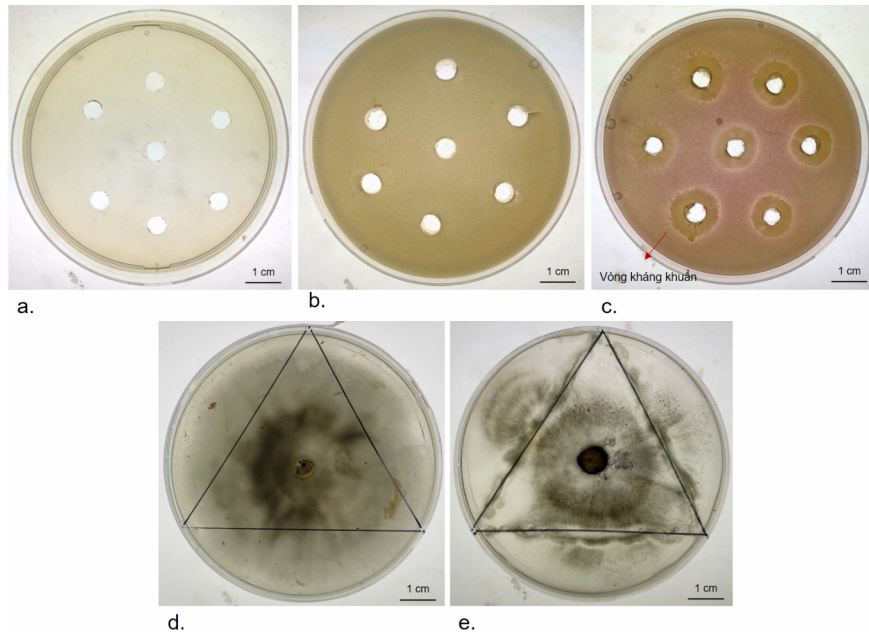
EPS có vai trò quan trọng trong việc bảo vệ tế bào vi khuẩn khỏi các điều kiện khắc nghiệt (như stress do muối, nhiệt độ cao, hoặc sự tấn công của vi



sinh vật khác). Với khả năng tạo màng sinh học, kết quả nghiên cứu này đã ghi nhận chủng BR12 có khả năng sinh tổng hợp EPS ở mức  $0,0323 \pm 0,025$  (g/ml) (Bảng 2). Kết quả nghiên cứu này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Kusale và cs (2021) [22], theo đó chủng *Klebsiella variicola* N6 với lượng EPS đạt 0,0322 g/ml ở điều kiện thường và đạt tối đa 0,0722 g/ml ở nồng độ muối 120 mM NaCl. Kết quả nghiên cứu của Patro và cs (2019) cho thấy, *K. variicola* có

đầy đủ hệ thống gen *cps-Wzx/Wzy-Wza/Wzb/Wzc/Wzi*, nên có khả năng tổng hợp EPS mạnh, ảnh hưởng đến mucoidy, biofilm và khả năng thích nghi với môi trường [23]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tiềm năng sử dụng chủng vi khuẩn BR2 với cây trồng trong các điều kiện bất lợi.

### 3.4. Kết quả đánh giá một số kháng vi sinh vật gây bệnh hại trên cam *in vitro*



Hình 3. Khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh trên cam trong điều kiện *in vitro* của chủng BR12; đĩa môi trường LB đặc (a); chủng khuẩn *Pseudomonas syringae* (b); khả năng kháng *Pseudomonas syringae* của chủng khuẩn BR12 (c); chủng nấm *Colletotrichum gloeosporioides* (d); khả năng kháng nấm *Colletotrichum gloeosporioides* của chủng khuẩn BR12 (e); Scale = 1 cm

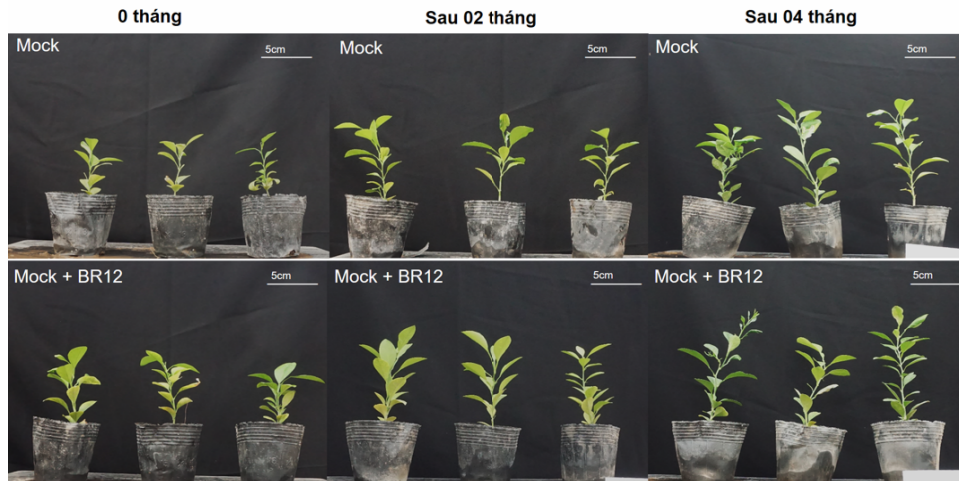
Trong thí nghiệm đối kháng khuẩn *Pseudomonas syringae* – tác nhân gây bệnh đốm lá vi khuẩn phổ biến trên cây cam, chủng vi khuẩn tiềm năng BR12 kháng chủng *P. syringae* cao với chỉ số đối kháng đạt  $3,06 \pm 0,39$ . Cho đến nay, vẫn chưa có nghiên cứu nào được ghi nhận về sự đối kháng giữa 2 chủng vi khuẩn này. Kết quả là phát hiện mới trong kiểm soát sinh học với vi khuẩn gây bệnh đốm lá trên cây cam bằng cách áp dụng chủng vi khuẩn tiềm năng BR12. Trong khi đó, chủng vi khuẩn BR12 không có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum gloeosporioides* – chủng nấm gây bệnh thán thư trên cam (Hình 3). Những phát hiện trên không chỉ góp phần làm rõ khả năng đối kháng của BR12 mà còn mở ra tiềm năng các nghiên cứu sâu hơn về ứng dụng chủng này trong phòng ngừa các tác nhân gây hại trên cây có múi.

### 3.5. Kết quả đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng trên cây cam ở điều kiện nhà lưới

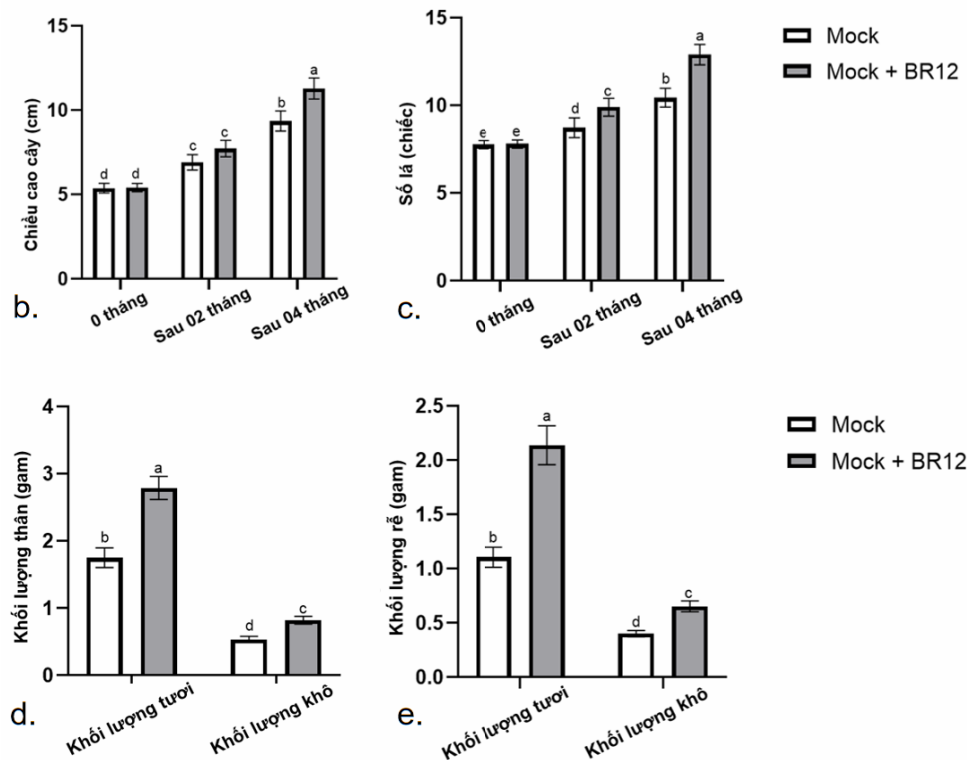
Trong các nghiên cứu trong và ngoài nước, *Klebsiella variicola* đã được ghi nhận có khả năng kích thích sinh trưởng đối với nhiều loại cây trồng [24]. Từ kết quả phân tích các đặc tính hóa sinh của chủng BR12 trong điều kiện *in vitro*, nhóm tác giả đã tiến hành thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của chủng vi khuẩn tiềm năng này tới sự phát triển của cây cam ở huyện Cao Phong trong điều kiện nhà lưới. Kết quả cho thấy, cây cam được lây nhiễm vi khuẩn BR12 có khả năng sinh trưởng tốt hơn so với cây đối chứng không lây nhiễm (Hình 4a). Cụ thể, chiều cao cây cam tăng lên 1,11 lần sau 2 tháng và 1,21 lần sau 4 tháng thí nghiệm so với cây đối chứng. Số lá mới của cây cam lây nhiễm BR12 cũng cao hơn so với cây đối chứng lần lượt 1,14 lần sau 2 tháng và 1,24 lần sau 4 tháng thí nghiệm (Hình 5b, c).

Kết quả đánh giá khối lượng tươi, khô của thân và rễ sau 4 tháng theo dõi trong điều kiện nhà lưới được thể hiện ở hình 5d, e. Trong đó, khối lượng tươi của thân và rễ thu được ở công thức lây nhiễm chủng khuẩn BR12 cao hơn lần lượt 56,62% và 93,63% so với cây đối chứng. Tương tự, khối lượng khô của thân và rễ ở công thức này cũng cao hơn lần lượt 54,71% và 62,51% so với cây đối chứng. Điều này chứng tỏ tác dụng tích cực của chủng khuẩn BR12 trong việc cải thiện sự phát triển tổng thể của cây cam, đặc biệt là

đối với sự gia tăng khối lượng tươi và khô của thân và rễ. Trong các nghiên cứu trước đây trên cây ngô [25] và cây khoai tây [26], các chủng vi khuẩn thuộc loài *K. variicola* được khẳng định có khả năng kích thích sinh trưởng. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu về tác dụng của chủng này trên cây cam quýt hay cây thân gỗ khác. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, tiềm năng của chủng *K. variicola* trong nghiên cứu và ứng dụng trên các đối tượng cây trồng khác nhau.



a.



Hình 4. Khả năng kích thích sinh trưởng cây cam tại huyện Cao Phong trong điều kiện không và có lây nhiễm chủng vi khuẩn BR12 sau 4 tháng: Chiều cao cây (a); số lá (b); khối lượng thân tươi và khô (c); khối lượng rễ tươi và khô (d); khả năng phát triển của cây (e); Scale = 5 cm

**4. KẾT LUẬN**

Qua sàng lọc các chủng vi khuẩn phân lập từ vùng rễ cây cam tại huyện Cao Phong, tỉnh Hòa Bình, nhóm tác giả đã phân lập được chủng vi khuẩn *Klebsiella variicola* BR12 với các đặc tính quan trọng như khả năng cố định đạm, phân giải lân, kali và đối kháng chủng vi khuẩn *Pseudomonas syringae*. Kết quả thực nghiệm khẳng định chủng BR12 có khả năng kích thích sinh trưởng đối với cây cam trong điều kiện nhà lưới. Đây là chủng vi khuẩn tiềm năng để tiếp tục phát triển và ứng dụng trong chăm sóc cây cam tại huyện Cao Phong, tỉnh Hòa Bình nói riêng cũng như mở rộng áp dụng cho các cây trồng khác trong tương lai.

**LỜI CẢM ƠN**

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài với mã số TĐCPVS.02/23-25 và sử dụng các trang thiết bị tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Silalahi, J. (2002). Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 11(1), 79 - 84.
2. Phạm Hồng Hiến, Nguyễn Thị Chúc Quỳnh, Phùng Quang Tùng, Bạch Thị Diệp, Nguyễn Xuân Cảnh (2021). Nấm Phytophthora gây bệnh trên cây cam tại một số vùng trồng chính của Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 8(129), 61 - 68.
3. Trần Thị Tường Linh, Trần Hồng Anh, Nguyễn Thị Ngọc Phương (2017). Ứng dụng phân bón lá sinh học chiết xuất từ Trùn quế (*Perionyx excavatus*) trong canh tác rau an toàn tại hộ gia đình ở nội thành. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Sư phạm thành phố Hồ Chí Minh*, 14(3), 182 - 188.
4. Chu Nguyên Thanh, Nguyễn Yến Nhi, Đào Ngọc Diệp, Trần Thị Hoài Bảo, Hoàng Thị Thanh Minh, Bùi Văn Lệ (2018). Đánh giá khả năng kích thích tăng trưởng thực vật của hai chủng *Pseudomonas* phân lập từ vùng rễ cây bắp. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ: Chuyên san Khoa học tự nhiên*, 2(2), 38 - 46.
5. De Andrade, L. A. (2023). Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. *Microorganisms*, 11(4), 1088.
6. Huy, P. Q., Tuong, H. M., Hoa, T. T., Manh, N. V., Ha, C. H., Phat, D. T. (2023). Isolation and characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose on sweet orange (*Citrus sinensis*) at Cao Phong, Hoa Binh. *The 22nd national conference of phytopathological society of Vietnam*, 22, 21 - 23.
7. Njoloma, J. P. B. (2022). Isolation of endophytic bacteria from leaves, stems, or roots. In *Endophytic Microbes: Isolation, Identification, and Bioactive Potentials* (pp. 3 - 6). New York, NY: Springer US.
8. Nguyễn Văn Giang, Phạm Phương Thu, Chu Đức Hà, Nguyễn Thị Thanh Mai (2018). Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn phân giải lân, kali khó tan từ đất trồng cà phê tại khu vực Tây Nguyên. *Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 60(5), 34 - 38.
9. Nguyễn Thị Thu Hằng, Nguyễn Thanh Tuyền, Trương Quỳnh Như, Nguyễn Trọng Ngữ (2023). Khảo sát sự hiện diện của vi bào tử trùng *Enterocytozoon heparopenaei* (EHP) trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) nuôi ở tỉnh Kiên Giang. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ*, 59(3), 149 - 160.
10. Peper, A., Newton, C. J., Lim, S., Zheng, W., Brenneman, T., Yang, L. (2024). Functional characterization of core and unique calcite-dissolving bacteria communities from peanut fields. *Phytopathology*, 114(5), 1011 - 1019.
11. Tian, A., Gong, Q. (2023). Endophytic bacterial communities in wild rice (*Oryza officinalis*) and their plant growth-promoting effects on perennial rice. *Frontiers in Plant Science*, 14, <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1184489>.
12. Huỳnh Văn Trương, Lý Tú Hương, Nguyễn Hữu Hiệp (2019). Phân lập và định danh vi khuẩn nội sinh ở cây diếp cá (*Houttuynia cordata* Thunb) tại

tỉnh Kiên Giang có hoạt tính kháng khuẩn với vi khuẩn *Staphylococcus aureus* từ mụn nhọt ở người. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ*, 55, 166 - 173.

13. Klock, J. H., Wieland, A., Seifert, R., & Michaelis, W. (2007). Extracellular polymeric substances (EPS) from cyanobacterial mats: characterisation and isolation method optimisation. *Marine Biology*, 152, 1077 - 1085.

14. Balouri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71 - 79.

15. Cui, Y., Zhu, Y., Dong, G., Li, Y., Xu, J., Cheng, Z., ... Yu, X. (2024). Evaluation of the control efficacy of antagonistic bacteria from V-Ti magnetite mine tailings on kiwifruit brown spots in pot and field experiments. *Frontiers in Microbiology*, 15, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1280333>.

16. Phan Thị Hồng Thảo, Nguyễn Vũ Mai Linh, Nguyễn Văn Hiếu, Nguyễn Thị Hồng Liên (2016). Đặc điểm sinh học và khả năng sinh tổng hợp chất kích thích sinh trưởng thực vật của xạ khuẩn nội sinh *Streptomyces Hebeiensis* TQR8-7. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 54(4A), 31 - 39.

17. Duran-Bedolla, J., Garza-Ramos, U., Rodríguez-Medina, N., Aguilar Vera, A., & Barrios-Camacho, H. (2021). Exploring the environmental traits and applications of *Klebsiella variicola*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52, 2233 - 2245.

18. Bhanja, E., Das, R., Begum, Y., & Mondal, S. K. (2021). Study of pyrroloquinoline quinine from phosphate-solubilizing microbes responsible for plant growth: in silico approach. *Frontiers in Agronomy*, 3, <https://doi.org/10.3389/fagro.2021.667339>.

19. Biswas, S., Philip, I., Jayaram, S., & Sarojini, S. (2023). Endophytic bacteria *Klebsiella* spp. and *Bacillus* spp. from *Alternanthera philoxeroides* in Madiwala Lake exhibit additive plant growth-promoting and biocontrol activities. *Journal of*

*Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00620-8>.

20. Naik, H., Chandarana, K. A., Gamit, H. A., Chandwani, S., & Amaresan, N. (2023). Nutrition and cultivation strategies of core rhizosphere microorganisms. In *Rhizobiome* (209 - 231). *Academic Press*.

21. Wang, D., Sun, L., Yin, Z., Cui, S., Huang, W., & Xie, Z. (2022). Insights into genomic evolution and the potential genetic basis of *Klebsiella variicola* subsp. *variicola* ZH07 reveal its potential for plant growth promotion and autotoxin degradation. *Microbiology Spectrum*, 10(6), <https://doi.org/10.1128/spectrum.00846-22>.

22. Kusale, S. P., Attar, Y. C., Sayyed, R. Z., Malek, R. A., Ilyas, N., Suriani, N. L., ... & El Enshasy, H. A. (2021). Production of plant beneficial and antioxidants metabolites by *Klebsiella variicola* under salinity stress. *Molecules*, 26(7), <https://doi.org/10.3390/molecules26071894>.

23. Patro, L. P. P., Rathinavelan, T. (2019). Targeting the sugary armor of *Klebsiella* species. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00367>.

24. Zhao, M., Li, H., Gan, D., Wang, M., Deng, H., & Yang, Q. E. (2024). Antibacterial effect of phage cocktails and phage-antibiotic synergy against pathogenic *Klebsiella pneumoniae*. *Msystems*, 9(9), <https://doi.org/10.1128/msystems.00607-24>.

25. Thái Thành Được, Nguyễn Hữu Hiệp (2022). Hiệu quả của vi khuẩn cố định đạm sinh học đến sự sinh trưởng và năng suất bắp tại tỉnh Đồng Tháp. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ*, 58(2B): 172 - 184.

26. Đào Thị Hồng Vân, Đỗ Phương Khanh, Nguyễn Văn Hiếu, Nguyễn Mai Chi, Đinh Trường Sơn, Đặng Thị Thanh Tâm (2024). Ảnh hưởng của một số chủng vi khuẩn nội sinh lên sinh trưởng của cây khoai tây giống *Solara in vitro*. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 22(4): 506 - 514.

EVALUATION OF BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION, ANTAGONISTIC ACTIVITY  
AGAINST PHYTOPATHOGENS AND PLANT - GROWTH - PROMOTING  
OF *Klebsiella variicola* BR12 ISOLATED FROM THE ORANGE RHIZOSPHERE

Le Van Manh<sup>1</sup>, Ho Manh Tuong<sup>3</sup>, Pham Quang Huy<sup>1</sup>,  
Nguyen Thi Hong Ha<sup>1</sup>, Tran Thi Hoa<sup>1</sup>, Phan Quyen<sup>1</sup>, Le Thi Thao Linh<sup>1</sup>,  
Chu Hoang Ha<sup>1,2</sup>, Do Tien Phat<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>3</sup>*Faculty of Chemistry and Environment, Thuy Loi University*

**Abstract**

Sweet orange (*Citrus sinensis* L.), a member of the citrus family, holds, high economic value and plays an important role in human nutrition. Among them, Cao Phong variety, cultivated in Hoa Binh province, stands out for its exceptional quality in Vietnam. However, the excessive use of chemical fertilizers and pesticides has resulted in soil compaction, microbial imbalance, pest infestations and nutrient deficiencies. To address these issues, applying Plant Growth - Promoting Rhizobacteria (PGPR) has emerged as a promising solution to improve soil health, enhance plant growth, suppress plant diseases. This study investigated the biochemical characteristics and growth-promoting effects of the strain BR12, isolated from the rhizosphere of orange trees in Cao Phong district, Hoa Binh province. *In vitro* analysis revealed that strain BR12 could fix nitrogen, solubilize phosphorus, potassium, and calcium, produce exopolysaccharides (EPS), and exhibit antagonistic activity against *Pseudomonas syringae*. Under greenhouse conditions, after four months of monitoring, BR12 - infected citrus plants showed a 1.21 - fold increase in height and a 1.24 - fold increase in leaf count compared to control plants. Moreover, BR12 - inoculated orange plants demonstrated significant growth enhancement, with fresh and dry weights of shoots and roots increasing by 56.62%, 93.63%, 54.71% and 62.51%, respectively, compared to the controls. These results highlight BR12 as a promising candidate for promoting plant growth and managing diseases in orange cultivation, providing a foundation for future research and practical applications in sustainable agriculture.

**Keywords:** *Citrus*, *Cao Phong*, *Hoa Binh*, *Klebsiella variicola*, *PGPR*.

**Ngày nhận bài:** 16/4/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 13/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 26/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 25/6/2025



# TỐI ƯU HÓA MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY ĐỂ KÍCH THÍCH KHẢ NĂNG TẠO NỘI BÀO TỬ CỦA VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG *Bacillus pumilus* TG-71 PHÒNG TRỊ BỆNH BẠC LÁ LÚA (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)

Thái Trần Anh Thư<sup>1</sup>, Hồ Xuân Bách<sup>1</sup>, Nguyễn Quang Tiến<sup>1</sup>, Nguyễn Đắc Khoa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Cần Thơ

\*Email: ndkhoa@ctu.edu.vn

## TÓM TẮT

Vi khuẩn đối kháng *Bacillus pumilus* TG-71 được phân lập từ đất ruộng lúa tại tỉnh Tiền Giang có khả năng phòng trị bệnh bạc lá (cháy bìa lá) lúa. Kết quả sàng lọc bằng ma trận Plackett-Burman cho thấy peptone,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  và  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  là 3 thành phần trong môi trường nhân sinh khối có ảnh hưởng đến quá trình tạo nội bào tử của vi khuẩn TG-71. Giá trị của 3 thành phần môi trường này được tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (Response surface methodology, RSM) kết hợp với phương án cấu trúc có tâm (Central composite designs, CCD). Hàm lượng của peptone,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  và  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  lần lượt là 12 g/l, 4 g/l và 2,699 g/l. Mật số nội bào tử của vi khuẩn TG-71 đạt  $9,4 \times 10^6$  (CFU/ml) khi áp dụng các giá trị này để thực hiện môi trường nhân sinh khối vi khuẩn.

**Từ khóa:** *Bacillus pumilus*, ma trận Plackett-Burman, nội bào tử, phương án cấu trúc có tâm (CCD), phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM).

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sử dụng vi sinh vật đối kháng để phòng trị bệnh hại cây trồng nói chung và bệnh bạc lá (cháy bìa lá) lúa nói riêng đang ngày càng được quan tâm, đây được xem là giải pháp có tính bền vững, thân thiện với môi trường và không ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng. Chủng vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71 được phân lập tại tỉnh Tiền Giang, có khả năng đối kháng với mầm bệnh *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh bạc lá lúa [1], đồng thời cho thấy khả năng phòng trị bệnh ngoài đồng ruộng [2]. *Bacillus pumilus* là một trong các chủng vi khuẩn có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật [3]. Bên cạnh đó, các nghiên cứu của Huang và cs (2012), Murugappan và cs (2013), Abdulkareem và cs (2014) và Dobrzyński và cs (2023) [4 - 7] cho thấy, vi khuẩn *Bacillus pumilus* vừa có khả năng kích thích sinh trưởng vừa giúp cây trồng hạn chế sự phát triển của nấm. Vi khuẩn TG-71 thuộc chi *Bacillus*, là một trong số ít chi vi khuẩn có khả năng hình thành nội bào tử trong điều kiện bất lợi (nhiệt độ cao, mất nước, thiếu chất dinh dưỡng, tiếp xúc tia cực tím, tia gamma...) giúp vi khuẩn tồn tại trong thời gian dài [8]. Do vậy,

nghiên cứu môi trường kích thích khả năng tạo nội bào tử của vi khuẩn là hết sức cần thiết nhằm tiết kiệm thời gian và chi phí khi ứng dụng vào sản xuất quy mô lớn. Đầu tiên cần sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo nội bào tử của vi khuẩn. Đã có nhiều nghiên cứu sử dụng phương pháp truyền thống để sàng lọc bằng cách thay đổi từng yếu tố trong khi giữ nguyên các yếu tố còn lại. Phương pháp này tuy đơn giản nhưng tốn nhiều thời gian do số lượng yếu tố khảo sát càng nhiều thì số lượng thí nghiệm cần thực hiện càng tăng và không xác định được sự tương tác giữa các yếu tố [9]. Hiện nay, thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa đa yếu tố theo ma trận Plackett-Burman [10] giúp tiết kiệm thời gian nghiên cứu, giảm thiểu số lượng thí nghiệm cần thực hiện [11] và xác định các yếu tố quan trọng [12]. Sau khi đã sàng lọc được các yếu tố quan trọng, các hàm lượng các yếu tố ảnh hưởng cần được tối ưu theo phương pháp đáp ứng bề mặt (Response surface methodology, RSM) và phương án cấu trúc có tâm (Central composite designs, CCD). Phương pháp này dựa trên cơ sở mô hình hóa toán học với nguyên tắc cơ bản là tiến hành thực nghiệm tại một số điểm của

các yếu tố và mô tả kết quả bằng phương trình hồi quy dạng đa thức bậc 2. Sau đó, phương trình được vẽ trên hệ trục tọa độ một đồ thị dạng mặt – được gọi là bề mặt đáp ứng – với điểm tối ưu là điểm cực trị của đồ thị [13]. Nghiên cứu của Posada-Urbe và cs (2015) [14] đã tối ưu hóa hàm lượng của các thành phần trong môi trường kích thích khả năng tạo nội bào tử của vi khuẩn *Bacillus subtilis* EA-CB0575 bằng ma trận Plackett-Burman kết hợp phương án CCD. Mirmajidi và cs (2024) [15] đã sử dụng phương pháp RSM-CCD tối ưu hóa các yếu tố thời gian, nhiệt độ và pH, tạo điều kiện thuận lợi để vi khuẩn *Bacillus coagulans* sinh nội bào tử. Cùng phương pháp này, Tian và cs (2022) [16] đã tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy nội bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* BSNK-5. Ở Việt Nam, các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào việc tối ưu hóa môi trường nhằm tăng sinh khối để thu lợi khuẩn hoặc hoạt tính sinh học mong muốn. Võ Hồng Phượng và cs (2019) [17] đã nghiên cứu điều kiện tối ưu để thu nội bào tử vi khuẩn *Bacillus subtilis* S5 bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. Trong nghiên cứu này các yếu tố lý hóa ảnh hưởng trực tiếp đến môi trường nhân sinh khối vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71 được sàng lọc bằng ma trận Plackett-Burman và tối ưu hóa theo phương pháp RSM-CCD nhằm xác định điều kiện tốt nhất kích thích khả năng tạo nội bào tử của vi khuẩn này, là cơ sở để ứng dụng vào nhiều lĩnh vực khác nhau.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71 (phân lập tại tỉnh Tiền Giang năm 2015) do nhóm nghiên cứu bệnh học thực vật, Phòng Thí nghiệm Sinh học Phân tử, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ cung cấp.

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu gồm: Glucose, peptone, yeast extract,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  và  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Thiết kế ma trận Plackett-Burman

Thí nghiệm được thiết kế theo ma trận Plackett-Burman [10] với 11 yếu tố (gồm: Glucose, peptone, yeast extract,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  và thời gian) và 12 nghiệm thức để xác định được các yếu tố và mức ảnh hưởng đến khả năng tạo nội bào tử của vi khuẩn TG-71. Mức dưới (-1) và mức trên (+1) của 11 yếu tố được thể hiện ở bảng 1.

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

| Yếu tố   |                                                 | Mức       |           |
|----------|-------------------------------------------------|-----------|-----------|
| Ký hiệu  | Tên yếu tố                                      | Dưới (-1) | Trên (+1) |
| $x_1$    | Glucose (g/l)                                   | 2         | 15        |
| $x_2$    | Peptone (g/l)                                   | 3         | 15        |
| $x_3$    | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/l) | 0,2       | 0,5       |
| $x_4$    | $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (g/l) | 0,5       | 2         |
| $x_5$    | Yeast extract (g/l)                             | 1         | 5         |
| $x_6$    | $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g/l)                  | 1         | 5         |
| $x_7$    | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/l)              | 0,5       | 2         |
| $X_8$    | $\text{CaCl}_2$ (g/l)                           | 0,5       | 1         |
| $X_9$    | $\text{ZnSO}_4$ ( $\mu\text{l/l}$ )             | 0         | 300       |
| $X_{10}$ | $\text{FeSO}_4$ (ml/l)                          | 0         | 1,2       |
| $X_{11}$ | Thời gian (giờ)                                 | 48        | 72        |

Tất cả 11 yếu tố kể trên được nhập vào phần mềm Design-Expert 10.0.1.0® và phần mềm cho ra ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman như ở bảng 2.

**Bảng 2. Ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman**

| Nghiệm thức | Các biến |       |       |       |       |       |       |       |       |          |          |
|-------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|----------|
|             | $X_1$    | $X_2$ | $X_3$ | $X_4$ | $X_5$ | $X_6$ | $X_7$ | $X_8$ | $X_9$ | $X_{10}$ | $X_{11}$ |
| 1           | 15       | 15    | 0,2   | 2     | 5     | 5     | 0,5   | 0,5   | 0     | 1,2      | 48       |
| 2           | 2        | 15    | 0,5   | 0,5   | 5     | 5     | 2     | 0,5   | 0     | 0        | 72       |

|    |    |    |     |     |   |   |     |     |     |     |    |
|----|----|----|-----|-----|---|---|-----|-----|-----|-----|----|
| 3  | 15 | 3  | 0,5 | 2   | 1 | 5 | 2   | 1   | 0   | 0   | 48 |
| 4  | 2  | 15 | 0,2 | 2   | 5 | 1 | 2   | 1   | 300 | 0   | 48 |
| 5  | 2  | 3  | 0,5 | 0,5 | 5 | 5 | 0,5 | 1   | 300 | 1,2 | 48 |
| 6  | 2  | 3  | 0,2 | 2   | 1 | 5 | 2   | 0,5 | 300 | 1,2 | 72 |
| 7  | 15 | 3  | 0,2 | 0,5 | 5 | 1 | 2   | 1   | 0   | 1,2 | 72 |
| 8  | 15 | 15 | 0,2 | 0,5 | 1 | 5 | 0,5 | 1   | 300 | 0   | 72 |
| 9  | 15 | 15 | 0,5 | 0,5 | 1 | 1 | 2   | 0,5 | 300 | 1,2 | 48 |
| 10 | 2  | 15 | 0,5 | 2   | 1 | 1 | 0,5 | 1   | 0   | 1,2 | 72 |
| 11 | 15 | 3  | 0,5 | 2   | 5 | 1 | 0,5 | 0,5 | 300 | 0   | 72 |
| 12 | 2  | 3  | 0,2 | 0,5 | 1 | 1 | 0,5 | 0,5 | 0   | 0   | 48 |

Các yếu tố ảnh hưởng đến mật số nội bào tử được xác định thông qua hệ số ảnh hưởng. Hệ số ảnh hưởng (E) của yếu tố thứ i được tính bằng công thức:

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

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

Nếu hệ số ảnh hưởng của một yếu tố mang giá trị dương, nghĩa là yếu tố đó ảnh hưởng nhiều hơn ở mức trên và ngược lại, yếu tố ảnh hưởng mang giá trị âm thì yếu tố đó ảnh hưởng nhiều hơn ở mức dưới đối với kết quả khảo sát [18, 19].

**Huyền phù vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71:** Vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71 được nuôi tăng sinh trên môi trường Nutrient Agar (NA) [20] và ủ ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ. Huyền phù vi khuẩn TG-71 được chuẩn bị bằng cách dùng que cấy đầu tròn thu tế bào vi khuẩn cho vào 100 ml dung dịch Nutrient Broth và tiến hành ủ lắc ở tốc độ 130 rpm, 30°C.

**Môi trường nuôi cấy kích thích khả năng tạo nội bào tử:** Môi trường nuôi cấy kích thích khả năng tạo nội bào tử được chuẩn bị với các nồng độ và thời gian ủ lắc khác nhau dựa theo ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman (Bảng 2). Trong đó, glucose được lọc bằng đầu lọc vi khuẩn để tránh hỏng.  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  và  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  được thanh trùng riêng biệt để tránh kết tủa với các muối có gốc  $SO_4^{2-}$ . Các

thành phần còn lại (gồm: Peptone, yeast extract,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  và  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) được hòa tan vào nước cất, khử trùng ở 121°C, 1 atm, để nguội và bổ sung glucose,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  và  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ . Mười mililit huyền phù vi khuẩn TG-71 (được hiệu chỉnh về mật số  $1,2 \times 10^8$  CFU/ml dựa vào đường chuẩn mật số được xây dựng theo giá trị hấp thụ quang phổ ở bước sóng 600 nm theo Nguyễn Huỳnh Nhã Uyên và cs (2018) [21] được cho vào 90 ml môi trường đã thanh trùng, hỗn hợp được cho vào túi vô trùng, cột kĩ, lắc ủ ở tốc độ 130 rpm, 30°C trong 48 hoặc 72 giờ (tùy mỗi nghiệm thức).

**Xác định mật số tế bào và mật số nội bào tử:** Mật số tế bào và mật số nội bào tử được xác định bằng phương pháp trải đếm. Sau thời gian ủ lắc, đồng nhất 1 ml dung dịch môi trường chứa trong túi vô trùng với 9 ml nước cất và pha loãng lần lượt về dãy nồng độ  $10^3 - 10^7$ . Trải đều 50  $\mu$ l huyền phù ở mỗi nồng độ pha loãng trên đĩa môi trường NA bằng que tam giác (lập lại 3 lần). Sau khi ủ 48 giờ ở nhiệt độ 28°C đếm số khuẩn lạc được hình thành. Kết quả này dùng để xác định tổng mật số của tế bào sống và mật số nội bào tử.

Mật số nội bào tử được xác định bằng cách đồng nhất 1 ml dung dịch môi trường với 9 ml nước cất và đun ở nhiệt độ 80°C trong 20 phút. Phương pháp sốc nhiệt ở giai đoạn này tạo điều kiện cho tế bào sinh dưỡng chuyển sang dạng nội bào tử [14]. Hỗn hợp sau khi đun được pha loãng và trải đếm tương tự.

**2.2.2. Tối ưu hóa môi trường bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (Response surface methodology) - Phương án cấu trúc có tâm (Central composite design)**

Từ thí nghiệm sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến mật số nội bào tử bằng ma trận Plackett-Burman, chọn ra 3 yếu tố ảnh hưởng chính. Thí nghiệm này nhằm tối ưu hóa và đánh giá sự tương tác của 3 yếu tố được chọn ở 5 mức ( $-\alpha$ , -1, 0, +1,  $+\alpha$ ) bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) kết hợp phương án cấu trúc có tâm (CCD), gồm 20 thí nghiệm.

Từ kết quả thực nghiệm, phần mềm sẽ đưa ra mô hình đáp ứng của 3 yếu tố ảnh hưởng đến mật số nội bào tử. Hàm đáp ứng được chọn là mật số nội 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.

**2.2.3. Kiểm định mô hình trên thực tế**

Dựa vào kết quả thực nghiệm từ thí nghiệm tối ưu hóa bằng phương pháp RSM-CCD, phần mềm Design-Expert 10.0.1.0® phân tích và đề xuất phương án thực hiện để thu được mật số nội bào tử vi khuẩn TG-71 cao nhất dựa trên 3 thành phần ảnh hưởng đến môi trường nhân sinh khối vi khuẩn. Thí nghiệm kiểm định mô hình được thực hiện với 3 lần lặp lại.

**2.2.4. Xử lý số liệu**

Sử dụng phần mềm Design-Expert (phiên bản 10.0.1.0, Copyright© 2016, Stat-Ease Inc., USA) để phân tích phương sai (ANOVA), tính toán hệ số của phương trình hồi quy và đề xuất giải pháp cho mô hình tối ưu hóa mật số nội bào tử vi khuẩn TG-71.

**3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Kết quả sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến mật số tế bào vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71 trên môi trường nuôi cấy**

Dựa theo ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman, hầu hết các nghiệm thức đều có mật số tế bào vi khuẩn trên  $10^8$  CFU/ml. Mật số tế bào ghi nhận đạt giá trị cao nhất ở nghiệm thức 2 ( $1,5 \times 10^9$  CFU/ml) và thấp nhất ở nghiệm thức 8 (chỉ đạt  $9 \times 10^7$  CFU/ml) (Bảng 3).

**Bảng 3. Kết quả mật số tế bào và mật số nội bào tử vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71**

| Nghiệm thức                            | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |
|----------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Mật số tế bào<br>(x $10^9$ CFU/ml)     | 0,85 | 1,50 | 0,15 | 0,60 | 0,48 | 1,20 | 0,22 | 0,09 | 0,14 | 1,10 | 0,34 | 0,38 |
| Mật số nội bào tử<br>(x $10^6$ CFU/ml) | 0,35 | 7,2  | 9,3  | 1,2  | 1,2  | 0,75 | 7,3  | 0,81 | 0,18 | 1,2  | 0,81 | 1,8  |

Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Posada-Urbe và cs (2015) [14], mật số tế bào cao nhất đạt  $2 \times 10^9$  CFU/ml. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của Monteiro và cs (2005) [22] thu được mật số

cao hơn ( $2,6 \times 10^9$  -  $2,2 \times 10^{10}$  CFU/ml).

Sự khác biệt về mật số tế bào vi khuẩn TG-71 giữa các nghiệm thức cho thấy, mật số vi khuẩn chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố khảo sát.

**Bảng 4. Kết quả ảnh hưởng của các yếu tố đối với mật số tế bào và mật số nội bào tử vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71**

| Yếu tố         |         | Mức  |      | Mức độ ảnh hưởng đến mật số tế bào |         | Mức độ ảnh hưởng đến mật số nội bào tử |         |
|----------------|---------|------|------|------------------------------------|---------|----------------------------------------|---------|
|                |         | Trên | Dưới | Ảnh hưởng                          | P-Value | Ảnh hưởng                              | P-Value |
| X <sub>1</sub> | Glucose | 15   | 2    | -0,02800                           | 0,0008  | -0,01100                               |         |
| X <sub>2</sub> | Peptone | 15   | 3    | 0,00497                            | 0,0225  | -0,02700                               | 0,0478  |

|                 |                                                 |     |     |          |        |          |        |
|-----------------|-------------------------------------------------|-----|-----|----------|--------|----------|--------|
| X <sub>3</sub>  | MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 0,5 | 0,2 | 0,00106  |        | 0,00619  |        |
| X <sub>4</sub>  | MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O            | 2   | 0,5 | 0,01400  | 0,0029 | -0,00840 |        |
| X <sub>5</sub>  | Yeast extract                                   | 5   | 1   | 0,01300  | 0,0034 | 0,01200  |        |
| X <sub>6</sub>  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 5   | 1   | 0,00447  | 0,0276 | 0,00899  |        |
| X <sub>7</sub>  | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 2   | 0,5 | -0,00018 |        | 0,02300  | 0,0790 |
| X <sub>8</sub>  | CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O            | 1   | 0,5 | -0,01200 | 0,0037 | 0,02700  | 0,0447 |
| X <sub>9</sub>  | ZnSO <sub>4</sub>                               | 300 | 0   | -0,00922 | 0,0067 | -0,04000 | 0,0102 |
| X <sub>10</sub> | FeSO <sub>4</sub>                               | 1,2 | 0   | 0,00872  | 0,0075 | -0,02800 | 0,0441 |
| X <sub>11</sub> | Thời gian                                       | 96  | 48  | 0,00652  | 0,0133 | 0,01600  |        |
| R <sup>2</sup>  |                                                 |     |     |          | 0,9992 | 0,8607   |        |
| %CV             |                                                 |     |     |          | 0,14   | 2,39     |        |

Bảng 4 cho thấy, các yếu tố ảnh hưởng đến mật số tế bào được chia thành 2 nhóm: Yếu tố ảnh hưởng ở mức trên (gồm peptone, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, yeast extract, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O và thời gian) và yếu tố ảnh hưởng ở mức dưới (gồm glucose, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O và ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O). Các yếu tố glucose, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, yeast extract và CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O có ảnh hưởng lớn đến mật số tế bào vi khuẩn TG-71, trong đó glucose ảnh hưởng lớn nhất (-0,02800).

Glucose là nguồn cung cấp các-bon cho quá trình chuyển hóa trong tế bào của vi khuẩn, làm tăng mật số tế bào sinh dưỡng [23] và tăng khả năng hô hấp của tế bào [24]. Ion Mn<sup>2+</sup> trong MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O có thể ảnh hưởng đến biểu hiện gen hoặc hoạt động của một số enzyme liên quan đến quá trình tổng hợp vỏ của nội bào tử [25]. Yeast extract là hỗn hợp chứa nhiều chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của vi khuẩn. Ca<sup>2+</sup> là thành phần quan trọng trong cấu tạo của màng tế bào vi khuẩn; đồng thời, ion này còn tham gia vào quá trình nhân đôi ADN, vận chuyển các loại đường và protein [26].

### 3.2. Kết quả sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến mật số nội bào tử vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71 trên môi trường nuôi cấy

Kết quả mật số nội bào tử thực hiện theo ma trận Plackett-Burman nằm trong khoảng từ 3,5 x 10<sup>5</sup> đến 9,3 x 10<sup>6</sup> (CFU/ml). Trong đó mật số nội bào tử vi

khuẩn TG-71 được ghi nhận cao nhất ở nghiệm thức 3 (9,3 x 10<sup>6</sup> CFU/ml) và thấp nhất của nghiệm thức 1 (3,5 x 10<sup>5</sup> CFU/ml) (Bảng 3).

Dựa theo mức độ ảnh hưởng của các yếu tố đến mật số nội bào tử vi khuẩn TG-71 thể hiện trong bảng 4, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O và (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> có ảnh hưởng lớn ở mức trên và ZnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> có ảnh hưởng lớn ở mức dưới. Tuy nhiên, qua biểu đồ phân tích của phần mềm cho thấy, cả ZnSO<sub>4</sub> và FeSO<sub>4</sub> đều có ảnh hưởng tiêu cực (ức chế) đến quá trình hình thành nội bào tử vi khuẩn TG-71. Vì vậy, ngoài CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O và (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, peptone là yếu tố thứ 3 được chọn cho thí nghiệm tối ưu hóa môi trường bằng phương pháp RSM-CCD (dựa vào hệ số ảnh hưởng ở mức dưới).

Nhân nội bào tử nằm ở trung tâm và chứa thông tin di truyền của vi khuẩn, protein nhỏ hòa tan trong axit (SASP), dipicolinic axit (DPA), ribosome và có đặc tính ngủ đông. Phức CaDPA được hình thành từ liên kết giữa cation Ca<sup>2+</sup> và DPA [27]. Phức chất này có chức năng bảo vệ nhân nội bào tử trong các điều kiện vật lý và hóa học khắc nghiệt. Khi gặp môi trường có chất dinh dưỡng phù hợp, hợp chất này sẽ được giải phóng khỏi màng nhân và nội bào tử sẽ bước vào giai đoạn nảy mầm. Peptone được xem là nguồn cung cấp đạm chính, tạo điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn phát triển và tăng nhanh về số lượng [28].



**3.3. Kết quả tối ưu hóa môi trường bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (Response surface methodology) - Phương án cấu trúc có tâm (Central composite design)**

Thí nghiệm RSM-CCD được tiến hành để xác định mối liên hệ giữa các yếu tố được chọn và giá trị tối ưu. Thí nghiệm được bố trí gồm 20 nghiệm thức được tổ hợp từ các giá trị ở mức trên và mức dưới của từng yếu tố (Bảng 5).

**Bảng 5. Giá trị các yếu tố dùng trong phương pháp RSM-CCD**

| Tên yếu tố                                            | Phạm vi nghiên cứu | Mức |    |     |    |      |
|-------------------------------------------------------|--------------------|-----|----|-----|----|------|
|                                                       |                    | -α  | -1 | 0   | +1 | +α   |
| Peptone (g/l)                                         | 3,9 - 14,1         | 3,9 | 6  | 9   | 12 | 14,1 |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/l) | 2,6 - 9,4          | 2,6 | 4  | 6   | 8  | 9,4  |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (g/l)            | 1,7 - 3,3          | 1,7 | 2  | 2,5 | 3  | 3,3  |

Kết quả tối ưu hóa cho mật số nội bào tử trong khoảng từ  $0,145 \times 10^6 - 9,6 \times 10^6$  CFU/ml và đạt mật số cao nhất là  $9,6 \times 10^6$  CFU/ml khi hàm lượng của peptone, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O lần lượt là 9 g/l, 6 g/l và 1,7 g/l.

Sau khi phân tích thực nghiệm RSM-CCD, phần mềm đề xuất phương trình đa thức bậc hai để dự đoán mật số nội bào tử vi khuẩn TG-71 như sau:

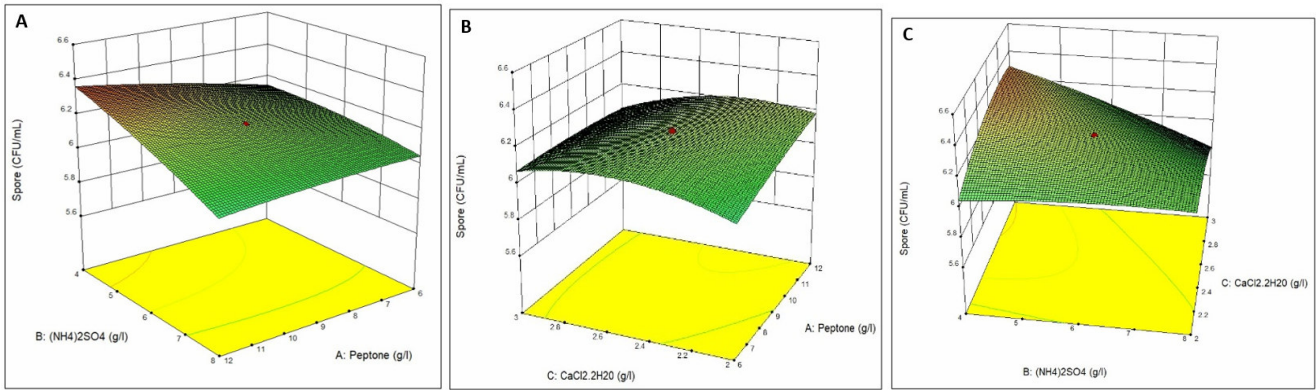
$$Y = 0,613 + 0,184x_1 + 0,438x_2 + 2,844x_3 - 0,001x_1^2 - 0,005x_2^2 - 0,353x_3^2 - 0,01x_1x_2 - 0,033x_2x_3 - 0,133x_1x_3$$

Trong đó: Y là mật số nội bào tử (CFU/ml), x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub>, x<sub>3</sub> lần lượt là peptone, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O.

Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) của thí nghiệm tối ưu hóa được trình bày trong bảng 6. với giá trị p-value của mô hình đạt 0,007 (có ý nghĩa thống kê) cho thấy, mô hình có độ phù hợp tốt. Hệ số hồi quy (R<sup>2</sup>) đạt 0,83 chứng tỏ số liệu thực nghiệm tương thích 83,07% với số liệu tiên đoán của mô hình. Hệ số R<sup>2</sup> điều chỉnh là 0,68 cũng chứng tỏ mô hình có ý nghĩa. Ngoài ra hệ số biến thiên còn xác định mức độ tin cậy của thí nghiệm. Trong thí nghiệm này, giá trị CV đạt 0,93 cho thấy, thí nghiệm thực hiện đáng tin cậy.

**Bảng 6. Kết quả phân tích phương sai ANOVA trong thí nghiệm tối ưu hóa theo phương pháp RSM-CCD**

|                                                                  | Tổng bình phương       | df | Trung bình bình phương | F-Value | P-Value |
|------------------------------------------------------------------|------------------------|----|------------------------|---------|---------|
| Mô hình                                                          | $2,611 \times 10^{-3}$ | 9  | $2,901 \times 10^{-4}$ | 5,45    | 0,0070  |
| x <sub>1</sub> – Peptone                                         | $1,229 \times 10^{-4}$ | 1  | $1,229 \times 10^{-4}$ | 2,31    | 0,1594  |
| x <sub>2</sub> – (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | $8,722 \times 10^{-4}$ | 1  | $8,722 \times 10^{-4}$ | 16,4    | 0,0023  |
| x <sub>3</sub> – CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O            | $1,146 \times 10^{-5}$ | 1  | $1,146 \times 10^{-5}$ | 0,22    | 0,6525  |
| x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>                                    | $1,625 \times 10^{-4}$ | 1  | $1,625 \times 10^{-4}$ | 3,06    | 0,1110  |
| x <sub>1</sub> x <sub>3</sub>                                    | $1,078 \times 10^{-4}$ | 1  | $1,078 \times 10^{-4}$ | 2,03    | 0,1850  |
| x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>                                    | $7,397 \times 10^{-4}$ | 1  | $7,397 \times 10^{-4}$ | 13,91   | 0,0039  |
| x <sub>1</sub> <sup>2</sup>                                      | $1,375 \times 10^{-5}$ | 1  | $1,375 \times 10^{-5}$ | 0,26    | 0,6222  |
| x <sub>2</sub> <sup>2</sup>                                      | $4,459 \times 10^{-5}$ | 1  | $4,459 \times 10^{-5}$ | 0,84    | 0,3814  |
| x <sub>3</sub> <sup>2</sup>                                      | $5,744 \times 10^{-4}$ | 1  | $5,744 \times 10^{-4}$ | 10,80   | 0,0082  |
| Sự không phù hợp                                                 | $5,316 \times 10^{-4}$ | 5  | $1,063 \times 10^{-4}$ | 1757,87 | <0,0001 |
| R <sup>2</sup>                                                   | 0,68                   |    |                        |         |         |
| CV (%)                                                           | 0,93                   |    |                        |         |         |



Hình 1. Biểu đồ đáp ứng bề mặt của mật số nội bào tử vi khuẩn *Bacillus pumilus* TG-71 theo từng cặp yếu tố

(A: Peptone và  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; B: Peptone và  $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ ; C:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  và  $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ )

Mỗi hình không gian 3 chiều thể hiện sự tương tác của 2 trong 3 yếu tố khảo sát, yếu tố còn lại được cố định ở giá trị mức (0) (giá trị trung tâm của yếu tố được thể hiện trong bảng khảo sát) (Hình 1).

Mật số nội bào tử của vi khuẩn TG-71 tăng tỉ lệ thuận với nồng độ peptone (Hình 1A và 1B). Bên cạnh đó,  $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$  cũng ảnh hưởng tích cực đến quá trình tạo nội bào tử, mật số nội bào tử đạt cực đại khi  $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$  đạt nồng độ 3 g/l (Hình 1B). Ngược lại, mật số nội bào tử vi khuẩn tăng tỉ lệ nghịch với  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  và đạt cực đại khi yếu tố có nồng độ 4 g/l (Hình 1A). Tóm lại, kết quả thực nghiệm phù hợp với kết quả tiên đoán của mô hình đưa ra và qua đó xác định được sự tương tác của  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  và  $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$  có ảnh hưởng lớn đến mật số nội bào tử vi khuẩn TG-71.

### 3.4. Kết quả thí nghiệm kiểm định mô hình tối ưu hóa

Từ kết quả tối ưu hóa môi trường nuôi cấy bằng phương pháp RSM-CCD, phần mềm Design-Expert 10.0.1<sup>®</sup> đã đưa ra mô hình dự đoán, khi hàm lượng các yếu tố peptone,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  và  $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$  đạt các giá trị lần lượt là 12 g/l, 4 g/l và 2,699 g/l thì mật số nội bào tử vi khuẩn TG-71 đạt mức cao nhất  $9,4 \times 10^6$  (CFU/ml). Dựa vào hàm lượng của các thành phần trong môi trường nhân sinh khối trên, thí nghiệm kiểm định mô hình được thực hiện bằng phương pháp trải đếm với 3 lần lặp lại. Sau 72 giờ, mật số nội bào tử thu được là  $9,4 \times 10^6$  (CFU/ml). Kết quả này tương thích với mật số nội bào tử phần mềm đã dự đoán.

### 4. KẾT LUẬN

Bằng ma trận Plackett-Burman và phương pháp RSM-CCD, đã xác định được 3 yếu tố chính ảnh hưởng đến khả năng tạo nội bào tử của vi khuẩn TG-71 với các giá trị tối ưu lần lượt là peptone (12 g/l),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (4 g/l) và  $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$  (2,699 g/l), trong đó  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  và  $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$  có ảnh hưởng lớn đến khả năng tạo nội bào tử vi khuẩn TG-71. Khi áp dụng giá trị tối ưu của các thành phần vào môi trường nhân sinh khối vi khuẩn, kết quả mật số nội bào tử đạt  $9,4 \times 10^6$  CFU/ml, phù hợp với giá trị phần mềm đã dự đoán. Bên cạnh thành phần môi trường nuôi cấy, cần quan tâm nghiên cứu thêm về nhiệt độ, pH, độ sục khí và tốc độ lắc trong quá trình nuôi lỏng để thu được mật số nội bào tử vi khuẩn TG-71 tối đa.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 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.
- 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.
- Dobrzy-ski, J., Jakubowska, Z. & Dybek, B. (2022). Potential of *Bacillus pumilus* to directly promote plant growth. *Front. Microbiol.* 13: 1069053.

4. Huang, X., Zhang, N., Yong, X., Yang, X. & Shen, Q. (2012). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. *Microbiological Research*, 167, 135 - 143.
5. Murugappan, R. M., Benazir Begum, S., Raja Roobia, R. (2013). Symbiotic influence of endophytic *Bacillus pumilus* on growth promotion and probiotic potential of the medicinal plant *Ocimum sanctum*. *Symbiosis*. 60(2), 91 - 99.
6. Abdulkareem, M., Aboud, H. M., Saood, H. M., Shibly, M. S. (2014). Antagonistic activity of some plant growth rhizobacteria to *Fusarium graminearum*. *International of Phytopathology*, 3(1), 49 - 54.
7. Dobrzyński, J., Jakubowska, Z., Kulkova, I., Kowalczyk, P. & Kramkowski, K. (2023). Biocontrol of fungal phytopathogens by *Bacillus pumilus*. *Front. Microbiol*, 14, 1194606.
8. 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.
9. Bùi Hồng Quân, Nguyễn Đức Lượng (2009). Tối ưu hóa sinh tổng hợp lipase từ *Pichia anomala* VTCC Y0787 sử dụng ma trận Plackett-Burman và phương pháp đáp ứng bề mặt – phương án cấu trúc có tâm. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 7(4), 493 - 500.
10. Plackett, R. L., Burman, J. P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(4), 305 - 325.
11. Kai, W., Peisheng, Y. (2016). Optimization of lipase production from a novel strain *Thalassospira permensis* M35-15 using response surface methodology. *Bioengineered*, 7(5), 298 - 303.
12. Borges, P. R. S., Tavares, E. G., Guimarães, I. C. et al. (2016). Obtaining a protocol for extraction of phenolics from açaí fruit pulp through Plackett-Burman design and response surface methodology. *Food Chemistry*, 210, 189 - 199.
13. Myers, H. R., Khuri, A. I., Carter, W. H. (1989). Response surface methodology: 1966 - 1988. *Technometrics*, 31, 137 - 157.
14. Posada-Urbe, L. F., Romero-Tabarez, M., Villegas-Escobar, V. (2015). Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(10), 1879 - 1888.
15. Mirmajidi, S. H., Irajie, C., Savardashtaki, A. et al. (2024). Optimization of spore production in *Bacillus coagulans* using response surface methodology approach. *Appl Biochemical Biotechnol*, 196, 7557 - 7569.
16. Tian, Z., Hou, L., Hu, M., Gao, Y., Li, D., Fan, B., Wang, F., Li, S. (2022). Optimization of sporulation conditions for *Bacillus subtilis* BSNK-5. *Processes*, 10(6), 1133.
17. Võ Hồng Phương, Đặng Ngọc Thùy, Nguyễn Thị Lan Chi, Nguyễn Thanh Trúc, Chu Quang Trọng, Phạm Thị Huyền Diệu (2019). Nghiên cứu điều kiện tối ưu nuôi cấy thu nhận bào tử *Bacillus* S5 bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM). *Tạp chí Nghề cá sông Cửu Long*, 13, 45 - 55.
18. Thakkar, A., Saraf, M. (2014). Application of statistically based experimental designs to optimize cellulase production and identification of gene. *Natural products and bioprospecting*, 4(6), 341 - 351.
19. El-Naggar, N. E. A., Moawad, H., El-Shweihy, N. M., El-Ewasy, S. M. (2015). Optimization of culture conditions for production of the anti-leukemic glutaminase free L-asparaginase by newly isolated *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 using response surface methodology. *BioMed Research International*, 1 - 17.
20. 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 stratophericus* sp. nov and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air sample from high altitudes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56, 1465 - 1473.

21. Nguyễn Huỳnh Nhã Uyên, Nguyễn Thị Cẩm Vân, 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, Đại học Cần Thơ*, 54(9B), 59 - 66.
22. Monteiro, S. M. S., Clemente, J. J., Henriques, A. O., Gomes, R. J., Carrondo, M. J. T., Cunha, A. E. (2005). A procedure for highyield spore production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Prog*, 21(4), 1026 - 1031.
23. Vladimir, E., Eva, K., Michael, L. C. (2018). Recent advances in the physiology of spore formation for *Bacillus* probiotic production. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11, 731 - 747.
24. Monteiro, S. M. S., Clemente, J. J., Carrondo, M. J. T. & Cunha, A. E. (2014). Enhanced spore production *Bacillus subtilis* grown in a chemically defined medium. *Advances in Microbiology*, 4, 444 - 454.
25. Atrih, A., Foster, S. J. (2001). Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *J Appl Microbiol*, 91, 364 - 372.
26. Norris, V., Grant, S., Freestone, P., Canvin, J., Sheikh, F. N., Toth, I., et al. (1996). Calcium signalling in bacteria. *J Bacteriol*, 178, 3677 - 3682.
27. Christelle Bressuire-Isoard, Véronique Broussolle, Frédéric Carlin (2018). Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: Evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(5), 614 - 626.
28. Dongsheng, Z., Zheng, W. & Wei, Z. (2018). Effect of  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  on growth and sporulation of *Bacillus* sp. L15. *Advances in engineering research*, 163, 416 - 421.

**OPTIMIZATION OF CULTURE MEDIUM INGREDIENTS  
TO STIMULATE SPORULATION OF THE ANTAGONISTIC *Bacillus pumilus* TG-71  
AGAINST RICE BACTERIAL LEAF BLIGHT (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)**

Thai Tran Anh Thu<sup>1</sup>, Ho Xuan Bach<sup>1</sup>,  
Nguyen Quang Tien<sup>1</sup>, Nguyen Dac Khoa<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Can Tho University

**Abstract**

The antagonistic *Bacillus pumilus* TG-71 against rice bacterial leaf blight was isolated from a rice field in Tien Giang Province of Vietnam. Using the Plackett-Burman matrix, three culture medium ingredients including peptone,  $(NH_4)_2SO_4$  and  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  were found to be major factors having impacts on TG-71 sporulation. Values of these three factors were optimized using the response surface methodology (RSM) combined with the central composite designs (CCD). Optimal values of peptone,  $(NH_4)_2SO_4$  and  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  were 12 g/l, 4 g/l and 2.699 g/l, respectively. Spore density was  $9.4 \times 10^6$  CFU/ml using these values.

**Keywords:** *Bacillus pumilus*, central composite designs, Plackett-Burman matrix, response surface methodology, sporulation.

**Ngày nhận bài:** 18/4/2025

**Ngày gửi phản biện:** 12/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 29/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 27/6/2025

# NGHIÊN CỨU DỊCH CHIẾT LÁ CÂY BẠCH ĐÀN PHÒNG CHỐNG NẤM *Colletotrichum* spp. GÂY BỆNH TRÊN CÂY CÀ CHUA TẠI TỈNH NGHỆ AN

Võ Thị Dung<sup>1,\*</sup>, Vũ Triệu Mân<sup>2</sup>,

Vương Thị Thúy Hằng<sup>1</sup>, Nguyễn Hoàng Tiến<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Nghệ An

<sup>2</sup> Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam

\* Email: vothidung@naue.edu.vn

## TÓM TẮT

Khi sử dụng dịch chiết lá cây bạch đàn trong điều kiện *in vitro* với nồng độ 5%, 10% và 15%, tác dụng ức chế nảy mầm của bào tử *Colletotrichum* spp. là 100% sau 24 giờ xử lý. Trong điều kiện nhà lưới, phun dịch chiết lá cây bạch đàn với nồng độ 5, 10 và 15% lên cây cà chua sau 24 giờ lây bệnh, hiệu lực ức chế tính gây bệnh của *Colletotrichum* spp. khi cây bắt đầu ra hoa đạt 51,28 - 71,08%, cây có quả với đường kính quả 3 - 4 cm đạt 49,03 - 67,28%. HLPT dịch chiết lá cây bạch đàn ở ngoài sản xuất khi cây bắt đầu ra hoa, khi cây có quả với đường kính quả 3 - 4 cm và sau thu hoạch quả lần đầu đạt dao động từ 49,25 - 65,31%.

**Từ khóa:** Cà chua, *Colletotrichum* spp., bạch đàn.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây cà chua *Solanum lycopersicum* L. có tầm quan trọng nhất trong nhóm cây trồng thuộc họ cà (*Solanaceae*) [1]. Hiện nay, cà chua được trồng nhiều nước châu Á như: Trung Quốc, Ấn Độ, Thái Lan, Hàn Quốc, In-đô-nê-si-a, Việt Nam, Ma-lai-xi-a. Ở Việt Nam, cây cà chua được xem là một trong những cây trồng mang lại hiệu quả kinh tế cao cho người sản xuất, khu vực tốt nhất để trồng cà chua là những khu vực có nhiệt độ trung bình từ 22 - 28°C, lượng mưa trung bình từ 1.500 - 2.500 mm/năm.

Nấm *Colletotrichum* spp. xuất hiện và gây hại hầu hết các vùng trồng cà chua ở Việt Nam, được xem là bệnh nguy hiểm sau bệnh xoắn lá và bệnh sương mai.

Ở Việt Nam, việc nghiên cứu và ứng dụng dịch chiết từ thực vật đã được tiến hành từ lâu nhưng mới chỉ nghiên cứu và ứng dụng trong ngành y học, chăn nuôi, trong bảo vệ thực vật sử dụng dịch chiết từ thực vật để phòng trừ bệnh hại cây trồng chưa nhiều. Trong giai đoạn hiện nay, việc sử dụng các dịch chiết có nguồn gốc từ thực vật để phòng trừ bệnh hại cây trồng là vấn đề rất cần thiết do hầu hết các sản phẩm nông nghiệp đều được quan tâm đến vấn đề an toàn cho người sử dụng [2, 3]. Dịch chiết từ thực vật có chứa tinh dầu và các hợp chất dễ bay hơi có khả năng ức chế đối với các loài thuộc chi *Colletotrichum* gây bệnh thán thư [4]. Arboleda và

cs (2017) đã nghiên cứu và cho rằng chiết xuất ethanol của bạch đàn có hiệu quả ức chế đến sự phát triển của nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh trên cây trồng [5].

Nghiên cứu này cung cấp dẫn liệu khoa học về khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên cây cà chua từ dịch chiết lá cây bạch đàn.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Giống cà chua (*Solanum lycopersicum* L.) CTV 40.

- Dịch chiết từ lá cây bạch đàn (*Eucalyptus globulus* Labil)

- Môi trường dinh dưỡng: WA (water agar), PDA (potato dextrose agar).

- Nguồn nấm *Colletotrichum* spp. được phân lập từ mẫu bệnh thán thư trên cà chua tại tỉnh Nghệ An.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Tạo dịch chiết lá cây bạch đàn

Sử dụng bạch đàn giống lá xanh, thu hái lá bánh tẻ mang về phòng thí nghiệm, lá bạch đàn rửa sạch, làm khô tự nhiên trong phòng thí nghiệm, được giã nhỏ ép lọc lấy dịch. Cho dịch của lá bạch đàn vào các ống nghiệm và tiến hành ly tâm, loại bỏ bã phía dưới để thu lấy dịch chiết. Dịch chiết của lá bạch đàn này được xem là nguyên chất. Sử dụng 5, 10, 15 ml dịch

chiết gốc pha thêm 95, 90, 85 ml nước cất để có 100 ml dịch chiết ở nồng độ 5, 10, 15%.

### 2.2.2. Ảnh hưởng của dịch chiết lá cây bạch đàn đến bào tử nấm *Colletotrichum* spp.

- Đo lường dịch chiết của lá cây bạch đàn 5, 10, 15 ml cho vào các bình tam giác có chứa môi trường WA để được nồng độ 5, 10, 15%. Lắc đều mỗi bình để dịch chiết phân tán đều trong môi trường WA, sau đó đổ môi trường có chứa các loại dịch chiết ra đĩa petri.

Sử dụng phương pháp cấy đơn bào tử lên bề mặt đĩa petri có chứa dịch chiết ở các nồng độ 5, 10, 15%, mỗi đĩa petri cấy 20 bào tử nấm *Colletotrichum* spp.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 4 công thức, mỗi công thức nhắc lại 3 lần, 5 đĩa petri/lần nhắc, quan sát 20 bào tử/đĩa.

Công thức 1: Dịch chiết lá cây bạch đàn có nồng độ 5%;

Công thức 2: Dịch chiết lá cây bạch đàn có nồng độ 10%;

Công thức 3: Dịch chiết lá cây bạch đàn có nồng độ 15%;

Công thức 4 (Đối chứng - Đ/C): Nước cất vô trùng.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ bào tử nảy mầm (%), hiệu lực ức chế (%) sau 24 và 48 giờ nuôi cấy.

### 2.2.3. Ảnh hưởng của dịch chiết lá cây bạch đàn đến khả năng gây bệnh của nấm *Colletotrichum* spp.

Đất và xơ dừa sau khi được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, trộn đều với phân vi sinh, phân hữu cơ và cho vào bầu kích thước 4 cm x 10 cm. Trồng cà chua vào bầu, khi cà chua có quả với đường kính 3 - 4 cm tiến hành phun dịch chiết lá cây bạch đàn với nồng độ 5, 10, 15% lên lá và quả:

Phương pháp 1: Phun dung dịch lá cây bạch đàn với nồng độ 5, 10, 15% lên lá và quả, sau 24 giờ tiến hành lây bệnh nhân tạo với nồng độ  $10^5$  bào tử/ml lên lá, quả.

Phương pháp 2. Lây bệnh nhân tạo trên lá và quả, nồng độ  $10^5$  bào tử/ml, sau 24 giờ phun dung dịch lá cây bạch đàn 5, 10, 15%.

Thí nghiệm bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 7 công thức, mỗi công thức 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc 3 cây.

Công thức 1: Phun dung dịch lá cây bạch đàn nồng độ 5% + lây bệnh;

Công thức 2: Phun dung dịch lá cây bạch đàn nồng độ 10% + lây bệnh;

Công thức 3: Phun dung dịch lá cây bạch đàn nồng độ 15% + lây bệnh;

Công thức 4: Lây bệnh + phun dung dịch lá cây bạch đàn nồng độ 5%;

Công thức 5: Lây bệnh + phun dung dịch lá cây bạch đàn nồng độ 10%;

Công thức 6: Lây bệnh + phun dung dịch lá cây bạch đàn nồng độ 15%;

Công thức 7 ĐC: Lây bệnh + phun nước cất vô trùng.

Phương pháp lây bệnh: Các bộ phận lây bệnh được khử trùng bề mặt bằng NaOCl 1% trong 5 phút, rửa lại 2 lần bằng nước cất vô trùng, thấm khô. Nhỏ 6  $\mu$ l dịch bào tử lên bề mặt bộ phận lây bệnh. Ủ quả, lá lây nhiễm ở 25 - 28°C, độ ẩm 100%, 12 giờ sáng/12 giờ tối trong 3 ngày. Tiếp theo lá, quả được ủ ở cùng điều kiện nhưng độ ẩm 70 - 80%.

Chỉ tiêu theo dõi: Thời gian ủ bệnh (ngày) trên lá, quả; đường kính vết bệnh (mm) trên lá, quả.

### 2.2.4. Đánh giá hiệu lực của dịch chiết lá cây bạch đàn đối với *Colletotrichum* spp. gây bệnh trên cây cà chua trong điều kiện nhà lưới

Phun dịch chiết lá cây bạch đàn nồng độ 10, 15% sau 24 giờ tiến hành lây bệnh trên cây cà chua trồng trong nhà lưới. Thí nghiệm bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 4 công thức, mỗi công thức 3 lần nhắc lại, 3 cây/lần nhắc.

Công thức 1: Phun dung dịch lá cây bạch đàn nồng độ 5%;

Công thức 2: Phun dung dịch lá cây bạch đàn nồng độ 10%;

Công thức 3: Phun dung dịch lá cây bạch đàn nồng độ 15%;

Công thức 4: Phun nước cất vô trùng.

Phương pháp lây bệnh: Các bộ phận lây bệnh được khử trùng bề mặt bằng NaOCl 1% trong 5 phút, rửa lại 2 lần bằng nước cất vô trùng, thấm khô. Nhỏ 6  $\mu$ l dịch bào tử lên bề mặt bộ phận lây bệnh. Bao quả, lá lây nhiễm, dùng máy phun sương để được độ ẩm



100% trong nhà lưới. Sau 3 ngày điều chỉnh ẩm độ 70 - 80%

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ bệnh (%), chỉ số bệnh (%).

**2.2.5. Đánh giá hiệu lực của dịch chiết lá cây bạch đàn đối với *Colletotrichum* spp. gây bệnh trên cây cà chua ngoài sản xuất tại tỉnh Nghệ An**

Từ các kết quả trong phòng thí nghiệm, dịch chiết lá cây bạch đàn nồng độ 10% được sử dụng để đánh giá hiệu lực với nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh trên cây cà chua ở đồng ruộng.

Thí nghiệm được bố trí trên đồng ruộng, mỗi công thức thí nghiệm là 10 m<sup>2</sup>, mỗi công thức nhắc lại 3 lần [6].

Công thức 1: Phun dung dịch lá cây bạch đàn nồng độ 10% khi cây ra hoa;

Công thức 2: Phun dung dịch lá cây bạch đàn nồng độ 10% khi cây có quả đường kính 3 - 4 cm;

Công thức 3: Phun dung dịch lá cây bạch đàn nồng độ 10% sau thu hoạch quả cà chua lần đầu;

Công thức 4: Phun nước cất.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ bệnh (%), chỉ số bệnh (%).

**2.3. Phương pháp tính toán và xử lý số liệu**

+ Tỷ lệ bệnh (TLB):

$$TLB (\%) = \frac{A}{B} \times 100$$

Trong đó: A là số lá, quả cây bị bệnh; B là tổng số lá, quả cây điều tra

+ Chỉ số bệnh (CSB):

$$CSB (\%) = \frac{\sum (n_i \times v_i)}{(N \times k)} \times 100$$

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.

+ Tỷ lệ bào tử nảy mầm: Quan sát và đếm số bào tử nảy mầm dưới kính hiển vi quang học:

$$Tỷ \text{ lệ } bào \text{ tử } nảy \text{ mầm } (\%) = \frac{\text{Số bào tử nảy mầm}}{\text{Tổng số bào tử quan sát}} \times 100$$

+ Hiệu lực phòng trừ (HLPT) theo công thức Henderson – Tilton:

$$HLPT (\%) = (1 - \frac{Ta \times Cb}{Ca \times Tb}) \times 100$$

Trong đó: Tb là CSB (%) ở công thức trước xử lý; Ta là CSB (%) ở công thức sau xử lý; Cb là CSB (%) ở công thức đối chứng trước xử lý; Ca là CSB (%) ở công thức đối chứng sau xử lý

Số liệu thí nghiệm được tính toán, xử lý thống kê theo phương pháp phân tích phương sai bằng chương trình IRRISTAT 5.0.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Ảnh hưởng của dịch chiết lá cây bạch đàn đến bào tử nấm *Colletotrichum* spp.

Đánh giá khả năng ức chế nảy mầm của bào tử *Colletotrichum* spp., thí nghiệm tiến hành ở nồng độ 5, 10, 15% trong điều kiện *in vitro* để từ đó tìm ra nồng độ của dịch chiết lá cây bạch đàn có hiệu lực ức chế cao đối với sự nảy mầm của bào tử nấm *Colletotrichum* spp. (Bảng 1).

**Bảng 1. Ảnh hưởng của dịch chiết lá cây bạch đàn đến bào tử nấm *Colletotrichum* spp.**

| TT                  | Công thức | Tỷ lệ bào tử nảy mầm (%) |        | Hiệu lực ức chế (%) |                    |
|---------------------|-----------|--------------------------|--------|---------------------|--------------------|
|                     |           | 24 giờ                   | 48 giờ | 24 giờ              | 48 giờ             |
| 1                   | CT1       | 0                        | 10,26  | 100                 | 81,61 <sup>b</sup> |
| 2                   | CT2       | 0                        | 8,03   | 100                 | 90,10 <sup>a</sup> |
| 3                   | CT3       | 0                        | 7,92   | 100                 | 91,78 <sup>a</sup> |
| 4                   | ĐC        | 100                      | 100    | -                   | -                  |
| LSD <sub>0,05</sub> |           |                          |        |                     | 3,58               |

*Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê; CT là công thức.*

Sau 24 giờ, bào tử nấm *Colletotrichum* spp. ở các nồng độ khác nhau của tất cả các CT thí nghiệm chưa thấy bào tử nấm *Colletotrichum* spp. nảy mầm, hiệu lực ức chế đạt 100% so với CT (Đ/C). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu Arboleda J.W và cs (2017): Trong điều kiện ống nghiệm dịch chiết lá bạch đàn có hiệu lực ức chế 100% đến sự nảy mầm của bào tử nấm *Colletotrichum* spp. trên môi trường WA sau 12 giờ, 24 giờ [5].

Sau 48 giờ ở tất cả các công thức đã thấy *Colletotrichum* spp. nảy mầm, hiệu lực ức chế của dịch chiết lá cây bạch đàn đối với nấm *Colletotrichum* spp. đạt 81,61 - 91,78%. Hiệu lực ức chế của dịch chiết lá cây bạch đàn đối với bào tử nấm

*Colletotrichum* spp. đã có sự sai khác giữa CT1 so với CT2 và CT3 ở mức  $LSD_{0,05}$ .

**3.2. Ảnh hưởng của dịch chiết lá cây bạch đàn đến khả năng gây bệnh của nấm *Colletotrichum* spp. trong điều kiện *in vitro***

**Bảng 2. Ảnh hưởng của dịch chiết lá cây bạch đàn đến khả năng gây bệnh của nấm *Colletotrichum* spp. trong điều kiện *in vitro***

| Công thức<br>(CT) | Thời điểm phun           | Trên lá                 |                          | Trên quả                |                          |
|-------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                   |                          | Thời gian ủ bệnh (ngày) | Đường kính vết bệnh (mm) | Thời gian ủ bệnh (ngày) | Đường kính vết bệnh (mm) |
| CT1               | Trước lây bệnh<br>24 giờ | 6,40 <sup>a</sup>       | 2,12 <sup>b</sup>        | 5,38 <sup>b</sup>       | 4,37 <sup>c</sup>        |
| CT2               |                          | 6,48 <sup>a</sup>       | 2,10 <sup>b</sup>        | 5,39 <sup>b</sup>       | 4,37 <sup>c</sup>        |
| CT3               |                          | 6,48 <sup>a</sup>       | 2,02 <sup>b</sup>        | 5,99 <sup>a</sup>       | 4,28 <sup>c</sup>        |
| CT4               | Sau lây bệnh 24<br>giờ   | 6,31 <sup>a</sup>       | 2,08 <sup>b</sup>        | 5,01 <sup>b</sup>       | 4,60 <sup>c</sup>        |
| CT5               |                          | 6,37 <sup>a</sup>       | 2,04 <sup>b</sup>        | 5,01 <sup>b</sup>       | 5,97 <sup>b</sup>        |
| CT6               |                          | 6,45 <sup>a</sup>       | 2,08 <sup>b</sup>        | 6,26 <sup>a</sup>       | 5,98 <sup>b</sup>        |
| CT7 (Đ/C)         |                          | 5,01 <sup>b</sup>       | 3,09 <sup>a</sup>        | 4,72 <sup>c</sup>       | 6,36 <sup>a</sup>        |
| $LSD_{0,05}$      |                          | 0,93                    | 0,72                     | 0,49                    | 1,02                     |

*Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.*

Xử lý dịch chiết trước lây bệnh 24 giờ, tinh dầu trong dịch chiết có khả năng ngăn cản sự xâm nhiễm và nảy mầm của bào tử nấm *Colletotrichum* spp. trên lá và quả cà chua. Khi phun dịch lá bạch đàn ở nồng độ 5, 10 và 15% thời gian ủ bệnh trên lá và quả dài hơn so với CT (ĐC).

Thời gian ủ bệnh trên lá khi phun dịch lá bạch đàn ở CT1, CT2, CT3 lần lượt là 6,40; 6,48 và 6,48 ngày, trong khi ở trên quả chỉ có 5,38; 5,39 và 5,99 ngày. Thời gian ủ bệnh tỉ lệ thuận với nồng độ dịch chiết, thời gian ủ bệnh dài nhất ở CT nồng độ dịch chiết 15%, ngắn nhất ở CT nồng độ dịch chiết 5% và sai khác có ý nghĩa khi so sánh giữa các CT và với

Thí nghiệm tiến hành trong điều kiện *in vitro* về khả năng ức chế của dịch chiết lá cây bạch đàn đến tính gây bệnh của nấm *Colletotrichum* spp. trên cà chua.

đối chứng trên quả, còn trên lá chưa có sự sai khác giữa các CT.

Đường kính vết bệnh ở CT1, CT2, CT3 trên quả dao động từ 4,28 - 4,37 mm trên lá từ 2,02 - 2,12 mm, đường kính vết bệnh trên lá và quả đều nhỏ hơn so với đường kính vết bệnh của CT (ĐC) (trên quả 3,09 mm, trên lá 6,36 mm), tuy nhiên đường kính vết bệnh trên lá và quả giữa các công thức chưa có sự sai khác có ý nghĩa khi so sánh thống kê.

Sau lây bệnh 24 giờ bào tử nấm *Colletotrichum* spp. đã nảy mầm, đã có quan hệ ký sinh với ký chủ mới tiến hành phun dịch chiết lá cây bạch đàn. Thời gian ủ bệnh ở trên lá là 6,31 - 6,45 ngày, trên quả là

5,01 - 6,26 ngày và thời gian ủ bệnh trên quả đã có sự sai khác có ý nghĩa thống kê.

Xử lý dịch chiết trước 24 giờ lây bệnh, các hoạt chất trong dịch chiết có khả năng ức chế sự xâm nhập và nảy mầm của bào tử nấm *Colletotrichum* spp. trên lá và quả cà chua. Nồng độ dịch chiết 5 và 10% có tác dụng kéo dài thời gian ủ bệnh trên lá và quả gần như nhau so với CT (Đ/C), giữa CT1 và CT2 chưa có sự sai khác ở mức  $LSD_{0,05}$ .

### 3.3. Đánh giá hiệu lực của dịch chiết lá cây bạch đàn đối với nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh trên cây cà chua trong điều kiện nhà lưới

Để lựa chọn nồng độ phù hợp của dịch chiết ngoài sản xuất, tiếp tục tiến hành thí nghiệm đánh giá hiệu lực của dịch chiết lá cây bạch đàn nồng độ 5, 10, 15% đến khả năng phòng chống nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh trên cây cà chua trong điều kiện nhà lưới.

**Bảng 3. Hiệu lực của dịch chiết lá cây bạch đàn phòng chống nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh trên cây cà chua trong điều kiện nhà lưới**

| CT           | Cây bắt đầu ra hoa |         |                    | Trên cây có quả đường kính 3 - 4 cm |         |                    |
|--------------|--------------------|---------|--------------------|-------------------------------------|---------|--------------------|
|              | TLB (%)            | CSB (%) | HLPT (%)           | TLB (%)                             | CSB (%) | HLPT (%)           |
| CT1          | 100                | 10,34   | 51,28 <sup>b</sup> | 100                                 | 13,53   | 49,03 <sup>b</sup> |
| CT2          | 100                | 8,26    | 70,02 <sup>a</sup> | 100                                 | 9,15    | 65,74 <sup>a</sup> |
| CT3          | 100                | 7,18    | 71,08 <sup>a</sup> | 100                                 | 8,05    | 67,28 <sup>a</sup> |
| CT (ĐC)      | 100                | 29,63   | -                  | 100                                 | 33,28   | -                  |
| $LSD_{0,05}$ |                    |         | 3,88               |                                     |         | 4,89               |
| CV%          |                    |         | 5,61               |                                     |         | 6,74               |

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Khi sử dụng nồng độ 5% (CT1) và 10% (CT2), HLPT trên lá là 51,28% và 70,02% còn HLPT trên quả là 49,03% và 65,74%. Khi giảm nồng độ của dịch chiết lá bạch đàn từ 15% xuống 10% thì HLPT đối nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh trên cây cà chua trên lá và trên quả không thay đổi nhiều, như vậy hiệu quả phòng chống bệnh trên lá và trên quả của CT2 và CT3 không có sự sai khác ở mức ý nghĩa thống kê. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Saini và cs (2017), Villafana và cs (2018), đã kết luận dịch chiết từ một số loài thực vật có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh trên cây cà chua vào thời kỳ cây cho quả với hiệu lực từ 45 - 70% [7, 8].

Như vậy, hiệu lực của dịch chiết lá cây bạch đàn đối với nấm *Colletotrichum* spp. trên lá và quả cà chua chưa có sự sai khác ở mức có ý nghĩa thống kê. Từ các kết quả trên, dịch chiết lá cây bạch đàn nồng độ 10% được sử dụng để tiến hành thí nghiệm ngoài sản xuất.

### 3.4. Hiệu lực phòng chống của dịch chiết lá cây bạch đàn đối nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh trên cây cà chua ở đồng ruộng tại tỉnh Nghệ An.

Để biết được dịch chiết lá bạch đàn có hiệu lực phòng chống *Colletotrichum* spp. ngoài sản xuất hay không, tiến hành thí nghiệm ngoài sản xuất về đánh giá hiệu lực của dịch chiết lá bạch đàn 10% trên cây cà chua vào thời điểm cây ra hoa, cây có quả với đường kính quả từ 3 - 4 cm và sau thu hoạch quả lần đầu.

**Bảng 4. Hiệu lực của dịch chiết lá cây bạch đàn phòng chống nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh trên cây cà chua ngoài sản xuất**

| CT                  | Thời điểm phun dịch chiết                   | TLB (%) | CSB (%) | HLPT(%)            |
|---------------------|---------------------------------------------|---------|---------|--------------------|
| CT1                 | Cây bắt đầu ra hoa                          | 11,18   | 10,80   | 65,31 <sup>a</sup> |
| CT2                 | Trên cây có quả với đường kính quả 3 - 4 cm | 16,81   | 15,53   | 52,92 <sup>b</sup> |
| CT3                 | Sau thu hoạch quả lần đầu                   | 20,64   | 27,92   | 49,25 <sup>c</sup> |
| CT (ĐC)             | Nước cất                                    | 32,23   | 39,47   | -                  |
| LSD <sub>0,05</sub> |                                             |         |         | 4,88               |
| CV%                 |                                             |         |         | 2,90               |

*Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.*

Khi cây cà chua bắt đầu ra hoa lúc này nấm *Colletotrichum* spp. xuất hiện chưa nhiều do vậy phun dịch bạch đàn tồn tại và bám dính trên bề mặt của lá tương đối tốt nên tăng khả năng ức chế sự xâm nhập và nảy mầm của bào tử nấm trên lá cà chua, HLPT lúc này đạt 65,31%. Khi cây có quả với đường kính quả từ 3 - 4 cm bắt đầu ra hoa tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh đều thấp hơn rất nhiều so với đối chứng, hiệu lực phòng chống của dịch bạch đàn lúc này đạt 52,92%.

Sau thu hoạch quả lần đầu, nấm *Colletotrichum* spp. tồn tại trên cây tương đối nhiều tiếp tục tái xâm nhiễm và gây hại, CSB thời điểm này lên tới 27,92% và hiệu lực của dịch chiết đạt 49,25%. Ở thời kỳ này, HLPT bệnh giảm so với thời điểm cây bắt đầu ra hoa và khi cây có quả với đường kính quả từ 3 - 4 cm, giữa các CT đều có sự sai khác có ý nghĩa thống kê.

Như vậy hiệu lực phòng trừ của dịch chiết lá cây bạch đàn nồng độ 10% đối với nấm *Colletotrichum* spp. ngoài sản xuất đạt 49,25 - 65,31%.

#### 4. KẾT LUẬN

Dịch chiết lá cây bạch đàn ở nồng độ 5, 10 và 15 % có hiệu lực ức chế 100% sự nảy mầm của bào tử nấm *Colletotrichum* spp. sau 24 giờ xử lý, sau 48 giờ xử lý hiệu lực ức chế đối với nấm *Colletotrichum* spp. đạt 81,61 - 91,78%. Nồng độ 5, 10 và 15% của dịch chiết lá cây bạch đàn đối với *Colletotrichum* spp. gây bệnh trên cây cà chua trong điều kiện nhà lưới HLPT

đạt 49,03 - 71,08%, ngoài sản xuất nồng độ dịch chiết lá cây bạch đàn 10% đạt 49,25 - 65,31%.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kuo O. G., Opena R. T. and Chen J. T. (1998). Guides for tomato production in the tropic and subtropics. *Asian Vegetable Research and Development Center*.
2. Diao, Y. Z., Zhang, C., Lin, D., Liu (2014). First report of *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose of tomato in China. *Dis. Notes* 98, 687.
3. Rashid, T. S., Sijam, K., Kadir, J., Saud, H. M., Awla, H. K., Hata, E.M (2015). First report of tomato anthracnose caused by *Colletotrichum boninense* in Malaysia. *J. Plant Pathol.* 97, 209 - 220.
4. Kumar A., Kudachikar V. B (2018). Antifungal properties of essential oils against anthracnose disease: A critical appraisal. *J. Plant Dis. Prot.* 125: 133 - 144.
5. Arboleda J. W., Ribeiro J. A., Abdelnur P.V., Guzman J. D (2017). Eucalyptus Leaf Byproduct Inhibits the Anthracnose-Causing Fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Ind. Crops Prod.* 108: 793 - 797.
6. Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia QCVN 01 - 160:2014/BNNPTNT về khảo nghiệm trên đồng ruộng hiệu lực phòng trừ bệnh thán thư (*Colletotrichum* spp.) hại cây rau của các thuốc trừ bệnh.

7. Saini, T. J., Gupta, S. G., Anandalakshmi (2017). Detection of tomato anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* in India. *Australas. Plant Dis. Notes*, 12, 48.
8. Villafana, R.T., Ramdass, A.C., Rampersad, S. N. (2018). First report of *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose in tomato fruit in Trinidad. *Dis. Notes*, 102, 1857.

**RESEARCH ON EUCALYPTUS EXTRACT TO PREVENT *Colletotrichum* spp.  
DISEASE ON TOMATO IN NGHE AN PROVINCE**

**Vo Thi Dung<sup>1</sup>, Vu Trieu Man<sup>2</sup>,  
Vuong Thi Thuy Hang<sup>1</sup>, Nguyen Hoang Tien<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Nghe An University*

<sup>2</sup> *Vietnamese Phytopathological Society*

**Abstract**

When using eucalyptus extraction invitro condition with extraction concentrations of 5%, 10% and 15%, the influence on germination inhibition of *Colletotrichum* spp. spores is 100% after 24 hours treatment. In greenhouse conditions, spraying eucalyptus extract at concentrations of 5, 10 and 15% on tomato plants after 24 hours of infection, the inhibitory effect on the pathogenicity of *Colletotrichum* spp. when the plants began to flower reached 51.28 - 71.08% and on plants with fruit diameters of 3 - 4 cm reached 49.03 - 67.28%. The prevention effectiveness reached of eucalyptus extract in production when the plants began to flower, when the plants had fruit with fruit diameters of 3 - 4 cm and after the first harvest ranged from 49.25 - 65.31%.

**Keywords:** *Tomato, Colletotrichum* spp., *eucalyptus*.

**Ngày nhận bài:** 15/5/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 20/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 29/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 27/6/2025

# SO SÁNH HIỆU QUẢ GIẢM BỆNH BẠC LÁ LÚA CỦA DỊCH CHIẾT LÁ CÂY HOA NGŨ SẮC (*Ageratum conyzoides*) VÀ CÂY CỎ HÔI (*Chromolaena odorata*)

Trương Văn Xạ<sup>1</sup>, Nguyễn Chí Thiện<sup>1</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

\* Email: ndkhoa@ctu.edu.vn

## TÓM TẮT

Bệnh bạc lá (cháy bìa lá) gây thiệt hại năng suất lúa và chất lượng hạt gạo, đặc biệt trong mùa mưa. Dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc (*Ageratum conyzoides*) và cây cỏ hôi (*Chromolaena odorata*) có khả năng giúp giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới. Nghiên cứu này so sánh hiệu quả giảm bệnh của 2 loại dịch chiết khi được xử lý bằng biện pháp ngâm hạt giống với dịch chiết trong 24 giờ trước khi gieo và ngâm hạt giống kết hợp phun lên lá lúa 7 hoặc 14 ngày trước khi lây bệnh (NTLB). Khi sử dụng biện pháp ngâm hạt, dịch chiết 3%, 4%, 5% (w/v) lá cây hoa ngũ sắc và dịch chiết 4% và 5% lá cây cỏ hôi đều có hiệu quả giảm bệnh tương đương thuốc hóa học Starner 20 WP, trong đó, 3% dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc và 4% dịch chiết lá cây cỏ hôi là nồng độ thấp nhất có hiệu quả giảm bệnh nên có thể tiếp tục nghiên cứu ứng dụng vào thực tế sản xuất. Hiệu quả giảm bệnh của dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc thấp hơn dịch chiết lá cây cỏ hôi. Kết hợp ngâm hạt giống với phun dịch chiết lên lá lúa cho thấy, hiệu quả giảm bệnh cao hơn chỉ xử lý ngâm hạt. Kết hợp ngâm hạt với phun lên lá lúa dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc ở thời điểm 7 NTLB có hiệu quả giảm bệnh cao hơn ngâm hạt kết hợp với phun lên lá lúa ở thời điểm 14 NTLB, trong đó ngâm hạt giống với dịch chiết 3% kết hợp phun lên lá lúa dịch chiết 4% ở thời điểm 7 NTLB có hiệu quả cao nhất (56,3%). Ngược lại, kết hợp ngâm hạt và phun lên lá lúa dịch chiết lá cây cỏ hôi ở thời điểm 14 NTLB có hiệu quả giảm bệnh cao hơn ngâm hạt kết hợp phun lên lá lúa ở thời điểm 7 NTLB, trong đó ngâm hạt giống với dịch chiết 4% kết hợp phun lên lá lúa dịch chiết 5% ở thời điểm 14 NTLB có hiệu quả cao nhất (56,1%).

**Từ khóa:** Bạc lá, cỏ hôi, hoa ngũ sắc, lúa, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bạc lá (cháy bìa lá) lúa do vi khuẩn Gram âm *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây ra [1] là một trong những bệnh gây hại nặng cho nền sản xuất lúa gạo trên thế giới [2, 3]. Ở Việt Nam, bệnh thường phát triển mạnh trên các vụ lúa hè thu và có thể gây thiệt hại năng suất và chất lượng lúa [4].

Các kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy, các loại dịch chiết thực vật có khả năng giúp giảm bệnh bạc lá như: Dịch chiết methanol lá cây cà độc dược (*Datura metel*) [5], dịch chiết nước và methanol lá cây cang mai (*Adhatoda vasica*) [6], dịch chiết nước lá cây ngũ trảo (*Vitex negundo*) [7], dịch chiết nước và methanol lá cây sống đời (*Kalanchoe pinnata*) [8 - 10].

Cây hoa ngũ sắc hay còn gọi là cây cỏ cứt heo (*Ageratum conyzoides*) là loại cây bụi, thuộc họ Asteraceae, là loại cây hoang dại phổ biến ở Việt

Nam [11]. Phun lên lá lúa dịch chiết ethanol lá cây hoa ngũ sắc có khả năng giúp giảm bệnh đạo ôn (*Pyricularia oryzae*) và bệnh đốm vằn (*Rhizoctonia solani*) trong điều kiện nhà lưới [12].

Cây cỏ hôi (*Chromolaena odorata*) là loại cây bụi, thuộc họ Asteraceae, là loại cây hoang dại thường phát triển mạnh và ra hoa vào mùa mưa [11]. Ngâm hạt lúa giống bằng dịch chiết lá cây cỏ hôi có khả năng giúp giảm các loại bệnh trên lúa lần lượt là 45% đối với bệnh đốm vằn và 57% đối với bệnh cháy lá (*Bipolaris oryzae*) trong điều kiện nhà lưới [13]. Hiệu quả giúp giảm bệnh khi được xử lý ngâm hạt lúa bằng dịch chiết cỏ hôi đã được chứng minh thông qua cơ chế kích kháng bằng phương pháp biểu hiện gen  $\beta$ -1,3-glucanase [13, 14].

Nghiên cứu này thực hiện nhằm so sánh hiệu quả giúp giảm bệnh bạc lá lúa của dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc và dịch chiết lá cây cỏ hôi thông qua hai



biện pháp áp dụng là: Ngâm hạt giống bằng dịch chiết trong 24 giờ trước khi gieo; ngâm hạt giống kết hợp phun lên lá lúa dịch chiết. Nghiên cứu này làm cơ sở để ứng dụng vào thực tế phòng trị bệnh bạc lá trên đồng ruộng một cách hiệu quả, thân thiện với môi trường, dễ sử dụng và có thể tận dụng nguồn nguyên liệu tại chỗ để giảm chi phí sản xuất.

## **2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu nghiên cứu**

Mầm bệnh là vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XCT-13 (*Xoo*) được cung cấp từ nhóm nghiên cứu Bệnh học Thực vật, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ. Vi khuẩn *Xoo* được nuôi cấy trên môi trường Wakimoto.

Giống lúa Jasmine 85 cấp xác nhận được cung cấp từ Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long là giống nhiễm bệnh bạc lá.

Cây hoa ngũ sắc (*A. conyzoides*) và cây cỏ hôi (*C. odorata*) được trồng tại nhà lưới của Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long (Trường ĐHSPTK Vĩnh Long) 12 tháng trước khi thu mẫu lá để thực hiện nghiên cứu này.

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

#### **2.2.1. Vật liệu nghiên cứu**

Đất sử dụng trong các thí nghiệm được thu thập trong khuôn viên Trường ĐHSPTK Vĩnh Long. Đất thu về được phơi khô và băm nhỏ. Sử dụng vôi bột (100 g vôi bột cho 10 kg đất) để bón vào đất ngay sau băm nhỏ. Sau đó, cho khoảng 7 - 10 kg đất vào mỗi chậu (30 x 45 x 20 cm), ngâm nước trong 4 ngày và làm tơi đất trước khi gieo lúa.

Phân bón sử dụng cho cây lúa thí nghiệm gồm: đạm urê (N) do Công ty Đạm Phú Mỹ cung cấp, super phosphate (P) từ Công ty Supe phốt phát và Hóa chất Lâm Thao và potassium chloride (K) của Tập đoàn Vinacam. Liều lượng bón được áp dụng theo khuyến cáo từ Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật - Thành phố Cần Thơ, với mức 120 N - 40 P - 60 K. Cụ thể mỗi chậu: Bón lót 2,4 g P trước khi gieo 2 ngày; bón thúc vào các giai đoạn 10, 20, 40 và 70 ngày sau khi gieo với 0,5 g N và 0,12 g K [9, 10].

Nghiệm thức đối chứng dương sử dụng thuốc hóa học Starner 20 WP (10 g/gói) do Công ty Bảo vệ Thực vật 1 Trung ương sản xuất. Starner chứa hoạt chất oxolinic axit với nồng độ 20%, có khả năng kháng khuẩn phổ rộng và đặc biệt hiệu quả trong việc kiểm soát bệnh bạc lá. Loại thuốc này được phun vào các thời điểm 5, 10 và 15 ngày sau khi lây bệnh (NSLB), với liều lượng 5 mL dung dịch (nồng độ 1 mg/mL) cho mỗi chậu trồng lúa thí nghiệm [8 - 10].

#### **2.2.2. Dịch chiết thực vật và huyền phù vi khuẩn *Xoo***

Chuẩn bị dịch chiết cho nghiên cứu: Mẫu lá cây hoa ngũ sắc và lá cây cỏ hôi được thu hoạch vào lúc 7 giờ sáng tại nhà lưới Trường ĐHSPTK Vĩnh Long, sau đó được chuyển ngay đến phòng thí nghiệm để tạo dịch chiết. Các lá trưởng thành, không bị sâu, bệnh, kích thước đồng đều được rửa sạch bằng nước máy và để ráo. Chuẩn bị dịch chiết thực vật nồng độ 1% (tính theo khối lượng lá tươi trên thể tích nước cất, w/v), tiến hành cân 5 g lá tươi đã được cắt nhỏ (kích thước khoảng 2 - 3 cm), cho vào máy xay cùng với 500 mL nước cất (sử dụng máy xay BL-T60 của Toshiba). Hỗn hợp này được xay nhuyễn trong 5 phút, sau đó lọc qua giấy lọc định tính (Whatman, Ø11 µm) để thu được dịch chiết với nồng độ 1% (w/v). Tương tự, dịch chiết nồng độ 2 - 5% cũng được chuẩn bị theo quy trình tương tự. Tất cả các loại dịch chiết đều được chuẩn bị trong cùng ngày và sử dụng ngay để ngâm hạt lúa giống.

Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn *Xoo* với nồng độ  $10^9$  CFU/mL dùng để chủng bệnh nhân tạo, thực hiện theo các bước sau: Sử dụng que cấy vô trùng, lấy hai vòng đầy vi khuẩn đã phát triển trên môi trường Wakimoto sau 48 giờ và hòa tan vào 10 mL nước cất đã được tiệt trùng. Sau đó, đo khả năng hấp thụ quang học của huyền phù này ở bước sóng 600 nm và điều chỉnh giá trị hấp thụ quang phổ đạt mức 0,37 [8, 10]. Huyền phù vi khuẩn được sử dụng ngay lập tức để tiến hành chủng bệnh nhân tạo.

#### **2.2.3. Khảo sát khả năng giảm bệnh bạc lá của dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc và dịch chiết lá cây cỏ hôi bằng biện pháp ngâm hạt**

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lặp lại gồm 2 yếu tố được nghiên cứu: Dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc và lá cây cỏ hôi; năm nồng độ dịch chiết là 1%, 2%, 3%, 4% và 5% (w/v). Thí nghiệm này được thực hiện từ năm 2022 - 2023, tại nhà lưới của Trường ĐHSPKT Vĩnh Long.

Thực hiện thí nghiệm: Các nghiệm thức thì hạt lúa giống được ngâm trong dịch chiết trong 24 giờ. Nghiệm thức đối chứng thì hạt lúa giống được ngâm trong nước cất tiệt trùng cùng thời gian. Sau giai đoạn ngâm, tất cả các nghiệm thức đều được ủ trong tối ở điều kiện nhiệt độ phòng ( $32 \pm 1^\circ\text{C}$ ) trong 48 giờ nhằm kích thích quá trình nảy mầm sau đó gieo vào các chậu đất đã chuẩn bị sẵn trong nhà lưới.

Cây lúa được lây bệnh nhân tạo vào giai đoạn 45 ngày sau khi gieo. Lây bệnh nhân tạo được thực hiện theo phương pháp của Kauffman (1973) [15] và được điều chỉnh bởi Xạ và cs (2023) [9], sử dụng kéo đã được tiệt trùng nhúng vào huyền phù vi khuẩn *Xoo* với mật độ  $10^9$  CFU/mL, sau đó cắt 3 - 5 chóp lá trên mỗi cây (cắt từ 2 - 3 cm từ chóp lá). Trong mỗi bụi chọn ngẫu nhiên 5 cây để tiến hành cắt.

Ghi nhận chỉ tiêu: Chiều dài vết bệnh được đo ở thời điểm 7, 14 và 21 ngày sau lây bệnh (NSLB) [9, 10].

Xác định hiệu quả giảm bệnh của nghiệm thức có xử lý dịch chiết hoặc nghiệm thức đối chứng dương so với nghiệm thức đối chứng âm theo mô tả của Nisha và cs (2012) [7], công thức:

$$\text{Hiệu quả giảm bệnh (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100\% \quad [7]$$

Trong đó: A là chiều dài vết bệnh của nghiệm thức đối chứng âm; B là chiều dài vết bệnh của nghiệm thức có xử lý dịch chiết hoặc nghiệm thức đối chứng dương.

#### *2.2.4. Khảo sát khả năng giảm bệnh bạc lá của dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc và dịch chiết lá cây cỏ hôi bằng biện pháp ngâm hạt kết hợp phun lên lá lúa*

Đối với dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lặp lại gồm 2 yếu tố: Ngâm hạt giống nồng độ 3% (nồng độ thấp nhất sử dụng để ngâm hạt giống nhưng vẫn thể hiện hiệu quả giảm bệnh duy trì đến 21 NSLB) kết

hợp phun lên lá lúa 7 ngày trước khi lây bệnh (NTLB) và 14 NTLB; năm nồng độ dịch chiết phun lên lá lúa là 1%, 2%, 3%, 4% và 5% (w/v).

Đối với dịch chiết lá cây cỏ hôi: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lặp lại gồm 2 yếu tố: Ngâm hạt giống nồng độ 4% (nồng độ thấp nhất sử dụng để ngâm hạt giống nhưng vẫn thể hiện hiệu quả giảm bệnh duy trì đến 21 NSLB) kết hợp phun lên lá lúa 7 NTLB và 14 NTLB; năm nồng độ dịch chiết phun lên lá lúa là 1%, 2%, 3%, 4% và 5% (w/v).

Thí nghiệm này được thực hiện từ năm 2023 - 2024, tại nhà lưới của Trường ĐHSPKT Vĩnh Long. Cây lúa được chủng bệnh nhân tạo, đo chiều dài vết bệnh và xác định hiệu quả giảm bệnh thực hiện tương tự như trên.

#### *2.2.5. Phân tích số liệu*

Số liệu chiều dài vết bệnh và hiệu quả giảm bệnh được tính trung bình, phân tích phương sai (ANOVA) và so sánh bằng phép thử Duncan với mức ý nghĩa 5% theo từng chỉ tiêu khảo sát bằng phần mềm thống kê SAS<sup>®</sup> 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, USA).

### **3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

#### **3.1. Khả năng giảm bệnh bạc lá của dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc và dịch chiết lá cây cỏ hôi bằng biện pháp ngâm hạt giống**

Chiều dài vết bệnh bạc lá của các nghiệm thức ngâm hạt giống bằng dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc ở nồng độ 3% là  $336,3 \pm 15,7$  mm, nồng độ 4% là  $317,4 \pm 28,9$  mm và nồng độ 5% là  $319,3 \pm 9,4$  mm; chiều dài vết bệnh của 3 nghiệm thức đều khác biệt có ý nghĩa với nghiệm thức đối chứng âm ( $387,6 \pm 39,5$  mm) và tương đương với nghiệm thức đối chứng dương ( $305,1 \pm 7,4$  mm) (Hình 1).

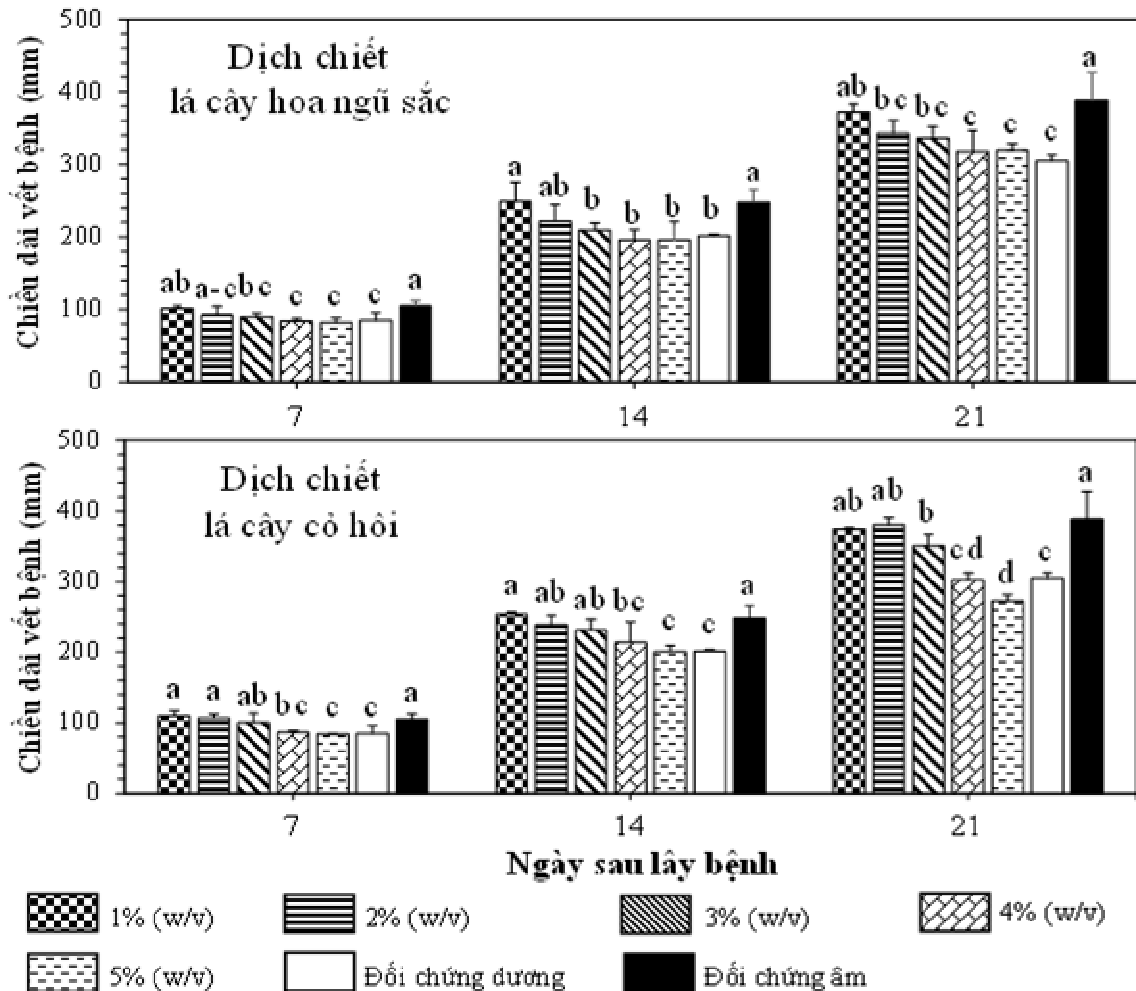
Tương tự, chiều dài vết bệnh bạc lá của các nghiệm thức ngâm hạt giống bằng dịch chiết lá cây cỏ hôi ở nồng độ 4% là  $302,5 \pm 9,6$  mm và nồng độ 5% là  $272,9 \pm 8,9$  mm; chiều dài vết bệnh của 2 nghiệm thức đều khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng âm và tương đương với nghiệm thức đối chứng dương (Hình 1).

Như vậy, ngâm hạt giống bằng dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc (nồng độ 3%, 4% và 5%) và dịch chiết lá cây cỏ hôi (nồng độ 4% và 5%) có khả năng giảm bệnh

bạc lá tương đương sử dụng thuốc hóa học Starner 20 WP và duy trì đến 21 NSLB. Trong đó, dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc nồng độ 3% và dịch chiết lá cây cỏ hôi nồng độ 4% là nồng độ thấp nhất có khả năng giảm chiều dài vết bệnh duy trì đến 21 ngày.

Khả năng giảm bệnh bạc lá cũng được ghi nhận ở các nghiên cứu ngâm hạt giống bằng dịch chiết lá

sống đời nồng độ 1,5% [8], ngâm hạt giống bằng cao chiết lá sống đời trong dung môi methanol nồng độ 1% [10], ngâm hạt giống bằng cao phân đoạn bằng dung môi acetone nồng độ 1% [16]. Như vậy, biện pháp ngâm hạt giống bằng dịch chiết thực vật có khả năng giúp giảm bệnh bạc lá.



Hình 1. Chiều dài vết bệnh bạc lá khi hạt giống được ngâm bằng dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc và dịch chiết lá cây cỏ hôi

Ghi chú: Các cột trong cùng một ngày có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) bằng phép thử Duncan.

### 3.2. Hiệu quả giảm bệnh bạc lá của dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc và dịch chiết lá cây cỏ hôi bằng biện pháp ngâm hạt

Hiệu quả giảm bệnh bạc lá của các nghiệm thức ngâm hạt giống bằng dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc (nồng độ 3%, 4% và 5%) và dịch chiết lá cây cỏ hôi (nồng độ 4% và 5%) khác biệt không ý nghĩa so với đối chứng dương (thuốc hóa học Starner 20 WP) (Bảng 2). Đặc biệt, ở 21 NSLB ghi nhận hiệu quả

giảm bệnh của các nghiệm thức ngâm hạt giống bằng dịch chiết lá cây cỏ hôi đều cao hơn so với dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc ở cùng nồng độ. Trong đó, hiệu quả giảm bệnh cao nhất ở nồng độ 5% của dịch chiết lá cây cỏ hôi là 28,9% ở 21 NSLB. Để tiết kiệm nguyên liệu thì 3% dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc và 4% dịch chiết lá cây cỏ hôi là nồng độ thấp nhất có hiệu quả giảm bệnh nên có thể tiếp tục nghiên cứu ứng dụng vào thực tế sản xuất.

**Bảng 1. Hiệu quả giảm bệnh bạc lá khi hạt lúa giống được ngâm bằng dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc và dịch chiết lá cây cỏ hôi**

| Loại dịch chiết                 | Nồng độ (w/v) | Hiệu quả giảm bệnh bạc lá (%) |                         |                          |
|---------------------------------|---------------|-------------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                                 |               | 7 NSLB                        | 14 NSLB                 | 21 NSLB                  |
| Dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc   | 3%            | 14,2 ± 5,7 <sup>a</sup>       | 15,2 ± 9,0 <sup>a</sup> | 12,8 ± 6,6 <sup>a</sup>  |
|                                 | 4%            | 20,2 ± 6,9 <sup>a</sup>       | 20,9 ± 7,8 <sup>a</sup> | 18,0 ± 3,7 <sup>ab</sup> |
|                                 | 5%            | 21,6 ± 5,8 <sup>a</sup>       | 21,2 ± 5,1 <sup>a</sup> | 16,9 ± 7,1 <sup>ab</sup> |
| Dịch chiết lá cây cỏ hôi        | 4%            | 17,3 ± 6,0 <sup>a</sup>       | 21,6 ± 9,1 <sup>a</sup> | 21,4 ± 8,0 <sup>ab</sup> |
|                                 | 5%            | 19,8 ± 5,5 <sup>a</sup>       | 18,7 ± 6,4 <sup>a</sup> | 28,9 ± 9,5 <sup>b</sup>  |
| Đối chứng dương (Starnar 20 WP) |               | 19,3 ± 7,4 <sup>a</sup>       | 18,4 ± 5,2 <sup>a</sup> | 20,9 ± 6,7 <sup>ab</sup> |
| Mức ý nghĩa                     |               | ns                            | ns                      | *                        |
| CV%                             |               | 0,261                         | 0,313                   | 1,415                    |

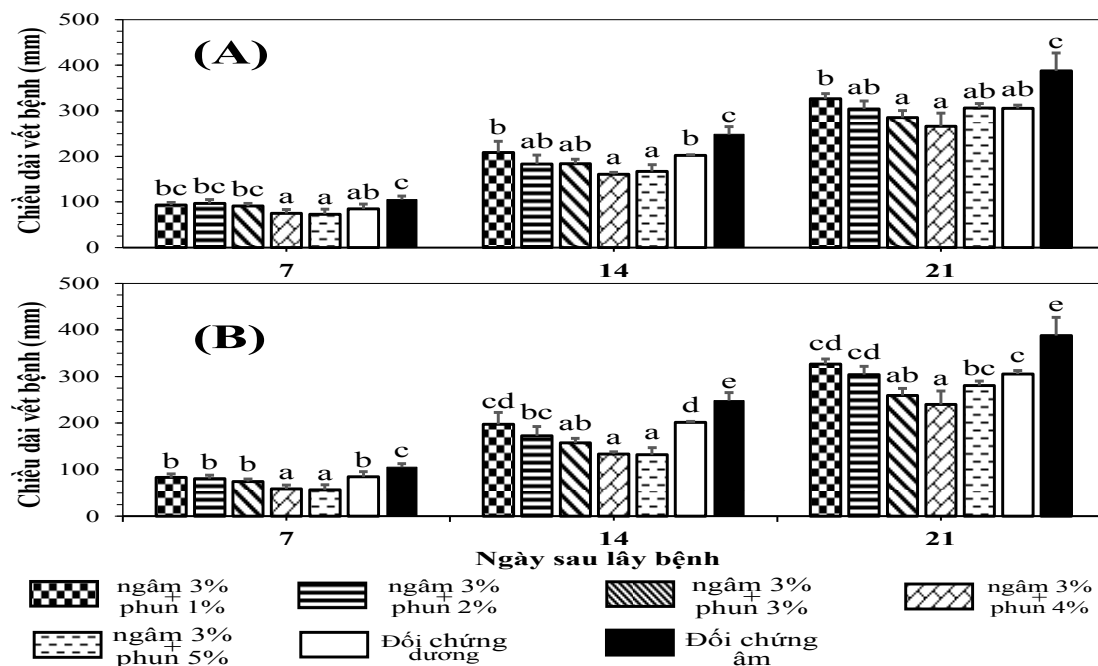
Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) bằng phép thử Duncan. NSLB là ngày sau lây bệnh.

### 3.3. Khả năng giảm bệnh bạc lá của dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc và dịch chiết lá cây cỏ hôi bằng biện pháp ngâm hạt kết hợp phun lên lá lúa

Ngâm hạt bằng dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc nồng độ 3% hoặc dịch chiết lá cây cỏ hôi 4% giúp giảm bệnh bạc lá lúa từ thí nghiệm trên. Ở thí

nghiệm này, biện pháp ngâm hạt giống kết hợp phun lên lá lúa dịch chiết nhằm xác định hiệu quả phòng trị bệnh trong thực tế sản xuất, đặc biệt khi áp lực bệnh cao.

#### 3.3.1. Đối với dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc



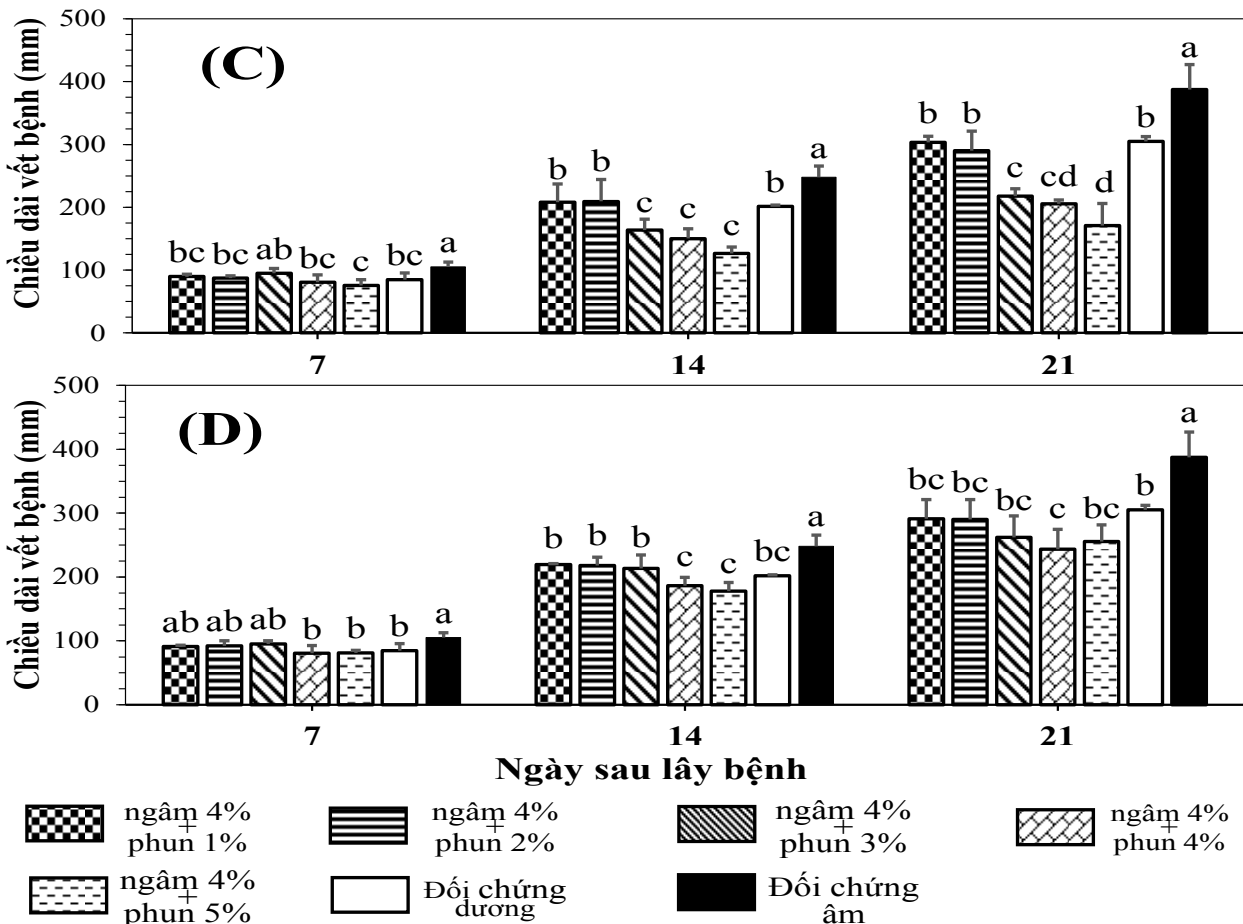
**Hình 2. Chiều dài vết bệnh bạc lá của biện pháp ngâm hạt giống kết hợp phun lên lá lúa bằng dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc**

Ghi chú: Các cột trong cùng một ngày có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) bằng phép thử Duncan. (A) Ngâm hạt lúa giống bằng dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc nồng độ 3% kết hợp phun dịch chiết ở thời điểm 14 ngày trước khi lây bệnh. (B) Ngâm hạt lúa giống bằng dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc nồng độ 3% kết hợp phun dịch chiết ở thời điểm 7 ngày trước khi lây bệnh.

Chiều dài vết bệnh bạc lá ở các nghiệm thức ngâm hạt lúa giống bằng dịch chiết nồng độ 3% kết hợp phun lên lá lúa nồng độ 1 - 5% ở thời điểm 14 NTLB đều tương đương với nghiệm thức đối chứng dương (Hình 2A). Trong đó, khi phun lên lá lúa dịch chiết nồng độ càng cao thì khả năng giảm bệnh càng biểu hiện rõ hơn thông qua chiều dài vết bệnh càng ngắn. Chiều dài vết bệnh bạc lá ở các nghiệm thức ngâm hạt lúa giống bằng dịch chiết nồng độ 3% kết

hợp phun lên lá lúa nồng độ 1 - 5% ở thời điểm 7 NTLB đều tương đương với nghiệm thức đối chứng dương (Hình 2B). Trong đó, ngâm hạt giống bằng dịch chiết nồng độ 3% kết hợp phun lên lá lúa nồng độ 4% ở thời điểm 7 NTLB khác biệt ý nghĩa so với sử dụng thuốc hóa học Starner 20 WP và duy trì ở cả 3 thời điểm khảo sát (7, 14 và 21 NSLB).

### 3.3.2. Đối với dịch chiết lá cây cỏ hôi



Hình 3. Chiều dài vết bệnh bạc lá của biện pháp ngâm hạt giống kết hợp phun lên lá lúa bằng dịch chiết lá cây cỏ hôi

Ghi chú: Các cột trong cùng một ngày có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) bằng phép thử Duncan. (C) Ngâm hạt lúa giống bằng dịch chiết lá cây cỏ hôi nồng độ 4% kết hợp phun dịch chiết ở thời điểm 14 ngày trước khi lây bệnh. (D) Ngâm hạt lúa giống bằng dịch chiết lá cây cỏ hôi nồng độ 4% kết hợp phun dịch chiết ở thời điểm 7 ngày trước khi lây bệnh.

Chiều dài vết bệnh bạc lá ở các nghiệm thức ngâm hạt lúa giống bằng dịch chiết nồng độ 4% kết hợp phun lên lá lúa nồng độ 1% và 2% ở thời điểm 14 NTLB tương đương với nghiệm thức đối chứng dương (Hình 2C). Đặc biệt, chiều dài vết bệnh của nghiệm thức ngâm kết hợp phun lên lá lúa nồng độ 3 - 5% khác biệt ý nghĩa so với đối chứng dương duy trì đến 21 ngày.

Chiều dài vết bệnh bạc lá ở các nghiệm thức ngâm hạt lúa giống bằng dịch chiết nồng độ 4% kết hợp phun lên lá lúa nồng độ 1 - 5% ở thời điểm 14 NTLB đều tương đương với nghiệm thức đối chứng dương (Hình 2D).

Các nghiên cứu trước đây với các loại dịch chiết thực vật cũng đã xác định khả năng giúp giảm bệnh bạc lá bằng biện pháp phun lên lá lúa hoặc ngâm hạt

giống kết hợp phun lên lá lúa như phun dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc nồng độ 3% và 5% lên lá lúa ở cả hai 14 và 7 NTLB giúp giảm chiều dài vết bệnh tương đương đối chứng dương [17]. Phun dịch chiết lá cây cỏ hôi nồng độ 3 - 5% ở thời điểm 14 NTLB có khả năng giảm bệnh đến 21 NSLB; trong đó, phun lên lá nồng độ 5% có khả năng giảm bệnh tương đương với thuốc hóa học [18]. Phun dịch chiết lá sống đời nồng

độ 1% ở thời điểm 14 NTLB có khả năng giảm bệnh đến 21 NSLB [19]. Ngâm hạt dịch chiết sống đời nồng độ 1% kết hợp phun lên lá lúa ở nồng độ 5% ở cả 2 thời điểm 14 và 7 NTLB giúp giảm chiều dài vết bệnh tương đương với sử dụng thuốc hóa học [9].

### 3.4. Hiệu quả giảm bệnh bạc lá của dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc và dịch chiết lá cây cỏ hôi bằng biện pháp ngâm hạt kết hợp phun lên lá lúa

**Bảng 2. Hiệu quả giảm bệnh bạc lá khi ngâm hạt giống với dịch chiết lá cây ngũ sắc nồng độ 3% kết hợp phun lên lá lúa**

| Biện pháp xử lý                                                                      | Nồng độ phun lá | Hiệu quả giảm bệnh bạc lá (%) |                           |                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------|
|                                                                                      |                 | 7 NSLB                        | 14 NSLB                   | 21 NSLB                  |
| Ngâm hạt bằng dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc nồng độ 3% kết hợp phun lá lúa ở 14 NTLB | 1%              | 11,1 ± 1,5 <sup>a</sup>       | 15,9 ± 9,2 <sup>a</sup>   | 15,2 ± 7,3 <sup>a</sup>  |
|                                                                                      | 2%              | 10,3 ± 2,0 <sup>a</sup>       | 26,2 ± 3,6 <sup>ab</sup>  | 20,9 ± 9,3 <sup>a</sup>  |
|                                                                                      | 3%              | 12,9 ± 5,7 <sup>ab</sup>      | 25,5 ± 8,4 <sup>ab</sup>  | 26,2 ± 5,3 <sup>a</sup>  |
|                                                                                      | 4%              | 29,0 ± 3,7 <sup>bc</sup>      | 35,2 ± 3,3 <sup>cd</sup>  | 31,4 ± 3,2 <sup>a</sup>  |
|                                                                                      | 5%              | 29,8 ± 9,4 <sup>bc</sup>      | 32,6 ± 6,3 <sup>abc</sup> | 20,2 ± 7,8 <sup>a</sup>  |
| Ngâm hạt bằng dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc nồng độ 3% kết hợp phun lá lúa ở 7 NTLB  | 1%              | 21,0 ± 9,8 <sup>ab</sup>      | 20,3 ± 9,2 <sup>ab</sup>  | 15,2 ± 7,3 <sup>a</sup>  |
|                                                                                      | 2%              | 23,6 ± 6,7 <sup>ab</sup>      | 30,5 ± 3,7 <sup>abc</sup> | 20,9 ± 4,7 <sup>a</sup>  |
|                                                                                      | 3%              | 28,8 ± 9,7 <sup>bc</sup>      | 45,8 ± 20,1 <sup>cd</sup> | 32,9 ± 4,6 <sup>a</sup>  |
|                                                                                      | 4%              | 44,9 ± 4,5 <sup>c</sup>       | 46,0 ± 2,6 <sup>cd</sup>  | 56,3 ± 12,2 <sup>b</sup> |
|                                                                                      | 5%              | 45,8 ± 13,5 <sup>c</sup>      | 56,2 ± 10,6 <sup>d</sup>  | 26,9 ± 10,1 <sup>a</sup> |
| Đối chứng dương (Starner 20 WP)                                                      |                 | 19,3 ± 7,4 <sup>ab</sup>      | 18,4 ± 5,2 <sup>ab</sup>  | 20,9 ± 6,7 <sup>a</sup>  |
| Mức ý nghĩa                                                                          |                 | **                            | **                        | *                        |
| CV%                                                                                  |                 | 5,310                         | 6,239                     | 2,668                    |

*Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) bằng phép thử Duncan. NTLB là ngày trước lấy bệnh. NSLB là ngày sau lấy bệnh.*

Hiệu quả giảm bệnh bạc lá khi ngâm hạt giống bằng dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc nồng độ 3% kết hợp phun lên lá lúa dịch chiết nồng độ 4% ở thời điểm 14 NTLB (là 31,4%) và 7 NTLB (là 56,3%); là 2 nghiệm thức có hiệu quả giảm bệnh cao nhất ở từng thời điểm phun dịch chiết (Bảng 2). Trong đó, ngâm hạt 3% kết hợp phun lá lúa 4% ở thời điểm 7 NTLB cao hơn so với sử dụng thuốc hóa học Starner 20 WP và duy trì 21 NSLB. Biện pháp ngâm hạt kết hợp phun lên lá ở thời điểm 7 NTLB (38 ngày sau khi sạ) ghi nhận hiệu quả giảm bệnh cao hơn so với phun lên lá ở thời điểm 14 NTLB (31 ngày sau khi sạ). Như vậy, biện pháp ngâm hạt kết hợp phun lên lá lúa dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc càng gần với thời gian xuất hiện bệnh thì hiệu quả giảm bệnh càng cao.

Hiệu quả giảm bệnh bạc lá khi ngâm hạt giống bằng dịch chiết lá cây cỏ hôi nồng độ 4% kết hợp phun lên lá lúa dịch chiết nồng độ 3 - 5% ở thời điểm 14 NTLB lần lượt là 43,3%, 46,5% và 56,1%; khác biệt ý nghĩa so với sử dụng thuốc hóa học Starner 20 WP (20,9%) (Bảng 3). Trong đó, hiệu quả giảm bệnh của biện pháp ngâm hạt kết hợp phun lên lá ở thời điểm 14 NTLB (31 ngày sau khi sạ) ghi nhận hiệu quả giảm bệnh cao hơn so với phun lên lá ở thời điểm 7 NTLB (38 ngày sau khi sạ). Như vậy, biện pháp ngâm hạt kết hợp phun lên lá lúa dịch chiết lá cây cỏ hôi càng xa với thời gian xuất hiện bệnh thì hiệu quả giảm bệnh càng cao.

Như vậy, ngâm hạt giống bằng dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc nồng độ 3% kết hợp phun lá lúa dịch



chiết nồng độ 4% ở 7 NTLB có hiệu quả giảm bệnh tốt nhất. Ngâm hạt giống bằng dịch chiết lá cây cỏ hôi nồng độ 4% kết hợp phun lá lúa dịch chiết nồng độ 5% có hiệu quả giảm bệnh tốt nhất.

**Bảng 3. Hiệu quả giảm bệnh bạc lá khi ngâm hạt giống với dịch chiết lá cây cỏ hôi nồng độ 4% kết hợp phun lên lá lúa**

| Biện pháp xử lý                                                                 | Nồng độ phun lá | Hiệu quả giảm bệnh bạc lá (%) |                            |                           |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                                                                                 |                 | 7 NSLB                        | 14 NSLB                    | 21 NSLB                   |
| Ngâm hạt bằng dịch chiết lá cây cỏ hôi nồng độ 4% kết hợp phun lá lúa ở 14 NTLB | 1%              | 14,4 ± 8,3 <sup>a</sup>       | 15,3 ± 7,5 <sup>a</sup>    | 21,1 ± 8,6 <sup>a</sup>   |
|                                                                                 | 2%              | 16,3 ± 8,7 <sup>a</sup>       | 15,8 ± 7,5 <sup>a</sup>    | 24,0 ± 6,5 <sup>ab</sup>  |
|                                                                                 | 3%              | 9,0 ± 3,2 <sup>a</sup>        | 33,9 ± 6,7 <sup>bcd</sup>  | 43,3 ± 8,4 <sup>bcd</sup> |
|                                                                                 | 4%              | 23,2 ± 8,1 <sup>a</sup>       | 39,3 ± 5,2 <sup>cd</sup>   | 46,5 ± 6,8 <sup>cd</sup>  |
|                                                                                 | 5%              | 28,2 ± 5,3 <sup>a</sup>       | 48,8 ± 5,3 <sup>d</sup>    | 56,1 ± 5,5 <sup>d</sup>   |
| Ngâm hạt bằng dịch chiết lá cây cỏ hôi nồng độ 4% kết hợp phun lá lúa ở 7 NTLB  | 1%              | 13,2 ± 7,5 <sup>a</sup>       | 11,1 ± 6,7 <sup>a</sup>    | 24,2 ± 12,3 <sup>ab</sup> |
|                                                                                 | 2%              | 11,7 ± 3,0 <sup>a</sup>       | 11,6 ± 6,0 <sup>a</sup>    | 24,2 ± 8,3 <sup>ab</sup>  |
|                                                                                 | 3%              | 9,0 ± 4,9 <sup>a</sup>        | 13,7 ± 7,9 <sup>a</sup>    | 31,6 ± 6,4 <sup>abc</sup> |
|                                                                                 | 4%              | 23,2 ± 11,2 <sup>a</sup>      | 24,8 ± 2,7 <sup>abc</sup>  | 37,3 ± 1,8 <sup>a-d</sup> |
|                                                                                 | 5%              | 22,5 ± 3,9 <sup>a</sup>       | 27,7 ± 10,4 <sup>abc</sup> | 33,7 ± 8,1 <sup>abc</sup> |
| Đối chứng đương (Starner 20 WP)                                                 |                 | 19,3 ± 7,4 <sup>a</sup>       | 18,4 ± 5,2 <sup>ab</sup>   | 20,9 ± 6,7 <sup>a</sup>   |
| Mức ý nghĩa                                                                     |                 | ns                            | **                         | **                        |
| CV%                                                                             |                 | 1,294                         | 5,479                      | 3,646                     |

*Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) bằng phép thử Duncan. NTLB là ngày trước lây bệnh. NSLB là ngày sau lây bệnh.*

Kết quả nghiên cứu cho thấy, hiệu quả giảm bệnh của dịch chiết lá cây cỏ hôi cao hơn so với dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc. Điều này có thể do các hoạt chất sinh học trong lá cây cỏ hôi có tác dụng kích thích tính kháng bệnh của cây lúa tốt hơn so với lá cây hoa ngũ sắc. Như vậy cần có các nghiên cứu tiếp theo để xác định cơ chế giúp giảm bệnh khi xử lý 2 loại dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc và dịch chiết lá cây cỏ hôi.

#### 4. KẾT LUẬN

Ngâm hạt giống bằng dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc (nồng độ 3%, 4% và 5%) và dịch chiết lá cây cỏ hôi (nồng độ 4% và 5%) có khả năng giảm bệnh bạc lá tương đương sử dụng thuốc hóa học Starner 20 WP và duy trì đến 21 NSLB. Trong đó, 3% dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc và 4% dịch chiết lá cây cỏ hôi là nồng độ thấp nhất có hiệu quả giảm bệnh nên có thể tiếp tục nghiên cứu ứng dụng vào thực tế sản xuất. Hiệu quả giảm bệnh khi ngâm hạt bằng dịch chiết cỏ hôi luôn cao hơn so với cỏ cứt heo. Khả năng giúp giảm

bệnh ghi nhận ở biện pháp ngâm hạt giống kết hợp phun lên lá đều cao hơn so với biện pháp ngâm hạt. Đối với dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc thì biện pháp ngâm hạt kết hợp phun lên lá ở thời điểm 7 NTLB ghi nhận hiệu quả giảm bệnh cao hơn so với phun lên lá ở thời điểm 14 NTLB. Ngược lại, dịch chiết lá cây cỏ hôi thì biện pháp ngâm hạt kết hợp phun lên lá ở thời điểm 14 NTLB ghi nhận hiệu quả cao giảm bệnh hơn so với phun lên lá ở thời điểm 7 NTLB. Hiệu quả giảm bệnh cao nhất khi ngâm hạt giống bằng dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc nồng độ 3% kết hợp phun lá lúa dịch chiết nồng độ 4% ở 7 NTLB và ngâm hạt giống bằng dịch chiết lá cây cỏ hôi nồng độ 4% kết hợp phun lá lúa dịch chiết nồng độ 5% ở 14 NTLB. Như vậy, ngâm hạt bằng dịch chiết hoặc ngâm hạt kết hợp phun lên lá lúa đều được áp dụng trước khi có sự xuất hiện của mầm bệnh nhưng vẫn hiệu quả giảm bệnh vẫn được ghi nhận tương đương so với sử dụng thuốc hóa học; do đó cần nghiên cứu tiếp theo để xác định cơ chế giúp giảm bệnh khi xử

lý hai loại dịch chiết lá cây hoa ngũ sắc và dịch chiết lá cây cỏ hôi.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Swings J., van Den Mooter M., Vauterin L., Hoste B., Gillis M., Mew T. W. (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(3), 309 - 311.
- Xu X., Li Y., Xu Z., Yan J., Wang Yong, Wang Yijie. (2022). TALE-induced immunity against the bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Phytopathology Research*, 4(1), 47.
- Dinh H. D., Oanh N. K., Toan N. D., Du P. V., Loan L. C. (2008). Pathotype profile of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates from the rice ecosystem in Cuu Long river Delta. *Omonrice*, 16, 34 - 40.
- Vũ Triệu Mân, Bùi Cách Tuyến, Nguyễn Văn Tuất, Phạm Văn Kim (Chủ biên). *Bệnh hại cây trồng Việt Nam*. Nxb Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Trang 107 - 113.
- Kagale S., Marimuthu T., Thayumanavan B., Nandakumar R., 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(2), 91 - 100.
- Govindappa M., Umesha S., Lokesh S. (2011). *Adhatoda vasica* leaf extract induces resistance in rice against bacterial leaf blight disease (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 3(1), 6 - 14.
- Nisha S., Revathi K., Chandrasekaran R., Kirubakaran S. A., Sathish-Narayanan S., Stout M. J., et al. (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.
- Khoa N. Đ., Xa T. V., Hao 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.
- Xa T. V., Thoa T. K., Thư T. T. A., Khoa N. D. (2023). Effects of seed soaking and foliar spraying of *Kalanchoe pinnata* aqueous leaf extracts against rice bacterial leaf blight. *CTU Journal of Innovation and Sustainable Development*, 15(3), 12 - 22.
- Xa T. V., Thoa T. K., Độ N. Đ., Khoa N. Đ. (2023). Seed soaking using methanol *Kalanchoe pinnata* leaf extracts induces rice resistance against bacterial leaf blight. *International Journal of Plant Biology*, 14(4), 1155 - 1166.
- Võ Văn Chi (2012). *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. Nxb Y học. 893 trang.
- Cuong, N. C., Nguyen, T. Q., Kanaori, K., Binh, T. D., Dao, X. H., Vang, L. V., & Kamei, K. (2021). Antifungal activities of *Ageratum conyzoides* L. extract against rice pathogens *Pyricularia oryzae* Cavara and *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agriculture*, 11(11), 1169.
- Khoa N. Đ., Thúy P. T. H., Thủy T. T. T., Collinge D. B., Jørgensen H. J. L. (2011). Disease-reducing effect of *Chromolaena odorata* extract on sheath blight and other rice diseases. *Phytopathology*, 101(2), 231 - 240.
- Rodríguez-Algaba J., Sørensen J. C., Sørensen H., Khoa N. Đ., Collinge D. B., Jørgensen H. J. L. (2015). Activity-guided separation of *Chromolaena odorata* leaf extract reveals fractions with rice disease-reducing properties. *European journal of plant pathology*, 143(2), 331 - 341.
- Kauffman, H. E., Reddy, A. P. K., Hsieh, S. P. Y., Merca, S. D. (1973). An Improved Technique for Evaluating Resistance of Rice Varieties to *Xanthomonas oryzae*. *Plant Disease Report*, 57, 737 - 741.
- Trương Văn Xạ, Nguyễn Đức Độ và Nguyễn Đắc Khoa (2024). Ngâm hạt lúa với cao phân đoạn lá sống đời (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.) để kích kháng bệnh bạc lá (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, số đặc biệt: Bệnh hại thực vật, tháng 7/2024, 61 - 69.
- Nguyễn Thị Thúy Ngân, Trương Văn Xạ, Nguyễn Đắc Khoa (2024). Khảo sát cơ chế kích kháng bệnh bạc lá khi phun lên lá lúa dịch trích lá cây ngũ sắc. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, số đặc biệt: Bệnh hại thực vật, tháng 7/2024, 44 - 51.

18. Trương Văn Xạ, Nguyễn Thị Tuyết Mai và Nguyễn Đắc Khoa (2022). *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*. Kỷ yếu Hội thảo Quốc gia Bệnh hại Thực vật Việt Nam lần thứ 21 ngày 22/7/2022 tại thành Phố Đà Nẵng. Nxb Nông nghiệp, 202 - 212.

19. Nguyễn Thị Thu Hương, Lâm Tấn Hào, Nguyễn Đắc Khoa (2018). Hiệu quả giảm bệnh và cơ chế kích kháng liên quan đến enzyme phenylalanine ammonia - lyase và polyphenol oxidase. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 54(7), 13 - 21.

## **COMPARISONS OF THE DISEASE-REDUCING EFFECTS AGAINST RICE BACTERIAL LEAF BLIGHT OF AQUEOUS LEAF EXTRACTS OF *Ageratum conyzoides* AND *Chromolaena odorata***

**Truong Van Xa<sup>1</sup>, Nguyen Chi Thien<sup>1</sup>, Nguyen Dac Khoa<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Vinh Long University of Technology Education

<sup>2</sup> Can Tho University

### **Abstract**

Bacterial leaf blight dramatically reduces rice yield and quality, particularly during wet seasons. Disease-reducing effects of the aqueous leaf extracts of *Ageratum conyzoides* and *Chromolaena odorata* were observed under net house conditions. This study aimed at comparing the effects of these extracts using two application methods, *i.e.*, seed soaking 24 hrs before sowing and combinations of seed soaking and foliar spraying either 7 or 14 days before pathogen inoculation (DBI). Using seed soaking, the 3%, 4% and 5% (w/v) extracts of *A. conyzoides* and 4% and 5% *C. odorata* showed similar effects as that of the chemical control (Starnar 20 WP) where the effects of *A. conyzoides* were lower compared to those of *C. odorata*. Seed soaking combined with foliar spraying exhibited higher effects than seed soaking did. For *A. conyzoides* extracts, combinations of seed soaking and foliar spraying 7 DBI provided higher effects than combinations of seed soaking and foliar spraying 14 DBI did, where the highest effects were obtained using 3% for seed soaking and 4% for foliar spraying 7 DBI (56.3%). In contrast, combinations of seed soaking and foliar spraying 14 DBI using *C. odorata* extracts provided higher effects than combinations of seed soaking and foliar spraying 7 DBI did, where the highest effects were obtained using 4% for seed soaking and 5% for foliar spraying 14 DBI (56.1%).

**Keywords:** *Ageratum conyzoides*, bacterial leaf blight, *Chromolaena odorata*, rice, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

**Ngày nhận bài:** 18/4/2025

**Ngày gửi phản biện:** 12/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 26/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 23/6/2025

# **KHẢ NĂNG KÍCH KHÁNG BỆNH BẠC LÁ (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) KHI NGÂM HẠT GIỐNG KẾT HỢP PHUN LÊN LÁ LÚA CAO CHIẾT LÁ SỐNG ĐỜI (*Kalanchoe pinnata*) LY TRÍCH BẰNG DUNG MÔI NƯỚC**

Phạm Thiết Trình<sup>1</sup>, Nguyễn Minh Khôi<sup>1</sup>,

Trương Văn Xạ<sup>2</sup>, Nguyễn Đắc Khoa<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long

\*Email: ndkhoa@ctu.edu.vn

## **TÓM TẮT**

Bạc lá (cháy bìa lá) do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây ra là một trong những bệnh hại quan trọng trên ruộng lúa. Bài báo này trình bày khả năng kích thích tính kháng bệnh lưu dẫn (kích kháng) trong cây lúa đối với bệnh bạc lá khi ngâm hạt giống kết hợp phun lên lá lúa cao chiết lá sống đời (*Kalanchoe pinnata*) ly trích bằng phương pháp tách chiết lỏng - lỏng với dung môi nước. Ba nồng độ cao chiết [1; 1,5; 2% (w/v)] và 3 biện pháp xử lý gồm (1) ngâm hạt + phun ở thời điểm 14 ngày trước lây bệnh (NTLB); (2) ngâm hạt + phun ở thời điểm 7 NTLB; (3) ngâm hạt + phun ở cả hai thời điểm 14 và 7 NTLB được sử dụng để khảo sát khả năng giúp giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới. Chiều dài vết bệnh được ghi nhận ở 3 thời điểm 7, 14, 21 ngày sau lây bệnh (NSLB). Kết hợp ngâm hạt và phun lên lá lúa với cao chiết 1,5% ở thời điểm 14 NTLB thể hiện hiệu quả giảm bệnh đến 21 NSLB. Kết quả khảo sát hoạt tính của 4 enzyme liên quan đến cơ chế kháng bệnh bạc lá gồm peroxidase (POX), catalase (CAT), polyphenol oxidase (PPO) và phenylalanine ammonia lyase (PAL) cho thấy khả năng giúp giảm bệnh của cao chiết lá sống đời có liên quan đến cơ chế kích kháng. Sự xuất hiện đơn lẻ của mầm bệnh hoặc cao chiết đều có khả năng làm tăng hoạt tính của 4 enzyme nhưng hoạt tính của các enzyme này tăng cao hơn rất nhiều khi có sự hiện diện của cả mầm bệnh (lây bệnh) và cao chiết trên cây lúa (ngâm hạt giống kết hợp phun lên lá lúa).

**Từ khóa:** Bạc lá, *Kalanchoe pinnata*, kích kháng, lúa, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

## **1. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Lúa (*Oryza sativa* L.) là cây trồng quan trọng trong sản xuất nông nghiệp tại nhiều quốc gia châu Á bao gồm Việt Nam. Tuy nhiên, trong quá trình canh tác, cây lúa thường xuyên bị ảnh hưởng bởi nhiều loại bệnh hại do nấm, vi khuẩn gây ra, dẫn đến giảm năng suất và chất lượng hạt gạo. Bệnh bạc lá (cháy bìa lá) do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), được xem là bệnh quan trọng trên ruộng lúa, gây thiệt hại năng suất lên đến 74% vào mùa mưa [1]. Việc lạm dụng thuốc bảo vệ thực vật hóa học để kiểm soát bệnh đã và đang đặt ra nhiều lo ngại về môi trường và sức khỏe cộng đồng. Trước thực trạng đó, xu hướng tìm kiếm các biện pháp phòng trị bệnh có nguồn gốc sinh học, an toàn và thân thiện với môi trường ngày càng được quan tâm [2, 3].

Kích kháng là một trong những biện pháp sinh học đang được quan tâm và ứng dụng để phòng trừ bệnh hại trên cây trồng, bao gồm bệnh bạc lá [4 - 8]. Cây trồng được kích thích khả năng phòng vệ vốn có bằng các tác nhân kích kháng (hóa chất, vi sinh vật và dịch trích thực vật), gồm các cơ chế như: Tăng tích lũy các hợp chất oxy hóa, phenol, hoặc sự gia tăng hoạt tính của các protein liên quan đến quá trình xâm nhập và phát triển của mầm bệnh, hoặc các enzyme phòng vệ (peroxidase, catalase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia-lyase...) [9]. Nhiều nghiên cứu ghi nhận được hiệu quả của dịch trích thực vật trong việc làm giảm bệnh bạc lá thông qua cơ chế kích thích tính kháng bệnh tự nhiên trên cây lúa. Các loài thực vật này bao gồm: Cà độc dược (*Datura metel*) [5], cỏ hôi (*Chromolaena odorata*) [6], xuân tiết (*Adhatoda vasica*) [7], sống

đồi (*Kalanchoe pinnata*) [8], bèo tây (*Eichhornia crassipes*), rau dền gai (*Amaranthus spinosus*), nhài tây (*Jasminum grandiflorum*) [9], bạch đầu ông (*Vernonia cinerea*) [10]. Những kết quả trên mở ra triển vọng ứng dụng dịch trích thực vật như một giải pháp an toàn và bền vững trong việc phòng trừ bệnh bạc lá.

Sống đời (*Kalanchoe pinnata*) là loài thực vật phổ biến ở vùng nhiệt đới, được biết đến với nhiều hoạt tính sinh học như: Kháng khuẩn, kháng viêm, chống oxy hóa [11]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh, dịch trích từ lá sống đời có khả năng làm giảm bệnh bạc lá [8, 12 - 14]. Tuy nhiên, dịch trích thô còn nhiều hạn chế như: Chứa nhiều tạp chất, khó bảo quản, gây trở ngại cho việc xác định các hợp chất có hoạt tính sinh học cụ thể và khó ứng dụng thực tiễn. Vì thế, nghiên cứu chiết xuất các hợp chất có khả năng kích kháng trong dịch trích lá sống đời với các loại dung môi khác nhau được triển khai.

Nước là dung môi phân được sử dụng nhiều trong quy trình tách chiết, với chi phí thấp an toàn và có khả năng tách chiết hiệu quả nhiều hợp chất phân cực như nhóm phenol [15]. Cao chiết lá sống đời được ly trích bằng dung môi nước đã được chứng minh hiệu quả giảm bệnh khi phun lên lá [16]. Nghiên cứu của Xạ và cs (2023) [13] đã ứng dụng biện pháp ngâm hạt kết hợp phun lên lá dịch trích thô lá sống đời và ghi nhận được hiệu quả giảm bệnh. Tuy nhiên, dịch trích còn nhiều hạn chế như đã nêu ở trên. Dựa trên những cơ sở đó, nghiên cứu này ứng dụng phương pháp ngâm hạt lúa kết hợp phun lên lá nhưng sử dụng cao chiết lá sống đời được ly trích bằng dung môi nước nhằm đánh giá khả năng làm giảm bệnh bạc lá trong điều kiện nhà lưới. Việc kết hợp ngâm hạt giống và phun cao chiết lên lá tại các thời điểm hợp lý có thể tạo ra hiệu ứng cộng hưởng, tăng cường khả năng bảo vệ cây lúa trước sự xâm nhiễm của mầm bệnh.

## **2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu**

Cây sống đời 12 tháng tuổi được thu hái vào lúc 7 giờ sáng tại nhà lưới Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long.

Giống lúa nguyên chủng Jasmine 85 được sử dụng trong nghiên cứu do Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất Giống, Tập đoàn Lộc Trời, tỉnh An Giang cung cấp.

Vi khuẩn gây bệnh bạc lá - *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XCT13 được cung cấp bởi nhóm nghiên cứu bệnh học thực vật, Bộ môn Sinh học Phân tử, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ.

Môi trường Wakimoto cải tiến gồm: Sucrose (20 g), peptone (5 g),  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (5 g),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,82 g),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,05 g), agar (15 g), nước cất (1.000 mL) [17].

Các hóa chất cho khảo sát sinh hóa bao gồm: Dung dịch đệm, cơ chất và chất chỉ thị phản ứng. Trong đó, các dung dịch đệm bao gồm: Sodium phosphate 0,1 M (pH 7,0), sodium phosphate 0,1 M (pH 6,5), sodium borate 0,1 M (pH 8,7) và potassium phosphate 0,1 M (pH 7,0). Cơ chất  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,05M, 0,1 M, L phenylalanine 1 M và hỗn hợp catechol 0,1 M. Chất chỉ thị guaiacol 0,15 M.

## **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

### **2.2.1. Chuẩn bị cao chiết**

Lá sống đời được khử trùng bề mặt ngay sau khi thu hái, 300 g lá được cắt nhuyễn và đồng nhất với 1.500 mL nước (1: 5 w/v). Hỗn hợp được đưa vào hệ thống trích ly bằng sóng siêu âm (120 W, 60 phút). Sau đó, dịch chiết lần lượt được làm trong và lọc bằng  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  và giấy lọc Whatman ( $\varnothing$ 110 mm). Sau đó, dịch chiết được cô quay ở 50°C với tốc độ quay 5.000 rpm (vòng trên phút). Cao chiết được làm khô ở 50°C và trữ ở -4°C [3].

### **2.2.2. Khảo sát hiệu quả giảm bệnh của cao chiết lá sống đời bằng phương pháp ngâm hạt kết hợp phun lên lá trong điều kiện nhà lưới**

Đất trồng lúa dùng trong thí nghiệm được thu thập tại khuôn viên Trường Đại học Cần Thơ. Đất được phơi khô, làm nhuyễn và được xử lý với vôi bột ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), nhằm tiêu diệt mầm bệnh trong đất. Sau đó, đất được chuyển vào chậu với kích thước 14 x 12 cm (7 kg/chậu), tiến hành ngâm nước 4 - 5 ngày và rửa vôi, sau đó đất được làm ráo trước khi gieo. Hạt lúa Jasmine 85 được xử lý 3 sôi 2 lạnh (55°C) trong

30 phút, sau đó ngâm trong cao chiết 24 giờ và được ủ ở 28°C trong 48 giờ.

Huyền phù vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XCT13 được chuẩn bị bằng cách chuyển khuẩn lạc 2 ngày tuổi trên môi trường Wakimoto cải tiến vào 10 mL nước cất và mật số được hiệu chỉnh đạt  $10^9$  CFU/mL [6].

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 29 nghiệm thức và 3 lần lặp lại, tương ứng với 3 khóm lúa trong một chậu. Ba nồng độ cao chiết [1; 1,5; 2%  $[(W_{\text{lá tươi}}/V_{\text{nước cất}})]$  và 3 biện pháp xử lý gồm: (1) ngâm hạt + phun ở thời điểm 14 NTLB, (2) ngâm hạt + phun ở thời điểm 7 NTLB và (3) ngâm hạt + phun ở cả hai thời điểm 14 và 7 NTLB được sử dụng để khảo sát khả năng giúp giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới. Chiều dài vết bệnh được ghi nhận ở 3 thời điểm: 7, 14, 21 NSLB. Thuốc hóa học Starner 20WP được sử dụng làm đối chứng dương, phun lên lúa với lượng 5 mL ở nồng độ 1 mg/mL tại 5, 10, 15 NSLB và nước cất là đối chứng âm [6]. Tại thời điểm 45 ngày sau khi gieo, cây lúa được lây bệnh nhân tạo bằng phương pháp cắt chóp lá [18], huyền phù vi khuẩn với mật số  $10^9$  CFU/mL được tẩm vào kéo, sau đó cắt 3 lá trưởng thành trên mỗi chồi, tại vị trí cách chóp lá 2 - 3 cm, thực hiện trên 5 chồi mỗi bụi lúa. Kết quả được ghi nhận bằng cách đo chiều dài vết bệnh tại thời điểm 7, 14, 21 NSLB. Số liệu thu thập được xử lý thống kê nhằm xác định nghiệm thức có nồng độ thấp nhất và thời gian phun tối ưu, nhưng vẫn đạt được hiệu quả giảm bệnh tương đương với nghiệm thức xử lý với thuốc hóa học tại các thời điểm đánh giá.

### 2.2.3. Khảo sát hoạt tính trong mô lá lúa

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 2 yếu tố (cao chiết và mầm bệnh *Xoo*), được thực hiện với 3 lần lặp lại và 4 nghiệm thức: (1) cây lúa được phun cao chiết lá sống đòi nồng độ 1% tại 7 NTLB và có lây bệnh (cao chiết + lây bệnh), (2) cây lúa được phun cao chiết lá sống đòi nồng độ 1% tại 7 NTLB và không lây bệnh (cao chiết + không lây bệnh), (3) cây lúa được phun nước cất thanh trùng tại 7 NTLB và có lây bệnh (nước + lây bệnh), (4) ở nghiệm thức đối chứng, cây lúa được phun nước cất thanh trùng tại 7 NTLB và không lây bệnh (nước + không lây bệnh). Quy trình trồng lúa,

chuẩn bị mầm bệnh và lây bệnh được thực hiện tương tự thí nghiệm 1.

#### - Thu mẫu lá lúa và ly trích enzyme

Mẫu lá lúa của 4 nghiệm thức được thu vào buổi sáng sớm ở thời điểm 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 NSLB và nhanh chóng được gói bằng giấy bạc và trữ trong nito lỏng. 0,1 g lá lúa được nghiền trong nito lỏng, sau đó đồng nhất sản phẩm nghiền với 1,5 mL dung dịch đệm (tương ứng với từng enzyme). Hỗn hợp được ly tâm lạnh ở 4°C với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 30 phút. Thu dịch nổi sau khi ly tâm, trữ mẫu ở -4°C [6].

#### - Hoạt tính enzyme peroxidase (POX)

Hoạt tính enzyme POX được xác định thông qua sự thay đổi của giá trị hấp thụ quang phổ ở bước sóng 470 nm ( $OD_{470nm}$ ), phản ánh sự hình thành sản phẩm tetraguaiacol có màu nâu từ phản ứng phân giải guaiacol không màu do POX xúc tác. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại. Mẫu trắng (blank) được hiệu chỉnh về 0 tại giá trị  $OD_{470nm}$  gồm: 1,6 mL dung dịch  $H_2O_2$  0,05 M, 0,15 mL dung dịch guaiacol 0,15 M, 0,15 mL và 0,15 mL đệm sodium phosphate 0,1 M pH 6,5. Mẫu khảo sát bao gồm: 1,6 mL dung dịch  $H_2O_2$  0,05 M, 0,15 mL dung dịch guaiacol 0,15 M và 0,15 mL enzyme. Giá trị  $OD_{470nm}$  được ghi nhận từ thời điểm bắt đầu phản ứng đến phút thứ 2, với khoảng 30 giây ghi nhận một lần [19].

#### - Hoạt tính enzyme catalase (CAT)

Hoạt tính enzyme CAT được đánh giá qua sự thay đổi giá trị hấp thụ quang phổ tại bước sóng 240 nm ( $OD_{240nm}$ ) của dung dịch  $H_2O_2$ , giá trị giảm dần theo thời gian phản ứng. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại. Mẫu trắng (blank) tại giá trị  $OD_{240nm}$  được hiệu chỉnh về 0 bao gồm 2 mL dung dịch đệm sodium-potassium phosphate, pH 7,0. Mẫu khảo sát bao gồm 1,75 mL dung dịch  $H_2O_2$  0,1 M và 0,15 mL enzyme. Giá trị  $OD_{240nm}$  được ghi nhận ngay khi bắt đầu phản ứng và ghi nhận ở mỗi 30 giây [20].

#### - Hoạt tính enzyme polyphenol oxidase (PPO)

Hoạt tính enzyme PPO được ghi nhận qua sự thay đổi giá trị hấp thụ quang phổ ở bước sóng 490 nm ( $OD_{490nm}$ ) của sản phẩm benzoquinone có màu nâu từ phản ứng chuyển hóa catechol dưới sự xúc tác của enzyme PPO. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Mẫu



trắng (blank) tại giá trị OD<sub>490nm</sub> được hiệu chỉnh về 0 gồm 1,75 mL dung dịch catechol 0,2 M và 0,15 mL dung dịch đệm. Mẫu khảo sát gồm 1,75 mL dung dịch catechol 0,2 M và 0,15 mL dung dịch enzyme. Giá trị OD<sub>490nm</sub> được ghi nhận từ lúc bắt đầu phản ứng và ghi nhận ở mỗi 30 giây [21].

*- Hoạt tính enzyme phenylalanine ammonia-lyase (PAL)*

Hoạt tính enzyme PAL được ghi nhận qua sự thay đổi giá trị hấp thụ quang phổ ở bước sóng 290 nm (OD<sub>290nm</sub>) của sản phẩm tran-cinamics axit từ phản ứng khử amin L-phenylalanine dưới sự xúc tác của PAL. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Mẫu trắng (blank) tại giá trị OD<sub>290nm</sub> được hiệu chỉnh về 0 gồm: 0,7 mL dung dịch đệm borate 0,1 M, pH 8,7, 1 mL dung dịch L-phenylalanine 1,0 M và 0,15 mL nước cất. Mẫu khảo sát gồm: 0,5 mL dung dịch borate 0,1 M, pH 8,7, 1 mL dung dịch L-phenylalanine 0,1 M, 0,15 mL nước cất và 0,2 mL dung dịch enzyme. Phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ 37°C trong 40 phút, phản ứng được dừng bằng 2 mL dung dịch HCl 5N [22].

*- Phân tích số liệu*

Số liệu thí nghiệm khảo sát hiệu quả giảm bệnh trong nhà lưới và giá trị hấp thụ quang phổ thể hiện sự thay đổi hoạt tính enzyme của 4 nghiệm thức từ 0 - 7 NSLB được trình bày dưới dạng biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2010. Các giá trị trung bình được phân tích bằng phần mềm thống kê IBM SPSS 22.0 thông qua phân tích phương sai 1 chiều (One-way ANOVA) theo kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 5%.

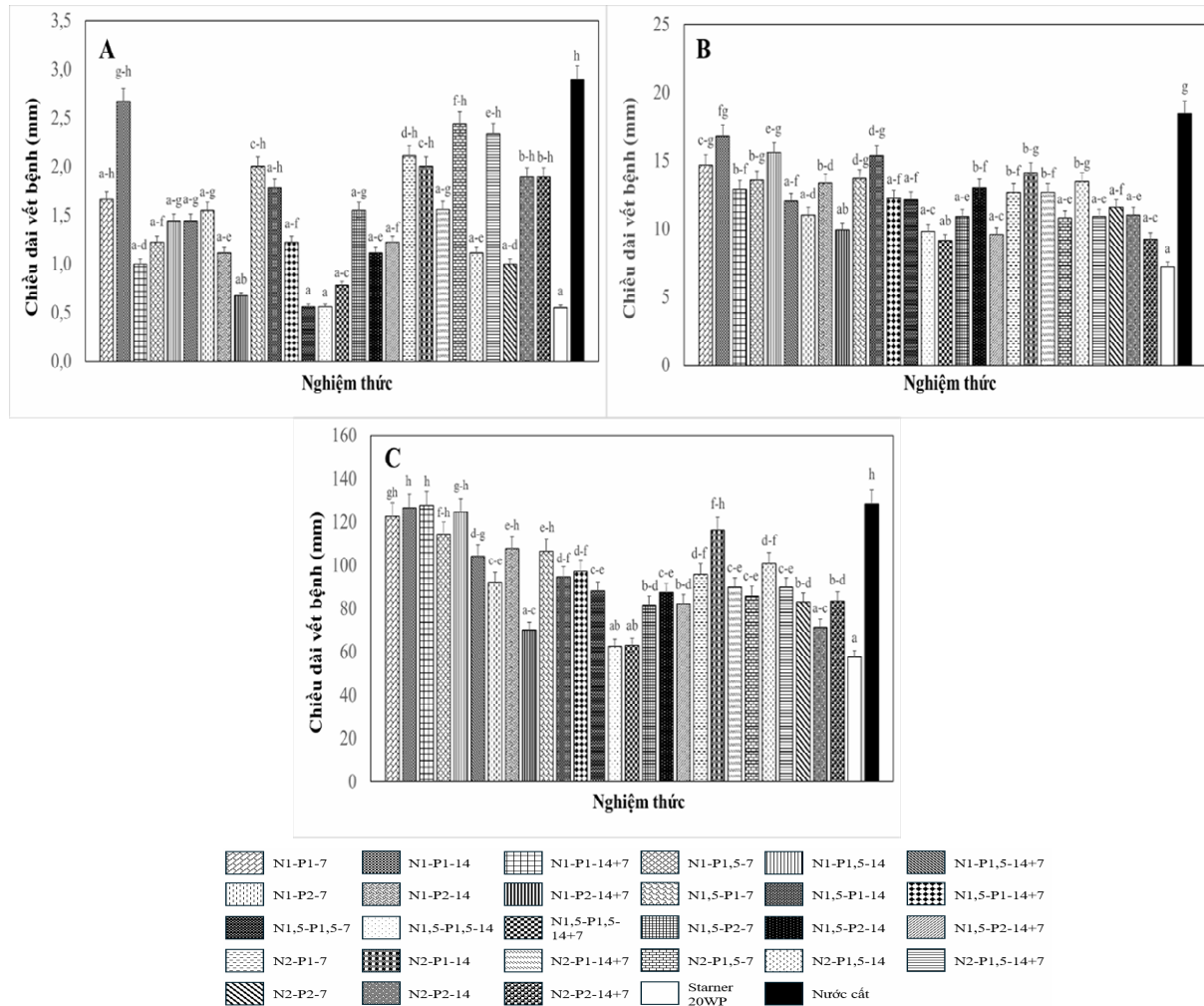
### **3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

#### **3.1. Hiệu quả giảm bệnh bạc lá của cao chiết lá sống đời trong điều kiện nhà lưới**

Hình 1 trình bày kết quả chiều dài vết bệnh tại các thời điểm 7, 14, 21 NSLB. Các nghiệm thức áp dụng cao chiết được thực hiện ở dãy nồng độ 1; 1,5; 2% (w/v) khi kết hợp ngâm hạt và phun lên lá trong điều kiện nhà lưới, cho thấy hiệu quả ức chế mầm bệnh đáng kể.

Tại thời điểm 7 NSLB (Hình 1A), 19/27 nghiệm thức có chiều dài vết bệnh tương đương với đối

chứng dương và thấp hơn đáng kể so với đối chứng âm. Đến 14 NSLB (Hình 1B), các nghiệm thức ngâm kết hợp phun tại nồng độ 1% không duy trì được hiệu quả, với chiều dài vết bệnh tăng đáng kể so với đối chứng dương. Trong khi đó, các nghiệm thức tại nồng độ 1,5 và 2% khi ngâm hạt kết hợp phun tại các thời điểm 14, 7 và kết hợp 14 và 7 NTLB đều duy trì hiệu quả giảm bệnh. Tại thời điểm 21 NSLB (Hình 1C), chiều dài vết bệnh tăng ở tất cả các nghiệm thức, tuy nhiên hiệu quả giảm bệnh giữa các nghiệm thức vẫn có sự khác biệt đáng kể. Các nghiệm thức tại nồng độ 1% hoàn toàn mất hiệu quả giảm bệnh, trong khi các nghiệm thức tại 1,5 và 2% vẫn duy trì hiệu quả. Đặc biệt, nghiệm thức tại nồng độ 1,5% là nồng độ thấp nhất khi phun đơn lẻ tại 14 NTLB và kết hợp 14 và 7 NTLB vẫn thể hiện hiệu lực phòng bệnh tương đương với nghiệm thức sử dụng thuốc hóa học. Mặc dù cả 2 nghiệm thức có hiệu quả tương đương, phương án phun 1 lần tại thời điểm 14 NTLB có ưu thế hơn về mặt tiết kiệm công sức lao động, chi phí cũng như nguyên liệu. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Hương và cs (2018) [12], theo đó dịch trích lá sống đời có hiệu quả giảm bệnh khi phun lên lá tại thời điểm 14 NTLB. Kết quả nghiên cứu của Xạ và cs (2023) [13] cho thấy dịch trích lá sống đời có khả năng làm giảm bệnh khi ngâm hạt lúa và phun lên lá tại thời điểm 14 và 7 NSLB. Trong khi đó, kết quả nghiên cứu hiện tại cho thấy việc sử dụng cao chiết lá sống đời ly trích bằng dung môi nước đạt được hiệu quả giảm bệnh tương đương với thuốc hóa học, ngay cả khi xử lý ngâm hạt và phun lên lá 1 lần tại thời điểm 14 NTLB. Đồng thời, giảm đi số lần phun so với phương pháp của nghiên cứu trên. Điều này có thể lý giải rằng, cao chiết có chứa hàm lượng hoạt chất sinh học đậm đặc và ổn định khi so với dịch trích thô, vì thế làm tăng hiệu quả kích kháng và duy trì ở thời gian dài. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Quiroz-Reyes và cs (2013) [23], theo đó cao chiết *Theobroma cacao* L. được chứng minh có hàm lượng polyphenol cao hơn so với dịch trích thô.



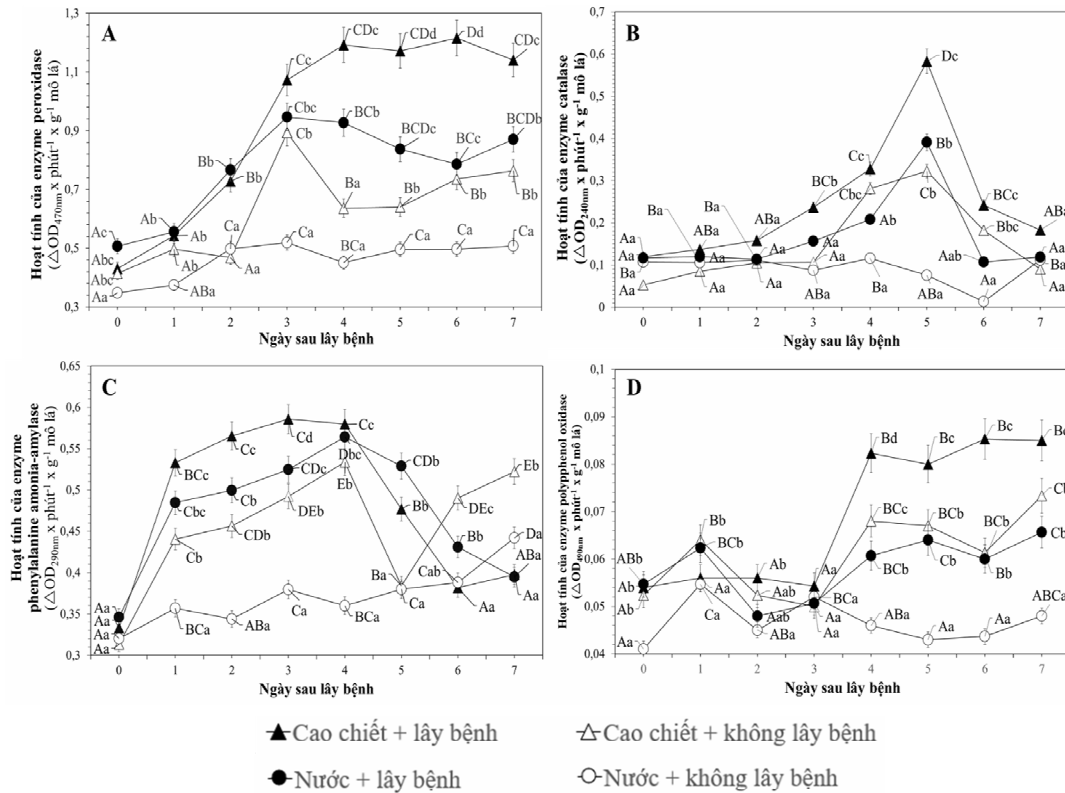
Hình 1. Trung bình giá trị chiều dài vết bệnh được ghi nhận tại thời điểm 7 NSLB (A); 14 NSLB (B) và 21 NSLB (C) khi kết hợp ngâm hạt và phun lên lá cao chiết lá sống đời (*Kalanchoe pinnata*) ở 3 nồng độ 1; 1,5; 2% ( $W_{\text{lá tươi}}/V_{\text{nước cất}}$ ) với 3 phương pháp phun tại thời điểm 14 NTLB, 7 NTLB và phun kết hợp cả 2 thời điểm. Đối chứng dương là Starner 20WP, phun vào 5, 10, 15 NSLB. Nước cất được sử dụng làm đối chứng âm

Ghi chú: N: Phương pháp ngâm hạt; P: Phương pháp phun lên lá lúa; 7: Thời điểm phun 7 NTLB; 14: 14 NTLB; 14+7: Kết hợp 14 và 7 NTLB. Các chữ cái trên các cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% theo kiểm định Duncan.

### 3.2. Cơ chế kích kháng liên quan đến các enzyme phòng vệ của cao chiết lá sống đời

Hoạt tính enzyme POX tại nghiệm thức nước + không lây bệnh (Hình 2A) luôn duy trì ở mức thấp hơn đáng kể so với các nghiệm khác, dao động từ 0 - 4 NSLB và duy trì ổn định sau đó. Đáng chú ý, hoạt tính POX tăng đáng kể khi có sự xuất hiện của mầm bệnh, giá trị hấp thụ có xu hướng tăng mạnh từ 0 - 7 NSLB, đạt giá trị cao nhất tại 3 NSLB, sau đó giảm và duy trì ổn định đến 7 NSLB. Nhìn chung, cả 2 nghiệm thức xử lý với nước có xu hướng tăng từ 0 - 7 NSLB, tuy nhiên tăng mạnh và rõ rệt hơn khi có sự xâm nhiễm của vi khuẩn gây bệnh *Xoo*. Có thể giải

thích rằng, hoạt tính enzyme POX tăng ở giai đoạn đầu do vi khuẩn *Xoo* xâm nhập qua vết thương của lá lúa, sau đó nhanh chóng tăng sinh và di chuyển sang các mô lân cận trong khoảng 24 - 96 giờ đầu [24]. POX đóng vai trò quan trọng trong quá trình lignin hóa vách tế bào nhằm hạn chế sự xâm nhập của mầm bệnh. Đặc biệt, trong trường hợp có sự xâm nhiễm của mầm bệnh là vi khuẩn, POX còn đóng vai trò điều hòa nồng độ các gốc oxy hóa tự do ROS (reactive oxygen species), trong đó  $H_2O_2$  là chất oxy hóa đóng vai trò quan trọng trong cơ chế phòng vệ của cây trồng, có khả năng gây độc cho mầm bệnh, chặn sự xâm nhập và tăng sinh của vi khuẩn gây bệnh [25].



Hình 2. Sự thay đổi hoạt tính enzyme POX (A), CAT (B), PAL (C), PPO (D) trong mô lá của giống lúa Jasmine 85 được khảo sát ở thời điểm từ 0 - 7 NSLB

Ghi chú: Cây lúa được xử lý với cao chiết lá sống đời ở nồng độ 1,5% khi ngâm hạt kết hợp phun lên lá tại 14 NTLB, nước cất được sử dụng làm đối chứng. Chữ cái thường: Sự thay đổi giữa các nghiệm thức trong cùng một thời điểm khảo sát; chữ cái in hoa: Sự thay đổi của một nghiệm thức từ 0 - 7 NSLB. Các chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% theo kiểm định Duncan.

Khi cây lúa chỉ được xử lý với cao chiết lá sống đời và không có sự lây nhiễm mầm bệnh (cao chiết + không lây bệnh), hoạt tính enzyme POX tăng từ 0 - 3 NSLB, đạt giá trị cao nhất tại 3 NSLB, sau đó giảm mạnh và giữ ổn định đến 7 NSLB và luôn cao hơn so với nghiệm thức nước + không lây bệnh. Có thể thấy rằng, cao chiết là tác nhân dẫn đến sự thay đổi hoạt tính enzyme POX. Khi có sự xuất hiện đồng thời của cao chiết và mầm bệnh, hoạt tính enzyme tăng mạnh tại 0 - 3 NSLB và đạt mức cao nhất tại 6 NSLB và luôn giữ ở mức cao hơn so với các nghiệm thức còn lại. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Kagale và cs (2004) [5], ghi nhận sự tăng hoạt tính enzyme POX từ 2 - 4 NSLB khi sử dụng cao chiết cà độc dược bằng phương pháp phun đơn lẻ. Tương tự, kết quả nghiên cứu của Xạ và cs (2023) [26] cũng chỉ ra được sự gia tăng mạnh mẽ của enzyme POX khi có sự xuất hiện đồng thời của dịch trích lá sống đời và mầm bệnh, đặc biệt trong khoảng từ 0 - 3 NSLB.

Hình 2B thể hiện sự thay đổi hoạt tính của enzyme CAT tại 4 nghiệm thức khác nhau, từ 0 - 7 NSLB. Hoạt tính enzyme CAT có xu hướng giữ ổn định trong suốt thời gian khảo sát ở nghiệm thức nước + không lây bệnh và luôn thấp hơn so với các nghiệm thức còn lại. Khi có mặt mầm bệnh (nước + lây bệnh), hoạt tính enzyme CAT tăng từ 0 - 5 NSLB, đạt giá trị cao nhất tại 5 NSLB, sau đó giảm mạnh và giữ ổn định đến 7 NSLB. Điều này cho thấy hệ thống phòng vệ của cây lúa phản ứng vào mầm bệnh bằng cách tăng cường hoạt động của enzyme CAT nhằm phân giải  $H_2O_2$ , kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Khoa và cs (2017) [6], ghi nhận được hoạt tính enzyme tăng khi có mặt của mầm bệnh *Xoo*. Khi chỉ phun cao chiết lá sống đời (cao chiết + không lây bệnh), hoạt tính enzyme CAT giữ ổn định 0 - 2 NSLB, sau đó tăng từ 3 - 5 NSLB, rồi giảm và giữ ổn định tại 7 NSLB, duy trì ở mức cao hơn so với nghiệm thức đối chứng từ 4 - 6 NSLB. Kết quả này

cho thấy cao chiết có khả năng kích thích hệ thống phòng vệ tự nhiên của cây lúa dù không có sự hiện diện của tác nhân gây bệnh. Đặc biệt, khi có mặt của mầm bệnh và cao chiết lá sống đời, hoạt tính enzyme tăng từ 3 - 5 NSLB và luôn duy trì ở mức cao hơn so với các nghiệm thức còn lại, đạt mức cao nhất tại 5 NSLB. Điều này cho thấy ở giai đoạn đầu với sự hoạt động của enzyme POX, nồng độ  $H_2O_2$  bắt đầu tăng trong mô cây để chống lại sự xâm nhập của mầm bệnh. Sau đó, nồng độ  $H_2O_2$  tăng vượt ngưỡng dẫn đến gây độc cho tế bào cây chủ [6], vì thế hoạt tính enzyme đạt ở mức cao nhất để giải độc cho cây chủ [19].

Hoạt tính enzyme PAL (Hình 2C) ở nghiệm thức nước + không lây bệnh có xu hướng tăng từ 0 - 7 NSLB và duy trì ở mức thấp hơn đáng kể so với các nghiệm thức khác. Khi có mặt mầm bệnh, hoạt tính PAL bắt đầu tăng từ 0 - 1 NSLB và đạt giá trị cao nhất tại 4 NSLB, sau đó giảm mạnh. Kết quả này cho thấy cây lúa đã kích hoạt hệ thống phòng vệ để phản ứng với sự xâm nhập của mầm bệnh. Đồng thời, khi chỉ xử lý với cao chiết, hoạt tính enzyme tăng từ 0 - 3 NSLB và giữ ổn định đến 7 NSLB, cho thấy cao chiết có khả năng kích thích trước hệ thống phòng vệ của cây khi không có sự hiện diện của vi khuẩn gây bệnh. Khi có mặt của mầm bệnh và cao chiết, hoạt tính enzyme PAL bắt đầu tăng 0 - 1 NSLB, sau đó tăng mạnh từ 2 - 3 NSLB. Kết quả nghiên cứu của Khoa và cs (2017) [6] cho thấy hoạt tính enzyme PAL tăng từ 1 - 3 NSLB. Ở nghiệm thức khác, PAL tăng sớm tại thời điểm 1 - 2 NSLB khi hạt lúa được ngâm với cao chiết lá sống đời ly trích bằng dung môi methanol [26]. Enzyme PAL xúc tác quá trình chuyển hóa L-phenylalanine thành trans-cinnamic axit, tiền chất của chuỗi phản ứng tổng hợp các hợp chất phenol có hoạt tính kháng khuẩn. Đồng thời, PAL tham gia vào con đường sinh tổng hợp salicylic axit (SA), đóng vai trò quan trọng trong quá trình truyền tín hiệu để kích hoạt cơ chế kháng bệnh lưu dẫn (systemic acquired resistance) của cây chủ [27].

Hoạt tính enzyme PPO (Hình 2D) ở các ngày khảo sát khác biệt không có ý nghĩa thống kê từ 0 - 7 NSLB ở nghiệm thức nước + không lây bệnh. Khi có sự xuất hiện của mầm bệnh (nước + lây bệnh), hoạt tính enzyme bắt đầu tăng tại 2-4 NSLB, sau đó tiếp tục tăng đến 7 NSLB. Khi chỉ xử lý với cao chiết (cao chiết + không lây bệnh), hoạt tính enzyme PPO tăng từ 0 - 4 NSLB, sau đó đạt cao nhất tại 7 NSLB. Nhưng

khi có mặt đồng thời của mầm bệnh và cao chiết, enzyme PPO tăng mạnh từ 3 NSLB và duy trì đến 6 NSLB, kết quả này có thể từ sự kết hợp giữa tín hiệu kích kháng từ cao chiết và sự tấn công của mầm bệnh dẫn đến tăng khả năng phòng vệ của cây lúa ở mức cao nhất. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nisha và cs (2012) [28], theo đó hoạt tính enzyme cũng được ghi nhận tăng mạnh từ 3 - 5 NSLB. Enzyme PPO xúc tác phản ứng chuyển hóa các hợp chất phenol thành *ortho*-quinones có hoạt tính kháng khuẩn ngăn chặn sự phát triển của mầm bệnh trong mô cây lúa [29].

Kết quả hai thí nghiệm cho thấy hiệu quả giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới có liên quan chặt chẽ với sự gia tăng hoạt tính các enzyme phòng vệ. Cụ thể, nghiệm thức sử dụng nồng độ cao chiết 1,5% khi kết hợp ngâm hạt và phun lên lá cho chiều dài vết bệnh ngắn, tương đương đối chứng dương ở cả 3 thời điểm khảo sát (Hình 1). Song song đó, hoạt tính của enzyme phòng vệ (POX, CAT, PAL, PPO) ở nghiệm thức này tăng sớm và duy trì trong suốt các thời điểm khảo sát (Hình 2). Ngược lại, đối chứng âm không ghi nhận được sự gia tăng rõ rệt của các enzyme, dẫn đến chiều dài vết bệnh dài hơn đáng kể. Kết quả này chứng minh, cao chiết lá sống đời ly trích bằng dung môi nước có khả năng kích thích hệ thống phòng vệ của cây lúa thông qua hoạt động của 4 enzyme: POX, CAT, PAL, PPO. Tuy mỗi enzyme có vai trò riêng, nhưng lại có sự liên quan mật thiết với nhau, đóng góp vào quá trình hình thành các phản ứng trước sự xâm nhập của vi khuẩn gây bệnh. Enzyme POX đóng vai trò trong quá trình điều hòa, sản sinh các ROS, đặc biệt là  $H_2O_2$ , một chất oxy hóa có tính kháng khuẩn mạnh và đóng vai trò quan trọng trong phản ứng phòng vệ của cây lúa đối với mầm bệnh là vi khuẩn. Đồng thời, CAT tăng mạnh tại 5 NSLB, xúc tác phản ứng phân giải  $H_2O_2$  (khi nồng độ chất này vượt ngưỡng), giúp giải độc và hạn chế tổn thương đến tế bào của cây chủ. Enzyme PAL được kích hoạt sớm từ 0 - 1 NSLB, giúp tổng hợp salicylic axit nhằm dẫn truyền tín hiệu kích hoạt cơ chế kháng bệnh lưu dẫn. Sau đó, PPO tăng từ 3 - 6 NSLB để tham gia tổng hợp chất *ortho*-quinones ức chế sự sinh trưởng của mầm bệnh. Nhìn chung, cao chiết lá sống đời hoạt động như một tác nhân kích kháng sinh học, kích hoạt sớm hệ thống phòng vệ của cây trồng được thể hiện qua 4 enzyme, trong đó POX và CAT có liên quan đến con đường oxy hóa khử, còn PAL và PPO

liên quan đến con đường sinh tổng hợp các chất có hoạt tính kháng khuẩn.

#### 4. KẾT LUẬN

Cao chiết lá sống đời ly trích bằng dung môi nước có khả năng làm giảm bệnh bạc lá khi áp dụng biện pháp ngâm hạt kết hợp phun lên lá lúa trước lây bệnh, trong đó đã tuyển chọn được nồng độ cao chiết 1,5% khi kết hợp ngâm và phun tại thời điểm 14 NTLB là nghiệm thức tối ưu thể hiện hiệu quả giảm bệnh ổn định và duy trì đến 21 NSLB. Cơ chế giảm bệnh được xác định có liên quan đến quá trình kích kháng trong cây lúa được thể hiện thông qua sự gia tăng hoạt tính của 4 enzyme peroxidase, catalase, polyphenol peroxidase và phenylalanine ammonia-lyase. Kết quả cho thấy hoạt tính của enzyme PAL và POX tăng sớm, trong khi hoạt tính của enzyme PPO và CAT tăng muộn hơn khi cây lúa được xử lý với cao chiết lá sống đời và sự xuất hiện của mầm bệnh. Sự liên kết giữa các enzyme góp phần kích hoạt hệ thống phòng vệ của cây lúa kịp thời trước sự xâm nhập và phát triển của mầm bệnh. Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết lá sống đời có tiềm năng ứng dụng như một sản phẩm thuốc bảo vệ thực vật sinh học trong phòng trừ bệnh bạc lá theo hướng canh tác nông nghiệp bền vững.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Reddy, A. P. K., Mackenzie, D. R., Rouse, D. I. & Rao, A. V. (1979). Relationship of bacterial leaf blight severity to grain yield of rice. *Phytopathology*, 69(9), 967 - 969.
- Abbas, A., Khan, S. U., Khan, W. U., Saleh, T. A., Khan, M. H. U., Ullah, S., Ali, A. & Ikram, M. (2019). Antagonist effects of strains of *Bacillus* spp. against *Rhizoctonia solani* for their protection against several plant diseases: Alternatives to chemical pesticides. *Comptes Rendus Biologies*, 342(5 - 6), 124 - 135. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2019.05.002>
- Teja, B. S., Jamwal, G., Gupta, V., Verma, M., Sharma, A., Sharma, A. & Pandit, V. (2025). Biological control of bacterial leaf blight (BLB) in rice – A sustainable approach. *Heliyon*, 11(2), e41769.
- Ooi, Y. S., Mohamed Nor, N. M. I., Furusawa, G., Tharek, M. & Ghazali, A. H. (2022). Application of bacterial endophytes to control bacterial leaf blight disease and promote rice growth. *The plant pathology Journal*, 38(5), 490 – 502. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.01.2022.0014>
- Kagale, S., Marimuthu, T., Thayumanavan, B., Nandakumar, R. & 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(2), 91 - 100.
- Khoa, N. Đ., Xà, 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.
- Govindappa, M., Umesha, S. & Lokesh, S. (2011). *Adhatoda vasica* leaf extract induces resistance in rice against bacterial leaf blight disease (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 3(1), 6 - 14.
- Khoa, N. Đ., Thúy, P. T. H., Thủy, T. T. T., Collinge, D. B. & Jørgensen, H. J. L. (2011). Disease-reducing effect of *Chromolaena odorata* extract on sheath blight and other rice diseases. *Phytopathology*, 101(2), 231 - 240. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-10-0113>
- Widiantini, F., Ayuningdiyas, A., Yulia, E. & Suganda, T. (2019). The effectiveness of several plant extracts to induce rice plant resistance against bacterial leaf blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). *Jurnal Perlindungan Tanaman Indones*, 23(1), 16 - 23. <https://doi.org/10.22146/jpti.34912>
- Joshi, T., Pandey, S. C., Maiti, P., Tripathi, M., Paliwal, A. & Nand, M. (2021). Antimicrobial activity of methanolic extracts of *Vernonia cinerea* against *Xanthomonas oryzae* and identification of their compounds using in silico techniques. *PLoS ONE*, 16(6), e0252759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252759>
- Nascimento, L. B. D. S., Casanova, L. M. & Costa, S. S. (2023). Bioactive compounds from kalanchoe genus potentially useful for the development of new drugs. *Life (Basel, Switzerland)*, 13(3), 646. <https://doi.org/10.3390/life13030646>

12. Nguyễn Thị Thu Hương, Lâm Tấn Hào & Nguyễn Đắc Khoa (2018). Hiệu quả giảm bệnh và cơ chế kích kháng liên quan đến enzyme phenylalanine ammonia-lyase và polyphenol oxidase đối với bệnh cháy bìa lá lúa khi phun qua lá với dịch trích lá Sống đời. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ*, 54(7B), 13 - 21.
13. Xạ, T. V., Thoa, T. K., Thư, T. T. A. & Khoa, N. Đ. (2023). Effects of seed soaking and foliar spraying of *Kalanchoe pinnata* aqueous leaf extracts against rice bacterial leaf blight. *CTU Journal of Innovation and Sustainable Development*, 15(3), 12 - 22. <https://doi.org/10.22144/ctujoisd.2023.047>
14. Thái Trần Anh Thư, Nguyễn Đắc Khoa (2024). So sánh khả năng giảm bệnh bạc lá lúa liên quan đến cơ chế kích kháng của chủng vi khuẩn *Serratia nematodiphila* CT-78 và dịch trích lá sống đời. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. Số đặc biệt: Bệnh hại Thực vật, 52 - 60.
15. Vian, M. A., Fabiano-Tixier, A. S., El Maataoui, M., Danguien, M. & Chemat, F. (2016). Water as a green solvent combined with different techniques for extraction of essential oil from lavender flowers. *Comptes Rendus Chimie*, 19(6), 710 - 717. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2015.06.005>
16. Phạm Thiết Trình, Lưu Minh Long, Trương Văn Xạ, Nguyễn Đắc Khoa (2024). Khả năng kích kháng bệnh bạc lá khi phun lên lá lúa cao chiết lá sống đời ly trích bằng dung môi nước. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. Số đặc biệt: Bệnh hại Thực vật, 52 - 60.
17. Karganilla, A., Natural, M. P. & Ou, S. H. (1973). A comparative study of culture media for *Xanthomonas oryzae*. *Philipp. Agric.*, 57, 141e152.
18. Kauffman, H. E. (1973). An improved technique for evaluating resistance to rice varieties of *Xanthomonas oryzae*. *Plant Dis. Rep.*, 57, 537 - 541.
19. Hammerschmidt, R., Nuckles, E. M. & Kuć, J. (1982). Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 20, 73 - 82.
20. Bailly, C., Leymarie, J., Lehner, A., Rousseau, S., Côme, D. & Corbineau, F. (2004). Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. *Journal of Experimental botany*, 55(396), 475 - 483. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh050>
21. Arora, Y. K. & Bajaj, K. L. (1985). Peroxidase and polyphenol oxidase associated with induced resistance of mung bean to *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Phytopathologische Zeitschrift*, 114, 325 - 331.
22. Dickerson, D. P., Pascholati, S. F., Hagerman, A. E., Butler, L. G. & Nicholson, R. L. (1984). Phenylalanine ammonia-lyase and hydroxycinnamate: CoA ligase in maize mesocotyls inoculated with *Helminthosporium maydis* or *Helminthosporium carbonum*. *Physiol. Plant Pathol.*, 25, 111 - 123.
23. Quiroz-Reyes, C. N., Aguilar-Méndez, M. A., Ramírez-Ortiz, M. E. & Ronquillo-De Jesús, E. (2013). Comparative study of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Revista mexicana de ingeniería química*, 12(1), 11 - 18.
24. Vidhyasekaran, P., Ponmalar, T. R., Samiyappan, R., Velazhahan, R., Vimala, R. & Ramanathan, A. (1997). Host specific toxin production by *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Phytopathology*, 87, 1258 - 1263.
25. Shetty, N. P., Jørgensen, H. J. L., Jensen, J. D., Collinge, D. B. & Shetty, H. S. (2008). Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *Eur J Plant Pathol*, 121, 267 - 280. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9302-5>
26. Xạ, T. V., Thoa, T. K., Độ, N. Đ. & Khoa, N. Đ. (2023). Seed soaking using methanol *Kalanchoe pinnata* leaf extracts induces rice resistance against bacterial leaf blight. *Int. J. Plant Biol*, 14, 1155 - 1166. <https://doi.org/10.3390/ijpb14040084>
27. Lefevre, H., Bauters, L., Gheysen, G. (2020). Salicylic acid biosynthesis in plants. *Front. Plant Sci*, 11, 338 doi: 10.3389/fpls.2020.00338
28. Nisha, S., Revathi, K., Chandrasekaran, R., Kirubakaran, S. A., Narayanan, S. S., Stout, M. J. & Nathan, S. 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.
29. Zhang, S. (2023). Recent advances of polyphenol oxidases in plants. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(5), 2158. <https://doi.org/10.3390/molecules28052158>.



SEED SOAKING COMBINED WITH FOLIAR SPRAYING USING  
AQUEOUS *Kalanchoe pinnata* LEAF EXTRACTS INDUCES RICE RESISTANCE  
AGAINST BACTERIAL LEAF BLIGHT (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)

Pham Thiet Trinh<sup>1</sup>, Nguyen Minh Khoi<sup>1</sup>,

Truong Van Xa<sup>2</sup>, Nguyen Dac Khoa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Can Tho University

<sup>2</sup> Vinh Long University of Technology Education

**Abstract**

Bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is an important rice disease. This paper presents the disease-reducing effects of aqueous *Kalanchoe pinnata* leaf extracts using seed soaking combined with foliar spraying and the involvement of induced resistance in the observed disease reduction. The extracts were prepared by the liquid-liquid extraction method. Three application methods using three extract concentrations (1, 1.5 and 2%) were tested under greenhouse conditions. The application methods included (1) seed soaking + foliar spraying 14 days before inoculation (DBI), (2) seed soaking + foliar spraying 7 DBI and (3) seed soaking + foliar spraying 14 and 7 DBI. The disease was assessed through lesion lengths at 7, 14 and 21 days after inoculation (DAI). Seed soaking combined with foliar spraying at 14 DBI using 1.5% extract maintained the disease-reducing effect until 21 DAI. Induced resistance involved in the observed disease reduction through activities of the four defense-related and/or antioxidant enzymes, *i.e.*, peroxidase (POX), catalase (CAT), polyphenol oxidase (PPO) and phenylalanine ammonia lyase (PAL). Indeed, activities of these enzymes increased with the presence of either pathogen inoculation or extract application and reached higher levels with the presence of both pathogen inoculation and extract application (seed soaking combined with foliar spraying).

**Keywords:** *Bacterial leaf blight, induced resistance, Kalanchoe pinnata, rice, Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

**Ngày nhận bài:** 15/4/2025

**Ngày gửi phản biện:** 12/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 30/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 25/6/2025

# CƠ CHẾ KÍCH KHÁNG CỦA MỘT SỐ HÓA CHẤT CHỐNG LẠI BỆNH SƯƠNG MAI DO *Peronospora belbahrii* TRÊN CÂY HÚNG QUẾ

Hồ Hoàng Nam<sup>1</sup>, Nguyễn Hoàng Duy<sup>1</sup>, Đoàn Thị Kiều Tiên<sup>1</sup>,

Nguyễn Thị Thùy Dương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thu Nga<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Bảo vệ Thực vật, Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

\*Email: nttnga@ctu.edu.vn

## TÓM TẮT

Biện pháp kích kháng trên cây trồng trong phòng trừ dịch hại là biện pháp bảo vệ thực vật hiệu quả và thân thiện môi trường. Nghiên cứu khảo sát khả năng kích kháng của Benzothiadiazole (BTH), Salicylic acid (SA), Calcium silicate (CaSiO<sub>3</sub>) trên cây húng quế chống lại bệnh sương mai do *Peronospora belbahrii* thông qua đánh giá tỉ lệ bệnh, phần trăm diện tích lá bệnh và khảo sát cơ chế kích kháng liên quan. Kết quả khi xử lý phun lá BTH 50 mg/L, SA 1 mM trước 2 ngày lây bệnh hoặc tưới đất với CaSiO<sub>3</sub> 1 g/kg đất trước 7 ngày lây bệnh mang lại hiệu quả giảm tỉ lệ bệnh và phần trăm diện tích lá nhiễm bệnh. Sự gia tăng hoạt tính enzyme Phenylalanine ammonia lyase (PAL) ở giai đoạn sớm 12 giờ sau khi lây bệnh (GSKLB) và 24 GSKLB ở 3 cây húng quế xử lý BTH 50 mg/L, SA 1 mM, CaSiO<sub>3</sub> 1 g/kg và sự gia tăng hoạt tính enzyme  $\beta$  - 1,3 - glucanase ở giai đoạn 72 GSKLB ở cây húng quế xử lý với SA 1 mM, BTH 50 mg/L, CaSiO<sub>3</sub> 1 g/kg có liên quan đến cơ chế kích kháng trên cây húng quế chống lại mầm bệnh sương mai do *Peronospora belbahrii*.

**Từ khóa:** *Ocimum basilicum*, kích kháng, *Peronospora belbahrii*.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây húng quế vừa là rau gia vị, vừa là thuốc chữa bệnh, đồng thời là cây nguyên liệu phục vụ cho công nghệ hương phẩm, tách chiết tinh dầu rất có giá trị. Húng quế là loại cây mọc ở vùng nhiệt đới và ôn đới được phân bố rải rác từ Bắc vào Nam ở Việt Nam [1]. Bệnh sương mai do *Peronospora belbahrii*, là một bệnh quan trọng trên cây húng quế (*Ocimum* spp.) trên toàn thế giới. Bệnh này có thể gây thiệt hại 100% năng suất ở khi trồng ngoài đồng và trong nhà kính [2]. Hiện nay, quản lý mầm bệnh vẫn lệ thuộc chính vào biện pháp hóa học, đặc biệt là thuốc trừ nấm chẳng hạn như Mancozeb được sử dụng rất phổ biến trong phòng trừ bệnh sương mai [3]. Do rau húng quế là cây ngắn ngày, nên việc áp dụng thuốc hóa học tuy mang lại hiệu quả phòng trừ, nhưng để lại dư lượng thuốc trên rau khi thu hoạch rất lớn, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người đồng thời gây ô nhiễm môi trường và giảm đa dạng sinh học [4]. Vì thế, chiến lược quản lý dịch bệnh hại trên cây trồng bằng các biện pháp thân thiện với môi trường là điều rất cần thiết. Trong đó, biện pháp kích thích tính kháng bệnh của cây trồng là một hướng đi đang được quan tâm. Bởi vì tác nhân kích kháng không tác động

trực tiếp lên mầm bệnh mà chỉ tạo ra các tín hiệu giúp kích thích cơ chế tự vệ có sẵn trong thực vật như sự tăng tích lũy các hợp chất phenol, các phytoalexin và sự tăng hoạt tính các protein liên quan đến quá trình phát sinh bệnh (pathogenesis - related proteins) hoặc các enzyme (peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia - lyase...) nhằm ngăn chặn sự phát triển của mầm bệnh, các tác nhân kích kháng có thể là vi sinh vật, dịch trích thực vật, chất hóa học [5, 6]. Theo kết quả nghiên cứu đã xác định được xử lý cây húng quế với các hợp chất BTH 50 mg/L, SA 1 mM, CaSiO<sub>3</sub> 1 g/kg đất giúp cây hạn chế được bệnh sương mai do *Peronospora belbahrii*. Tuy nhiên, nghiên cứu chưa xác định được cơ chế kích kháng liên quan đến hiệu quả giảm bệnh [7].

Dựa vào kết quả nghiên cứu của Hồ Hoàng Nam (2022) [7], nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát hiệu quả giảm bệnh và cơ chế kích thích tính kháng bệnh (kích kháng) liên quan đến enzyme phenylalanine ammonia lyase và  $\beta$  - 1,3 - glucanase của các chất kích kháng Benzothiadiazole, SA, CaSiO<sub>3</sub> chống lại bệnh sương mai trong điều kiện nhà lưới.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đánh giá hiệu quả của Benzothiadiazole, SA và $\text{CaSiO}_3$ trong kích kháng trên cây húng quế phòng trừ bệnh sương mai

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố với 4 lần lặp lại. Thí nghiệm có 4 nghiệm thức bao gồm 3 nghiệm thức xử lý hóa chất kích kháng: (1) Phun lá 2 ngày trước khi lây bệnh với hóa chất BTH 50 mg/l, (2) Phun lá 2 ngày trước khi lây bệnh SA 1mM, (3) Tưới gốc 7 ngày trước khi lây bệnh  $\text{CaSiO}_3$  1 g/kg và (4) nghiệm thức đối chứng không xử lý. Thí nghiệm được thực hiện trên giống húng quế Đông An 191. Hạt giống được xử lý 2 sôi 3 lạnh (khoảng 50°C) trong 30 phút. Sau đó, gieo vào chậu đất đã chuẩn bị sẵn (1,5 kg đất được trộn với xơ dừa và vỏ trấu tỉ lệ 2: 1: 1.), mỗi chậu gieo 5 hạt sau 7 - 10 ngày, tuyển chọn lại 3 cây phát triển đồng đều. Cây được chăm sóc và bón phân định kì theo Trần Thị Ba và cs (1999) [8].

Vì đây là mầm bệnh kí sinh bắt buộc không thể nhân nuôi trong môi trường nhân tạo nên phải thu mẫu bệnh từ ngoài đồng. Mẫu bệnh sau khi thu về quan sát dưới kính hiển vi quang học để xác định đúng *Peronospora belbahrii*. Sau đó, ủ mẫu trong điều kiện lạnh nhiệt độ 25°C trong 24 giờ để sinh bào tử. Thực hiện thu hoạch bào tử *Peronospora belbahrii* và xác định mật số bào tử nấm bằng lam đếm hồng cầu dưới kính hiển vi.

Thực hiện lây bệnh nhân tạo phun huyền phù bào tử *Peronospora belbahrii* với mật số  $10^4$  bào tử/ml khi cây có 3 đến 4 cặp lá thật [9]. Cây sau khi lây bệnh được ủ bệnh trong tối 14 giờ ở ẩm độ 100% và nhiệt độ 25°C. Sau đó cây được chuyển sang nhà lưới có che mưa. Theo dõi tình hình phát triển bệnh của cây và ghi nhận chỉ tiêu tỉ lệ bệnh và phần trăm diện tích lá bệnh khi triệu chứng bệnh bắt đầu xuất hiện.

### 2.2. Khảo sát hoạt tính enzyme Phenylalanine ammonia lyase (PAL) và enzyme $\beta$ - 1,3 - glucanase liên quan trong cơ chế kích kháng trên cây húng quế chống lại bệnh sương mai

#### 2.2.1. Chuẩn bị mẫu lá và ly trích enzyme

Hoạt tính enzyme PAL được thể hiện thông qua sự thay đổi giá trị hấp thụ quang phổ (hay còn gọi là mật độ quang) ở bước sóng 290 nm (ký hiệu OD290 nm) của nồng độ sản phẩm axit trans - cinnamic trong phản ứng khử nhóm  $\text{NH}_2$  từ L-phenylalanine dưới sự xúc tác của enzyme PAL tạo thành sản phẩm axit trans - cinnamic. Axit trans - cinnamic là tiền chất

tổng hợp các chất tín hiệu SA và các hợp chất chuyển hóa liên quan đến tính tự vệ của cây trồng [10].

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố với 4 lần lặp lại. Thí nghiệm có 8 nghiệm thức: (1) Nghiệm thức đối chứng có lây bệnh; (2) BTH phun lá, nồng độ 50 mg/L, có lây bệnh; (3) SA phun lá, nồng độ 1 mM, có lây bệnh; (4)  $\text{CaSiO}_3$  tưới vào đất, nồng độ 1 g/kg đất, có lây bệnh; (5) nghiệm thức đối chứng không lây bệnh; (6) BTH phun lá, nồng độ 50 mg/L, không lây bệnh; (7) SA phun lá, nồng độ 1 mM, không lây bệnh; (8)  $\text{CaSiO}_3$  tưới vào đất, nồng độ 1 g/kg đất, không lây bệnh. Chuẩn bị đất, gieo hạt, chuẩn bị mầm bệnh và lây bệnh được thực hiện tương tự thí nghiệm thứ nhất.

Mẫu lá húng quế được thu vào các thời điểm 0, 12, 24, 48, 72, 96 và 120 giờ sau khi lây bệnh (GSKLB) bằng cách dùng kéo cắt cặp lá thứ 2 và 3 từ gốc lên, ngâm trong nito lỏng và được trữ lạnh -80°C. Mẫu được ly trích bằng cách nghiền với nito lỏng trong cối và chày được làm lạnh, sau đó cho vào ống eppendorf. Mẫu nghiền được ly trích bằng dung dịch đệm buffer (25 mM Tris HCl, pH 8,8 + 32 mM  $\beta$  - mercaptoethanol), ly tâm ở vận tốc 13.000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C, sau đó phần dịch trong bên trên được trữ lạnh ở 4°C làm nguồn cho phân tích enzyme

Protein trong mẫu được ước lượng bằng đường chuẩn protein BSA (Bovine serum albumin) gồm hàm lượng BSA (0 - 7  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) và thể tích Bradford tương ứng để đạt 260  $\mu\text{L}/\text{giếng}$ , chờ 5 phút, đọc ở bước sóng 595 nm. Tiến hành đo hàm lượng protein trong mẫu bằng cách kết hợp các giếng chứa mẫu (5  $\mu\text{L}$  dịch trích mẫu + 255  $\mu\text{L}$  Bradford) được đọc trên máy ELISA ở bước sóng 595 nm. Lặp lại 2 lần/mẫu. Kết quả hiển thị sẽ cho biết hàm lượng protein ( $\mu\text{g}$ ) tương ứng có trong mẫu dựa vào so sánh với đường chuẩn BSA được xây dựng [11].

#### 2.2.2. Khảo sát hoạt tính enzyme (PAL)

Đường chuẩn CA được xây dựng gồm hỗn hợp: Tris HCl 25 mM với pH 8,8 (100  $\mu\text{L}/\text{giếng}$ ); tris HCl 100 mM với pH 8,8 (125  $\mu\text{L}/\text{giếng}$ ); chuẩn bị dung dịch gốc CA 20 mM, thực hiện rút với thể tích tăng dần 0 - 6  $\mu\text{L}$  qua các giếng (tương ứng nồng độ đường chuẩn 0 - 0,12 mM CA/ $\mu\text{L}$ ) và thể tích Tris HCl 25 mM +  $\beta$  - mercaptoethanol 32 mM tương ứng để đạt 250  $\mu\text{L}/\text{giếng}$ , lặp lại 2 lần. Sau 1 giờ ủ ở 40°C, ngừng phản ứng bằng 15  $\mu\text{L}$  HCl 5N và đọc ở bước sóng 290 nm để xác định đường chuẩn CA [12].

Hoạt tính enzyme PAL trong mẫu được xác định với hỗn hợp phản ứng gồm 25  $\mu$ L dịch trích enzyme, 125  $\mu$ L substrate (L - phenylalanin 50 mM trong Tris HCl 100 mM, pH 8,8), 100  $\mu$ L Tris HCl 25 mM (pH 8,8, không chứa mercaptoethanol). Tương ứng với mỗi giếng trên là giếng mẫu blank gồm 25  $\mu$ L dịch trích enzyme và 225  $\mu$ L Tris HCl 25 mM, lặp lại 2 lần/mẫu. Tiếp tục, ủ ở 40°C trong 1 giờ, ngừng phản ứng bằng 15  $\mu$ L HCl 5N, tiến hành đọc phản ứng trên máy ELISA ở bước sóng 290 nm. Sau đó dựa vào đường chuẩn CA để xác định nồng độ của CA trong dịch trích enzyme. Nồng độ của CA trong dịch trích enzyme được xác định bằng hiệu của nồng độ CA trong mẫu có chứa L - phenylalanine trừ nồng độ CA trong mẫu blank (không chứa L - phenylalanine). Kết quả hoạt tính của enzyme PAL được biểu hiện bằng mM CA/mg protein/giờ. Được tính qua công thức: (mM của CA x 1000)/( $\mu$ g của protein x 1 giờ).

### 2.2.3. Khảo sát hoạt tính enzym $\beta$ - 1,3 - glucanase

Hoạt tính  $\beta$  - 1,3 - glucanase được xác định theo các phương pháp đã mô tả trước đây [13], với glucose làm đường chuẩn. Cơ chất là laminarin 0,1% (w/v) trong dung dịch đệm natri acetate 50 mM (pH 5,2). Phản ứng được thực hiện bằng cách thêm 225  $\mu$ L laminarin và 25  $\mu$ L dịch chiết enzyme vào ống microcentrifuge, sau đó ủ trong 15 phút ở 37°C. Phản ứng được dừng lại bằng cách thêm 250  $\mu$ L thuốc thử dinitrosalicylic và đun sôi mẫu trong bể nước trong 10 phút. Cuối cùng, độ hấp thụ được đo ở bước sóng 540 nm trên máy Elisa reader. Hoạt tính đặc hiệu được biểu thị dưới dạng  $\mu$ mol glucose giải phóng trên mg protein mỗi phút. Thực hiện đo mẫu đối chứng trắng cơ chất (225  $\mu$ L dung dịch cơ chất + 25  $\mu$ L buffer) và đối chứng trắng enzyme (225  $\mu$ L buffer + 25  $\mu$ L dịch trích enzyme) trừ đi để đạt giá trị của mẫu. Sau đó dựa vào đường chuẩn glucose để xác định nồng độ glucose ( $\mu$ mol) được phóng thích trong dịch trích enzyme. Hàm lượng enzyme  $\beta$  - 1,3 - glucanase ( $\mu$ mol glucose/mg protein/min) được tính bằng công thức ( $\mu$ mol Glucose x 1.000/ $\mu$ g protein x 15 min).

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả đánh giá hiệu quả của các nghiệm thức xử lý kích kháng trên cây húng quế đối với bệnh sương mai do *Peronospora belbahrii*

Qua 3 thời điểm khảo sát cho thấy 3 nghiệm thức xử lý kích kháng phun lá với BTH 50 mg/L, SA

1 mM và tưới đất CaSiO<sub>3</sub> 1 g/kg đất đều có tỉ lệ bệnh và phần trăm diện tích lá bệnh thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng ở 2 thời điểm 8 NSKLB và 10 NSKLB (Bảng 1, 2 và hình 1).

**Bảng 1. Tỉ lệ bệnh sương mai trên cây húng quế do *Peronospora belbahrii***

| Nghiệm thức                   | Tỉ lệ bệnh (%) |         |          |
|-------------------------------|----------------|---------|----------|
|                               | 6 NSKLB        | 8 NSKLB | 10 NSKLB |
| BTH 50 mg/L                   | 7,80           | 8,33 b  | 12,43 b  |
| SA 1 mM                       | 7,34           | 9,35 b  | 11,75 b  |
| CaSiO <sub>3</sub> 1 g/kg/đất | 6,94           | 4,70 b  | 9,17 b   |
| Đối chứng                     | 15,87          | 31,42 a | 34,49 a  |
| Mức ý nghĩa                   | ns             | *       | **       |
| CV (%)                        | 96,97          | 66,52   | 36,10    |

Tỉ lệ bệnh phòng bệnh sương mai được thể hiện tại bảng 1, 3 nghiệm thức gồm: BTH 50 mg/L, SA 1 mM và tưới đất CaSiO<sub>3</sub> 1 g/kg có tỉ lệ bệnh lần lượt dao động từ 8,33 - 12,43% (BTH 50 mg/L); 9,35 - 11,75% (SA 1 mM); 4,70 - 9,17% (CaSiO<sub>3</sub> 1 g/kg) thấp hơn và khác biệt so với nghiệm thức đối chứng không xử lý (31,42% - 34,49%) qua hai thời điểm 8 NSKLB và 10 NSKLB.

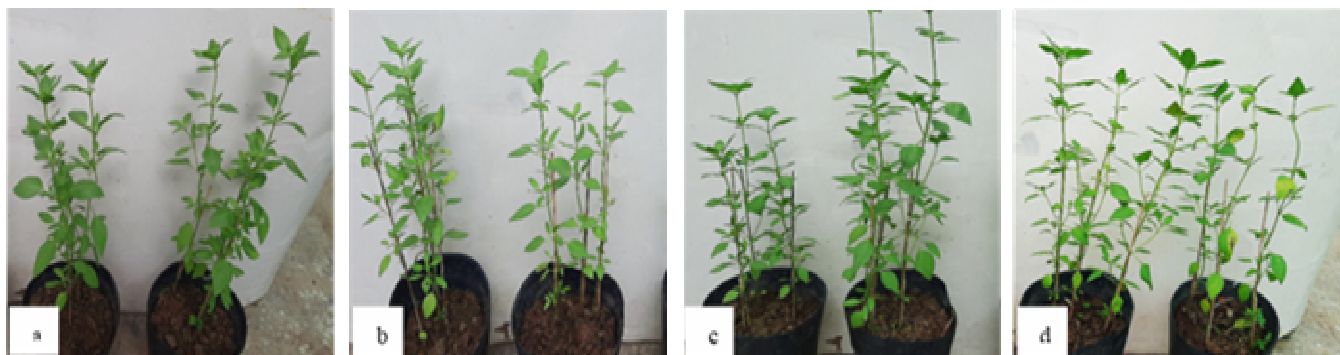
Tương tự, phần trăm diện tích lá bệnh của nghiệm thức gồm BTH 50 mg/L, SA 1 mM và tưới đất CaSiO<sub>3</sub> 1 g/kg (Bảng 2) đã cho thấy diện tích lá bệnh dao động từ 3,03 - 7,19% thấp hơn và khác biệt so với nghiệm thức đối chứng với phần trăm diện tích từ 17,51- 23,23% ở thời điểm 8 và 10 NSKLB.

Nhìn chung, ba nghiệm thức xử lý kích kháng phun lá với BTH 50 mg/L, SA 1mM và tưới đất CaSiO<sub>3</sub> 1 g/kg đất đều có tỉ lệ bệnh và phần trăm diện tích lá bệnh thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng ở điểm 8 và 10 NSKLB.

Hiệu quả kích kháng của Benzothiadiazole (BTH) đã được ghi nhận đối với nhiều mầm bệnh [4, 6]. Bên cạnh đó, SA ở nồng độ 1 mM đã chứng minh hiệu quả hơn trong việc tăng cường hàm lượng phenolic và flavonoid so với 2 mM trên húng quế [14]. Việc sử dụng CaSiO<sub>3</sub> 1 g/kg đất cho hiệu quả làm giảm chiều dài vết bệnh cháy bìa lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây ra [15]. Ngoài ra, theo nghiên cứu đã xác định được xử lý cây húng

quế với các hợp chất BTH 50 mg/l, SA 1 mM, CaSiO<sub>3</sub> 1 g/kg đất, giúp cây hạn chế được bệnh sương mai do *Peronospora belbahrii* [7]. Sự kích kháng của cây trồng có liên quan đến nhiều cơ chế như sinh hóa và phân tử gen trong cây, một trong số đó là sự gia tăng

nhạy cảm hoạt tính của các enzyme [16]. Chính vì vậy, tiếp tục cơ chế liên quan đến sự phòng bệnh của cây trồng bằng cách phân tích hàm lượng enzyme gia tăng khi *Peronospora belbahrii* xâm nhiễm vào cây húng quế.



Hình 1. Mức độ bệnh sương mai do *Peronospora belbahrii* trên húng quế ở thời điểm 10 NSKLB trong điều kiện nhà lưới

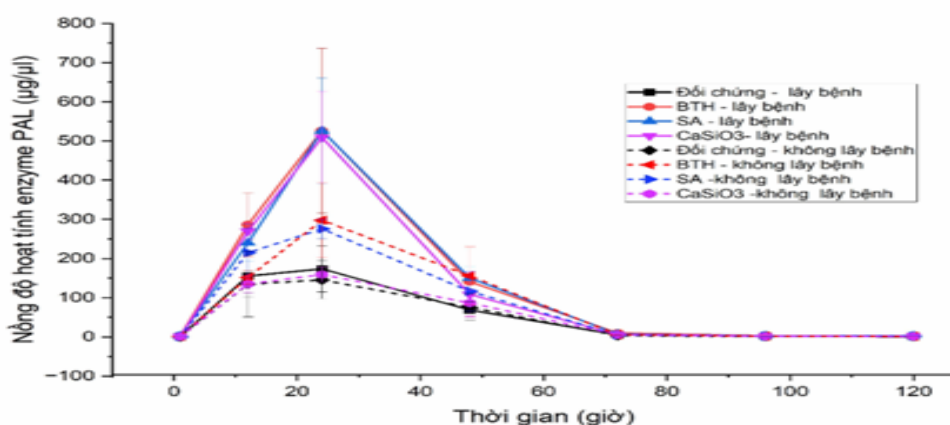
Ghi chú: a: Nghiệm thức xử lý BTH 50 mg/l, b: Nghiệm thức xử lý SA 1 mM, c: Nghiệm thức xử lý CaSiO<sub>3</sub> 1 g/kg đất, d: Nghiệm thức đối chứng.

Bảng 2. Phần trăm diện tích lá bệnh sương mai trên cây húng quế do *Peronospora belbahrii*

| Nghiệm thức                   | Phần trăm diện tích lá bệnh (%) |         |         |
|-------------------------------|---------------------------------|---------|---------|
|                               | 6NSKLB                          | 8NSKLB  | 10NSKLB |
| BTH 50 mg/L                   | 0,44                            | 5,13 b  | 7,19 b  |
| SA 1 mM                       | 1,51                            | 5,68 b  | 7,32 b  |
| CaSiO <sub>3</sub> 1 g/kg đất | 1,95                            | 3,03 b  | 4,6 b   |
| Đối chứng                     | 4,71                            | 17,51 a | 23,23 a |
| Mức ý nghĩa                   | ns                              | *       | **      |
| CV (%)                        | 130,26                          | 71,36   | 42,16   |

Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5% (\*) và 1% (\*\*), ns: không khác biệt, NSKLB: ngày sau khi lây bệnh.

### 3.2. Kết quả khảo sát hoạt tính enzyme phenylalanine ammonia lyase (PAL)



Hình 2. Diễn biến hoạt tính enzyme PAL trên cây húng quế ở các nghiệm thức có xử lý kích kháng các thời điểm sau khi lây bệnh

Diễn biến hoạt tính PAL qua các thời điểm 0, 12, 24, 48, 72, 96 và 120 giờ sau khi lây bệnh (GSKLB) cho thấy, hoạt tính enzyme PAL bắt đầu gia tăng ở thời điểm 12 GSKLB và hoạt tính vẫn tiếp tục duy trì đến thời điểm 24 GSKLB. Sau đó, hoạt tính enzyme PAL có xu hướng giảm, ở điểm 48 GSKLB và tiếp tục có chiều hướng giảm ở các thời điểm 72, 96 và 120 GSKLB.

Tại thời điểm 12 GSKLB, ở điều kiện có mầm bệnh, nghiệm thức xử lý kích kháng BTH 50 mg/l và SA 1 mM có hoạt tính enzyme PAL (mM CA/mg protein/giờ) cao hơn lần lượt là 564,85  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  và 621,10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  khác biệt so với đối chứng lây bệnh 285,08  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Mặt khác trong điều kiện không có mầm bệnh chỉ duy nhất nghiệm thức xử lý kích kháng SA 1 mM hoạt tính enzyme PAL được hoạt hóa 573,77  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  khác biệt với đối chứng không lây bệnh (197,04). Từ đó cho thấy, việc sử dụng SA ngoại sinh ở nồng độ 1 mM đã làm gia tăng hoạt tính enzyme PAL trong hệ thống miễn dịch trên cây *Pistacia vera* L (một loại cây ở Iran) [17].

Tại thời điểm 24 GSKLB nghiệm thức xử lý hóa chất BTH ở nồng độ 50 mg/L phun qua lá và hóa chất  $\text{CaSiO}_3$  ở nồng độ 1 g/kg đất tưới vào đất, hoạt tính enzyme PAL được hoạt hóa đạt 526,38 của nghiệm thức BTH và đạt 500,70 của nghiệm thức  $\text{CaSiO}_3$  có gia tăng vượt trội, cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng lây bệnh (187,67).

Hình 2 cho thấy, trong điều kiện lây bệnh, hoạt tính enzyme PAL đều được hoạt hóa ở 3 nghiệm thức BTH 50 mg/L, SA 1 mM,  $\text{CaSiO}_3$  1 g/kg đất ở thời điểm 12 GSKLB hoặc 24 GSKLB. Kết quả nghiên cứu của Way và cs (2002) [18] và Wang và cs (2004) [19] đã chỉ ra rằng, enzyme PAL đóng vai trò quan trọng trong các phản ứng ban đầu của sự phòng vệ cây trồng. PAL tham gia vào sự chuyển hóa của các chất kháng sinh thực vật (phytoalexin), tạo lên sự chuyển hóa hình thành các hợp chất phenol trong tế bào ký chủ. Khi bị mầm bệnh tấn công, cây được kích kháng chủ động tổng hợp các cơ chế chống lại mầm bệnh. Việc kích thích để tạo ra tính kháng bệnh của thực vật nhằm giúp cây trồng bị nhiễm bệnh trở nên có khả năng kháng được bệnh sau khi được xử lý chất kích kháng [20]. Do vậy, dựa vào kết quả thực nghiệm của 3 hoạt chất BTH 50 mg/L, SA 1 mM,  $\text{CaSiO}_3$  1 g/kg đất cùng với các minh chứng về khả năng kích kháng hệ thống tự vệ của cây trồng trước sự tấn công của mầm bệnh đã thấy rằng 3 chất BTH

50 mg/L, SA 1 mM,  $\text{CaSiO}_3$  1 g/kg đất có hiệu quả giảm bệnh liên quan đến gia tăng hoạt tính enzyme PAL.

### **3.3. Kết quả khảo sát hoạt tính enzyme $\beta$ - 1,3 - glucanase**

Nhìn chung qua các thời điểm có sự gia tăng hoạt tính enzyme  $\beta$  - 1,3 - glucanase ( $\mu\text{mol}/\text{glucose}/\text{mg protein}/\text{min}$ ) ở thời điểm 72 và 96 GSKLB (Hình 3).

Tại thời điểm 72 GSKLB, nghiệm thức SA 1 mM lây bệnh có hoạt tính enzyme  $\beta$  - 1,3 - glucanase ( $\mu\text{mol}/\text{glucose}/\text{mg protein}/\text{min}$ ) được hoạt hóa cao hơn 1,83  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  khác biệt so với nghiệm thức SA 1 mM không lây bệnh 0,53  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  và nghiệm thức đối chứng lây bệnh 0,63  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Tại thời điểm 96 GSKLB, nghiệm thức xử lý hóa chất kích kháng BTH ở nồng độ 50 mg/L cho thấy hiệu quả hoạt tính enzyme  $\beta$  - 1,3 - glucanase ( $\mu\text{mol}/\text{glucose}/\text{mg protein}/\text{min}$ ) cao đạt 1,85  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức xử lý hóa chất BTH không lây bệnh lần lượt là 0,70 và 0,79  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

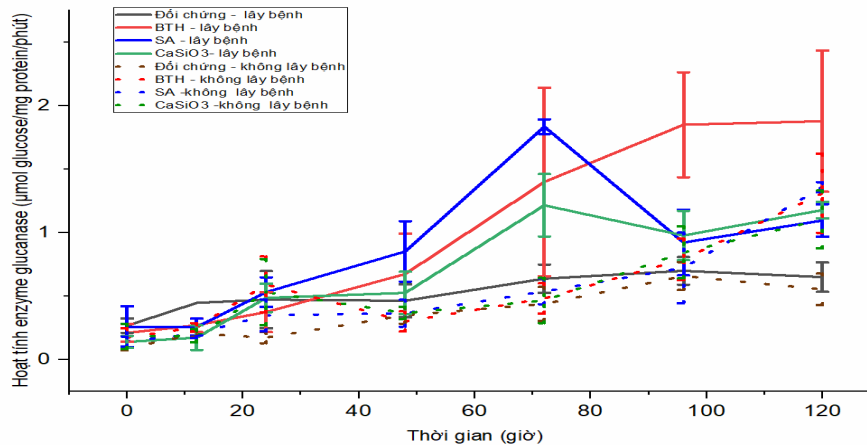
Tại thời điểm 120 GSKLB, ở điều kiện có mầm bệnh, nghiệm thức xử lý hóa chất kích kháng BTH ở nồng độ 50 mg/L thực hiện phun qua lá thì hoạt tính enzyme  $\beta$  - 1,3 - glucanase tiếp tục tăng và khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng cây bệnh và cây khỏe.

Tóm lại, kết quả khảo sát hoạt tính enzyme  $\beta$  - 1,3 - glucanase ghi nhận ở (Hình 3) trong điều kiện lây bệnh, hoạt tính enzyme  $\beta$  - 1,3 - glucanase được hoạt hóa vượt trội của 3 nghiệm thức hoạt chất BTH 50 mg/L, SA 1 mM,  $\text{CaSiO}_3$  1 g/kg ở thời điểm 72 GSKLB, trong đó nghiệm thức BTH 50 mg/L có hàm lượng glucanase cao hơn và khác biệt với các nghiệm thức còn lại ở thời điểm 96 GSKLB. Hoạt tính enzyme  $\beta$  - 1,3 - glucanase chỉ tăng lên khi có mầm bệnh xuất hiện. Điều này cho thấy rằng, thực vật gia tăng tổng hợp các protein liên quan đến mầm bệnh (PR- proteins) để ngăn chặn sự xâm nhiễm và phát triển của mầm bệnh và  $\beta$  - 1,3 - glucanase là một PR protein được phân bố rộng rãi ở thực vật PR được ghi nhận liên quan nổi bật đến sự tự vệ cây trồng chống lại sự xâm nhiễm [15, 13]. Qua kết quả khảo sát hoạt tính enzyme  $\beta$  - 1,3 - glucanase ở bảy thời điểm ghi



nhận trong điều kiện lây bệnh có thể thấy tính kích kháng hình thành khi xử lý SA 1 mM và BTH 50

mg/L có liên quan đến sự gia tăng hoạt tính enzyme  $\beta$  - 1,3 - glucanase [20].



Hình 3. Diễn biến sự gia tăng hoạt tính enzyme  $\beta$  - 1,3 - glucanase qua các thời điểm

#### 4. KẾT LUẬN

Xử lý phun lá BTH 50 mg/L, SA 1 mM vào hai ngày trước lây bệnh hoặc tưới đất với  $\text{CaSiO}_3$  1 g/kg đất vào bảy ngày trước khi lây bệnh mang lại hiệu quả giảm bệnh sương mai trên cây húng quế, và sự gia tăng hoạt tính enzyme PAL và  $\beta$  - 1,3 - glucanase được xác định có liên quan đến cơ chế kích kháng lưu dẫn trên cây húng quế chống lại bệnh sương mai do *Peronospora belbahrii*.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Phạm Thanh Huệ, Vũ Thị Thu Lê, Vũ Thành Đạt (2023). Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của tinh dầu cây húng quế (*Ocimum basilicum* L.) ở thái nguyên. *Tạp chí khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên* 228(09): 169 - 174.
- Patel, J. S., Wyenandt, C. A. & McGrath, M. T. (2021). Effective downy mildew management in basil using resistant varieties, environment modifications, and fungicides. *Plant Health Progress*, 22(3), 226 - 234.
- Wyenandt, C. A., Simon, J. E., Pyne, R. M., Homa, K., McGrath, M. T., Zhang, S. and Madeiras, A. (2015). Basil downy mildew (*Peronospora belbahrii*): Discoveries and challenges relative to its control. *Phytopathology*, 105(7), 885 - 894.
- Lini, R. S., D. T. P. Scanferla, N. G. de Oliveira, R. G. Agüera, T. D. S. Santos, J. J. V. Teixeira, A. M. S. Kaneshima and S. A. G. Mossini (2024). Fungicides as a risk factor for the development of neurological diseases and disorders in humans: A systematic review. *Crit Rev. Toxicol.* 54(1): 35 - 54

- Vidhyasekaran, P., Rabindran, R., Muthamilan, M., Nayar, K., Rajappan, K., Subramanian, N. & Vasumathi, K. (1997). Development of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of rice blast. *Plant pathology*, 46(3), 291 - 297.
- Van Loon, L. C, Bakker, P. A. H. and Peiterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by Rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 36, 453 – 483.
- Hồ Hoàng Nam (2022). Đánh giá hiệu quả kích kháng trên cây húng quế trong phòng trị bệnh sương mai do *Peronospora belbahrii* trong điều kiện nhà lưới. Luận văn tốt nghiệp ngành Bảo vệ thực vật, Trường Nông Nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.
- Trần Thị Ba, Trần Thị Kim Ba và Phạm Hồng Cúc (1999). *Giáo trình trồng rau*. Nxb Nông Nghiệp.
- Phạm Văn Kim (2000). *Giáo trình các nguyên lý về bệnh hại cây trồng*. Nxb trường Đại học Cần Thơ.
- Lavanya, S. N., Niranjan-Raj, S., Jadimurthy, R., Sudarsan, S., Srivastava, R., Tarasatyavati, C... & Nayaka, S. C. (2022). Immunity elicitors for induced resistance against the downy mildew pathogen in pearl millet. *Scientific Reports*, 12(1), 4078.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1 - 2), 248 - 254.
- Sadasivam, S. (1996). *Biochemical methods*. New age international.

13. Nga, N. T. T., de Neergaard, E. & Jørgensen, H. J. L. (2024). Infection biology of *Stagonosporopsis cucurbitacearum* in watermelon and defence responses in the host. *Agriculture*, 14(3), 380, 117 - 132.
14. Rithichai, P., Jirakiattikul, Y., Nambuddee, R. and Itharat, A. (2024). Effect of salicylic acid foliar application on bioactive compounds and antioxidant activity in holy basil (*Ocimum sanctum* L.). *International Journal of Agronomy*, 1 - 8, <https://doi.org/10.1155/2024/8159886>
15. Su, Y., Wang, Z., Liu, F., Li, Z., Peng, Q., Guo, J. and Que, Y. (2016). Isolation and Characterization of ScGluD 2, a New Sugarcane beta-1, 3-Glucanase D Family Gene Induced by *Sporisorium scitamineum*, ABA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaCl and CdCl<sub>2</sub> Stresses. *Frontiers in plant science*, 7: 1348
16. Fraser, R. S. (Ed.). (2012). *Mechanisms of resistance to plant diseases*. Springer Science & Business Media, (17).
17. Ghamari, M., Hosseiniaveh, V., Talebi, K., Nozari, J. & Allahyari, H. (2020). *Biochemical characterization of the induced immune system of pistachio (Pistacia vera) by salicylic acid*. *International Journal of Fruit Science*, 20(2), 117 - 132.
18. Way, H. M., Kazan, K., Mitter, N., Goulter, K. C., Birch, R. G. & Manners, J. M. (2002). Constitutive expression of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced disease resistance but impaired plant growth. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60(6), 275 - 282.
19. Wang, L., An, C., Qian, W., Liu, T., Li, J. & Chen, Z. (2004). Detection of the putative cis-region involved in the induction by a *Pyricularia oryzae* elicitor of the promoter of a gene encoding phenylalanine ammonia-lyase in rice. *Plant Cell Reports*, 22, 513 - 518.
20. Simmons, C.R. (1994). The physiology and molecular biology of plant 1.3 -  $\beta$  - D - glucanases and 1,3;1,4 -  $\beta$  - D - glucanases. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(4), 325 - 387.

## INDUCED RESISTANCE MECHANISM OF SOME CHEMICALS AGAINST DOWNY MILDEW CAUSED BY *Peronospora belbahrii* IN BASIL

Ho Hoang Nam<sup>1</sup>, Nguyen Hoang Duy<sup>1</sup>, Doan Thi Kieu Tien<sup>1</sup>,

Nguyen Thi Thuy Duong<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thu Nga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Plant Protection Department, College of Agriculture, Can Tho University*

### Abstract

Induced resistance methods in crop protection against pests and diseases are effective and environmentally friendly plant protection strategies. This study investigated the ability of Benzothiadiazole (BTH), Salicylic acid (SA) and Calcium silicate (CaSiO<sub>3</sub>) to induce resistance in basil (*Ocimum basilicum*) against downy mildew caused by *Peronospora belbahrii*, through disease assessment and analysis of related induced resistance mechanisms. The results show that foliar spraying BTH 50 mg/L and SA 1 mM at two days before infection, or soil drenching with CaSiO<sub>3</sub> 1 g/kg soil at seven days before infection, effectively reduces disease incidence and the percentage of infected leaf area. The increase Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzyme activity in the early stage at 12 hours after infection (hai) and 24 hai in basil plants treated with BTH 50 mg/L, SA 1 mM, and CaSiO<sub>3</sub> 1 g/kg, as well as the increase in  $\beta$  - 1,3 - glucanase enzyme activity at 72 hai in basil plants treated with SA 1 mM, BTH 50 mg/L, and CaSiO<sub>3</sub> 1 g/kg, are associated with the induced resistance mechanism in basil plants against downy mildew caused by *Peronospora belbahrii*.

**Keywords:** *Basil, Induced resistance, Peronospora belbahrii.*

**Ngày nhận bài:** 25/4/2025

**Ngày gửi phản biện:** 23/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 5/6/2025

**Ngày duyệt đăng:** 23/6/2025

# ĐÁNH GIÁ HIỆU LỰC *IN VITRO* CỦA MỘT SỐ HOẠT CHẤT THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT ĐỐI VỚI NẤM *Pestalotiopsis microspora* VÀ *Colletotrichum gloeosporioides* TÁC NHÂN GÂY BỆNH RỤNG LÁ ĐỐM TRÒN TRÊN CÂY CAO SU

Nguyễn Đôn Hiệu<sup>1,\*</sup>, Nguyễn Thị Thanh Trang<sup>1</sup>,

Nguyễn Thị Kim Uyên<sup>1</sup>, Nguyễn Ngọc Mai<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam

Email: donhieurriv@gmail.com

## TÓM TẮT

Tám hoạt chất thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) bao gồm: Propiconazole, Tebuconazole, Hexaconazole, Copper oxychloride, Propineb, Chlorothalonil, Tetramycin và Kasugamycin đã được đánh giá hiệu lực đối với nấm *Pestalotiopsis microspora* và *Colletotrichum gloeosporioides*, tác nhân gây bệnh rụng lá đốm tròn trên cây cao su tại Việt Nam. Kết quả cho thấy, các hoạt chất có tính nội hấp và lưu dẫn như: Propiconazole, Tebuconazole đạt hiệu quả ức chế cao, đặc biệt là Propiconazole với hiệu quả 100% ở nồng độ 120 ppm. Các thuốc có tính tiếp xúc như: Copper oxychloride và Propineb cũng thể hiện khả năng kiểm soát bệnh, nhưng yêu cầu nồng độ cao hơn. Bên cạnh đó, các thuốc sinh học như Tetramycin cũng cho thấy, hiệu quả ức chế tốt đối với nấm *Pestalotiopsis microspora*, mặc dù nồng độ cần thiết cho hiệu quả 100% có sự khác biệt. Kết quả nghiên cứu này giúp bổ sung cơ sở khoa học cho việc lựa chọn thuốc BVTV phù hợp trong việc phòng trị bệnh rụng lá đốm tròn trên cây cao su.

**Từ khóa:** Cây cao su, *Pestalotiopsis microspora*, *Colletotrichum gloeosporioides*, hoạt chất thuốc BVTV.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tại Việt Nam, bệnh rụng lá đốm tròn trên cây cao su được phát hiện lần đầu tiên vào tháng 10 năm 2021. Đến nay, bệnh đã xuất hiện trên nhiều vùng trồng cao su trọng điểm như: Đông Nam bộ, miền Trung và Tây Nguyên [1]. Trong bối cảnh thời tiết khí hậu ngày càng biến động khó lường, mức độ và phạm vi lây lan của bệnh có xu hướng gia tăng mạnh, gây ảnh hưởng lớn đến năng suất và hiệu quả sản xuất của ngành cao su. Nhiều công ty cao su đã phải đầu tư nguồn kinh phí đáng kể để triển khai các biện pháp phòng trừ bệnh.

Việc lựa chọn và sử dụng thuốc BVTV có hiệu quả trong kiểm soát bệnh là một yêu cầu cấp thiết. Tuy nhiên, nghiên cứu ứng dụng thuốc BVTV cho một đối tượng bệnh mới thường đòi hỏi thời gian và chi phí lớn. Do đó, trước khi tiến hành thử nghiệm

ngoài đồng ruộng, cần thực hiện các thí nghiệm trong phòng để đánh giá sơ bộ hiệu lực và xác định khoảng nồng độ phù hợp của từng loại thuốc. Trong số các phương pháp thử thuốc *in vitro*, phương pháp đầu độc môi trường là kỹ thuật phổ biến, cho phép xác định được tỷ lệ ức chế sinh trưởng của nấm bệnh dưới tác động của hoạt chất, làm cơ sở lựa chọn thuốc và tính toán nồng độ sử dụng thích hợp cho các bước nghiên cứu tiếp theo ngoài thực địa.

Xuất phát từ yêu cầu thực tiễn nêu trên, nghiên cứu “Đánh giá hiệu lực *in vitro* của một số hoạt chất thuốc BVTV đối với nấm *Pestalotiopsis microspora* và *Colletotrichum gloeosporioides* tác nhân gây bệnh rụng lá đốm tròn trên cây cao su tại Việt Nam” đã được thực hiện. Kết quả nghiên cứu là nguồn dữ liệu quan trọng phục vụ công tác tuyển chọn thuốc BVTV có hiệu lực cao, góp phần nâng cao hiệu quả kiểm soát bệnh trên vườn cây cao su.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

**Nguồn nấm:** Từ kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh học của 94 chủng nấm *Pestalotiopsis* và 94 chủng nấm *Colletotrichum* gây bệnh rụng lá đốm tròn trên cây cao su tại Việt Nam [1], hai chủng đại diện được lựa chọn gồm: Chủng nấm PesDN002 và chủng nấm CoDN02. Hai chủng nấm này được sử dụng làm vật liệu để đánh giá hiệu lực của các thuốc trừ nấm trong điều kiện phòng thí nghiệm.

**Thuốc trừ nấm:** Gồm 8 hoạt chất: Hexaconazole, Tebuconazole, Propiconazole, Copper oxychloride, Propineb, Chlorothalonil, Tetramycin và Kasugamycin. Dãy nồng độ thử nghiệm cho từng loại thuốc trên hai chủng nấm PesDN02 và CoDN02 được thiết lập dựa trên các kết quả thăm dò trước đó.

**Dụng cụ và thiết bị:** Bao gồm hóa chất, dụng cụ thí nghiệm, máy móc và thiết bị cơ bản phục vụ công tác nuôi cấy nấm, pha chế môi trường, xử lý thuốc và đo đạc trong phòng thí nghiệm.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

**Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với 3 lần lặp lại. Từ kết quả của các thí nghiệm thăm dò, dựa vào phần trăm (%) ức chế sự phát triển đường kính tán nấm, chọn dãy nồng độ thích hợp (ức chế 15 - 100%) đối với mỗi chủng nấm để thực hiện thí nghiệm chính thức. Tổng cộng có 16 thí nghiệm, tương ứng với 8 hoạt chất được thử nghiệm trên 2 chủng nấm PesDN02 và CoDN02. Nghiệm thức đối chứng sử dụng nước cất thanh trùng để pha với môi trường nuôi dưỡng nấm. Mỗi ô cơ sở gồm 3 đĩa petri (Bảng 1).

**Bảng 1. Hoạt chất thuốc và dãy nồng độ thuốc (a.i.) đánh giá hiệu lực đối với chủng nấm PesDN02 và CoDN02**

| Thí nghiệm | Tên hoạt chất thuốc | Cơ chế tác động    | Nồng độ (ppm a.i.)                          | Nồng độ (ppm a.i.)                          |
|------------|---------------------|--------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 1          | Hexaconazole        | Nội hấp và lưu dẫn | 10; 50; 100; 150; 200; 250; 300             | 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20                 |
| 2          | Tebuconazole        | Nội hấp và lưu dẫn | 10; 25; 50; 75; 100; 125; 150               | 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 5; 10              |
| 3          | Propiconazole       | Nội hấp và lưu dẫn | 10; 20; 40; 60; 80; 100; 120                | 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2,5; 5             |
| 4          | Copper oxychloride  | Tiếp xúc           | 300; 350; 400; 450; 500; 550; 600           | 300; 350; 400; 450; 500; 550; 600           |
| 5          | Propineb            | Tiếp xúc           | 200; 250; 300; 350; 400; 450; 500           | 200; 250; 300; 350; 400; 450; 500           |
| 6          | Chlorothalonil      | Tiếp xúc           | 500; 750; 1.000; 1.250; 1.500; 1.750; 2.000 | 500; 750; 1.000; 1.250; 1.500; 1.750; 2.000 |
| 7          | Tetramycin          | Kháng sinh         | 10; 25; 50; 75; 100; 125; 150               | 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100                   |
| 8          | Kasugamycin         | Kháng sinh         | 50; 100; 250; 500; 750; 1.000; 1.250; 1.500 | 50; 100; 250; 500; 750; 1.000; 1.250; 1.500 |

- **Phương pháp thử nghiệm:** Áp dụng phương pháp đầu độc môi trường. Nguồn chủng nấm PesDN02 và CoDN02 được nuôi cấy thuần trên môi

trường PDA trong 7 - 10 ngày trước khi sử dụng. Môi trường PDA được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút, để nguội về 40 - 50°C rồi trộn với thuốc ở các

nồng độ thí nghiệm. Nồng độ hoạt chất các thuốc thử nghiệm được chuẩn bị ở dạng dung dịch pha trong nước ở nồng độ cao gấp 10 lần so với nồng độ hoạt chất của thuốc thử nghiệm dùng trong môi trường nuôi cấy.

- *Chỉ tiêu theo dõi*:

+ Đường kính tản nấm (ĐKTN) được đo bằng công thức:

$$d = (d_1 + d_2) / 2$$

Trong đó: d là đường kính trung bình của tản nấm;  $d_1$ ,  $d_2$  là hai đường chéo vuông góc đo trên bề mặt tản nấm.

+ Tỷ lệ phần trăm ức chế sinh trưởng được tính theo công thức:

$$I = (C - T) / C \times 100$$

Trong đó: I là tỷ lệ ức chế (%); C là ĐKTN ở nghiệm thức đối chứng; T là ĐKTN ở nghiệm thức xử lý thuốc.

+ *Phân tích số liệu*: Dữ liệu % ức chế được chuyển đổi sang dạng Probit (y), nồng độ thuốc được chuyển đổi thành logarit thập phân của (C x 1000) (x). Mô hình toán học được xây dựng theo phương trình:  $y = a + bx$ , sau đó tính hệ số tương quan (r).

+ *Xử lý số liệu*: Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel, phân tích hồi quy tuyến tính, tính hệ số tương quan và biểu diễn bằng đồ thị.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Hiệu lực của một số thuốc BVTV đối với chủng nấm PesDN02

Kết quả thí nghiệm *in vitro* cho thấy, cả ba nhóm

thuốc (nội hấp - lưu dẫn, tiếp xúc và sinh học) đều có khả năng ức chế sự phát triển của chủng nấm PesDN02, tuy nhiên hiệu lực trừ nấm có sự khác biệt rõ rệt giữa các hoạt chất và nhóm thuốc.

*Nhóm thuốc nội hấp, lưu dẫn*: Propiconazole thể hiện hiệu quả cao nhất, ức chế hoàn toàn (100%) sự phát triển của tản nấm ở nồng độ thấp nhất là 120 ppm a.i. Tebuconazole cũng đạt hiệu quả tương đương ở nồng độ 150 ppm a.i. Trong khi đó, Hexaconazole có hiệu lực thấp hơn đáng kể so với hai hoạt chất trên, khi ở nồng độ 300 ppm a.i. tỷ lệ ức chế chỉ đạt 90,05%.

*Nhóm thuốc tiếp xúc*: Copper oxychloride đạt hiệu lực ức chế 100% ở nồng độ 600 ppm a.i. Propineb cũng đạt hiệu quả tương tự ở nồng độ 500 ppm a.i. và Chlorothalonil cho hiệu lực thấp nhất trong nhóm, khi ở nồng độ 2.000 ppm a.i. tỷ lệ ức chế chỉ đạt 85%.

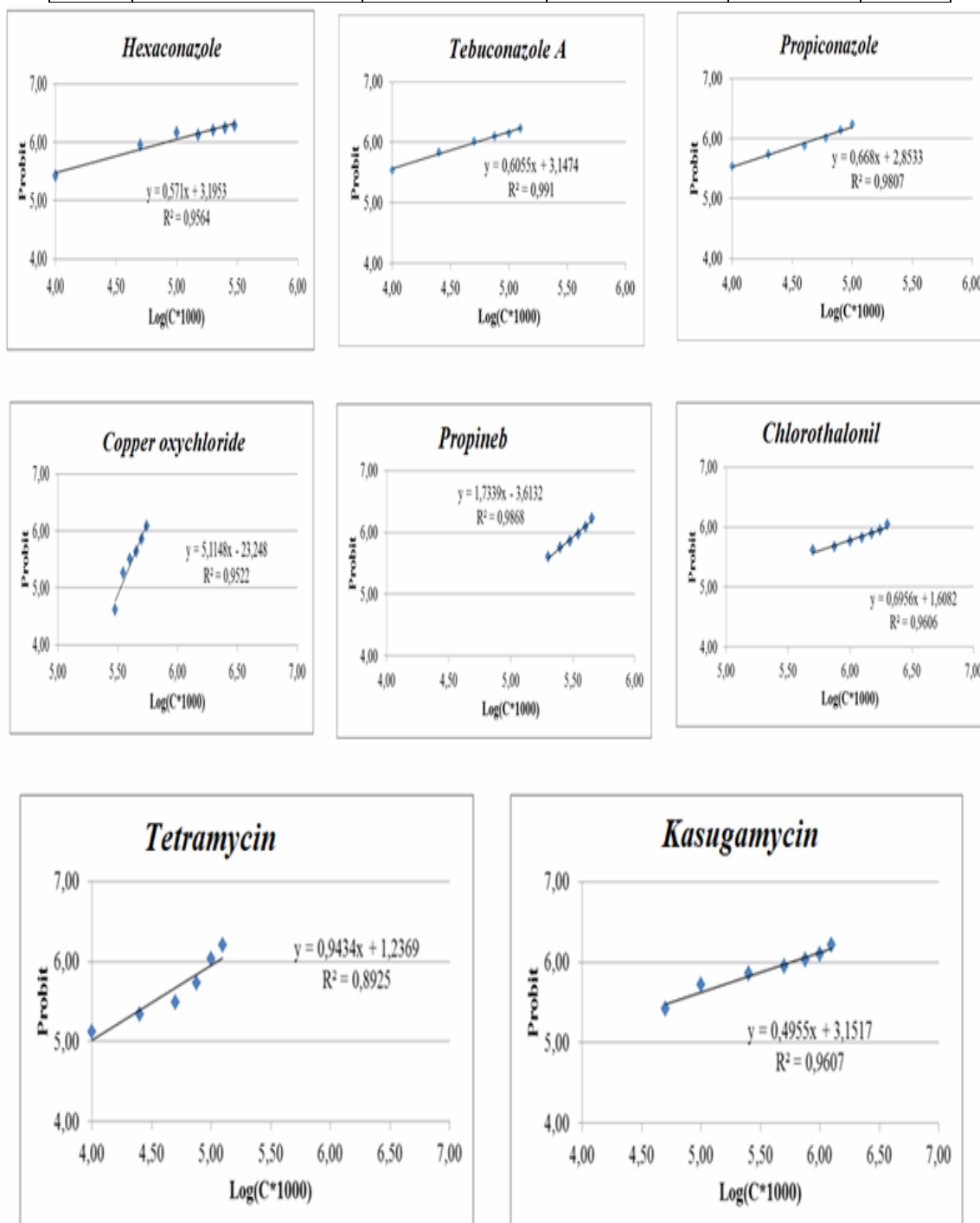
*Nhóm thuốc sinh học*: Tetramycin (kháng sinh) thể hiện hiệu quả cao, đạt tỷ lệ ức chế 100% ở nồng độ 150 ppm a.i. Kasugamycin (chiết xuất từ xạ khuẩn) có hiệu quả thấp hơn đáng kể, cần đến nồng độ 1.500 ppm a.i. mới đạt tỷ lệ ức chế 100%.

Kết quả phân tích thống kê, cho thấy giữa tỷ lệ ức chế sinh trưởng chủng nấm PesDN02 và nồng độ hoạt chất của 8 hoạt chất thuốc thử nghiệm đều có mối tương quan chặt, với hệ số tương quan r dao động từ 0,94 - 0,99. Phương trình biểu diễn tương quan giữa tỷ lệ ức chế sinh trưởng và nồng độ hoạt chất được thể hiện ở hình 1, hình 2.

**Bảng 2. Kết quả đánh giá hiệu lực của các thuốc thử nghiệm đối với chủng nấm PesDN02**

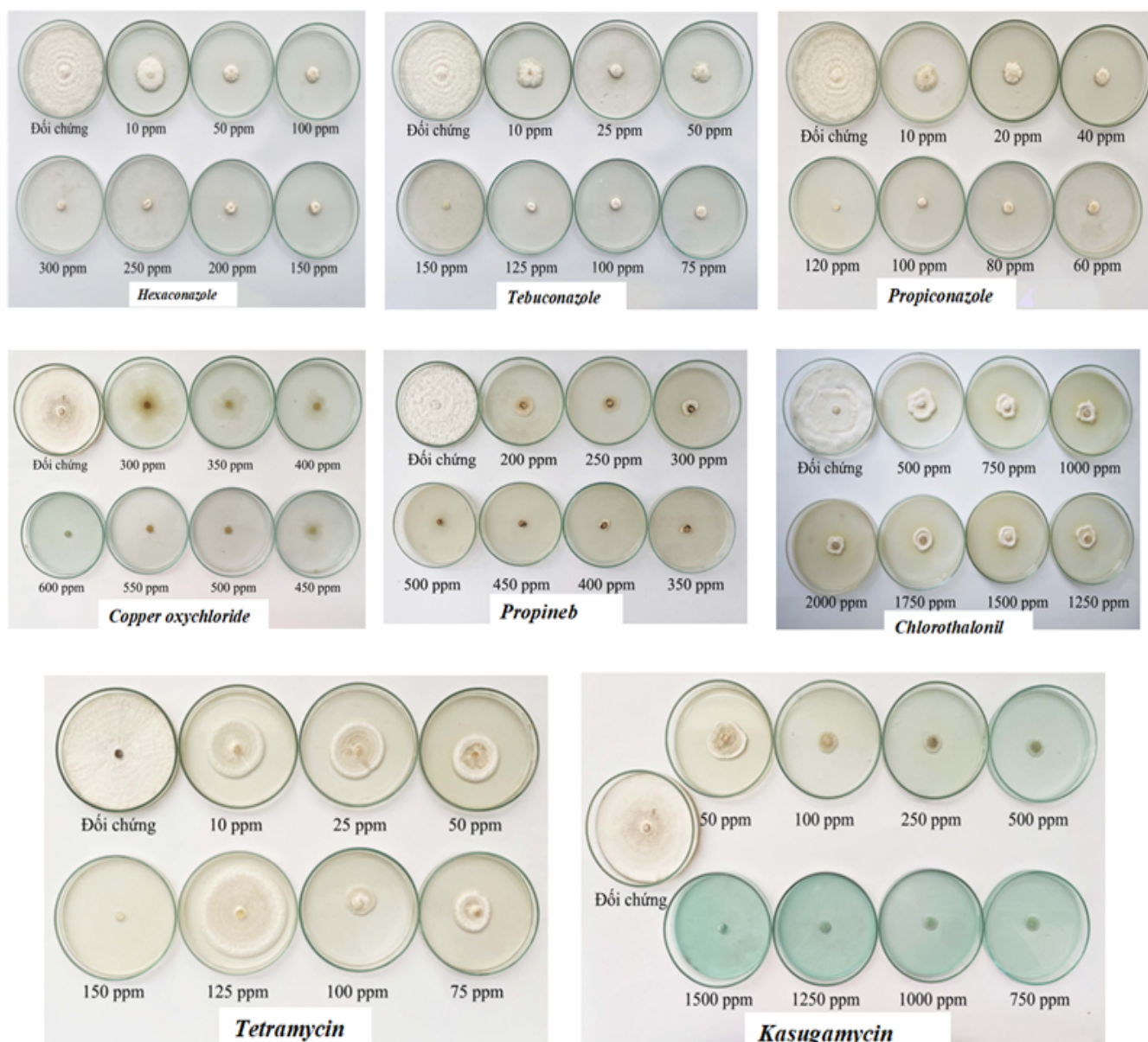
| STT | Hoạt chất thuốc BVTV | Nồng độ (ppm a.i) | Trung bình ĐKTN (mm) | % Ức chế | r    |
|-----|----------------------|-------------------|----------------------|----------|------|
| 1   | Hexaconazole         | 300               | 8,8                  | 90,05    | 0,98 |
| 2   | Tebuconazole         | 150               | 0,0                  | 100,0    | 0,99 |
| 3   | Propiconazole        | 120               | 0,0                  | 100,0    | 0,99 |
| 4   | Copper oxychloride   | 600               | 0,0                  | 100,0    | 0,98 |

|   |                |       |      |       |      |
|---|----------------|-------|------|-------|------|
| 5 | Propineb       | 500   | 0,0  | 100,0 | 0,99 |
| 6 | Chlorothalonil | 2.000 | 13,5 | 85,0  | 0,98 |
| 7 | Tetramycin     | 150   | 0,0  | 100,0 | 0,94 |
| 8 | Kasugamycin    | 1500  | 0,0  | 100,0 | 0,98 |



**Hình 1. Biểu đồ biểu diễn tương quan giữa nồng độ thuốc thử nghiệm và tỷ lệ ức chế sinh trưởng chủng nấm PesDN02 ở các nồng độ thuốc tương ứng**





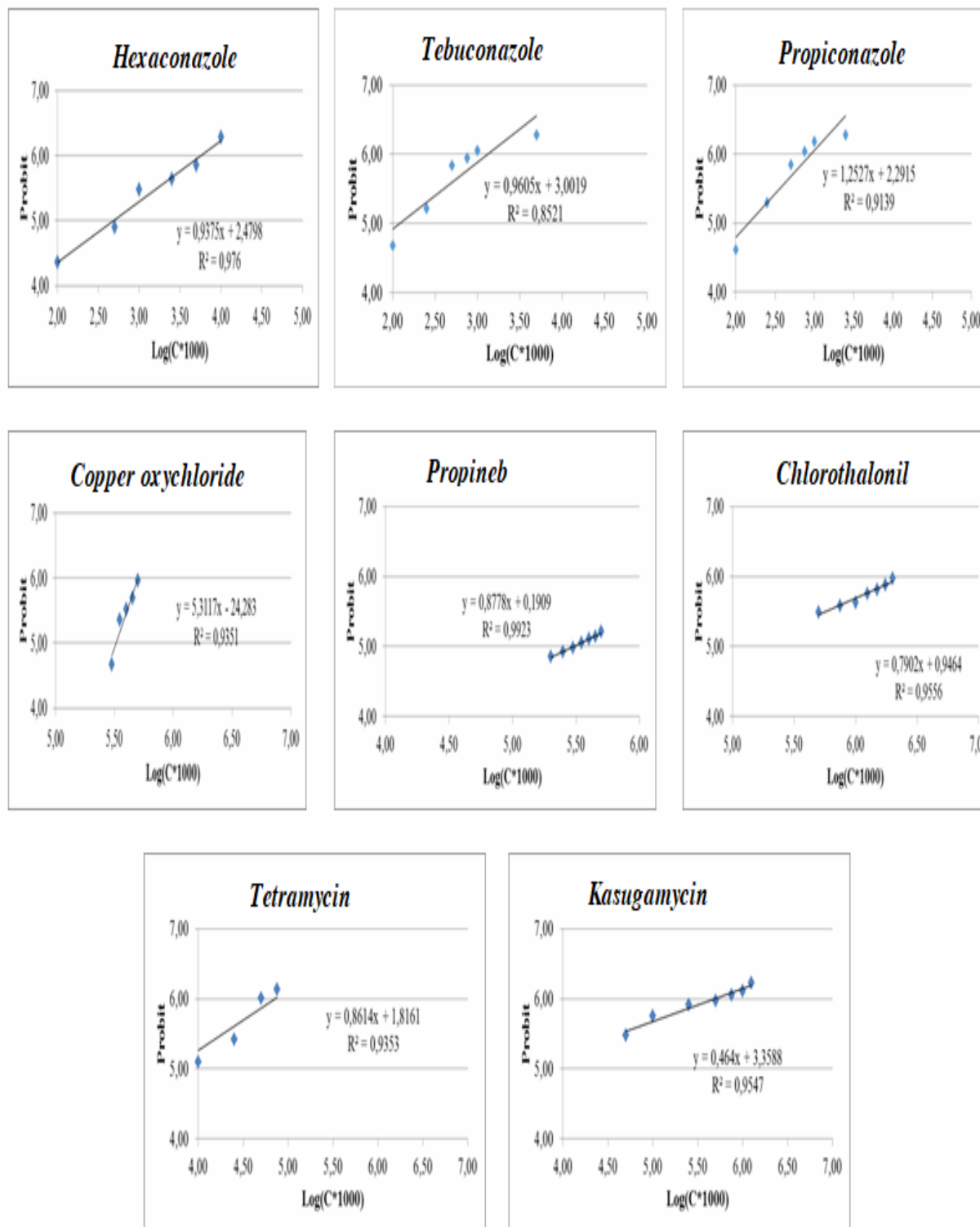
Hình 2. Mức độ ức chế sinh trưởng chủng nấm PesDN02 trên môi trường được đầu độc thuốc ở các nồng độ khác nhau

### 3.2. Hiệu lực của một số thuốc BVTV đối với chủng nấm CoDN02

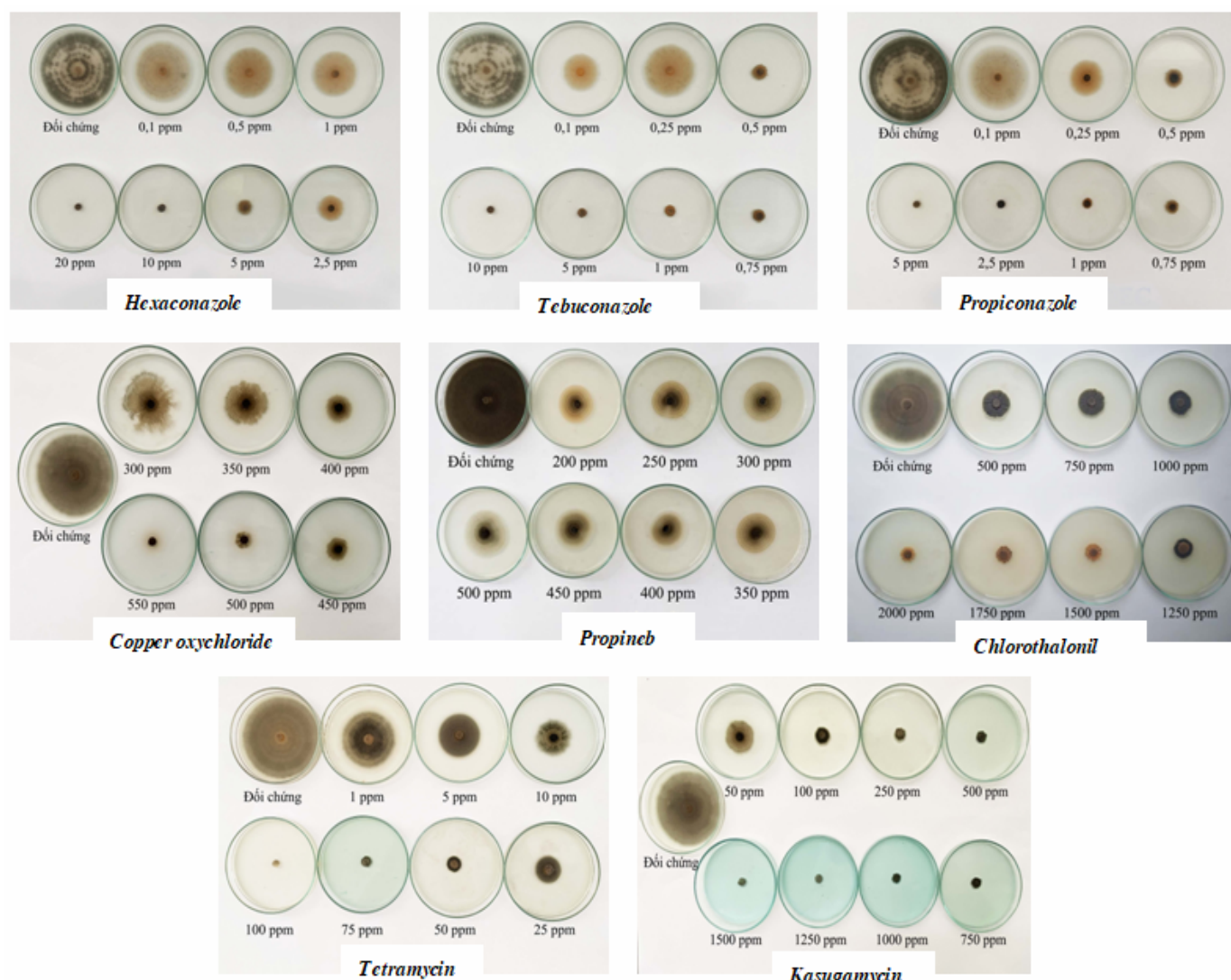
Bảng 3. Kết quả đánh giá hiệu lực của các thuốc thử nghiệm đối với chủng nấm CoDN02

| STT | Hoạt chất thuốc BVTV | Nồng độ (ppm a.i) | Trung bình ĐKTN (mm) | % Ức chế | r    |
|-----|----------------------|-------------------|----------------------|----------|------|
| 1   | Hexaconazole         | 20                | 0,0                  | 100,0    | 0,99 |
| 2   | Tebuconazole         | 10                | 0,0                  | 100,0    | 0,92 |
| 3   | Propionazole         | 5                 | 0,0                  | 100,0    | 0,96 |
| 4   | Copper oxychloride   | 550               | 0,0                  | 100,0    | 0,97 |
| 5   | Propineb             | 500               | 37,6                 | 58,3     | 0,99 |

|   |                |      |      |      |      |
|---|----------------|------|------|------|------|
| 6 | Chlorothalonil | 2000 | 13,5 | 85,0 | 0,98 |
| 7 | Tetramycin     | 100  | 0,0  | 100  | 0,97 |
| 8 | Kasugamycin    | 1500 | 0,0  | 100  | 0,98 |



**Hình 3. Biểu đồ biểu diễn tương quan giữa nồng độ thuốc thử nghiệm và tỷ lệ ức chế sinh trưởng chủng nấm CoDN02 ở các nồng độ thuốc tương ứng**



Hình 4. Mức độ ức chế sinh trưởng chủng nấm CoDN02 trên môi trường được đầu độc thuốc ở các nồng độ khác nhau

Các hoạt chất thuốc thuộc ba nhóm (nội hấp - lưu dẫn, tiếp xúc và sinh học) đều có khả năng ức chế sự phát triển của chủng nấm CoDN02, tuy nhiên mức độ hiệu quả giữa các hoạt chất có sự khác biệt rõ rệt.

**Nhóm thuốc nội hấp, lưu dẫn:** Các hoạt chất thuốc trong nhóm này đều cho thấy, hiệu lực ức chế mạnh đối với chủng nấm CoDN02, ngay cả ở nồng độ thấp. Propiconazole đạt hiệu lực ức chế hoàn toàn (100%) sự phát triển của nấm ở nồng độ rất thấp, chỉ 5 ppm a.i. Tebuconazole cũng đạt tỷ lệ ức chế 100% ở nồng độ 10 ppm a.i và Hexaconazole yêu cầu nồng độ 20 ppm a.i. để đạt hiệu quả tương đương.

**Nhóm thuốc tiếp xúc:** Các thuốc tiếp xúc vẫn cho thấy, khả năng ức chế nấm, tuy nhiên cần sử dụng ở nồng độ cao hơn đáng kể. Copper oxychloride là hoạt chất có hiệu lực cao nhất trong nhóm, đạt ức chế hoàn toàn ở nồng độ 550 ppm a.i.

Chlorothalonil cho hiệu quả thấp hơn, ở nồng độ 2.000 ppm a.i. tỷ lệ ức chế chỉ đạt 85%. Propineb là hoạt chất có hiệu quả thấp nhất trong nhóm, khi ở cùng nồng độ 550 ppm a.i. chỉ đạt tỷ lệ ức chế 58,3%.

**Nhóm thuốc sinh học:** Tetramycin (kháng sinh) cho thấy hiệu lực cao, đạt tỷ lệ ức chế 100% ở nồng độ 100 ppm a.i. Kasugamycin (nguồn gốc từ xạ khuẩn) chỉ đạt hiệu lực tương đương ở nồng độ rất cao (1500 ppm a.i.).

Kết quả phân tích thống kê cho thấy, giữa tỷ lệ ức chế sinh trưởng chủng nấm CoDN02 và nồng độ hoạt chất của 8 hoạt chất thuốc thử nghiệm đều có mối tương quan chặt, với hệ số tương quan r dao động từ 0,92 - 0,99. Phương trình biểu diễn tương quan giữa tỷ lệ ức chế sinh trưởng nấm và nồng độ hoạt chất được thể hiện ở hình 3.

Như vậy, các hoạt chất cho thấy, hiệu quả trừ nấm cao trên cả hai chủng nấm PesDN02 và

CoDN02 gồm: Propiconazole, Tebuconazole và Tetramycin. Trong đó, hoạt chất Propiconazole cho hiệu quả trừ nấm cao hơn các thuốc còn lại.

### **3.3. Thảo luận**

Kể từ khi bệnh rụng lá đốm tròn xuất hiện trên cây cao su, nhiều quốc gia bị ảnh hưởng đã tập trung nghiên cứu nhằm xác định tác nhân gây bệnh và đề xuất các biện pháp quản lý hiệu quả. Các nghiên cứu tại In-đô-nê-xi-a, Ma-lai-xi-a và Sri Lanka đã xác định nấm *Colletotrichum* spp. và *Pestalotiopsis* spp. là các tác nhân chính, trong khi tại Ấn Độ và Thái Lan, *Colletotrichum* spp. được ghi nhận là loài chiếm ưu thế [2].

Tại In-đô-nê-xi-a, *Pestalotiopsis* spp. được xác định là tác nhân chính và các hoạt chất Hexaconazole, Thiophanate-methyl đã được khuyến cáo sử dụng kết hợp với biện pháp bón phân hợp lý nhằm kiểm soát bệnh [2]. Tại Thái Lan, *Colletotrichum* spp. được xác định là loài gây bệnh và các hoạt chất Carbendazim và nhóm Triazole (gồm Propiconazole, Hexaconazole, Difenconazole + Propiconazole) đã chứng minh hiệu quả cao trong việc ức chế sự phát triển của nấm bệnh [3]. Tại Malaysia, các hoạt chất Chlorothalonil, Mancozeb, Propineb, Propiconazole và Hexaconazole đều cho hiệu quả rõ rệt đối với cả nấm *Pestalotiopsis* spp. và *Colletotrichum* spp., trong khi các biện pháp canh tác hợp lý cũng góp phần kiểm soát dịch bệnh [4 - 5]. Tại Sri Lanka, Carbendazim và Hexaconazole tiếp tục được ghi nhận là có hiệu lực cao trong việc ngăn chặn sự phát triển của nấm gây hại [6].

Tại Việt Nam, bệnh rụng lá đốm tròn được ghi nhận lần đầu vào tháng 10 năm 2021 và hiện đã lan rộng tại nhiều vùng trồng cao su trọng điểm thuộc Đông Nam bộ, miền Trung và Tây Nguyên. Kết quả phân lập và thử nghiệm lây nhiễm theo định đề Koch xác định phức hợp nấm *Pestalotiopsis* spp. và *Colletotrichum* spp. là tác nhân gây bệnh [1]. Kết quả nghiên cứu này tương đồng với các phát hiện tại các quốc gia khác, đồng thời mở rộng phạm vi khảo sát đến nhóm thuốc tiếp xúc và sinh học.

Kết quả thí nghiệm *in vitro* cho thấy, mức độ nhạy cảm của nấm *Pestalotiopsis microspora* và *Colletotrichum gloeosporioides* đối với các hoạt chất thuốc thử nghiệm có sự khác biệt rõ rệt. Cụ thể, Propiconazole ức chế hoàn toàn sự phát triển của *Colletotrichum gloeosporioides* ở nồng độ rất thấp (5 ppm a.i.), trong khi cần nồng độ cao hơn đáng kể

(120 ppm a.i.) để đạt hiệu quả tương tự đối với *Pestalotiopsis microspora*.

Trong nhóm thuốc sinh học, Tetramycin cho thấy, hiệu lực phổ rộng, ức chế hoàn toàn cả hai loại nấm ở nồng độ trung bình (100 - 150 ppm a.i.), cho thấy, tiềm năng ứng dụng như một giải pháp thay thế thân thiện với môi trường hoặc kết hợp trong các chương trình quản lý tổng hợp dịch hại. Trong khi đó, kasugamycin có hiệu lực thấp hơn rõ rệt, yêu cầu nồng độ lên đến 1.500 ppm a.i. để đạt được hiệu quả tương đương, làm giảm tính hiệu quả về mặt chi phí trong thực tế sản xuất.

## **4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ**

### **4.1. Kết luận**

Kết quả thí nghiệm trong phòng cho thấy, các hoạt chất thuốc có khả năng kiểm soát nấm *Pestalotiopsis microspora* và *Colletotrichum gloeosporioides*, tác nhân gây bệnh rụng lá đốm tròn trên cây cao su ở Việt Nam, bao gồm Propiconazole, Tebuconazole và Tetramycin. Trong đó, Propiconazole ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm *Pestalotiopsis microspora* tại nồng độ 120 ppm a.i và nấm *Colletotrichum gloeosporioides* chỉ ở 5 ppm a.i, cho thấy, hiệu lực rất mạnh ngay ở nồng độ thấp. Tebuconazole cũng cho kết quả tương đương với hiệu lực 100% tại 150 ppm a.i đối với nấm *Pestalotiopsis microspora* và 10 ppm a.i đối với *Colletotrichum gloeosporioides*. Trong nhóm thuốc sinh học, Tetramycin đạt hiệu quả ức chế 100% đối với *Pestalotiopsis microspora* ở 150 ppm a.i và *Colletotrichum gloeosporioides* ở 100 ppm a.i. Kết quả này cho thấy, tiềm năng ứng dụng của các hoạt chất trên trong phòng trừ bệnh rụng lá cao su.

### **4.2. Đề nghị**

Dựa trên kết quả thí nghiệm trong phòng, đề nghị tiến hành thử nghiệm ngoài đồng ruộng đối với các thuốc BVTN có hiệu lực cao để xác định hiệu quả thực tế và đưa ra khuyến cáo cho việc phòng trị bệnh rụng lá đốm tròn trên cây cao su tại Việt Nam. Đồng thời, cần tiếp tục thử nghiệm các nhóm thuốc và hoạt chất khác nhau để tìm ra giải pháp tổng hợp, bền vững trong công tác quản lý bệnh.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. 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 và Nguyễn Anh Nghĩa (2024).

Xây dựng quy trình phòng trị bệnh rụng lá đốm tròn mới phát hiện trên cây cao su ở Việt Nam. *Báo cáo tổng kết đề tài cấp Tập đoàn Công nghiệp Cao su Việt Nam*.

2. Febbiyanti, T. R. (2023). The status of the circular leaf spot disease (*Pestalotiopsis*) in IRRDB member countries. In: *Proceedings of the Pathology Expert Meeting*, International Rubber Research and Development Board (IRRDB), Kuala Lumpur, Malaysia, 10 - 12.

3. Rodesuchit A. (2020). The new leaf fall disease in Thailand. *Webinar Pestalotiopsis*.

4. Ismail T. (2020). Current status of fungal disease in Asia. Fusicoccum or pestalotiopsis? A planter's experience in Indonesia. *Webinar*

*Pestalotiopsis*.

5. Aliya S. S. S., Ali N. S., Mahyudin M. M., Yun W. M. and Yusop, M. R. (2022). Emerging and existing major leaf diseases of hevea brasiliensis in Malaysia. *Journal of Current Opinion in Crop Science*, 3(1): 34 - 47.

6. Silva M .K. R., Fernando T. H. P. S. and Aberathne A. H. M. N. R. (2023). *Screening of fungicides on the management of circular leaf spot disease of rubber*. Proceedings of the 27th International Forestry and Environment symposium 2023 of the Department of Forestry and Environmental science, University of Sri Jayewardenepura, Sri Lanka.

**IN VITRO EFFICACY EVALUATION OF SOME ACTIVE INGREDIENT OF PESTICIDES  
AGAINST *Pestalotiopsis microspora* AND *Colletotrichum gloeosporioides*, CAUSAL AGENTS  
OF CIRCULAR LEAF SPOT DISEASE ON RUBBER TREES**

Nguyen Don Hieu<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thanh Trang<sup>1</sup>,

Nguyen Thi Kim Uyen<sup>1</sup>, Nguyen Ngoc Mai<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Rubber Research Institute of Vietnam

**Abstract**

Eight (8) active ingredients of pesticides, including Propiconazole, Tebuconazole, Hexaconazole, Copper oxychloride, Propineb, Chlorothalonil, Tetramycin and Kasugamycin, have been evaluated for their effectiveness against the fungi *Pestalotiopsis microspora* and *Colletotrichum gloeosporioides*, which are the causative agents of circular leaf spot disease in rubber trees in Vietnam. The results show that systemic active ingredients such as Propiconazole and Tebuconazole achieved high inhibitory effects, especially Propiconazole with 100% effectiveness at a concentration of 120 ppm. Contact fungicides like Copper oxychloride and Propineb also demonstrated the ability to control the disease, but required higher concentrations. In addition, biological fungicides such as Tetramycin also showed good inhibitory effects against *P. microspora*, although the concentration required for 100% effectiveness varied. The results of this study help to supplement the scientific basis for the selection of appropriate pesticides in preventing and treating circular leaf spot disease in rubber trees.

**Keywords:** Rubber trees, *Pestalotiopsis microspora*, *Colletotrichum gloeosporioides*, active ingredient of pesticides.

**Ngày nhận bài:** 15/4/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 5/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 30/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 20/6/2025



# SÀNG LỌC NGUỒN VẬT LIỆU LẠC (*Arachis hypogaea* L.) CHỊU HẠN VÀ KHÁNG BỆNH HÉO XANH VI KHUẨN (*Ralstonia solanacearum* Smith) CHO CÁC TỈNH MIỀN TRUNG

Lê Thị Phương Lan<sup>1</sup>, Nguyễn Xuân Đoan<sup>2</sup>, Nguyễn Huy Chung<sup>1</sup>,

Nguyễn Xuân Thu<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Tho<sup>1</sup>, Lê Tuấn Tú<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Viện Bảo vệ thực vật

<sup>2</sup> Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm

\*Email: lelan36@gmail.com

## TÓM TẮT

Miền Trung là vùng trồng lạc quan trọng của Việt Nam, tuy nhiên điều kiện hạn hán và áp lực bệnh héo xanh vi khuẩn cao đã làm giảm năng suất và sản lượng lạc. Sử dụng các giống chống chịu với các điều kiện bất lợi nêu trên là chiến lược quan trọng để bảo vệ ngành sản xuất lạc của vùng. Trong số 150 dòng/giống lạc được đánh giá, có 37 dòng/giống lạc có khả năng chịu hạn ở mức chống chịu cao đến trung bình, đồng thời có khả năng kháng cao đến trung bình với bệnh héo xanh vi khuẩn như: L28, Trăm Dầu 207, L27, L33, L34, L35... Những dòng/giống này là nguồn vật liệu tốt phục vụ cho công tác chọn tạo giống chống chịu hạn và kháng bệnh héo xanh vi khuẩn.

**Từ khóa:** *Arachis hypogaea*, chịu hạn, héo xanh vi khuẩn, kháng bệnh, lạc, *Ralstonia solanacearum* Smith, sàng lọc.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây lạc (*Arachis hypogaea* L.) là cây công nghiệp ngắn ngày có giá trị cao phục vụ tiêu thụ nội địa, xuất khẩu và chuyển đổi cơ cấu cây trồng. Miền Trung là vùng trồng lạc quan trọng của Việt Nam với diện tích gieo trồng lạc năm 2022 khoảng 73.835 ha chiếm 46,3% diện tích lạc cả nước; đạt sản lượng 185.424 tấn, tương đương 45,4% sản lượng của cả nước [1]. Cây lạc ở miền Trung chủ yếu được gieo trồng trên đất phù sa, đất xám, đất xám bạc màu và đất cát. Hầu hết các diện tích trồng lạc ở miền Trung thường bị khô hạn, phần lớn các tỉnh trong vùng không chủ động được tưới tiêu. Bên cạnh đó, bệnh héo xanh vi khuẩn (HXVK) được ghi nhận với tỷ lệ nhiễm cao (lên đến 60%) [2] cũng là nguyên nhân gây ra thiệt hại nghiêm trọng về năng suất và sản lượng lạc, không tương xứng với tiềm năng của vùng. Một trong những yêu cầu cấp thiết để đảm bảo năng suất và sản lượng lạc ở miền Trung là việc chọn tạo giống lạc vừa có khả năng chịu hạn tốt, vừa có khả năng kháng bệnh HXVK.

Cơ chế chịu hạn của cây lạc là một hệ thống tổng hợp, phối hợp nhịp nhàng giữa các thay đổi về cấu trúc hình thái, chức năng sinh lý và điều hòa phân tử. Các đặc điểm chịu hạn tích hợp thể hiện ở cấp độ tổ

chức cao được cho là hữu ích trong chương trình cải tiến giống chịu hạn [3]. Nghiên cứu hiện tại của Viện Nghiên cứu Cây trồng Quốc tế (ICRISAT) cho vùng nhiệt đới Bán khô hạn đã tạo ra được nhiều vật liệu nhân giống đầy hứa hẹn thông qua thử nghiệm kiểu hình ở nhiều địa điểm khác nhau như: ICGS 76 (ICGV 87141), TAG 24, ICGV 91114 ...[4, 5]. Việt Nam cũng chọn tạo và công nhận một số giống lạc có khả năng chịu hạn cải thiện, phù hợp với điều kiện sản xuất tại các vùng khô hạn như: ĐM1, ĐM4, ĐM7, HL11, HL22, MHZ, L12, Sen thất [6].

Bệnh HXVK (*Ralstonia solanacearum* Smith) là loại bệnh hại nghiêm trọng nhất trên lạc, gây thiệt hại năng suất từ 10 - 30% và tới 60% ở những vùng bị nhiễm nặng [7]. Bệnh cũng gây thiệt hại nghiêm trọng ở các hệ thống canh tác nhờ nước mưa, đặc biệt trên đất cát ven bờ sông và trên đất cao [8]. Sử dụng giống lạc kháng bệnh được coi là phương pháp kinh tế và khả thi duy nhất để kiểm soát bệnh. Nhiều nguồn gen lạc kháng bệnh héo xanh đã được xác định từ các bộ sưu tập vật liệu di truyền toàn cầu, tại ICRISAT có các dòng/giống kháng nổi bật như: Schwarz 21, Matjan, E Hua 5, Gui You 28, Lu Hua 3... [9, 10, 11]. Ở Việt Nam, công tác chọn tạo giống lạc kháng bệnh HXVK đã được tiến hành từ năm 1994 và



đã giới thiệu nhiều giống chống chịu khá với bệnh HXVK như: MD7, MD9, TK10 của Viện Bảo vệ thực vật; L29, L34, L35 của Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm [12].

Cả hai tính trạng chịu hạn và kháng bệnh HXVK đều quy định bởi nhiều gen [9, 13]. Quá trình chọn lọc đồng thời cả hai tính trạng đòi hỏi phương pháp đánh giá phức tạp và tốn kém trong cả điều kiện phòng thí nghiệm và đồng ruộng. Các phương pháp sàng lọc nguồn vật liệu có cả 2 tính trạng này gồm: Phương pháp sàng lọc kiểu hình trong điều kiện phòng thí nghiệm - ngoài đồng ruộng và chọn lọc dựa vào chỉ thị phân tử.

Trong nghiên cứu này, thông qua đánh giá tính kháng bệnh HXVK cũng như khả năng chịu hạn của 150 dòng/giống lạc trong điều kiện nhân tạo, đã chọn được 37 nguồn vật liệu có khả năng chịu hạn trung bình đến tốt, đồng thời có khả năng kháng trung bình đến kháng cao đối với bệnh HXVK. Các dòng/giống lạc được chọn có thể được dùng làm vật liệu khởi đầu cho các chương trình chọn tạo giống lạc với các đặc tính phù hợp với điều kiện hạn hán và áp lực bệnh HXVK cao, đảm bảo duy trì diện tích, năng suất và sản lượng lạc ở miền Trung Việt Nam.

## **2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu nghiên cứu**

Nghiên cứu này sử dụng 150 dòng/giống lạc, bao gồm các dòng/giống thu thập, nhập nội và lai tạo mới, cùng các giống đang phổ biến trong sản xuất được lưu giữ tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm. Các giống lạc Gié Nho Quan và ICGV3704 (ICRISAT) được dùng làm đối chứng kháng và đối chứng nhiễm trong đánh giá tính kháng bệnh HXVK.

Nguồn vi khuẩn *R. solanacearum* sử dụng trong lây bệnh nhân tạo được thu thập từ huyện Diễn Châu, tỉnh Nghệ An (NA1). Nguồn vi khuẩn được phân lập trên môi trường TZCA và nhân nuôi trên môi trường SPA.

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

#### **2.2.1. Đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng/giống lạc thông qua gây hạn nhân tạo**

Khả năng chịu hạn của các dòng/giống lạc được đánh giá dựa vào năng suất khi gây hạn ở thời kỳ hình thành quả hạt thông qua nhạy cảm với hạn (Drought Sensitivity Index – DSI) [14].

Các dòng/giống lạc được gieo trong các chậu nhựa có đường kính 50 cm, chiều cao 30 cm; các chậu được đục lỗ dưới đáy và mỗi chậu chứa 7 kg cát và được bố trí 10 cây lạc/chậu. Thí nghiệm được tiến hành trong nhà có mái che bằng màng nilon trong suốt. Nhiệt độ, độ ẩm không khí phụ thuộc vào điều kiện môi trường tự nhiên.

Thí nghiệm được chia thành 2 phần giống nhau (một phần có tưới và một phần gây hạn nhân tạo) bố trí thí nghiệm theo phương pháp ngẫu nhiên hoàn toàn với 3 lần nhắc lại.

+ *Phần có tưới*: Lạc trong thí nghiệm được tưới nước đầy đủ trong suốt quá trình sinh trưởng, phát triển.

+ *Phần gây hạn*: Lạc trong thí nghiệm được tưới nước đầy đủ cho đến thời kỳ hình thành quả, hạt thì ngừng tưới trong thời gian 7 ngày; sang ngày thứ 8 (sau gây hạn) tưới nước trở lại và duy trì chế độ tưới nước đến cuối vụ để tính năng suất.

Khả năng chịu hạn của lạc dựa vào chỉ số nhạy cảm với hạn được tính theo công thức:

$$DSI = \frac{1 - \frac{Y_s}{Y_p}}{1 - \frac{X_s}{X_p}}$$

Trong đó: DSI là chỉ số nhạy cảm với hạn,  $Y_s$  là năng suất lạc ở điều kiện hạn,  $Y_p$  là năng suất lạc ở điều kiện bình thường (có tưới),  $X_s$  là năng suất trung bình của tất cả các dòng/giống trong điều kiện hạn,  $X_p$  là năng suất trung bình của tất cả các dòng/giống trong điều kiện bình thường (có tưới). Các dòng/giống có chỉ số  $DSI < 0,5$  có khả năng chịu hạn tốt,  $0,5 \leq DSI \leq 1,0$  thể hiện khả năng chịu hạn trung bình và các dòng/giống có chỉ  $DSI > 1$  miễn cảm với điều kiện hạn.

Các thí nghiệm được tiến hành tại nhà lưới Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm, năm 2021.

#### **2.2.2. Đánh giá khả năng chống chịu bệnh HXVK của các dòng/giống thông qua lây nhiễm nhân tạo**

Thí nghiệm đánh giá tính kháng bệnh HXVK của 150 dòng/giống lạc được tiến hành tại khu thí nghiệm Viện Bảo vệ thực vật, năm 2022 theo phương pháp hạt nứt nanh [7]. Nguồn vi khuẩn được làm thuần, nhân lên trên môi trường SPA bằng phương

pháp trang trên đĩa petri, sau 2 - 3 ngày nuôi cấy, hòa dịch vi khuẩn đã nuôi cấy vào nước cất vô trùng với mật độ tế bào vi khuẩn đạt  $10^8 - 10^9$  CFU/ml. Ngâm hạt lạc đã nảy mầm nứt nanh vào dịch vi khuẩn đã chuẩn bị sẵn trong thời gian 20 phút trước khi gieo, sau đó trồng để đánh giá trên nền sick-plot [7]. Lấy nhiễm bổ sung nguồn vi khuẩn gây bệnh vào giai đoạn lạc ra hoa đợt 1 bằng cách thu thập tàn dư cây lạc bị bệnh tại vùng dịch bệnh. Cây lạc bị bệnh được chặt nhỏ, ngâm với nước cho ra dịch vi khuẩn trong vòng 2 giờ rồi đem tưới bổ sung. Mỗi dòng/giống được nhắc lại 3 lần, gieo 10 hạt/lần nhắc với khoảng cách gieo cây cách cây 10 cm, hàng cách hàng 25 cm. Đếm toàn bộ số cây bị héo và chết sau khi mọc và khi giống đối chứng nhiễm ICGV 3704 đạt tỷ lệ bệnh cao nhất. Đánh giá khả năng kháng nhiễm theo thang 6 cấp của ICRISAT như sau:

| Điểm số | Tỷ lệ cây bệnh (%) | Mức độ kháng bệnh HXVK | Ký hiệu |
|---------|--------------------|------------------------|---------|
| 1       | $\leq 10$          | Kháng cao              | HR      |
| 2       | $> 10 - 20$        | Kháng                  | R       |
| 3       | $> 20 - 30$        | Kháng trung bình       | MR      |
| 4       | $> 30 - 50$        | Nhiễm trung bình       | MS      |
| 5       | $> 50 - 90$        | Nhiễm                  | S       |
| 6       | $> 90$             | Nhiễm nặng             | HS      |

**Bảng 1. Khả năng chịu hạn của 150 dòng/giống lạc trong điều kiện nhà lưới**

| Cấp độ chịu hạn     | Chỉ số DSI |            |          | Dòng/giống đại diện                                                                                                                          |
|---------------------|------------|------------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     | Nhỏ nhất   | Trung bình | Lớn nhất |                                                                                                                                              |
| Chịu hạn tốt        | 0,20       | 0,407      | 0,50     | L28, Trạm Dầu 207, L23, LCH-01, L17, L29, L35, L34, BW62, CP1, L33, L32, L14, LCH-02.                                                        |
| Chịu hạn trung bình | 0,54       | 0,877      | 1,00     | 20LAC01B, LSH15, LCM-02, L31, L27, 1005.4, 1005.14.1, 1005.1.4, 1315.5, 1310.6.1, 1310.6, 0909.1.1, 1301.8.1, 1314.12, 1114.5.1, 1608.7, ... |
| Mẫn cảm             | 1,01       | 1,21       | 1,45     | 20LAC02B, 20LAC02M, LFH1, 20LAC01M, LDC19, L18, 1209.2, 1310.10, 1317.5, 1301.1, 1301.1A, 1005.18, 1301.1B, 1315.8, 1326.2, 1326.6, ...      |

**3.2. Kết quả sàng lọc khả năng kháng bệnh HXVK của các dòng/giống lạc bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo**

Tập đoàn dòng/giống lạc được đánh giá bằng phương pháp lây bệnh nhân tạo vào vụ xuân năm 2022 với nguồn vi khuẩn NA1. Trong số 150 dòng/giống thí nghiệm, có 6/150 dòng/giống thể

### 2.2.3. Phân tích số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê trên phần mềm Excel và phần mềm R 4.4.1. Đồ thị tương quan tuyến tính được vẽ bằng gói R/ggplot2.

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả sàng lọc khả năng chịu hạn của các dòng/giống lạc

Đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng/giống lạc dựa vào chỉ số nhạy cảm với hạn (DSI) tính trên năng suất trong điều kiện có tưới và không tưới nước đã được sử dụng trong nhiều báo cáo để xác định nguồn vật liệu có năng suất ổn định trong điều kiện khô hạn [15].

Kết quả đánh giá khả năng chịu hạn cho thấy, trong tổng số 150 dòng/giống lạc được đánh giá, có 14/150 dòng/giống (9,33%) có tính chịu hạn tốt ( $DSI = 0,407 \pm 0,0756$ ), 52/150 dòng/giống (34,67%) có tính chịu hạn trung bình ( $DSI = 0,877 \pm 0,107$ ) và 84/150 dòng/giống (56,00%) mẫn cảm với điều kiện hạn hán ( $DSI = 1,210 \pm 0,130$ ). Một số dòng/giống chịu hạn tốt nhất bao gồm: LCH-02, BW62 và L35 với chỉ số DSI lần lượt bằng 0,20, 0,35, 0,36. Ngược lại, một số dòng/giống được đánh giá là rất mẫn cảm với điều kiện hạn hán gồm: 1734.1, L05 và Lạc 3 Tháng với cùng chỉ số DSI bằng 1,45.

hiện khả năng kháng cao với bệnh HXVK (L28, 1005.18, 1314.12, 1608.7, 1602.3...) chiếm 4,00%; có 32/150 dòng/giống kháng (Trạm Dầu 207, LFH1, L18, LCM-02, L27...) chiếm 21,33%; có 33/150 dòng/giống kháng trung bình (L23, L17, 1005.1.4, 0909.1.1, 1315.8...) chiếm 22,00%; 42/150 dòng/giống nhiễm trung bình (20LAC02B,

20LAC01M, L31 1005.14.1, 1310.6.1...) chiếm 28,00%; có 27/150 dòng/giống nhiễm (20LAC01B, LSH15, 1005.4, 1301.8.1, 1009.4...) chiếm 18,00% và có 10/150 dòng/giống nhiễm nặng (20LAC02M, LDC19, ICGV1005, ICGV12897, ICGV3704...) chiếm

6,67%. Giống chuẩn kháng Gié Nho Quan thể hiện phản ứng kháng với tỷ lệ bệnh 17,41%. Giống chuẩn nhiễm ICGV3704 thể hiện phản ứng nhiễm nặng với tỷ lệ bệnh 96,67%.

**Bảng 2. Khả năng chống chịu bệnh HXVK của các dòng/giống lạc bằng lây bệnh nhân tạo**

| Mức độ kháng     | Số dòng/giống | Tỷ lệ bệnh trung bình | Dòng/giống đại diện                               |
|------------------|---------------|-----------------------|---------------------------------------------------|
| Kháng cao        | 6             | 5,25 ± 1,84           | L28, 1005.18, 1314.12, 1608.7, 1602.3...          |
| Kháng            | 32            | 14,70 ± 2,52          | Trạm Dầu 207, LFH1, L18, LCM-02, L27...           |
| Kháng trung bình | 33            | 22,90 ± 2,47          | L23, L17, 1005.1.4, 0909.1.1, 1315.8...           |
| Nhiễm trung bình | 42            | 33,30 ± 3,48          | 20LAC02B, 20LAC01M, L31 1005.14.1, 1310.6.1...    |
| Nhiễm            | 27            | 68,70 ± 14,30         | 20LAC01B, LSH15, 1005.4, 1301.8.1, 1009.4...      |
| Nhiễm nặng       | 10            | 95,50 ± 2,68          | 20LAC02M, LDC19, ICGV1005, ICGV12897, ICGV3704... |

### 3.3. Sàng lọc nguồn vật liệu triển vọng

Dựa trên kết quả đánh giá khả năng chịu hạn và khả năng kháng bệnh HXVK, trong tổng số 150 dòng/giống lạc được đánh giá, có 37 dòng/giống có khả năng chịu hạn từ mức độ chịu hạn tốt đến mức

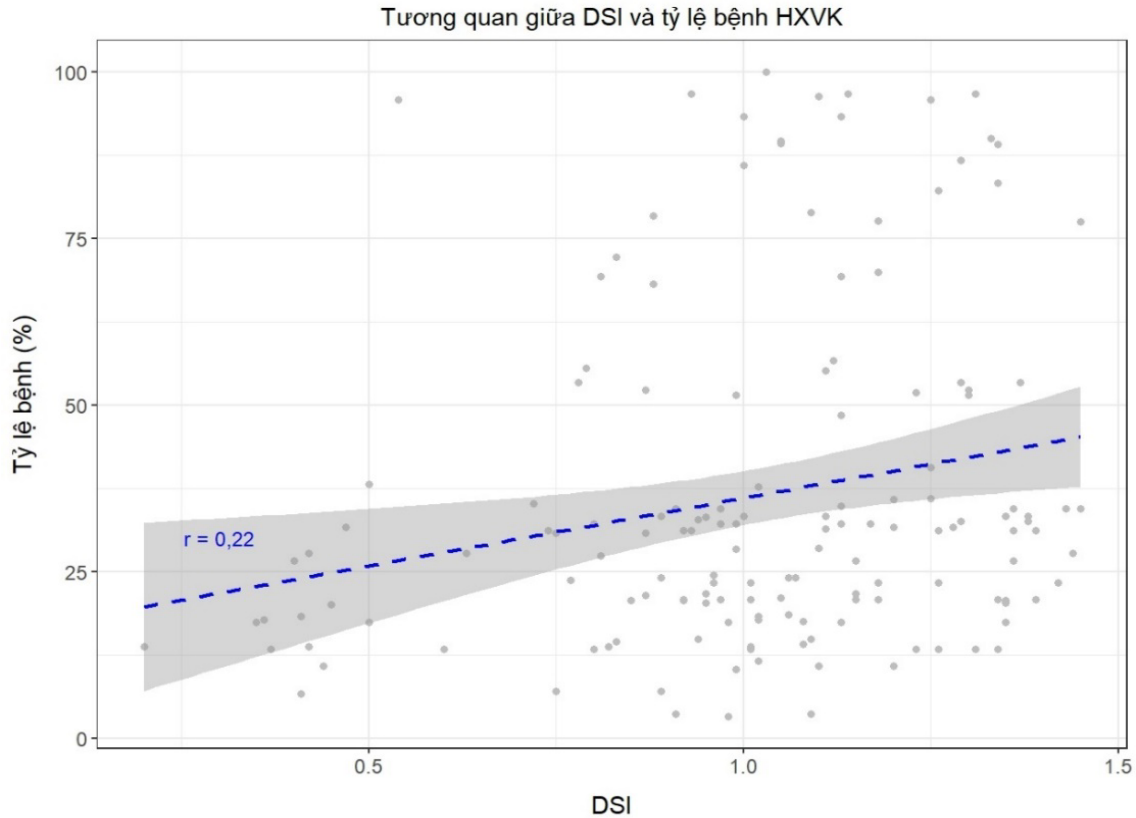
trung bình (DSI < 1) và có khả năng kháng cao (HR) đến kháng trung bình (MR) đối với bệnh HXVK. Các dòng/giống điển hình như: L28, Trạm Dầu 207, L27, L29, L33, L34, L35.... Đây là nguồn vật liệu có giá trị trong công tác lai tạo giống chống chịu tiếp theo.

**Bảng 3. Các dòng/giống lạc chịu hạn và kháng bệnh HXVK được lựa chọn thông qua đánh giá kiểu hình trong điều kiện nhân tạo**

| TT | Tên dòng/giống | Chỉ tiêu DSI | Cấp độ chịu hạn | Tỷ lệ bệnh (%) | Mức độ kháng HXVK |
|----|----------------|--------------|-----------------|----------------|-------------------|
| 1  | L28            | 0,41         | Tốt             | 6,67           | HR                |
| 2  | Trạm Dầu 207   | 0,41         | Tốt             | 18,33          | R                 |
| 3  | LCM-02         | 0,83         | Trung bình      | 14,54          | R                 |
| 4  | L23            | 0,42         | Tốt             | 27,78          | MR                |
| 5  | L27            | 0,60         | Trung bình      | 13,33          | R                 |
| 6  | L17            | 0,40         | Tốt             | 26,67          | MR                |
| 7  | L29            | 0,50         | Tốt             | 17,41          | R                 |
| 8  | L35            | 0,36         | Tốt             | 17,78          | R                 |
| 9  | 1005.1.4       | 0,89         | Trung bình      | 24,07          | MR                |
| 10 | 1315.5         | 0,94         | Trung bình      | 14,91          | R                 |

| TT | Tên dòng/giống | Chỉ tiêu DSI | Cấp độ chịu hạn | Tỷ lệ bệnh (%) | Mức độ kháng HXVK |
|----|----------------|--------------|-----------------|----------------|-------------------|
| 11 | 1310.6         | 0,98         | Trung bình      | 17,41          | R                 |
| 12 | 0909.1.1       | 0,96         | Trung bình      | 24,44          | MR                |
| 13 | 1314.12        | 0,98         | Trung bình      | 3,33           | HR                |
| 14 | L34            | 0,44         | Tốt             | 10,83          | R                 |
| 15 | 1114.5.1       | 0,99         | Trung bình      | 10,37          | R                 |
| 16 | 1608.7         | 0,89         | Trung bình      | 7,04           | HR                |
| 17 | 1602.8         | 0,92         | Trung bình      | 20,74          | MR                |
| 18 | 1602.3         | 0,91         | Trung bình      | 3,70           | HR                |
| 19 | 1607.1         | 0,80         | Trung bình      | 13,33          | R                 |
| 20 | 1607.5         | 0,95         | Trung bình      | 20,37          | MR                |
| 21 | 1404.1         | 0,95         | Trung bình      | 21,67          | MR                |
| 22 | 0808.2.1       | 0,75         | Trung bình      | 7,04           | HR                |
| 23 | 1724.8         | 0,92         | Trung bình      | 20,83          | MR                |
| 24 | L18/NT         | 0,87         | Trung bình      | 21,48          | MR                |
| 25 | LCH-01         | 0,47         | Tốt             | 27,41          | MR                |
| 26 | L32            | 0,50         | Tốt             | 23,33          | MR                |
| 27 | Việt Dầu 13    | 0,77         | Trung bình      | 23,70          | MR                |
| 28 | ICGV06424      | 0,54         | Trung bình      | 28,33          | MR                |
| 29 | MT15           | 0,85         | Trung bình      | 20,74          | MR                |
| 30 | Hưng Lộc       | 0,97         | Trung bình      | 20,83          | MR                |
| 31 | TK10           | 0,82         | Trung bình      | 13,70          | R                 |
| 32 | BW62           | 0,35         | Tốt             | 17,41          | R                 |
| 33 | Việt Dầu 45    | 0,63         | Trung bình      | 27,78          | MR                |
| 34 | CP1            | 0,37         | Tốt             | 13,33          | R                 |
| 35 | L33            | 0,42         | Tốt             | 13,70          | R                 |
| 36 | L14            | 0,45         | Tốt             | 20,74          | MR                |
| 37 | LCH-02         | 0,20         | Tốt             | 13,70          | R                 |

### 3.4. Mối tương quan tuyến tính giữa khả năng chịu hạn và khả năng kháng bệnh HXVK



**Hình 1. Mối tương quan giữa khả năng chịu hạn và khả năng kháng bệnh HXVK**

Từ kết quả đánh giá chỉ số nhạy cảm với hạn DSI và tỷ lệ bị bệnh HXVK của 150 dòng/giống lạc đã cho thấy, khả năng chịu hạn và khả năng kháng bệnh HXVK có tương quan tuyến tính với nhau về mặt thống kê ( $p$ -value = 0,0065) nhưng là tương quan yếu ( $r = 0,22$ ). Hệ số tương quan nói trên thể hiện mối tương quan thuận, chỉ số DSI càng cao (tính chịu hạn càng kém) thì tỷ lệ bệnh càng cao (tính kháng bệnh HXVK càng kém).

Trong điều kiện đồng ruộng, cây trồng chịu tác động của nhiều yếu tố căng thẳng phi sinh học và sinh học khác nhau cùng lúc hoặc tuần tự. Sự tương tác giữa các căng thẳng này và tác động của chúng lên cây trồng như một phần của "tam giác bệnh". Sự tương tác giữa hai điều kiện căng thẳng có thể ảnh hưởng tiêu cực hoặc tích cực đến sự phát triển của cây trồng [16]. Hiện chưa có kết quả nghiên cứu nào thể hiện rõ mối tương quan giữa khả năng chịu hạn và khả năng kháng bệnh HXVK. Tuy nhiên, các dòng/giống lạc chịu hạn với hệ thống rễ khỏe mạnh, giúp cây hấp thụ nước tốt

hơn trong điều kiện hạn cũng có thể giúp chống chịu tốt hơn sự xâm nhập của vi khuẩn héo xanh.

## 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1. Kết luận

Kết quả sàng lọc kiểu hình thông qua đánh giá nhân tạo khả năng chịu hạn và khả năng kháng bệnh HXVK của tập đoàn 150 dòng/giống lạc đã xác định được 37 dòng/giống lạc vừa có khả năng chịu hạn ở mức chống chịu cao đến mức chống chịu trung bình, vừa có khả năng kháng cao đến kháng trung bình bệnh HXVK, điển hình là các dòng/giống: L28, Trạm Dầu 207, L27, L33, L34, L35...

Kết quả đánh giá mối tương quan giữa khả năng chịu hạn và khả năng kháng bệnh HXVK của các dòng/giống lạc với hệ số tương quan 0,22 đã phản ánh mối tương quan thuận, yếu giữa khả năng chịu hạn và khả năng kháng bệnh.

### 4.2. Đề nghị

Tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về đặc tính sinh lý của khả năng chịu hạn và sàng lọc nguồn vật liệu lạc chịu hạn, kháng bệnh HXVK ở mức độ phân tử.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Tổng cục Thống kê (2022). Số liệu nông, lâm nghiệp và thủy sản.
2. Phạm Vũ Bảo, Trương Thị Thuận, Hoàng Minh Tâm, Hồ Huy Cường (2016). Tiềm năng và hạn chế trong sản xuất lạc trên đất mặn duyên hải miền Trung. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 9, 87 - 94.
3. Reddy, T., V. Reddy and V. Anbumozhi (2003). Physiological responses of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) to drought stress and its amelioration: A critical review. *Plant growth regulation*, 41, 75 - 88.
4. Cruickshank, A., N. Rachaputi and G. Wright (2003). Breeding of drought resistant peanuts. *ACIAR Proceedings*, 112.
5. Behura, D., S. Haldar, N. Teufel, D. K. Charyulu, M. T. Variath and J. Pasupuleti (2020). Status of adoption of improved groundnut technologies in Odisha State. *ICRISAT*, 1 - 12.
6. Phạm Thị Mai, Đồng Thị Kim Cúc, Nguyễn Văn Quang, Phan Thanh Phương, Lê Thanh Nhuận, Nguyễn Xuân Thu, Phạm Văn Cường (2017). Kết quả đánh giá khả năng chịu hạn trong điều kiện nhân tạo của một số dòng/giống lạc làm vật liệu phục vụ công tác chọn tạo giống. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 23, 21 - 25.
7. Mehan, V., B. Liao, Y. Tan, A. Robinson-Smith, D. McDonald and A. Hayward (1994). Bacterial wilt of groundnut. *ICRISAT information bulletin* No.35, ICRISAT, Hyderabad, India, 23.
8. Nguyen, X. H., V. K. Mehan, N. T. Ly and M. T. Vinh (1994). Status of groundnut bacterial wilt research in Vietnam. Groundnut bacterial wilt in Asia: Proceedings of the Third Working Group Meeting, 135 - 141.
9. V. K. Mehan and D. McDonald (1994). Groundnut bacterial wilt in Asia. Proceedings of the third working group meeting, Oil Crops Research Institute, Wuhan, China, ICRISAT, 160.
10. Coker C., Hamidou F., Waliyar F. and U. H. D. (2010). Screening groundnut genotypes for resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 12, 545 - 550.
11. Luo H., Ren X., Zhang X., Li C., Chen W., Li X. and J. H. (2019). QTL mapping and candidate gene analysis for bacterial wilt resistance in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Plant Biology*, 19, 1 - 15.
12. Lê Thị Phương Lan, Nguyễn Xuân Thu, Lê Tuấn Tú, Nguyễn Thị Tho và Tạ Hồng Linh (2018). Kết quả đánh giá khả năng chống chịu với bệnh héo xanh vi khuẩn (*Ralstonia solanacearum* Smith) của tập đoàn dòng/giống lạc. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 5, 80 - 92.
13. Songsri, P., S. Jogloy, T. Kasmala, N. Vorasoot, C. Akkasaeng, A. Patanothai and C. Holbrook (2008). Heritability of drought resistance traits and correlation of drought resistance and agronomic traits in peanut. *Crop science*, 48(6), 2245 - 2253.
14. Fischer, R. and R. Maurer (1978). Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29(5): 897 - 912.
15. Solomon, K. and M. Labuschagne (2003). Expression of drought tolerance in F1 hybrids of a diallel cross of durum wheat (*Triticum turgidum* var. *durum* L.). *Cereal Research Communications*, 31(1): 49 - 56.
16. Pandey, P., V. Irulappan, M. V. Bagavathiannan and M. Senthil-Kumar (2017). Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological Traits. *Frontiers in Plant Science*, 8, 537.



SCREENING GROUNDNUT (*Arachis hypogaea* L.) GERMPLASM FOR DROUGHT  
TOLERANT AND BACTERIAL WILT (*Ralstonia solanacearum* Smith) RESISTANCE  
IN CENTRAL VIETNAM PROVINCES

Le Thi Phuong Lan<sup>1</sup>, Nguyen Xuan Doan<sup>2</sup>, Nguyen Huy Chung<sup>1</sup>,

Nguyen Xuan Thu<sup>2</sup>, Nguyen Thi Tho<sup>1</sup>, Le Tuan Tú<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Plant Protection Research Institute,

<sup>2</sup> Legumes Research and Development Center, Field Crops Research Institute

**Abstract**

The Central region is the most important groundnut growing area in Vietnam. However, drought conditions and the prevalence of the bacterial pathogen responsible for bacterial wilt disease have substantially reduced groundnut productivity and yield. Developing varieties that are tolerant to these adverse conditions is an essential strategy to safeguard groundnut production in this region. Among 150 groundnut germplasm accessions evaluated, 37 accessions were identified as both drought tolerance and bacterial wilt resistance, including L28, Tram Dau 207, L27, L29, L33, L34 and L35... These accessions represent valuable initial materials for breeding groundnut varieties with enhanced tolerance to drought and resistance to bacterial wilt.

**Keywords:** *Arachis hypogaea*, bacterial wilt, drought tolerance, groundnut, *Ralstonia solanacearum* Smith, resistance, screening.

**Ngày nhận bài:** 10/4/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 23/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 30/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 23/6/2025

# ẢNH HƯỞNG CỦA LƯỢNG PHÂN BÓN VÀ MẬT ĐỘ TRỒNG ĐẾN NĂNG SUẤT VÀ HIỆU QUẢ KINH TẾ CỦA GIỐNG Sắn KHÁNG BỆNH KHẢM LÁ HN1 TRÊN ĐẤT NÂU ĐỎ BAZAN TẠI TỈNH ĐẮK LẮK

Nguyễn Văn Minh<sup>1</sup>\*, Hoàng Mai Đức<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Nông Lâm nghiệp, Trường Đại học Tây Nguyên

<sup>2</sup>Công ty TNHH Phân bón Con Cò Vàng

\*Email: nvminh@ttn.edu.vn

## TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này là xác định lượng phân bón và mật độ trồng thích hợp cho giống sắn kháng bệnh khảm lá HN1 trên đất nâu đỏ bazan tại xã EaTu, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk năm 2024 - 2025. Kết quả nghiên cứu đã xác định được công thức M4P5 với mật độ trồng 10.000 hom/ha (khoảng cách 1,0 x 1,0 m) và lượng phân bón là 500 kg NPK 16 - 16 - 8 + 500 kg NPK 10 - 0 - 30 + 1,5 tấn phân hữu cơ vi sinh (Con Cò Vàng) cho khối lượng củ/gốc tốt nhất đạt 4,87 kg/gốc; năng suất củ tươi cao nhất đạt 48,67 tấn/ha/vụ, hàm lượng tinh bột tốt nhất là 31,68% và năng suất tinh bột đạt cao nhất là 15,39 tấn/ha/vụ, có ý nghĩa thống kê mức 95%. Đây cũng là công thức cho lãi thuần cao nhất, đạt 79,00 triệu đồng/ha/vụ, cao hơn công thức M1P1 là 50,77 triệu đồng/ha.

**Từ khóa:** Đất nâu đỏ bazan, giống sắn kháng khảm lá HN1, mật độ trồng, lượng phân bón, tỉnh Đắk Lắk.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây sắn là cây lương thực quan trọng ở Việt Nam, có sản lượng đứng thứ ba sau lúa và ngô, được trồng tại 43 tỉnh, thành phố trên cả 3 miền Bắc, Trung, Nam. Năm 2024, Việt Nam có diện tích trồng sắn đạt 504 nghìn ha (giảm hơn so với năm 2015 là 567 nghìn ha, năm 2022 là 530 nghìn ha [1], năng suất bình quân 20,58 tấn/ha và sản lượng đạt 10,38 triệu tấn [2], [3]. Năm 2024, cả nước có hơn 120 nhà máy, công ty, doanh nghiệp sản xuất tinh bột sắn quy mô công nghiệp, với công suất thiết kế 11,3 triệu tấn củ tươi/năm và 4 nhà máy chế biến cồn sinh học, với công suất 200.000 m<sup>3</sup>/nhà máy, nhu cầu sắn lát khô là 500.000 tấn/năm đặt tại 27 tỉnh, thành trên cả nước [4, 5]. Hiện nay, Việt Nam là nước có kim ngạch xuất khẩu sắn và các sản phẩm từ sắn đứng thứ hai trên thế giới sau Thái Lan, giá trị xuất khẩu sắn từ năm 2013 đến nay luôn đạt trên 1 tỉ USD, cao nhất là năm 2023 đạt 1,35 tỉ USD, đứng thứ tư sau lúa, cà phê và điều [4 - 6].

Sắn là loại cây dễ trồng, ít chăm sóc, chi phí thấp, dễ thu hoạch và chế biến, phù hợp với nhiều vùng sinh thái, nhiều loại đất khác nhau, kể cả

những vùng đất nghèo dinh dưỡng. Trong khi đó, giá củ tươi luôn ổn định, do đó cây sắn đã mang lại nguồn thu nhập chính của nhiều hộ nông dân nghèo, đồng bào dân tộc thiểu số trên địa bàn tỉnh Đắk Lắk trong nhiều năm qua. Hiện nay, tỉnh Đắk Lắk có diện tích trồng sắn đứng thứ 3 cả nước (sau tỉnh Gia Lai và Tây Ninh), đạt hơn 45.300 ha, năng suất đạt 25,1 tấn củ tươi/ha (đứng thứ 2 cả nước sau tỉnh Tây Ninh đạt 29,9 tấn/ha) và sản lượng đạt hơn 1 triệu tấn [7, 8, 2]. Với 8 nhà máy chế biến tinh bột sắn đang hoạt động, tỉnh Đắk Lắk đứng thứ hai cả nước (sau tỉnh Tây Ninh) về số lượng nhà máy và sản lượng chế biến, với tổng công suất trên 250.000 tấn tinh bột/năm, tương đương 900.000 tấn củ tươi [9]. Hiện nay, sản lượng củ sắn tươi không đáp ứng được nhu cầu thu mua, chế biến do năng suất sắn còn thấp, đặc biệt là cây sắn hiện đang bị bệnh khảm lá không chỉ ở tỉnh Đắk Lắk mà ở cả Việt Nam.

Bệnh khảm lá sắn (*Cassava Mosaic disease*) do một loại virus có tên là *Srilanka cassava mosaic virus* (SLCMV) gây ra [10], xuất hiện lần đầu tiên ở Việt Nam vào năm 2017 tại tỉnh Tây Ninh, sau đó lan ra nhiều khu vực trên khắp cả nước trong đó có tỉnh Đắk Lắk [11]. Năm 2018, tại tỉnh Đắk Lắk, bệnh

khảm lá sần đã gây hại trên diện tích 1.500 ha [12]. Đây là một loại bệnh nguy hiểm trên cây sắn, rất khó hoặc không thể kiểm soát, nếu để bệnh biểu hiện và phát tán, sẽ làm giảm năng suất củ tươi hoặc thất thu [13]. Do vậy, việc nghiên cứu thử nghiệm, sử dụng giống sắn mới kháng khảm lá (HN1) để thay thế các giống sắn cũ hầu hết bị bệnh khảm lá và nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật như: Lượng phân bón, mật độ trồng... cho giống sắn mới kháng bệnh khảm lá là cần thiết. Vì vậy, đã tiến hành nghiên cứu để xác định lượng phân bón và mật độ trồng thích hợp nhất cho giống sắn HN1 đạt năng suất cao, hàm lượng tinh bột cao và hiệu quả kinh tế tốt nhất trồng trên đất nâu đỏ bazan tại tỉnh Đắk Lắk.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu và thời gian nghiên cứu

HN1 là giống sắn kháng bệnh khảm lá do Viện Di truyền nông nghiệp chọn lọc, đánh giá từ nguồn giống nhập nội từ Nigeria có tên TMEB419 và được Cục Trồng trọt, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn tiếp nhận hồ sơ tự công bố lưu hành giống cây trồng [14]. Thời gian sinh trưởng trung bình từ 9 - 10 tháng, màu thân xanh nhạt, không phân cành, nhạt mắt, màu lá xanh, cuống lá màu xanh. Năng suất củ tươi 40 - 45 tấn/ha, hàm lượng tinh bột cao, đạt từ 28 - 30%.

Phân bón được sử dụng trong thí nghiệm: Các loại phân đơn: Phân urê có hàm lượng đạm nguyên chất là 46%; phân lân Văn Điển có hàm lượng  $P_2O_5$  là 16%; phân kali clorua có hàm lượng  $K_2O$  là 60%; phân NPK Con Cò Vàng có hàm lượng ghi trên bao bì theo quy định của nhà sản xuất đã công bố và được kiểm định; phân hữu cơ vi sinh Con Cò Vàng, thành phần chất hữu cơ: 20%, ẩm độ: 25%, S: 1%, tỉ lệ C/N: 4,5, trung vi lượng gồm: Ca, Mg, Mo, Zn, Bo... và vi sinh vật hữu ích:  $1 \times 10^6$  CFU/g (*Trichoderma* spp., *Streptomyces*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* sp, *Bacillus megaterium*).

Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 4 năm 2024 đến tháng 3 năm 2025, trên đất nâu đỏ bazan tại xã EaTu, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk.

### 2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ô chính - ô phụ (Split - Splot) gồm 20 công thức, 3 lần lặp lại tổng cộng 60 ô cơ sở. Diện tích ô là cơ sở 40 m<sup>2</sup> (4 x 10 m). Số liệu được đo, cân... theo dõi các chỉ tiêu của 10 cây/ô ở 2 hàng giữa, sau đó lấy giá trị trung bình giữa các lần đo, cân. Mỗi ô thí nghiệm trồng 4 hàng. Khoảng cách giữa các lần nhắc lại 1 m. Xung quanh có hàng bảo vệ.

### Sơ đồ thí nghiệm

| Nhắc I |    |    |    | Nhắc II |    |    |    | Nhắc III |    |    |    |
|--------|----|----|----|---------|----|----|----|----------|----|----|----|
| M4     | M3 | M2 | M1 | M4      | M3 | M2 | M1 | M4       | M3 | M2 | M1 |
| P5     | P3 | P4 | P2 | P4      | P1 | P2 | P5 | P2       | P1 | P5 | P4 |
| P2     | P1 | P5 | P4 | P1      | P3 | P4 | P2 | P4       | P3 | P2 | P5 |
| P4     | P2 | P3 | P1 | P2      | P5 | P1 | P4 | P1       | P5 | P4 | P3 |
| P1     | P5 | P2 | P3 | P5      | P2 | P3 | P1 | P3       | P4 | P1 | P2 |
| P3     | P4 | P1 | P5 | P3      | P4 | P5 | P3 | P5       | P2 | P3 | P1 |

Ghi chú: M: Mật độ; P: Phân bón. Mật độ 1 (M1): 0,8 x 0,8 m, 15.625 hom/ha; mật độ 2 (M2): 1,0 x 0,7 m, 14.286 hom/ha; mật độ 3 (M3): 1,0 x 0,8 m, 12.500 hom/ha; mật độ 4 (M4): 1,0 x 1,0 m, 10.000 hom/ha. Phân bón: Bón lót 1,5 tấn phân hữu cơ vi sinh Con Cò Vàng. P1: 90 kg N + 60 kg  $P_2O_5$  + 90 kg  $K_2O$  (bón theo quy trình của Bộ Nông nghiệp và PTNT), tương đương 200 kg đạm urê + 375 kg phân lân + 150 kg kali; P2: 90 kg N + 60 kg  $P_2O_5$  + 120 kg  $K_2O$  (tương đương 200 kg đạm urê + 375 kg phân lân + 200 kg kali); P3: 90 kg N + 60 kg  $P_2O_5$  + 150 kg  $K_2O$  (tương đương 200 kg đạm urê + 375 kg phân lân + 250 kg kali); P4: 120 kg N + 60 kg  $P_2O_5$  + 90 kg  $K_2O$  (tương đương 266 kg đạm urê + 375 kg phân lân + 150 kg kali); P5: 500 kg NPK 16 - 16 - 8 + 500 kg NPK 10 - 0 - 30 (tương đương 288 kg đạm urê + 500 kg phân lân + 316 kg kali).

### 2.3. Phương pháp xử lý số liệu và quy chuẩn áp dụng

- Xử lý số liệu: Các số liệu đo đếm được lấy trung bình sau đó tổng hợp bằng phần mềm Excel và phần mềm xử lý thống kê chuyên dụng Minitab 16.

- Quy trình kỹ thuật áp dụng và các chỉ tiêu theo dõi: Thực hiện theo QCVN 01-61:2011/BNNT [15] và Quy trình kỹ thuật canh tác giống sắn HN1 của Viện Di truyền nông nghiệp (2021) [16]. Mọi yêu cầu thí nghiệm được áp dụng đồng đều và thống nhất toàn thí nghiệm, ngoại trừ yếu tố lượng phân bón và mật độ trồng.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Ảnh hưởng của lượng phân bón và mật độ trồng đến một số chỉ tiêu hóa tính đất tại địa điểm thí nghiệm

Tiến hành lấy mẫu đất và phân tích một số chỉ tiêu hóa tính đất trồng sắn trước và sau thí nghiệm tại Bộ môn Khoa học Đất và Cây trồng, Khoa Nông Lâm nghiệp, Trường Đại học Tây Nguyên. Số liệu được ghi nhận tại bảng 1 cho thấy, đối với hàm lượng đạm, ở các công thức trồng giống sắn kháng bệnh khảm lá HN1, với lượng phân vô cơ khác nhau trên nền 1,5 tấn phân hữu cơ vi sinh Con Cò Vàng, kết quả hàm lượng đạm trong đất dao động từ 0,15% - P1 đến 0,19% -

P5, có 2 công thức bón phân P4 và P5 cho kết quả cao hơn, còn lại các công thức khác cho hàm lượng đạm bằng hoặc thấp hơn so với trước thí nghiệm. Hàm lượng lân dễ tiêu trong đất của các công thức bón phân cho giống sắn HN1 trên đất nâu đỏ bazan dao động từ 9,75 - 12,23 mg/100 g đất, tất cả các công thức bón phân đều có hàm lượng lân dễ tiêu thấp hơn so với trước thí nghiệm, ngoại trừ công thức P3 và P5. Hàm lượng kali dễ tiêu trong đất của các công thức thí nghiệm dao động từ 10,35 - 15,76 mg/100 g đất, tất cả các công thức bón phân đều có hàm lượng kali dễ tiêu thấp hơn so với trước thí nghiệm, ngoại trừ công thức P3 và P5 do có lượng phân kali bón vào đất cao hơn so với công thức đối chứng. Hàm lượng  $Ca^{2+}$  và  $Mg^{2+}$  của các công thức bón phân khác nhau cho giống sắn HN1 dao động từ 1,54 - 1,79 lđl/100 g đất (đối với canxi) và 1,99 - 2,17 lđl/100 g đất (đối với magie) và có hai công thức cho kết quả cao hơn so với trước thí nghiệm là P3 và P5. Kết quả phân tích hàm lượng một số chỉ tiêu hoá tính đất trong thí nghiệm này có sự sai khác nhưng chênh lệch không nhiều so với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Minh và cs (2020) [17], khi nghiên cứu về lượng phân bón và mật độ trồng cho các giống sắn HLS11 tại tỉnh Đắk Lắk.

**Bảng 1. Kết quả phân tích một số chỉ tiêu hoá tính đất trồng sắn trước và sau thí nghiệm**

| Công thức        | Chỉ tiêu theo dõi      |                                                   |                                                  |                                     |                                     |
|------------------|------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|                  | N <sub>ts</sub><br>(%) | P <sub>2</sub> O <sub>5dt</sub><br>(mg/100 g đất) | K <sub>2</sub> O <sub>dt</sub><br>(mg/100 g đất) | Ca <sup>2+</sup><br>(lđl/100 g đất) | Mg <sup>2+</sup><br>(lđl/100 g đất) |
| Trước thí nghiệm | 0,16                   | 11,77                                             | 12,15                                            | 1,65                                | 2,14                                |
| Sau thí nghiệm   |                        |                                                   |                                                  |                                     |                                     |
| P1               | 0,15                   | 9,75                                              | 10,35                                            | 1,54                                | 1,99                                |
| P2               | 0,16                   | 9,99                                              | 12,14                                            | 1,59                                | 2,02                                |
| P3               | 0,16                   | 11,78                                             | 12,85                                            | 1,71                                | 2,15                                |
| P4               | 0,18                   | 10,87                                             | 10,48                                            | 1,65                                | 2,14                                |
| P5               | 0,19                   | 12,23                                             | 15,76                                            | 1,79                                | 2,17                                |

Như vậy, sau một năm thí nghiệm về lượng phân bón vô cơ cho giống sắn kháng bệnh khảm lá HN1 trồng ở các mật độ khác nhau trên đất nâu đỏ bazan cho thấy, ở các công thức bón phân P3 và P5 không

làm giảm hàm lượng một số chỉ tiêu trong đất so với trước thí nghiệm, một số công thức có tăng nhưng không đáng kể; các công thức bón phân còn lại thấp hơn so với trước thí nghiệm nên cần chú ý bón phân cân đối với lượng phù hợp để đảm bảo hàm lượng

một số chỉ tiêu hoá tính trong đất giữ ổn định và tăng hơn so với trước thí nghiệm.

### 3.2. Ảnh hưởng của lượng phân bón và mật độ trồng đến một số yếu tố cấu thành năng suất giống sắn HN1 trồng trên đất nâu đỏ bazan

#### 3.2.1. Ảnh hưởng của lượng phân bón và mật độ trồng đến số củ trên gốc

Theo dõi về số củ trên gốc của giống sắn HN1 khi thay đổi lượng phân bón và mật độ khác nhau được ghi nhận tại bảng 2 cho thấy, số củ/gốc đạt từ 10,57 củ/gốc (15.625 hom/ha - M1) đến 12,01 củ/gốc (12.500 hom/ha - M3) và sự sai khác này có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,05$  giữa mật độ trồng M3 với M1; giữa các mật độ khác có sự sai khác nhưng không có ý nghĩa thống kê. Tương tự, khi thay đổi lượng phân từ P1 - P5 dẫn đến số củ/gốc đạt từ 9,85 củ/gốc (P1) đến 12,49 củ/gốc (P5) và sự sai khác

này có ý nghĩa thống kê ở mức 95% giữa các mức phân bón P5 và P1 với P2, giữa các công thức bón phân khác có sự sai khác nhưng không có ý nghĩa thống kê. Khi có sự tương tác giữa hai yếu tố mật độ trồng và lượng phân bón cho kết quả số củ/gốc trung bình từ 8,87 củ/gốc (M1P1) đến 13,48 củ/gốc (M2P5) và sự sai khác này chỉ có ý nghĩa thống kê giữa công thức M2P5 đối với công thức M1P1, M1P2 và M2P1; các công thức còn lại có sự sai khác nhưng không có ý nghĩa thống kê. Số củ trên gốc trong nghiên cứu này cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Minh và Nguyễn Thị Hoài (2020) [18], khi nghiên cứu về mật độ trồng cho giống sắn KM140, HLS10, HLS12 và HLS14 cùng các mật độ từ 10.000 - 15.625 hom/ha trên đất nâu đỏ bazan tại thành phố Buôn Ma Thuột nhưng lượng phân bón là khác nhau.

**Bảng 2. Ảnh hưởng của lượng phân bón và mật độ trồng đến số củ trên gốc giống sắn HN1**

| Phân bón<br>(P)   | Mật độ trồng (M)      |                       |                       |                       | Trung bình<br>(P)   |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
|                   | M1<br>(15.625 hom/ha) | M2<br>(14.286 hom/ha) | M3<br>(12.500 hom/ha) | M4<br>(10.000 hom/ha) |                     |
| P1                | 8,87 <sup>d</sup>     | 9,74 <sup>bcd</sup>   | 10,44 <sup>a-d</sup>  | 10,35 <sup>a-d</sup>  | 9,85 <sup>C</sup>   |
| P2                | 9,22 <sup>cd</sup>    | 10,90 <sup>a-d</sup>  | 11,73 <sup>a-d</sup>  | 11,36 <sup>a-d</sup>  | 10,80 <sup>BC</sup> |
| P3                | 11,18 <sup>a-d</sup>  | 11,44 <sup>a-d</sup>  | 12,26 <sup>a-d</sup>  | 11,26 <sup>a-d</sup>  | 11,53 <sup>AB</sup> |
| P4                | 11,70 <sup>a-d</sup>  | 12,13 <sup>a-d</sup>  | 12,95 <sup>ab</sup>   | 11,64 <sup>a-d</sup>  | 12,10 <sup>AB</sup> |
| P5                | 11,88 <sup>a-d</sup>  | 13,48 <sup>a</sup>    | 12,69 <sup>abc</sup>  | 11,84 <sup>a-d</sup>  | 12,49 <sup>A</sup>  |
| Trung<br>bình (M) | 10,57 <sup>B</sup>    | 11,54 <sup>AB</sup>   | 12,01 <sup>A</sup>    | 11,29 <sup>AB</sup>   |                     |

CV%: 13,23.

Ghi chú: Giá trị đi kèm các chữ cái khác nhau trong từng hàng và cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,05$ .

#### 3.2.2. Ảnh hưởng của lượng phân bón và mật độ trồng đến đường kính củ

Khi thay đổi lượng phân từ P1 - P5 bón cho giống sắn HN1 cho kết quả đường kính củ dao động từ 19,84 mm (P1) đến 44,83 mm (P5), sự sai khác này có ý nghĩa thống kê ở mức 95% ở công thức bón phân khác nhau ngoại trừ công thức P3 và P4 có sự sai khác nhưng không có ý nghĩa thống kê. Khi thay đổi mật độ trồng cho kết quả đường kính củ thấp nhất ở công thức M1 là 29,24 mm và cao nhất ở công thức M4 là 37,48 mm và sự sai khác này có ý nghĩa thống kê mức 95% giữa các mật độ ngoại trừ mật độ M3 với

M4 và M2. Khi tương tác hai yếu tố lượng phân bón và mật độ cho thấy, đường kính củ thấp nhất ở công thức M1P1 (15,30 mm) và cao nhất ở công thức M4P5 (47,42 mm), sự sai khác này có ý nghĩa thống kê ở mức 95%, đặc biệt là các công thức P3 và P5 so với P1 và P2 ở hầu hết các mật độ trồng. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Minh (2020) [19] về đường kính củ của giống sắn HLS12 trên cùng loại đất nâu đỏ bazan, mật độ trồng cho kết quả cao hơn với đường kính củ giống sắn HN1 trong nghiên cứu này ở những công thức có bón lượng phân hữu cơ từ 2 tấn/ha trở lên.

**Bảng 3. Ảnh hưởng của lượng phân bón và mật độ trồng đến đường kính củ giống sắn HN1 (mm)**

| Phân bón (P)   | Mật độ trồng (M)      |                       |                       |                       | Trung bình (P)     |
|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
|                | M1<br>(15.625 hom/ha) | M2<br>(14.286 hom/ha) | M3<br>(12.500 hom/ha) | M4<br>(10.000 hom/ha) |                    |
| P1             | 15,30 <sup>g</sup>    | 17,85 <sup>fg</sup>   | 19,84 <sup>efg</sup>  | 26,38 <sup>c-g</sup>  | 19,84 <sup>D</sup> |
| P2             | 20,50 <sup>d-g</sup>  | 26,28 <sup>c-g</sup>  | 33,70 <sup>a-e</sup>  | 31,11 <sup>b-f</sup>  | 27,90 <sup>C</sup> |
| P3             | 34,17 <sup>a-d</sup>  | 37,75 <sup>abc</sup>  | 38,93 <sup>abc</sup>  | 44,40 <sup>ab</sup>   | 38,81 <sup>B</sup> |
| P4             | 35,18 <sup>abc</sup>  | 35,10 <sup>abc</sup>  | 35,01 <sup>abc</sup>  | 38,09 <sup>abc</sup>  | 35,84 <sup>B</sup> |
| P5             | 41,03 <sup>ab</sup>   | 45,22 <sup>a</sup>    | 45,36 <sup>a</sup>    | 47,42 <sup>a</sup>    | 44,83 <sup>A</sup> |
| Trung bình (M) | 29,24 <sup>C</sup>    | 32,50 <sup>BC</sup>   | 34,57 <sup>AB</sup>   | 37,48 <sup>A</sup>    |                    |

CV%: 30,47.

Ghi chú: Giá trị đi kèm các chữ cái khác nhau trong hàng và cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,05$ .

### 3.2.3. Ảnh hưởng của lượng phân bón và mật độ trồng đến khối lượng củ tươi/gốc

Khối lượng củ tươi/gốc là một trong những chỉ tiêu quan trọng cùng với số lượng cây trên đơn vị diện tích góp phần tăng năng suất củ tươi, khối lượng củ tươi/gốc lớn cùng số cây/ha nhiều sẽ cho năng suất củ tươi cao và ngược lại. Phân tích số liệu về khối lượng củ/gốc của giống sắn HN1 ở bảng 4 cho thấy, khi thay đổi lượng phân từ P1 - P5 dẫn đến khối lượng củ/gốc đạt từ 2,14 kg củ/gốc (P1) đến 3,55 kg củ/gốc (P5) và sự sai khác này có ý nghĩa thống kê ở mức 95% giữa các mức phân bón khác nhau, đặc biệt là mức phân bón P5 và P3 so với P1. Trồng sắn kháng bệnh khảm lá HN1 ở các mật độ khác nhau dẫn đến khối lượng củ/gốc cũng khác nhau dao động từ thấp nhất đạt 2,10 kg củ/gốc (M1) đến 4,11 kg củ/gốc (M4) và sự sai khác này có ý nghĩa thống kê mức 95% giữa mật độ trồng 10.000

hom/ha đối với tất cả các mật độ trồng còn lại. Kết hợp hai yếu tố lượng phân bón và mật độ trồng cho kết quả, khối lượng củ/gốc từ 1,62 kg củ/gốc (M1P1) đến 4,87 kg củ/gốc (M4P5) và sự sai khác này có ý nghĩa thống kê, đặc biệt là các công thức bón phân ở mức P3 và P5 khi trồng ở mật độ M4 so với các công thức bón phân còn lại ở các mật độ khác. Khối lượng củ trung bình trên gốc của giống sắn HLS12 đạt cao nhất khi trồng ở mật độ 10.000 hom/ha trên cùng đất nâu đỏ bazan trong nghiên cứu của Nguyễn Văn Minh và Nguyễn Thị Hoài (2020) [18] là 4,03 kg/gốc (thấp hơn 0,08 kg/gốc) so với giống HN1 trong nghiên cứu này ở cùng mật độ trồng là do lượng phân bón và giống là khác nhau. Như vậy, giống và lượng phân bón sẽ quyết định phần lớn năng suất củ tươi trên gốc khi trồng cùng mật độ.

**Bảng 4. Ảnh hưởng của lượng phân bón và mật độ trồng đến khối lượng củ tươi/gốc giống sắn HN1 (kg/gốc)**

| Phân bón (P)   | Mật độ trồng (M)      |                       |                       |                       | Trung bình (P)     |
|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
|                | M1<br>(15.625 hom/ha) | M2<br>(14.286 hom/ha) | M3<br>(12.500 hom/ha) | M4<br>(10.000 hom/ha) |                    |
| P1             | 1,62 <sup>f</sup>     | 1,83 <sup>f</sup>     | 2,23 <sup>def</sup>   | 2,87 <sup>c-f</sup>   | 2,14 <sup>C</sup>  |
| P2             | 2,02 <sup>ef</sup>    | 2,52 <sup>c-f</sup>   | 3,12 <sup>a-f</sup>   | 4,16 <sup>abc</sup>   | 2,96 <sup>AB</sup> |
| P3             | 2,26 <sup>def</sup>   | 2,94 <sup>b-f</sup>   | 3,20 <sup>a-f</sup>   | 4,70 <sup>ab</sup>    | 3,27 <sup>AB</sup> |
| P4             | 2,00 <sup>ef</sup>    | 2,22 <sup>def</sup>   | 3,07 <sup>b-f</sup>   | 3,94 <sup>a-d</sup>   | 2,81 <sup>B</sup>  |
| P5             | 2,57 <sup>c-f</sup>   | 3,13 <sup>a-f</sup>   | 3,61 <sup>a-e</sup>   | 4,87 <sup>a</sup>     | 3,55 <sup>A</sup>  |
| Trung bình (M) | 2,10 <sup>C</sup>     | 2,53 <sup>BC</sup>    | 3,05 <sup>B</sup>     | 4,11 <sup>A</sup>     |                    |

CV%: 34,84.

Ghi chú: Giá trị đi kèm các chữ cái khác nhau trong hàng và cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,05$ .



**3.3. Ảnh hưởng của lượng phân bón và mật độ trồng đến năng suất củ tươi và hàm lượng tinh bột giống sắn HN1 trồng trên đất nâu đỏ bazan**

*3.3.1. Ảnh hưởng của lượng phân bón và mật độ trồng đến năng suất củ tươi*

**Bảng 5. Ảnh hưởng của lượng phân bón và mật độ trồng đến năng suất củ tươi giống sắn HN1 (tấn/ha)**

| Phân bón<br>(P)   | Mật độ trồng (M)         |                          |                          |                          | Trung bình<br>(P)   |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|
|                   | M1<br>(15.625<br>hom/ha) | M2<br>(14.286<br>hom/ha) | M3<br>(12.500<br>hom/ha) | M4<br>(10.000<br>hom/ha) |                     |
| P1                | 25,31 <sup>b</sup>       | 26,10 <sup>b</sup>       | 27,92 <sup>ab</sup>      | 32,53 <sup>ab</sup>      | 27,96 <sup>C</sup>  |
| P2                | 31,56 <sup>ab</sup>      | 36,00 <sup>ab</sup>      | 39,04 <sup>ab</sup>      | 41,60 <sup>ab</sup>      | 37,05 <sup>AB</sup> |
| P3                | 35,36 <sup>ab</sup>      | 42,00 <sup>ab</sup>      | 39,96 <sup>ab</sup>      | 46,97 <sup>ab</sup>      | 41,07 <sup>AB</sup> |
| P4                | 31,30 <sup>ab</sup>      | 31,76 <sup>ab</sup>      | 38,33 <sup>ab</sup>      | 39,43 <sup>ab</sup>      | 35,21 <sup>BC</sup> |
| P5                | 40,21 <sup>ab</sup>      | 44,72 <sup>ab</sup>      | 45,17 <sup>ab</sup>      | 48,67 <sup>a</sup>       | 44,69 <sup>A</sup>  |
| Trung<br>bình (M) | 32,75 <sup>B</sup>       | 36,12 <sup>AB</sup>      | 38,08 <sup>AB</sup>      | 41,84 <sup>A</sup>       |                     |

CV%: 23,94.

*Ghi chú: Giá trị đi kèm các chữ cái khác nhau trong hàng và cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,05$ .*

Đối với cây sắn nói riêng và cây lấy củ nói chung, năng suất củ tươi là chỉ tiêu quan trọng mà người trồng sắn cũng như các nhà nghiên cứu chọn giống sắn đặc biệt quan tâm. Kết quả theo dõi về năng suất củ tươi của giống sắn HN1 khi thay đổi mật độ trồng từ 10.000 - 15.625 hom/ha trên đất nâu đỏ bazan tại xã EaTu, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk đạt từ 32,75 tấn/ha (M1) đến 41,84 tấn/ha (M4) và sự sai khác này có ý nghĩa thống kê 95% giữa các mật độ trồng, đặc biệt M4 so với M1. Khi bón phân với lượng khác nhau cho năng suất củ tươi đạt từ 27,96 tấn/ha (P1) đến 44,69 tấn/ha (P5) và sự sai khác này có ý nghĩa thống kê ở mức 95% giữa mức phân bón P1 đối với tất cả các mức phân bón còn lại. Xét tương tác hai yếu tố mật độ trồng và lượng phân bón, kết quả năng suất củ tươi dao động từ 25,31 tấn/ha (M1P1) đến 48,67 tấn/ha (M4P5) và sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê giữa các công thức ngoại trừ công thức M4P5 với M1P1 và M2P1. Ở cùng công thức mật độ trồng, trên đất nâu đỏ bazan cho năng suất trung bình tốt nhất (10.000 hom/ha), so sánh với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Minh và Đỗ Thị Nga (2021) [20], khi nghiên cứu mật độ và lượng phân bón cho giống sắn HLS14 trên đất nâu đỏ bazan tại tỉnh Đắk Lắk, năng suất củ tươi đạt 32,30 tấn/ha so với năng suất củ tươi giống sắn HN1 đạt trung bình 41,84 tấn/ha, thấp hơn

9,54 tấn/ha. Kết quả này một phần do giống khác nhau và lượng phân bón vô cơ khác nhau, thậm chí lượng phân hữu cơ vi sinh trong thí nghiệm giống HLS14 đạt 3 tấn/ha, cao hơn 1,5 tấn so với thí nghiệm giống HN1 trong nghiên cứu này.

*3.3.2. Ảnh hưởng của lượng phân bón và mật độ trồng đến hàm lượng tinh bột*

Trong cùng một giống sắn, với điều kiện đất đai, khí hậu, chăm sóc và thời điểm thu hoạch giống nhau, hàm lượng tinh bột cao hay thấp còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác, đặc biệt lượng phân bón và mật độ trồng. Hàm lượng tinh bột của giống sắn kháng bệnh khảm lá HN1 trồng trên đất nâu đỏ bazan tại xã EaTu, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk đạt thấp nhất ở công thức bón phân P1, đạt 26,04% và cao nhất công thức P5 là 30,83% và có sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa công thức bón phân P5 so với các công thức còn lại ngoại trừ công thức P3. Khi thay đổi mật độ trồng cho hàm lượng tinh bột là khác nhau, tuy nhiên sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê. Khi kết hợp hai yếu tố lượng phân bón và mật độ trồng cho kết quả hàm lượng tinh bột có sự thay đổi từ 25,28% (M1P1) đến 31,68% (M4P5), có sự sai khác giữa các công thức nhưng không có ý nghĩa thống kê ngoại trừ công thức bón phân M4P5 với 4 công thức bón phân

M1P1, M1P2, M1P3, M1P2. So sánh hàm lượng tinh bột trung bình của giống sắn HN1 trồng trên đất nâu đỏ bazan ở các mật độ và lượng phân bón khác nhau đạt 28,90%, thấp hơn không đáng kể với hàm lượng tinh bột của các giống HLS11 trong kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Minh và cs (2020) [17], giống

HLS12, HLS14 của Nguyễn Văn Minh và Nguyễn Thị Hoài (2020) [18] đạt trung bình 29,15%, điều này chứng tỏ HN1 là giống sắn có hàm lượng tinh bột khá cao, tương đương với nhiều giống có hàm lượng tinh bột cao đã được khẳng định trong nhiều năm qua.

**Bảng 6. Ảnh hưởng của lượng phân bón và mật độ trồng đến hàm lượng tinh bột của giống sắn HN1 (%)**

| Phân bón<br>(P)   | Mật độ trồng (M)      |                       |                       |                       | Trung bình<br>(P)   |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
|                   | M1<br>(15.625 hom/ha) | M2<br>(14.286 hom/ha) | M3<br>(12.500 hom/ha) | M4<br>(10.000 hom/ha) |                     |
| P1                | 25,28 <sup>d</sup>    | 25,87 <sup>cd</sup>   | 25,87 <sup>d</sup>    | 27,15 <sup>a-d</sup>  | 26,04 <sup>C</sup>  |
| P2                | 26,21 <sup>bcd</sup>  | 28,02 <sup>a-d</sup>  | 29,69 <sup>a-d</sup>  | 28,56 <sup>a-d</sup>  | 28,12 <sup>B</sup>  |
| P3                | 29,12 <sup>a-d</sup>  | 28,64 <sup>a-d</sup>  | 29,91 <sup>abc</sup>  | 29,70 <sup>a-d</sup>  | 29,34 <sup>AB</sup> |
| P4                | 27,12 <sup>a-d</sup>  | 28,37 <sup>a-d</sup>  | 28,46 <sup>a-d</sup>  | 27,65 <sup>a-d</sup>  | 27,90 <sup>B</sup>  |
| P5                | 30,80 <sup>ab</sup>   | 29,53 <sup>a-d</sup>  | 31,32 <sup>a</sup>    | 31,68 <sup>a</sup>    | 30,83 <sup>A</sup>  |
| Trung bình<br>(M) | 27,71 <sup>A</sup>    | 28,09 <sup>A</sup>    | 29,05 <sup>A</sup>    | 28,95 <sup>A</sup>    |                     |

CV%: 7,66.

Ghi chú: Giá trị đi kèm các chữ cái khác nhau trong hàng và cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,05$ ; NS: Sai khác không có ý nghĩa thống kê.

3.3.3. Ảnh hưởng của lượng phân bón và mật độ trồng đến năng suất tinh bột

**Bảng 7. Ảnh hưởng của lượng phân bón và mật độ trồng đến năng suất tinh bột giống sắn HN1 (tấn/ha)**

| Phân bón<br>(P)   | Mật độ trồng (M)      |                       |                       |                       | Trung bình<br>(P)   |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
|                   | M1<br>(15.625 hom/ha) | M2<br>(14.286 hom/ha) | M3<br>(12.500 hom/ha) | M4<br>(10.000 hom/ha) |                     |
| P1                | 6,40 <sup>d</sup>     | 7,86 <sup>bcd</sup>   | 7,25 <sup>cd</sup>    | 8,9 <sup>a-d</sup>    | 7,62 <sup>C</sup>   |
| P2                | 8,27 <sup>bcd</sup>   | 10,91 <sup>a-d</sup>  | 11,60 <sup>a-d</sup>  | 11,89 <sup>a-d</sup>  | 10,66 <sup>B</sup>  |
| P3                | 10,31 <sup>a-d</sup>  | 12,67 <sup>a-d</sup>  | 11,95 <sup>a-d</sup>  | 14,00 <sup>abc</sup>  | 12,23 <sup>AB</sup> |
| P4                | 8,53 <sup>a-d</sup>   | 10,44 <sup>a-d</sup>  | 10,98 <sup>a-d</sup>  | 10,92 <sup>a-d</sup>  | 10,22 <sup>BC</sup> |
| P5                | 12,40 <sup>a-d</sup>  | 14,40 <sup>ab</sup>   | 14,14 <sup>abc</sup>  | 15,39 <sup>a</sup>    | 14,08 <sup>A</sup>  |
| Trung bình<br>(M) | 9,18 <sup>B</sup>     | 11,25 <sup>AB</sup>   | 11,18 <sup>AB</sup>   | 12,23 <sup>A</sup>    |                     |

CV%: 28,35.

Ghi chú: Giá trị đi kèm các chữ cái khác nhau trong hàng và cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,05$ .

Sắn là cây có khả năng tổng hợp tinh bột, một dạng carbohydrat hiệu quả nhất hiện nay trong số các cây trồng lấy củ. Đối với mỗi giống sắn, hàm lượng tinh bột cao kết hợp với năng suất củ tươi cao

sẽ cho kết quả năng suất tinh bột cao và ngược lại. Do vậy, năng suất tinh bột được xem là yếu tố hàng đầu để đánh giá chất lượng giống sắn trong chọn giống, nhân rộng và tiến tới trồng đại trà. Xét về mặt

độ trồng, khi trồng giống sắn HN1 với mật độ từ 10.000 - 15.625 hom/ha cho năng suất tinh bột đạt từ 9,18 tấn/ha (M1) đến 12,23 tấn/ha (M4) và sự sai khác này có ý nghĩa thống kê mức 95% giữa công thức M1 và M4; giữa các công thức còn lại có sự sai khác nhưng không có ý nghĩa thống kê. Xét về lượng phân bón, khi bón phân với lượng từ P1 - P5 cho năng suất tinh bột đạt từ 7,62 tấn/ha (P1) đến 14,08 tấn/ha (P5) và sự sai khác này có ý nghĩa thống kê ở mức 95% giữa các mức phân bón P5 với tất cả các công thức bón phân còn lại, ngoại trừ công thức P3. Khi kết hợp hai yếu tố mật độ và phân bón, kết quả cho thấy, năng suất tinh bột thấp nhất từ 6,40 tấn/ha (M1P1) đến cao nhất đạt 15,39 tấn/ha (M4P5) và sự sai khác này có ý nghĩa thống kê, đặc biệt là công thức bón phân P5, P3 ở các mật độ M2, M3, M4 so với công thức phân bón P1 ở tất cả các mật độ trồng ngoại trừ M4.

#### 3.4. Ảnh hưởng của lượng phân bón và mật độ trồng đến hiệu quả kinh tế giống sắn HN1 trồng trên đất nâu đỏ bazan

Mong muốn cuối cùng của người trồng sắn là nâng cao thu nhập. Có nhiều biện pháp để nâng cao thu nhập, cùng giống sắn và điều kiện thời tiết, đất đai như nhau thì yếu tố kỹ thuật canh tác, đặc biệt là sử dụng lượng phân bón hợp lý và mật độ trồng phù hợp sẽ làm tăng năng suất củ tươi, hàm lượng tinh bột, từ đó góp phần đem lại hiệu quả kinh tế cao cho người trồng. Căn cứ tính hiệu quả kinh tế dựa trên một số chỉ tiêu cơ bản như: Tổng thu, tổng chi và lãi thuần. Tổng chi bao gồm: Chi phí phân bón, giống, thuốc bảo vệ thực vật, công lao động, làm cỏ, chăm sóc, bón phân, thu hoạch... theo QCVN 01-61:2011/BNNPTNT [15], với giá được tính trung bình từ tháng 4 năm 2024 đến tháng 3 năm 2025 tại địa phương tổng cộng hết 27,92 triệu đồng (ở công thức M3P1). Các công thức về lượng phân bón và

mật độ trồng khác nhau có tổng chi phí dao động từ 25,31 triệu đồng/ha/vụ (M1P1) đến 48,67 triệu đồng/ha/vụ (M4P5) do chi phí giống, phân bón, công lao động và công thu hoạch tăng, giảm khác nhau. Đối với sắn củ tươi, giá thu mua của các nhà máy phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố như: Hàm lượng tinh bột, thời điểm thu hoạch, giá cả thị trường trong nước... Thực tế, từ năm 2020 – 2024, giá sắn củ tươi tăng liên tục (có những lúc các nhà máy sắn thu mua đến 4.500 đồng/kg củ tươi khi đạt hàm lượng tinh bột từ 29 - 30%). Nhưng vào giai đoạn đầu năm 2025, giá sắn củ tươi đã giảm đột ngột do lượng tồn kho tinh bột từ năm trước chưa xuất bán và do chính sách thuế của Trung Quốc có sự thay đổi nên mức giá trung bình của các nhà máy chế biến tinh bột sắn mua của nông dân trong giai đoạn năm 2024 và đầu năm 2025 ở mức 2,5 triệu đồng/tấn củ tươi. Mức giá trên được sử dụng để tính toán lãi thuần trong nghiên cứu này.

Lãi thuần: Giống sắn kháng bệnh khảm lá HN1 trồng với mật độ từ 10.000 - 15.625 hom/ha kết hợp với lượng phân bón khác nhau trên đất nâu đỏ bazan tại xã EaTu, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk cho lãi thuần thấp nhất là công thức M1P1 đạt 28,23 triệu đồng/ha/vụ đến cao nhất là công thức M4P5 đạt 79,00 triệu đồng/ha/vụ. Nhìn chung, lãi thuần trung bình của giống sắn kháng bệnh khảm lá HN1 trong thí nghiệm về mật độ và phân bón đều cao hơn lãi thuần của các giống HLS11, HLS12, HLS14 trong kết quả nghiên cứu về mật độ, lượng phân bón, giống của Nguyễn Văn Minh và cs (2020) [17]; Nguyễn Văn Minh và Nguyễn Thị Hoài (2020) [18], mặc dù giá sắn củ tươi bán trong giai đoạn này thấp hơn thời điểm của những nghiên cứu trước, nhưng do năng suất củ tươi trung bình cao hơn nên hiệu quả kinh tế đạt tốt hơn.

**Bảng 8. Hiệu quả kinh tế của giống sắn HN1**

| Công thức | Năng suất củ tươi (tấn/ha) | Đơn giá (triệu đồng/tấn) | Tổng thu (triệu đồng/ha) | Tổng chi (triệu đồng/ha) | Lãi thuần (triệu đồng/ha) |
|-----------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| M1P1      | 25,31                      | 2,50                     | 68,34                    | 35,05                    | 28,23                     |
| M1P2      | 31,56                      | 2,50                     | 85,22                    | 39,65                    | 39,26                     |
| M1P3      | 35,36                      | 2,50                     | 95,48                    | 41,5                     | 46,91                     |
| M1P4      | 31,30                      | 2,50                     | 84,52                    | 39,21                    | 39,05                     |
| M1P5      | 40,21                      | 2,50                     | 108,56                   | 44,92                    | 55,60                     |
| M2P1      | 26,10                      | 2,50                     | 70,46                    | 34,51                    | 30,73                     |
| M2P2      | 36,00                      | 2,50                     | 97,20                    | 39,11                    | 50,89                     |

|      |       |      |        |       |       |
|------|-------|------|--------|-------|-------|
| M2P3 | 42,00 | 2,50 | 113,40 | 40,96 | 64,04 |
| M2P4 | 31,76 | 2,50 | 85,76  | 38,67 | 40,74 |
| M2P5 | 44,72 | 2,50 | 120,73 | 44,39 | 67,40 |
| M3P1 | 27,92 | 2,50 | 75,38  | 33,8  | 35,99 |
| M3P2 | 39,04 | 2,50 | 105,41 | 38,4  | 59,20 |
| M3P3 | 39,96 | 2,50 | 107,89 | 40,25 | 59,65 |
| M3P4 | 38,33 | 2,50 | 103,50 | 37,96 | 57,87 |
| M3P5 | 45,17 | 2,50 | 121,95 | 43,67 | 69,25 |
| M4P1 | 32,53 | 2,50 | 87,82  | 32,80 | 48,51 |
| M4P2 | 41,60 | 2,50 | 112,32 | 37,40 | 66,60 |
| M4P3 | 46,97 | 2,50 | 126,81 | 39,25 | 78,17 |
| M4P4 | 39,43 | 2,50 | 106,47 | 36,96 | 61,62 |
| M4P5 | 48,67 | 2,50 | 131,40 | 42,67 | 79,00 |

*Ghi chú: Giá bán củ tươi trung bình năm 2024 - 2025 là 2,5 triệu đồng/tấn củ tươi; tổng chi đã tính lượng phân bón, giống và công lao động tăng thêm.*

#### 4. KẾT LUẬN

Lượng phân bón tối ưu/ha là (P5) 500 kg NPK 16 - 16 - 8 + 500 kg NPK 10 - 0 - 30 + 1,5 tấn phân hữu cơ vi sinh Con Cò Vàng. Mật độ trồng (M4) 10.000 hom/ha là thích hợp nhất, khối lượng củ/gốc cao nhất đạt 4,87 kg/gốc. Năng suất củ tươi cao nhất đạt 48,67 tấn/ha/vụ, hàm lượng tinh bột cao nhất là 31,68% và năng suất tinh bột đạt cao nhất là 15,39 tấn/ha/vụ, có ý nghĩa thống kê ở mức 95%. Hiệu quả kinh tế, công thức bón phân M4P5 cho lãi thuần cao nhất, đạt 79,00 triệu đồng/ha, cao hơn công thức M1P1 là 50,77 triệu đồng/ha.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cục trồng trọt (2024). *Báo cáo kết quả sản xuất, chế biến và tiêu thụ sản phẩm giai đoạn 2015 - 2022, định hướng và giải pháp phát triển cây sản phẩm thời gian tới.*
2. Hiệp hội Sản Việt Nam (2024). *Báo cáo tổng kết năm 2024 và chương trình công tác năm 2025.*
3. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2024). *Báo cáo tổng kết sản xuất nông nghiệp năm 2024 và kế hoạch năm 2025.*
4. Tổng cục Thống kê (2024). *Số liệu thống kê nông, lâm nghiệp và thủy sản.* <http://www.gso.gov.vn/nong-lam-nghiep-va-thuy-san/>, truy cập ngày 25/3/2025.
5. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2024). *Food Outlook Biannual report on global food markets.*
6. Phúc Nguyên (2022). Sản là sản phẩm chủ lực

với kim ngạch xuất khẩu 1,35 tỷ USD/năm. [https://thoibaotaichinhvietnam.vn/san-la-san-pham-chu-luc-voi-kim-ngach-xuat-khau-135-ty-usdnam-103255.html?utm\\_source=chatgpt.com&gidzl=xxRw5gurqbhflyIholNNUckyXMqVuzJfV-X6EDuYWFs-V99iYdQK\\_Iff1-nVOa6-lgi7M5pjHn\\_hZFNm0&gidzl=2y0Z8UoIJXq4tliXxenB6WJVBYNrZKzC7Dih9F6EHafCtN5ufuyGG1pOTtohoYqT568agVM7VOLGBvP166G](https://thoibaotaichinhvietnam.vn/san-la-san-pham-chu-luc-voi-kim-ngach-xuat-khau-135-ty-usdnam-103255.html?utm_source=chatgpt.com&gidzl=xxRw5gurqbhflyIholNNUckyXMqVuzJfV-X6EDuYWFs-V99iYdQK_Iff1-nVOa6-lgi7M5pjHn_hZFNm0&gidzl=2y0Z8UoIJXq4tliXxenB6WJVBYNrZKzC7Dih9F6EHafCtN5ufuyGG1pOTtohoYqT568agVM7VOLGBvP166G), truy cập ngày 20/3/2025

7. Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn tỉnh Đắk Lắk (2024). *Báo cáo tổng kết sản xuất nông nghiệp năm 2024 và kế hoạch sản xuất năm 2025.*
8. Cục Thống kê tỉnh Đắk Lắk (2024). *Số liệu thống kê nông, lâm nghiệp và thủy sản* <https://cucthongkedaklak.gso.gov.vn/>, truy cập ngày 17/3/2025
9. Sở Công thương tỉnh Đắk Lắk (2024). *Báo cáo tổng kết tình hình sản xuất công nghiệp tỉnh Đắk Lắk năm 2024.*
10. Patil, B. L. & Fauquet, C. M. (2009). *Cassava mosaic geminiviruses: Actual knowledge and perspectives. Molecular Plant Pathology*, 10(5), 685 - 701.
11. Nguyễn Thanh Việt, Trần Kiên Cường, Nguyễn Thị Nhã, Thân Văn Thái (2019). Xác định đặc điểm di truyền học của *Sri Lanka cassava mosaic virus* gây bệnh khảm lá sắn tại Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 9, 28 - 32.
12. Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn tỉnh

Đắk Lắk (2018). *Báo cáo tình hình nhiễm bệnh khảm lá sắn*.

13. Nguyễn Anh Vũ, Lê Ngọc Tuấn, Nguyễn Hùng, Đỗ Thị Trang, Nguyễn Thị Hạnh, Phạm Thị Hương, Mai Đức Chung, Nguyễn Văn Đồng, Motoaki Seki, Hiroki Tokunaga, Nguyễn Hữu Phong, Lê Thị Kiều Trang, Nguyễn Văn Hồng, Phạm Xuân Hội và Lê Huy Hàm (2021). Nghiên cứu đánh giá khả năng kháng bệnh khảm lá trong tập đoàn giống sắn (*Manihot esculenta* Crantz) phục vụ công tác chọn tạo giống mới. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 19, 57 - 63.

14. Cục Trồng trọt (2022). *Thông báo số 76/TB-TT-CLT ngày 19/01/2022 về tiếp nhận hồ sơ tự công bố lưu hành giống cây trồng*.

15. Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia QCVN 01-61:2011/BNNPTNT về Khảo nghiệm giá trị canh tác và giá trị sử dụng của giống sắn.

16. Viện Di truyền nông nghiệp (2021). *Quyết định số 237/QĐ-VDT ngày 6/12/2021 về việc Công nhận cấp cơ sở Quy trình kỹ thuật canh tác giống sắn HN1*.

17. Nguyễn Văn Minh, Đỗ Thị Nga, Nguyễn Văn Nam (2020). Ảnh hưởng của mật độ trồng và lượng phân bón đến năng suất, chất lượng và hiệu quả kinh tế của giống sắn HLS11 trồng trên đất nâu đỏ bazan tại huyện Krông Búk. *Tạp chí Khoa học, Đại học Tây Nguyên*, 44, 49 - 57.

18. Nguyễn Văn Minh, Nguyễn Thị Hoài (2020). Ảnh hưởng mật độ trồng đến năng suất, chất lượng và hiệu quả kinh tế của một số giống sắn mới trên đất nâu đỏ bazan tại thành phố Buôn Ma Thuột. *Tạp chí Khoa học, Đại học Tây Nguyên*, 44, 31 - 39.

19. Nguyễn Văn Minh (2020). Ảnh hưởng mật độ trồng và lượng phân bón hữu cơ vi sinh đến năng suất, hàm lượng tinh bột và hiệu quả kinh tế của giống sắn HLS12 trồng xen trong cao su trên đất nâu đỏ bazan tại huyện Krông Búk, tỉnh Đắk Lắk. *Tạp chí Khoa học, Đại học Tây Nguyên*, 45, 46 - 54.

20. Nguyễn Văn Minh, Đỗ Thị Nga (2021). Ảnh hưởng lượng phân bón và mật độ trồng đến năng suất và hiệu quả kinh tế của giống sắn HLS14 tại tỉnh Đắk Lắk. *Tạp chí Khoa học, Đại học Tây Nguyên*, 50, 65 - 73.

## **EFFECTS OF FERTILIZERS AND CROP DENSITY ON YIELD AND ECONOMIC EFFICIENCY OF HN1 MOSAIC DISEASE RESISTANT CASSAVA VARIETY CULTIVATED ON BASALT SOIL IN DAKLAK PROVINCE**

**Nguyen Van Minh<sup>1</sup>, Hoang Mai Duc<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Faculty of Agriculture and Forestry, Tay Nguyen University*

<sup>2</sup>*Golden Stork Company Limited*

### **Abstract**

This study aimed to determine a suitable fertilizer dose and crop density for HN1 mosaic disease resistant cassava variety cultivated on basalt soil in EaTu commune, Buon Ma Thuot city, Dak Lak province in 2024 - 2025. The results showed that the M4P5 formula with the planting density of 10.000 plants/ha (1.0 m x 1.0 m) and the fertilizer dose of 500 kg NPK 16 - 16 - 8 + 500 kg NPK 10 - 0 - 30 combined with 1.5 tons of Con Co Vang microorganic fertilizer resulted in the highest root weight/root - 4.87 kg/root; highest average yield of fresh roots - 48.67 tons/ha/crop, highest starch content of 31.68% and highest yield of starch - 15.39 tons/ha/crop at 95% significance level. This also resulted in the highest net profit of 79 million VND/ha/crop higher than that of M1P1 which was 50.77 million VND/ha.

**Keywords:** Basalt soil, HN1 Mosaic disease resistant cassava variety, planting density, fertilizer dose, Dak Lak province.

**Ngày nhận bài:** 10/4/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 12/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 26/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 25/6/2025

# NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG PHỤ PHẨM BÃ BỘT MÌ TRONG LÊN MEN *Acinetobacter nosocomialis* CYS-V3 TẠO NANO BẠC SINH HỌC VÀ ĐÁNH GIÁ TIỀM NĂNG KHÁNG TUYẾN TRÙNG NỐT SUNG TRÊN HỒ TIÊU

Đỗ Văn Chung<sup>1,2,\*</sup>, Phan Tử Quý<sup>3</sup>, Nguyễn Văn Bốn<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên

<sup>2</sup>Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên

<sup>3</sup>Khoa Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Trường Đại học Tây Nguyên

\*Email: nvbon@ttn.edu.vn; chungtaynguyen@gmail.com

## TÓM TẮT

Chủng vi khuẩn *Acinetobacter nosocomialis* CYS-V3 có khả năng tổng hợp nano bạc (AgNPs) theo cơ chế ngoại bào, với hoạt tính sinh học mạnh trong việc ức chế và tiêu diệt tuyến trùng *Meloidogyne* spp. và nấm *Phytophthora* spp. gây hại trên cây hồ tiêu. Nhờ tính an toàn và thân thiện môi trường, nano bạc sinh học được xem là giải pháp thay thế tiềm năng cho các loại thuốc bảo vệ thực vật hóa học. Tuy nhiên, hiện nay vẫn còn rất ít nghiên cứu ứng dụng phụ phẩm nông nghiệp, đặc biệt là bã tinh bột mì (CSPB), làm nguồn cơ chất trong lên men sản xuất AgNPs bằng vi sinh vật. Mục tiêu của nghiên cứu này là sử dụng phụ phẩm CSPB làm nguồn C/N giá rẻ và thân thiện môi trường cho quá trình lên men chủng *A. nosocomialis* CYS-V3. Sau 72 giờ nuôi cấy trong môi trường CSPB ở tỷ lệ 70% và 100% (CT4 và CT5), mật độ vi khuẩn lần lượt đạt  $3,1 \times 10^8$  và  $2,7 \times 10^8$  CFU/mL. Dịch lên men thu sẽ được sử dụng để tổng hợp nano bạc sinh học. Kết quả phân tích cho thấy, AgNPs có dạng hình cầu, phổ hấp thụ từ 420 - 540 nm với đỉnh cực đại tại 400 nm, kích thước hạt trung bình 86,5 nm và độ ổn định cao (điện thế zeta đạt -48,3 mV). AgNPs tổng hợp có hiệu lực ức chế 100% trứng tuyến trùng sau 3 ngày ủ và tiêu diệt tuyến trùng tuổi 2 tại nồng độ 1,25 ppm sau 5 ngày ủ.

**Từ khóa:** *A. nosocomialis* CYS-V3, CSPB, AgNPs tổng hợp xanh, lên men.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hồ tiêu (*Piper nigrum*) là cây công nghiệp lâu năm có giá trị xuất khẩu cao, đặc biệt được trồng phổ biến tại các tỉnh Tây Nguyên (Đắk Lắk, Đắk Nông, Gia Lai, Lâm Đồng và Kon Tum). Năm 2024, diện tích trồng hồ tiêu của Việt Nam ước đạt khoảng 110.500 ha, với năng suất bình quân 2,6 tấn/ha, tổng sản lượng khoảng 200.000 tấn. Việt Nam tiếp tục giữ vị trí dẫn đầu thế giới về sản lượng và xuất khẩu hồ tiêu. Trong năm 2024, Việt Nam xuất khẩu khoảng 250.600 tấn hồ tiêu, giảm 5,1% về lượng so với năm 2023, nhưng nhờ giá tiêu tăng mạnh, kim ngạch đạt 1,32 tỷ USD, tăng 45,4% so với năm trước. Giá xuất khẩu tiêu đen trung bình đạt 5.154 USD/tấn và tiêu trắng là 6.884 USD/tấn [1].

Biến đổi khí hậu và cạnh tranh ngoài quy hoạch đã làm gia tăng sâu, bệnh, đặc biệt là bệnh vàng lá chết chậm do tuyến trùng nốt sùng. Giai đoạn 2020 - 2023, cả nước có khoảng 18,9 nghìn héc-ta hồ tiêu bị chết do bệnh này [2]. Các biện pháp hóa học phòng trừ

tuyến trùng có hiệu quả thấp, chi phí cao và gây ô nhiễm môi trường [3].

Sắn (*Manihot esculenta*), một loài cây trồng chịu hạn, có thể được trồng trong điều kiện bất lợi như đất nghèo dinh dưỡng và lượng mưa không thể đoán trước. Đây là cây lương thực chủ lực ở Sahara của châu Phi và là cây trồng có giá trị cao ở các nước công nghiệp hóa châu Á [4]. Việt Nam là nước trồng sắn hàng đầu và đứng thứ bảy trong số các nước sản xuất sắn hàng đầu thế giới [5]. Từ lâu loài cây này được sử dụng làm thực phẩm cho người và thức ăn gia súc, gia cầm, thủy, hải sản, cũng như để chiết xuất tinh bột [6]. CSPB được sinh ra với số lượng đáng kể sau khi chiết xuất tinh bột từ sắn và vẫn giàu chất dinh dưỡng, do đó quản lý không tốt có thể dẫn đến môi trường bị ô nhiễm [7]. CSPB chủ yếu được ứng dụng vào sản xuất thức ăn chăn nuôi và phân bón [8, 9]. Ở Việt Nam, hàng năm sản xuất số lượng lớn và ổn định lượng CSPB. Do đó, nguồn phụ phẩm này rất dồi dào và có tiềm năng cho nghiên cứu, ứng



dụng. Vì vậy, nghiên cứu này đã sử dụng CSPB để nhân nuôi chủng vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3 và thu hồi canh trường lên men để tạo hạt nano bạc ngoại bào.

Ứng dụng canh trường lên men của vi khuẩn để tổng hợp nano bạc (AgNPs) đang trở thành hướng nghiên cứu tiềm năng trong quản lý dịch hại nông nghiệp. Sử dụng canh trường lên men từ vi khuẩn để tổng hợp AgNPs giảm thiểu ô nhiễm môi trường, chi phí sản xuất thấp và có hoạt tính kháng tuyến trùng, kháng nấm hiệu quả cao. Nano bạc sinh học này đã chứng minh hiệu quả trong việc ức chế các loài nấm gây hại như: *Fusarium*, *Phytophthora* gây hại trên nhiều cây trồng, bao gồm: Hồ tiêu, lúa, cà chua,... Nhiều nghiên cứu cho thấy, nano bạc sinh học có hoạt tính làm biến đổi màng tế bào, ức chế enzym và hỏng quá trình trao đổi chất của nấm bệnh, từ đó ngăn chặn sự phát triển và lây lan của chúng [10, 11].

Dù có tiềm năng lớn, nhưng hướng nghiên cứu này tại Việt Nam vẫn còn ít được khai thác. Chính vì vậy, nghiên cứu ứng dụng phụ phẩm CSPB trong lên men *Acinetobacter nosocomialis* CYS-V3 tạo nano bạc sinh học và đánh giá tiềm năng kháng tuyến trùng nốt sùng trên hồ tiêu là cần thiết.

## **2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu nghiên cứu**

- Chủng vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3 có khả năng sinh tổng hợp nano bạc ngoại bào, được sử dụng để nghiên cứu [12].

- CSPB trong công trình này được mua từ Công ty DAKTASCO, tỉnh Đắk Lắk, ở dạng khô với độ ẩm là 12%, được bảo quản ở nhiệt độ phòng để tiến hành thử nghiệm thêm.

- Môi trường thương mại: NB (Nutrient Broth) của hãng Himedia, Ấn Độ với thành phần môi trường (Peptone 5,0 g; Sodium chloride (NaCl) 5,0 g; Meat extract B# (cao thịt) 1,5 g; Yeast extract (cao nấm men) 1,5 g; pH 7,4 ± 0,2 ở 25°C). Bạc nitrat ( $\text{AgNO}_3$ , Sigma-Aldrich, độ tinh khiết 99,0%) là tiền chất để tổng hợp nano bạc, Glycerol (AR, GHTECH, Cas 56-81-5) của hãng GHTECH (JHD), tinh khiết 92,09%.

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

**2.2.1. Nhân nuôi vi khuẩn nội sinh *A. nosocomialis* CYS-V3 trong bình tam giác xác định nguồn cơ chất phù hợp**

Tiến hành hoạt hoá và nhân nuôi chủng vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3 trong môi trường NB. Hút 1 ml dịch nuôi cấy đã hoạt hóa cho vào các bình môi

trường bổ sung các phụ phẩm CSPB tỷ lệ khác nhau (khử trùng ở 121°C, áp suất 1 atm, trong thời gian 15 phút và ở pH= 6). Chủng vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3 nuôi cấy trong thời gian 72 giờ, ở nhiệt độ 35°C, pH= 6 và tốc độ lắc 200 vòng/phút.

**2.2.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ phế phụ phẩm CSPB đến khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3**

Tiến hành nhân nuôi chủng vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3 trong các môi trường thích hợp bổ sung tỷ lệ phế phụ phẩm CSPB khác nhau. Ở điều kiện nuôi cấy là 40°C, pH= 6 và 72 giờ, thu dịch lên men và đánh giá số lượng vi khuẩn. Mỗi thí nghiệm làm lặp lại 3 lần.

Cách làm: *A. nosocomialis* CYS-V3 được lên men trong các môi trường với tỷ lệ dinh dưỡng khác nhau của CSPB và NB gồm: 0/10; 3/7; 5/5; 7/3; 10/0.

Trong đó:

+ Công thức (CT)1: Peptone 0,5 g; Sodium chloride (NaCl) 0,5 g; Meat extract B# (cao thịt) 0,15 g; Yeast extract (cao nấm men) 0,15 g + 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ .

+ CT2: 0,45 g CSPB + 1,05 g NB (5 Peptone: 1,5 Meat extract B#: 1,5 Yeast extract) + 0,5 g NaCl + 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ .

+ CT3: 0,75 g CSPB + 0,75 g NB (5 Peptone: 1,5 Meat extract B#: 1,5 Yeast extract) + 0,5 g NaCl + 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ .

+ CT4: 1,05 g CSPB + 0,45 g NB (5 Peptone: 1,5 Meat extract B#: 1,5 Yeast extract) + 0,5 g NaCl + 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ .

+ CT5: 1,5 g CSPB + 0,5 g NaCl + 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ .

**2.2.3. Phương pháp xác định một số điều kiện thích hợp tạo hạt nano (nồng độ bạc nitrat, tỷ lệ phối trộn bạc nitrat và canh trường lên men, nồng độ pha loãng canh trường lên men và thời gian phản ứng)**

Dịch lên men của *A. nosocomialis* CYS-V3 sau thời gian nuôi cấy 72 giờ được ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong thời gian 15 phút.

**Ảnh hưởng nồng độ bạc nitrat:** Dịch lên men của *A. nosocomialis* CYS-V3 sau ly tâm được pha loãng 5,0%, tiến hành cho phản ứng ở các nồng độ bạc nitrat ở 1 milimol; 1,5 milimol; 2 milimol; 3 milimol; 4 milimol; 5 milimol; 6 milimol; 7 milimol.

**Ảnh hưởng của tỷ lệ dung dịch vi khuẩn/dung dịch bạc nitrat:** Dịch lên men của *A. nosocomialis* CYS-V3 sau ly tâm được pha loãng 5,0% và tiến hành

cho phản ứng với dung dịch  $\text{AgNO}_3$  2 milimol, ở các tỉ lệ dung dịch vi khuẩn/dung dịch bạc nitrat như sau: 1: 1; 1: 2; 1: 3; 1: 4; 1: 5 với thời gian phản ứng là 20 giờ.

**Ảnh hưởng của nồng độ pha loãng độ pha loãng canh trường lên men đến phản ứng:** Dịch lên men của *A. nosocomialis* CYS-V3 sau ly tâm được pha loãng ở nồng độ 5%, 10%, 20% với nước cất tiến hành cho phản ứng với dung dịch  $\text{AgNO}_3$  2 milimol ở tỷ lệ 1: 3 sau 20 giờ phản ứng.

**Ảnh hưởng của thời gian đến phản ứng:** Dung dịch nuôi cấy vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3 ở mật độ  $18,2 \times 10^8$  CFU/mL ở  $30^\circ\text{C}$ . Được pha loãng ở nồng độ 5% với nước cất tiến hành cho phản ứng với dung dịch  $\text{AgNO}_3$  2 mM ở tỷ lệ 1: 3 trong thời gian 12, 24, 36, 48 và 60 giờ.

#### 2.2.4. Phương pháp xác định đặc tính hạt nano

Dịch lên men của *A. nosocomialis* CYS-V3 sau ly tâm được pha loãng ở tỷ lệ 1: 20, tiến hành sử dụng cho phản ứng tạo nano bạc, ở tỷ lệ thể tích 1: 3 (1 mL dung dịch canh trường, 3 mL dung dịch  $\text{AgNO}_3$  2 mM) ở nhiệt  $30^\circ\text{C}$ , pH= 8,0 trong thời gian phản ứng 35 giờ.

**Quang phổ UV-Vis:** Dựa vào phổ UV-Vis đặc trưng của nano bạc có giải cộng hưởng plasmon bề mặt trong khoảng 420 - 440 nm để xác minh có sự xuất hiện hạt nano canh trường lên men [13]. Dùng phần mềm Spectragryh v1.2.16.1 để phân tích và vẽ biểu đồ.

**SEM:** Hình thái và cấu trúc bề mặt của các hạt nano được đánh giá bằng kính hiển vi điện tử quét để bàn (Phenom Pro Desktop SEM), độ phóng đại quang học ánh sáng 20 - 134 X, phóng đại quang học điện tử 160 - 350.000 X, độ phân giải  $\leq 6$  nm SED và  $\leq 8$  nm BSD, điện áp gia tốc chế độ nâng cao với phạm vi điều chỉnh giữa chế độ hình ảnh 4,8 kV và 20,5 kV.

**Phân bố hạt (SIZE):** Phân bố kích cỡ hạt nano bạc được đo bằng máy SZ-100 (Hãng HORIBA).

**Điện thế Zeta:** Được đo bằng máy SZ-100 (Hãng HORIBA).

#### 2.2.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng tuyến trùng nốt sùng trong điều kiện in vitro

**Phương pháp chuẩn bị trứng và tuyến trùng nốt sùng**

Trứng tuyến trùng nốt sùng (*Meloidogyne* spp.) được thu thập từ rễ các cây hồ tiêu bị bệnh. Rửa sạch đất bám xung quanh rễ sau đó dùng dao mổ hoặc panh để thu thập khối trứng tuyến trùng từ các u

sung trên rễ hồ tiêu. Rửa trứng tuyến trùng bằng nước cất rồi bằng dung dịch sodium hypoclorit 0,5% và rửa sạch bằng nước cất rồi thu trứng bằng rây có kích thước lỗ rây 26  $\mu\text{m}$ . Trứng được dùng trong thí nghiệm *in vitro* hoặc ủ trong 3 - 5 ngày, tuyến trùng tuổi 2 (J2) được thu bằng phễu Baermann có cải tiến.

#### Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng trứng tuyến

Nghiên cứu thực nghiệm ở 6 CT như sau: ĐC (sử dụng 100% nước cất vô trùng); CT1; CT2; CT3; CT4; CT5 tương ứng với nồng độ lần lượt là 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 ppm AgNPs và mỗi CT có 3 lần lặp lại. Trứng tuyến trùng được bổ sung vào mỗi giếng (well) với số lượng 50 trứng/giếng. Hút 200  $\mu\text{l}$  mỗi loại nồng độ bơm vào mỗi giếng có chứa trứng tuyến trùng, tiến hành ủ đĩa (plate) ở  $27^\circ\text{C}$  trong 24, 48, 72 và 96 giờ, số trứng nở ở mỗi giếng được xác định thông qua kính hiển vi soi nổi. Tỷ lệ trứng nở (TLTN) được tính như sau:

$$\text{Tỷ lệ trứng nở} = \frac{\text{Số tuyến trùng}}{\text{Tổng số trứng tuyến trùng trong đĩa}} \times 100 \quad (1)$$

#### 2.2.6. Phương pháp đánh giá khả năng ức chế tuyến trùng Meloidogyne spp. trong điều kiện in vitro

Thí nghiệm khảo sát hoạt tính ức chế tuyến trùng tuổi 2 được thực hành theo phương pháp cải tiến của Aravind và cs (2016) [14] và Chen và cs (2018) [15]. Nghiên cứu thực nghiệm ở 6 CT sau: ĐC (sử dụng 100% nước cất vô trùng); CT1; CT2; CT3; CT4; CT5 tương ứng với nồng độ lần lượt là 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 ppm AgNPs và mỗi CT có 3 lần lặp lại. Tuyến trùng J2 được bổ sung vào mỗi giếng (well) với số lượng 50 con/giếng. Hút 200  $\mu\text{l}$  mỗi loại nồng độ bơm vào mỗi giếng có chứa tuyến trùng, tiến hành ủ đĩa (plate) ở  $27^\circ\text{C}$  trong 24 giờ, số tuyến trùng chết ở mỗi giếng được đếm bằng kính hiển vi soi nổi. Tỷ lệ tử vong (TLTV) được tính như sau:

$$\text{Tỷ lệ tử vong} = \frac{\text{Số tuyến trùng}}{\text{Tổng số tuyến trùng trong đĩa}} \times 100 \quad (2)$$

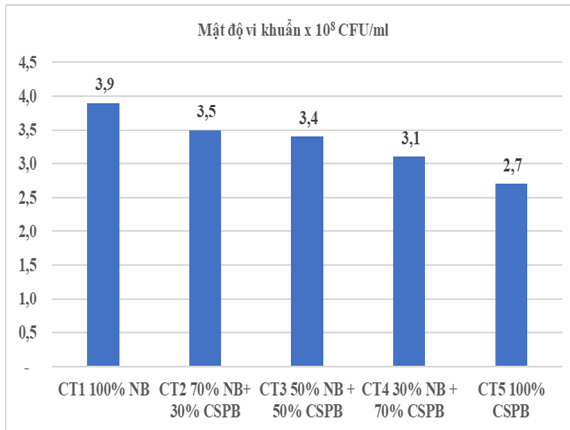
### 2.3. Phương pháp xử lý số liệu thống kê

Kết quả nghiên cứu thực nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel, phân tích

ANOVA và SPSS 22.0. Các số liệu sử dụng trong nghiên cứu là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại  $\pm$  độ lệch chuẩn với mức ý nghĩa  $p < 0,01$ .

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ phối phụ phẩm CSPB đến khả năng sinh trưởng của *A. nosocomialis* CYS-V3



Hình 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn phụ phẩm CSPB tới sinh trưởng của vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3

Môi trường nuôi cấy là một trong những điều kiện quyết định đến sự phát triển và sinh trưởng của vi sinh vật. Nhiều loài *Acinetobacter* spp. sử dụng nhiều nguồn các-bon, nhưng có sự khác biệt đáng kể về các nguồn các-bon cụ thể có thể đồng hóa được, *Acinetobacter* spp. sử dụng con đường Entner-Doudoroff, con đường pentose phosphate, chu trình axit tricarboxylic (TCA), con đường glyoxylate và quá trình tân tạo glucose trong quá trình chuyển hóa các-bon trung tâm [16]. Dựa trên cơ sở này, tiến hành khảo sát xác định tỷ lệ protein phù hợp cho quá trình nhân nuôi chủng *A. nosocomialis* CYS-V3. Kết quả nghiên cứu cho thấy, vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3 sinh trưởng mạnh nhất trên môi trường NB và yếu nhất trên môi trường 100% CSPB. (Hình 1). Khi lên men ở các môi trường phối trộn tỷ lệ giữa NB/CSPB khác nhau sẽ có mật độ vi khuẩn khác nhau. Mật độ tối ưu của vi khuẩn nhân nuôi ở bình tam giác là  $3,9 \times 10^8$  CFU/ml tại CT1, tại CT5 mật độ vi khuẩn chủng *A. nosocomialis* CYS-V3 đạt  $2,7 \times 10^8$  CFU/ml sau 72 giờ nhân nuôi [17]. Như vậy, việc ứng dụng môi trường 100% CSPB nhân nuôi chủng vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3 vẫn sinh trưởng và phát triển tốt, bước đầu có tiềm năng thuận lợi về nguồn canh trường lên men, ứng dụng quá trình khảo sát tạo hạt nano bạc trong điều kiện *in vitro*.

#### 3.2. Một số điều kiện thích hợp tạo hạt nano (Môi trường nuôi cấy, nồng độ bạc nitrat, tỷ lệ phối trộn bạc nitrat và canh trường lên men, nồng độ pha loãng canh trường lên men và thời gian phản ứng)

Tỷ lệ phối trộn NB/SCPB ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp nano bạc: Canh trường lên men trong trong bình tam giác từ (CT1 - CT5) được ly tâm thu hồi dịch trong, pha loãng và được dùng sinh tổng hợp nano bạc sinh học. Sau khi ly tâm, tiến hành pha loãng canh trường với tỷ lệ 5% và tiến hành phản ứng tạo nano bạc với tỷ lệ 1: 3 (1 ml dung dịch + 3 ml  $\text{AgNO}_3$ ). Mẫu dung dịch dung dịch  $\text{AgNO}_3$  hấp thụ bước sóng cực đại trong dải dưới 340 nm. Sau phản ứng 35 giờ của canh trường lên men của CT1, CT2, CT3, CT4 và CT5 với dung dịch  $\text{AgNO}_3$  (Hình 2a và b), hỗn hợp phản ứng ở CT - CT4 đã có đỉnh hấp thụ cực đại ở  $\sim 463$  nm, trong đó ở CT5 với môi trường lên men 100% SCPB không có hiện tượng tạo hạt nano bạc.

Điều này đã chứng minh nano bạc ở CT1 - CT4 đã được hình thành trong dung dịch phản ứng do xuất hiện dải cộng hưởng plasmon bề mặt trong vùng đặc trưng của nano bạc [18]. Kết quả nghiên cứu thực nghiệm tại hình 2a và b cho thấy, ở CT1 có tiềm năng tạo hạt nano bạc tốt nhất, ở CT2, CT3, CT4, CT5 khả năng tạo nano giảm dần, khi tăng tỷ lệ phối trộn SCPB từ 0 - 100%. Tuy nhiên, ở CT4 môi trường nhân nuôi chiếm tỷ lệ 70% vẫn có tiềm năng tạo hạt nano bạc rất tốt. Vì vậy, ở các nghiên cứu tiếp theo đã lựa chọn môi trường này để đánh giá một số điều kiện hình thành hạt nano. Kết quả nghiên cứu này, tương đương với kết quả nghiên cứu của Kalimuthu và cs (2008) về chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* có hoạt tính sinh tổng hợp nano bạc [19]. Đặc tính hạt của AgNPs được xác định thông qua phân tích ảnh SEM (Hình 7), phân bố hạt (Hình 8), ảnh TEM (Hình 10) và điện thế zeta (Hình 9).

**Ảnh hưởng nồng độ bạc nitrat:** Nồng độ bạc nitrat ảnh hưởng đến quá trình tạo hạt AgNPs được thể hiện ở hình 3, trong đó phổ hấp thụ đặc trưng của  $\text{Fe}^{3+}$  là 325 nm và  $\text{Ag}^+$  từ 280 - 320 nm, bước sóng từ 420 - 540 nm phổ hấp thụ của AgNPs. Phổ UV-Vis thể hiện đỉnh cao nhất ở nồng độ 1,5 mM  $\text{AgNO}_3$ . Ở nồng độ 1 mM  $\text{AgNO}_3$  chưa có xuất hiện rõ quá trình hình thành hạt AgNPs. Ở các nồng độ 2, 3, 4, 5, 6 mM  $\text{AgNO}_3$  đều có dấu hiệu tạo hạt nano bạc, tuy nhiên tín hiệu phổ UV-Vis thấp. Kết quả thực nghiệm (Hình 3) cho thấy, sự tạo mầm của NPs ảnh hưởng

khi nồng độ muối Ag tăng lên, một phần ion  $Ag^+$  bị khử thành nguyên tử  $Ag^0$ , các nguyên tử Ag này đóng vai trò là trung tâm tạo mầm, đẩy nhanh quá trình khử các ion  $Ag^+$  còn lại và tạo ra nhiều AgNPs hơn, do đó làm tăng độ hấp thụ. Vì vậy, 6 nồng độ thực nghiệm trong nghiên cứu này, nồng độ 1,5 mM  $AgNO_3$  được xem là nồng độ phù hợp nhất để tổng hợp AgNPs.

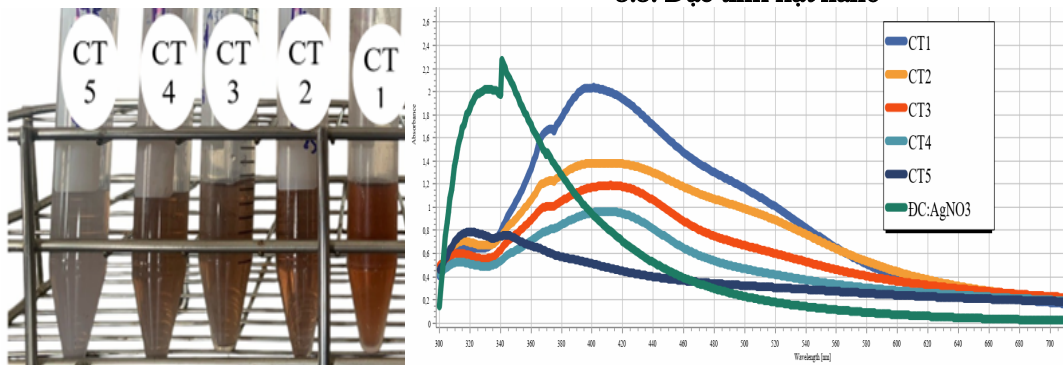
**Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi canh trường/dung dịch bạc nitrat:** Quá trình tạo hạt AgNPs ảnh hưởng bởi tỷ lệ phối trộn được thể hiện trên (Hình 4) trong đó phổ hấp thụ của AgNPs ở bước sóng từ 400 - 550 nm. Phổ UV-Vis thể hiện đỉnh cao nhất ở tỷ lệ phối trộn 1 mL dung dịch canh trường với 3 mL dung dịch  $AgNO_3$  2 mM. Kết quả thực nghiệm cho thấy, ở tỷ lệ phối trộn thích hợp, tạo điều kiện thuận lợi cho sự tạo mầm của NPs. Ở các tỷ lệ phối trộn giữa dung dịch canh trường với dung dịch bạc nitrat đều cho thấy, các đỉnh hấp phụ của phổ UV-VIS đều thấp hơn so với tỷ lệ 1: 3. Một số công bố trước đây, đã chứng minh, hiệu ứng tổng hợp và sự cạnh tranh giữa các NPs góp phần làm thay đổi dải SPR, không phụ thuộc vào sự gia tăng nồng độ  $Ag^+$ . Ngoài ra, việc xử lý ở các tỷ lệ 1: 4 và 1: 5 dẫn đến sự kết tụ các NPs do tần số va chạm của các ion  $Ag^+$  tăng lên. Vì vậy, trong số các tỷ lệ phối trộn giữa dung dịch canh trường với dung dịch bạc nitrat, được thử nghiệm trong nghiên cứu này là 1: 3 (1 mL dung dịch canh trường 3 mL

dung dịch bạc nitrat ở nồng độ 2 mM) là tỷ lệ thích hợp cho quá trình tạo hạt AgNPs.

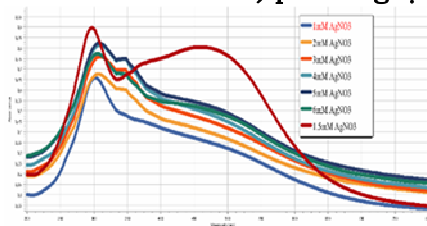
**Ảnh hưởng của nồng độ pha loãng canh trường lên men:** Nồng độ pha loãng canh trường lên men khác nhau, dẫn đến quá trình khử ion  $Ag^+$  thành  $Ag^0$  khác nhau (Hình 5). Phổ UV-Vis thể hiện đỉnh cao nhất ở tỷ pha loãng 5% (1 mL dung dịch nuôi cấy pha với 19 mL  $H_2O$  cất) cho biết điều kiện tổng hợp tối ưu. Ở các tỷ lệ pha loãng canh trường lên men 10% và 20% cho thấy, đỉnh hấp phụ của phổ UV-Vis đều thấp hơn so với tỷ lệ pha loãng 5%. Vì vậy, trong số các tỷ lệ pha loãng canh trường lên men được thử nghiệm trong nghiên cứu ở 5% là hợp lý nhất để tổng hợp nano bạc sinh học.

**Ảnh hưởng thời gian phản ứng:** Canh trường lên men của chủng vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3 sau khi li tâm, được pha loãng ở nồng độ 5%, tạo phản ứng với dung dịch  $AgNO_3$  2 mM ở tỷ lệ phối trộn 1: 3 (1 mL dung dịch canh trường, 3 mL dung dịch  $AgNO_3$  2 mM) trong 12, 24, 36 và 60 giờ. Hình 6 cho thấy, phổ hấp phụ UV-Vis xuất hiện từ 380 - 540 nm, cho thấy các hạt Ag đã xuất hiện. Thời gian phản ứng kéo dài thì cường độ hấp thụ có xu hướng tăng, có nghĩa là số hạt nano bạc đã tăng lên. Tuy nhiên, ở 48 giờ phản ứng có đỉnh hấp phụ cao nhất, nhưng đến 60 giờ thì đỉnh hấp phụ giảm xuống. Điều này chứng tỏ bên cạnh quá trình khử tạo hạt nano bạc còn có sự hình thành keo tụ [20].

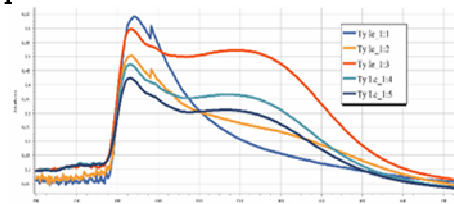
### 3.3. Đặc tính hạt nano



Hình 2. a) phản ứng tạo nano bạc, b) phổ UV-Vis của 5 CT và ĐC

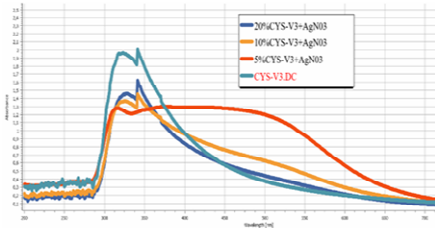


Hình 3. Ảnh hưởng nồng độ bạc nitrat

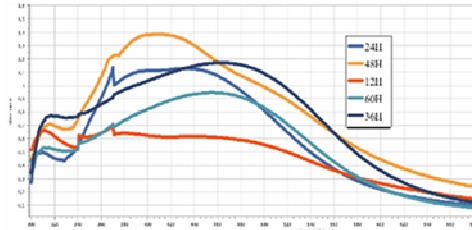


Hình 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi canh trường/dung dịch bạc nitrat

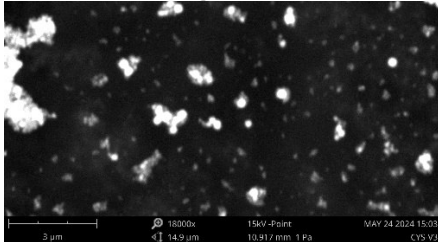




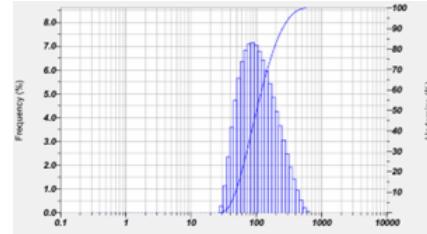
Hình 5. Ảnh hưởng của tỷ lệ pha loãng canh trường lên men



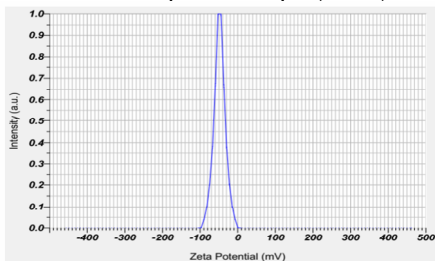
Hình 6. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến quá trình tạo hạt nano bạc sinh học



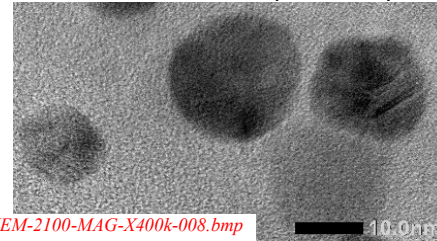
Hình 7. Hạt nano bạc (SEM)



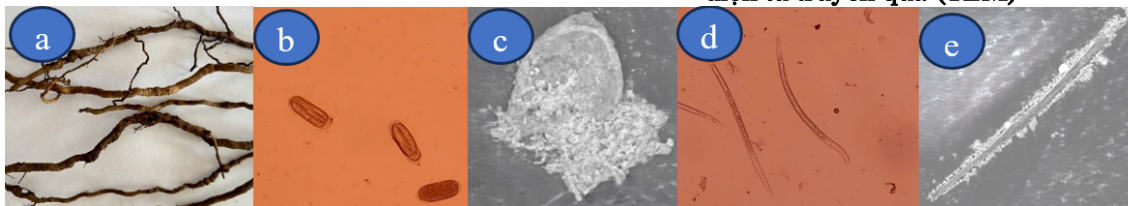
Hình 8. Phân bố hạt nano bạc



Hình 9. Điện thế zeta ở 35 giờ



Hình 10. Hạt nano bạc sinh học qua kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM)



Hình 11. a) Rễ hồ tiêu, b) ĐC, c) Nano bạc tác động làm vỡ trứng, d) ĐC, e) Nano bạc tấn công gây chết tuyến trùng J2

**Ảnh SEM:** Các hình ảnh SEM ban đầu cho thấy, hình thái bề mặt của AgNP được sinh tổng hợp từ chủng vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3. Sự kết tụ nhẹ của các hạt nano dựa trên kim loại đã được quan sát thấy trên ảnh SEM (Hình 7) [19].

**Phân bố hạt:** Kích thước hạt nano bạc tạo ra càng nhỏ diện tích tiếp xúc bề mặt càng tăng, đặc biệt quan trọng trong quá trình ức chế tuyến trùng, nấm bệnh hại. Hình 8 cho thấy, kích thước hạt nano bạc trung bình 86,5 nm.

**Điện thế zeta:** Tại thời điểm 35 giờ (Hình 9) sau phản ứng tạo hạt nano bạc, điện thế zeta là -48,3 mV. Như vậy, với kết quả đo được điện thế zeta khá tối ưu, ở một công bố trước điện thế zeta của nano bạc âm hoặc dương từ 25 - 26 mV đã cho thấy, độ ổn định

cao, điện thế zeta càng bé hoặc càng lớn sẽ chống lại sự keo tụ, kết đám của hạt nano bạc [21].

**Kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM):** Hình 9 cho thấy, hạt nano bạc dạng hình cầu, bề mặt nhẵn, có kích thước từ 20 - 100 nm. Theo Dong và cs (2019) [16], kích thước hạt nano bạc càng nhỏ, hoạt tính kháng tuyến trùng, nấm càng cao.

### 3.4. Hoạt tính ức chế trứng và tuyến trùng *Meloidogyn* spp. trong điều kiện *in vitro*

#### 3.4.1. Hoạt tính ức chế trứng tuyến trùng *Meloidogyn* spp.

Kết quả thực nghiệm tại bảng 1 và hình 11c cho thấy, tất cả các CT nghiên cứu sau ngày thứ 2 có 100% trứng chưa nở. Tuy nhiên, đến ngày thứ 3 ở nồng độ 1,0 và 1,25 ppm AgNPs đã ức chế 75,5% và 100% trứng không nở. Đặc biệt ở nồng độ 1,25 ppm

AgNPs ở các ngày thứ 3, 4, 5 và 6 ức chế 100% trứng nở, ở nồng độ 1,0 ppm AgNPs ức chế ngày 5 và 6 chỉ đạt 88,5 và 88,8%. Như vậy, việc tăng nồng độ không

chỉ làm tăng hiệu quả ức chế mà còn chứng minh sự cần thiết của việc tối ưu hóa liều lượng để đạt hiệu quả cao nhất.

**Bảng 1. Khả năng ức chế trứng tuyến trùng của AgNPs**

| Ký hiệu | Nồng độ (ppm AgNPs) | Hiệu lực ức chế (%) sau 2 ngày | Hiệu lực ức chế (%) sau 3 ngày | Hiệu lực ức chế (%) sau 4 ngày | Hiệu lực ức chế (%) sau 5 ngày | Hiệu lực ức chế (%) sau 6 ngày |
|---------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| CT1     | 0,25                | 0,0                            | 17,1 ± 0 <sup>b</sup>          | 4,7 ± 0,1 <sup>b</sup>         | 5,6 ± 0,1 <sup>b</sup>         | 5,4 ± 0,1 <sup>b</sup>         |
| CT2     | 0,50                | 0,0                            | 33,2 ± 0,1 <sup>c</sup>        | 10,5 ± 0,1 <sup>c</sup>        | 13,6 ± 0,1 <sup>c</sup>        | 9,7 ± 0,1 <sup>c</sup>         |
| CT3     | 0,75                | 0,0                            | 42,5 ± 0,1 <sup>d</sup>        | 17,8 ± 0 <sup>d</sup>          | 24,8 ± 0,1 <sup>d</sup>        | 16,7 ± 0,2 <sup>d</sup>        |
| CT4     | 1,00                | 0,0                            | 75,5 ± 0,1 <sup>e</sup>        | 84,6 ± 0 <sup>e</sup>          | 88,5 ± 0,1 <sup>ce</sup>       | 88,8 ± 0,1 <sup>e</sup>        |
| CT5     | 1,25                | 0,0                            | 100,0 ± 0 <sup>f</sup>         | 100,0 ± 0 <sup>f</sup>         | 100,0 ± 0 <sup>f</sup>         | 100,0 ± 0 <sup>f</sup>         |
| ĐC      | 0,0                 | 0,0                            | 0,0 ± 0 <sup>a</sup>           | 0,0 ± 0 <sup>a</sup>           | 0,0 ± 0 <sup>a</sup>           | 0,0 ± 0 <sup>a</sup>           |

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột có sự khác biệt với mức ý nghĩa  $p=0,01$

#### 3.4.2. Hoạt tính ức chế tuyến trùng J2 ở điều kiện in vitro

Hoạt tính ứng chế tuyến trùng tại bảng 2 và hình 11e cho thấy, ở nồng độ 1,25 ppm AgNPs tại ngày thứ nhất đã có hiệu lực 8,6%. Đến ngày thứ 2 ở nồng độ 1,0 ppm có hiệu lực là 50,7% (CT4) còn ở CT5 là 69,4% ở các CT1, CT2 và CT3 chưa có hiệu lực ức chế. Sau 5 ngày ủ tại CT4 và CT5 có hiệu lực ức chế 100%. Hiệu lực ức chế tuyến trùng đều có sự sai khác và có ý nghĩa thống kê với mức  $p=0,01$ . Kết quả nghiên cứu này, tương đồng với kết quả nghiên cứu của Baronía và cs (2020) đối với tuyến trùng *M. graminicola* gây u sưng rễ lúa cụ thể ở thí nghiệm nồng độ AgNPs (0,5 ppm) sau 24 giờ có tỷ lệ chết là

60%, ở nồng độ 1,0 ppm tỷ lệ chết là 73,3% và ở nồng độ 2,0 và 3,0 ppm, tỷ lệ chết của tuyến trùng tuổi 2 (J2) là 100% [22]. Nguyên nhân gây chết tuyến trùng có thể do nano bạc khi tiếp xúc với tuyến trùng gây tổn thương màng tế bào, làm rò rỉ ion và phá vỡ cân bằng nội bào. Đồng thời, nano bạc có khả năng tạo ra các gốc tự do (ROS), gây stress oxy hóa, phá hủy cấu trúc protein và ADN của tuyến trùng. Nano bạc cũng có thể ức chế hoạt động enzyme và chức năng sinh lý của tuyến trùng, làm giảm khả năng di chuyển, xâm nhiễm và sinh sản. Ngoài ra, nano bạc có thể gắn vào bề mặt hoặc cơ quan cảm thụ, làm rối loạn cảm nhận và phản ứng sinh học của tuyến trùng [23].

**Bảng 2. Khả năng ức chế tuyến trùng của nano bạc CYS-V3**

| Ký hiệu | Nồng độ (ppm AgNPs) | Hiệu lực ức chế (%) sau 2 ngày | Hiệu lực ức chế (%) sau 3 ngày | Hiệu lực ức chế (%) sau 4 ngày | Hiệu lực ức chế (%) sau 5 ngày | Hiệu lực ức chế (%) sau 6 ngày |
|---------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| CT1     | 0,25                | 0,0 ± 0 <sup>a</sup>           | 0,0 ± 0 <sup>a</sup>           | 0,0 ± 0 <sup>a</sup>           | 1,9 ± 0,1 <sup>b</sup>         | 4,1 ± 0 <sup>b</sup>           |
| CT2     | 0,50                | 0,0 ± 0 <sup>a</sup>           | 0,0 ± 0 <sup>a</sup>           | 0,0 ± 0 <sup>a</sup>           | 6,5 ± 0 <sup>c</sup>           | 11,8 ± 0,1 <sup>c</sup>        |
| CT3     | 0,75                | 0,0 ± 0 <sup>a</sup>           | 0,0 ± 0 <sup>a</sup>           | 0,0 ± 0 <sup>a</sup>           | 10,1 ± 0,1 <sup>d</sup>        | 17,3 ± 0,1 <sup>d</sup>        |
| CT4     | 1,00                | 50,7 ± 0 <sup>b</sup>          | 67,5 ± 0,1 <sup>b</sup>        | 81,2 ± 0 <sup>b</sup>          | 100,0 ± 0 <sup>e</sup>         | 100,0 ± 0 <sup>e</sup>         |
| CT5     | 1,25                | 69,4 ± 0,1 <sup>c</sup>        | 78,2 ± 0 <sup>c</sup>          | 97,2 ± 0 <sup>c</sup>          | 100,0 ± 0 <sup>e</sup>         | 100,0 ± 0 <sup>e</sup>         |
| ĐC      | 0,0                 | 0,0 ± 0 <sup>a</sup>           | 0,0 ± 0 <sup>a</sup>           | 0,0 ± 0 <sup>a</sup>           | 0,0 ± 0 <sup>a</sup>           | 0,0 ± 0 <sup>a</sup>           |

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột có sự khác biệt với mức ý nghĩa  $p=0,01$

#### 4. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3 sinh trưởng tốt ở môi trường có 70 - 100% CSPB, pH= 6, thời gian là 72 giờ trong điều kiện bình tam giác mật số chủng vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3 tối ưu là  $3,1 \times 10^8$  CFU/ml và  $2,7 - 3,1 \times 10^8$  CFU/ml. Canh

trường lên men của chủng vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3 có tiềm năng khử ion  $Ag^+$  thành các hạt nano bạc sinh học sau 48 giờ các hạt nano bạc được sinh tổng hợp thông qua dải cộng hưởng plasmon bề mặt thông qua đo phổ UV-VIS với đỉnh hấp phụ từ 420 - 540 nm. Một số đặc tính của hạt nano bạc được xác định thông qua hình SEM, TEM và điện thế zeta, hạt



nano bạc tạo ra từ canh trường lên men có độ bền cao với điện thế zeta -48,3 mV sau 35 giờ phản ứng. Các kết quả nghiên cứu ở trên đã khẳng định tiềm năng ứng dụng nguồn CSPB trong lên men *A. nosocomialis* CYS-V3 vào công nghệ xanh tạo nano bạc. Đặc biệt, đã xác định nano bạc tổng hợp từ canh trường lên men chủng *A. nosocomialis* CYS-V3 có hoạt tính cao trong kháng trùng tuyến trùng nở và tiêu diệt tuyến trùng tuổi 2.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hiệp hội Hồ tiêu Việt Nam (2025). Báo cáo xuất khẩu hồ tiêu năm 2024.
2. Bộ Nông nghiệp và PTNT (2023). Báo cáo thống kê diện tích hồ tiêu bị bệnh năm 2023.
3. Nguyễn Thị Hồng, Trần Văn Minh, Lê Quốc Phong, Phạm Thị Lan (2021). Hiệu quả của các biện pháp hóa học trong phòng trừ tuyến trùng hồ tiêu. *Tạp chí Bảo vệ Thực vật*, 4, 45 - 50.
4. Le Phuong Dung, Nguyen Vu, Pham Nhan, Nguyen Huy, Nguyen Hien, Le Kha, Le Ham Huy, Nhu Lien, Labarta R. A., de Haan S., Maredia M., Becerra L. A., Ovalle T. (2019). *Characterization of cassava production systems in Vietnam*. Working Paper CIAT, 480, 1 - 54.
5. WorldAtlas. Top Cassava Producing Countries in the World, <https://www.worldatlas.com/articles/top-cassava-producing-countries-in-the-world.html>, truy cập ngày 01 tháng 8 năm 2023.
6. Li Shuran, Wang Jie, Zhang Xiaobo, Chen Yan, Liu Lan (2017). The Industrial Applications of Cassava: Current Status, Opportunities and Prospects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 2282 - 2290.
7. Zhang Min, Li Jing, Wang Hao, Chen Yan, Zhao Lei (2016). Biorefinery Approach for Cassava - Based Industrial Wastes: Current Status and Opportunities. *Bioresource Technology*, 215, 50 - 62.
8. Nair M. P. D., Padmaja G., Moorthy S. N. (2011). Biodegradation of Cassava Starch Factory Residue Using a Combination of Cellulases, Xylanases and Hemicellulases. *Biomass and Bioenergy*, 35, 1211 - 1218.
9. Zheng Yan, Wang Lin, Chen Min, Liu Hong, Zhang Xin (2020). Effect of Cassava Residue Substituting for Crushed Maize on *in vitro* Ruminant Fermentation Characteristics of Dairy Cows at Mid-Lactation. *Animals*, 10, 893.
10. Jo Young-Ki, Kim Byung-Ho, Jung Geunwoo (2009). Antifungal Activity of Silver Ions and Nanoparticles on Phytopathogenic Fungi. *Plant Disease*, 93(10), 1037 - 1043.
11. Khezerlou Amir, Alizadeh-Sani Mohammad Reza, Amiri Shahram, Maleki Dizaj Shapour, Sharifi Abolfazl (2021). Silver Nanoparticles and Their Antimicrobial Applications in Agriculture and Food Industry: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(1), 1 - 21.
12. Đỗ Văn Chung, Phan Tứ Quý, Hồ Nhật Được, Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Văn Bốn (2024). *Nghiên cứu tạo hạt nano bạc bằng công nghệ lên men chủng vi khuẩn Acinetobacter nosocomialis CYS-V3 phân lập tại Vườn Quốc gia Chư Yang Sin*. Hội nghị Khoa học toàn quốc về Công nghệ Sinh học, Công nghệ vi sinh, thực phẩm và môi trường, 652 - 658.
13. Luan Quang, Nguyen Thi Mai, Tran Van Long, Pham Van Binh, Doan Thi Hoa (2005). Biological Effect of Irradiated Chitosan on Plant *in vitro*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 41, 49 - 57.
14. Aravind Suresh, Kumar Pradeep, Rao Mahesh (2016). A modified bioassay for *Meloidogyne* spp. J2 Mortality on agar Plates. *Journal of Nematology Sciences*, 48(2), 123 - 130.
15. Chen Li, Zhang Yan, Li Xiaomei (2018). Improved J2 Mortality Assay Using Plant Root Exudates. *Nematology Research*, 50(3), 201 - 210.
16. Dong Yaohua, Zhu Hao, Shen Yujie, Zhang Wei, Zhang Lin (2019). Antibacterial activity of silver nanoparticles of different particle size against *Vibrio natriegens*. *PLoS One*, 14(9), e0222322.
17. Quynh Đình Thi, Trần Thị Quỳnh Anh, Nguyễn Thị Thảo (2007). Optimization of certain culture conditions for marine microorganism strain *Acinetobacter* sp. QN6 producing protease. *Journal of Biotechnology*, 5, 1987 - 1996.
18. Ajith P., Murali A. S., Sreehari H., Vinod B. S., Anil A., Smitha C. S. (2019). *Green synthesis of silver nanoparticles using Calotropis gigantea extract and its applications in antimicrobial and larvicidal*

activity. *Materials Today: Proceedings*, 18, 4987 - 4991. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.07.491>.

19. Kalimuthu K., Babu S., Venkataraman D., Mohd Yusuf S., Gurunathan S. (2008). Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65, 150 - 153.

20. Rajivgandhi G. N., Ramachandran G., Kanisha C. C., Alharbi N. S., Kadaikunnan S., Khaled J. M., Alanzi K. F., Li W. J. (2021). *Effect of Ti and Cu doping on the structural, optical, morphological and anti-bacterial properties of nickel ferrite nanoparticles*. *Results in Physics*, 23, 104065. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2021.104065>.

21. Ho Dinh Quang, Chu Thi Thuy Dung, Nguyen Thi Quynh Giang, Nguyen Hoa Du, Le The

Tam (2020). Study on the synthesis of silver-chitosan nanoparticles by in-situ coating method oriented for plant disease control formulation. *Journal of Science*, 49(4A), 51 - 59.

22. Baronia R., Kumari A., Rai A., Singh S., Prasad R. (2020). Silver nanoparticles as a potential nematocide against *Meloidogyne graminicola*. *Journal of Nematology*, 52, e2020-02. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2020-002>.

23. Hassan M. E. M., Zawam H. S., El-Nahas E. M., Desoukey A. F. (2016). Comparison study between silver nanoparticles and two nematocides against *Meloidogyne incognita* on tomato seedlings. *Plant Pathology Journal*, 15(3), 144 - 151. <https://doi.org/10.3923/ppj.2016.144.151>.

# STUDY ON THE APPLICATION OF WHEAT FLOUR RESIDUE IN THE FERMENTATION OF *Acinetobacter nosocomialis* CYS-V3 FOR BIOSYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES AND EVALUATION OF THEIR POTENTIAL AGAINST ROOT - KNOT NEMATODES ON BLACK PEPPER

Do Van Chung <sup>1,2</sup>, Phan Tu Quy <sup>3</sup>, Nguyen Van Bon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology and Environment, Tay Nguyen University*

<sup>2</sup>*Western Highlands Agriculture and Forestry Scientific Institute*

<sup>3</sup>*Department of Science and Technology, Tay Nguyen University*

## Abstract

The bacterial strain *Acinetobacter nosocomialis* CYS-V3 has the potential for extracellular biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs) with potential inhibitory, nematocidal and fungicidal activity against *Meloidogyne* spp. and *Phytophthora* spp. fungi that are harmful to black pepper (*Piper nigrum*) plants. Biogenic AgNPs offer a safe and environmentally friendly alternative to chemical pesticides. To date, the application of wheat flour residue for culturing *A. nosocomialis* CYS-V3 in AgNPs production via fermentation remains limited. Most existing studies have employed commercial nutrient media as carbon/nitrogen sources for the fermentation process. Aiming to reduce production costs and generate environmentally benign products, cassava starch processing byproduct (CSPB) was utilized as the primary substrate for fermenting *A. nosocomialis* CYS-V3. The results showed that after 72 hours of cultivation under CT4 and CT5 conditions (corresponding to 70% and 100% CSPB, respectively), bacterial densities reached  $3.1 \times 10^8$  CFU/mL and  $2.7 \times 10^8$  CFU/mL. The fermented supernatant of *A. nosocomialis* CYS-V3 was subsequently used for the biosynthesis of silver nanoparticles. Characterization of the nanoparticles indicated that the AgNPs were spherical in shape, exhibited an absorption spectrum within the range of 420 - 540 nm with a maximum peak at 400 nm, had a small particle size (86.5 nm), and demonstrated high stability with a zeta potential of -48.3 mV. The biosynthesized AgNPs in this study exhibited strong inhibitory efficacy (100%) against nematode egg hatching after 3 days of incubation, and second-stage juvenile nematodes at a concentration of 1.25 ppm AgNPs after 5 days of incubation.

**Keywords:** *A. nosocomialis* CYS-V3, CSPB, green-synthesized AgNPs, fermentation.

**Ngày nhận bài:** 10/4/2025

**Ngày gửi phản biện:** 12/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 25/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 25/6/2025

# NGHIÊN CỨU QUẦN XÃ TUYẾN TRÙNG KÝ SINH CÂY SẦU RIÊNG Ở MỘT SỐ VÙNG CANH TÁC CHÍNH TẠI ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Trần Vũ Phấn<sup>1</sup>, Đặng Quốc Huy<sup>2</sup>, Nguyễn Trường Vũ<sup>2</sup>, Huỳnh Văn Sáu<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Khoa Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Cựu sinh viên ngành Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>3</sup> Học viên cao học ngành Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Cần Thơ

\*Email: tvphen@ctu.edu.vn

## TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện trong 2 năm (2022 - 2024) tại huyện Phong Điền và Thới Lai (thành phố Cần Thơ) và huyện Cai Lậy (tỉnh Tiền Giang) và một số địa bàn khác, với trên 80 mẫu đã được khảo sát. Tuyến trùng được ly trích từ mẫu đất và rễ theo phương pháp Bearmann (dish) cải tiến, xác định mật số hiện diện và thành phần tuyến trùng ký sinh dựa vào các đặc điểm hình thái và các số đo hình thái lượng. Đặc điểm của quần xã tuyến trùng ký sinh cũng được xác định dựa vào các chỉ số sinh thái. Kết quả ghi nhận có 12 giống tuyến trùng hiện diện, trong đó, giống *Pratylenchus* với chỉ số giá trị ưu thế (PV) cao nhất (855,96), tiếp đến là *Basiria* (260,31) và *Helicotylenchus* (134,40). Dựa theo tập tính ký sinh trên cây sầu riêng, *Pratylenchus* và *Helicotylenchus* được đánh giá có tiềm năng gây hại, với mật số trung bình trong đất (con/100 g đất) đạt 85,60, 13,44; trong rễ (con/5 g rễ) là 56,80 và 0,66; tuy chưa đạt tới ngưỡng kinh tế nhưng cần được nghiên cứu thêm về khả năng gây hại của chúng, nhất là giai đoạn cây con. Giống *Helicotylenchus* và *Pratylenchus* xuất hiện ở tất cả các nhóm độ tuổi của cây sầu riêng, riêng *Pratylenchus* xuất hiện với mật số cao ở nhóm cây có độ tuổi từ 1 - 3 năm. Bên cạnh đó, loài *Radopholus* sp. cũng được ghi nhận trong đất và rễ cây sầu riêng ở huyện Cai Lậy, tỉnh Tiền Giang, tuy chỉ với mật số tương đối (RD) thấp (0,37%), nhưng có tiềm năng gây hại cao của nhóm nội ký sinh di động. Do có sự tích lũy mật số của tuyến trùng theo thời gian nên cần có những khuyến cáo ngăn ngừa phát tán và phòng trị phù hợp, góp phần định hướng cho công tác quản lý các đối tượng gây hại này trong canh tác cây sầu riêng theo hướng an toàn và bền vững.

**Từ khóa:** Cai Lậy, Phong Điền, sầu riêng, Thới Lai, quần xã tuyến trùng.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Với vai trò là một loại cây ăn quả xuất khẩu quan trọng, sầu riêng (*Durio zibethinus* L.) đóng góp đáng kể vào nền kinh tế nông nghiệp của vùng đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Đến nay, diện tích sầu riêng cả nước đạt hơn 150.000 ha [1], trong đó ĐBSCL với > 33.200 ha, tập trung ở tỉnh Tiền Giang (21.790 ha), thành phố Cần Thơ (khoảng 5.000 ha, Phong Điền 3.530 ha), tỉnh Hậu Giang (2.500 ha) và ở nhiều tỉnh thành khác. Sầu riêng là một loại cây trồng lâu năm và tác động tiêu cực của tuyến trùng ký sinh gây hại là vấn đề cần được quan tâm [2], tuy nhiên rất ít nghiên cứu về tuyến trùng ký sinh ở loại cây này trên thế giới, chỉ có một số nghiên cứu ở Malaysia và Thái Lan,... [3]. Để quản lý tuyến trùng hiệu quả, việc hiểu rõ đặc điểm của quần xã tuyến trùng ký sinh gây hại cây sầu riêng, đang còn rất hạn chế là rất cần thiết. Nghiên cứu này tập trung vào

việc phân tích về đặc điểm quần xã của tuyến trùng ký sinh liên quan đến cây sầu riêng tại một số vùng canh tác chính ở ĐBSCL, nhằm cung cấp những tiền đề cho việc xây dựng các biện pháp quản lý bền vững, bảo vệ năng suất và chất lượng của cây sầu riêng trong khu vực.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng, địa điểm nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Tuyến trùng ký sinh thực vật liên quan cây sầu riêng.

Địa điểm nghiên cứu: 50 vườn tại thành phố Cần Thơ (huyện Phong Điền: 20, huyện Thới Lai: 30), 20 vườn tại tỉnh Tiền Giang (huyện Cai Lậy: 15, huyện Cái Bè: 5), 10 vườn tại tỉnh Đồng Tháp (huyện Cao Lãnh). Số lượng mẫu được thu dựa trên diện tích canh tác (tương đối).

Địa điểm phân tích mẫu: Phòng Thí nghiệm và Nhà lưới Khoa Bảo vệ thực vật, Trường Nông Nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

## 2.2. Phương pháp

Mẫu phân tích được thu trên các vườn có diện tích > 1.000 m<sup>2</sup>, là mẫu gộp thu từ 5 điểm/vườn, gồm 500 g đất vùng rễ và 5 g rễ cây sầu riêng. Tuyến trùng được tách ra từ đất và rễ theo phương pháp Bearmann cải tiến (petri dish) được mô tả bởi Hallmann và Subbotin (2018) [4]. Sau 36 giờ, thu dịch trích chứa tuyến trùng, để lắng và gạn bớt nước thừa và khảo sát trên lame đếm dưới kính hiển vi nhằm ghi nhận: Thành phần giống tuyến trùng ký sinh (dựa vào các khóa phân loại của Mai và cs (1996) [5]; Siddiqi (2000) [6]) và đếm số lượng tuyến trùng của mỗi giống.

Nghiên cứu phân bố về giống tuyến trùng theo tuổi cây, được thực hiện tại huyện Thới Lai (30 vườn); nghiên cứu phân bố về giống tuyến trùng theo vùng canh tác được phân tích dựa trên các mẫu thu ở các huyện: Thới Lai, Phong Điền và Cai Lậy dựa trên các chỉ số sinh thái quần thể.

Tính toán các chỉ số sinh thái học quần thể tuyến trùng (mật số tương đối, relative density - RD), tần suất tuyệt đối (absolute frequency - AF), tần suất tương đối (relative frequency - RF), chỉ số giá trị ưu thế (prominence value - PV) theo Norton (1978) [7].

$$RD (\%) = \frac{\text{Số cá thể một giống trong mẫu}}{\text{Tổng số cá thể trong một mẫu}} \times 100$$

$$AF (\%) = \frac{\text{Số mẫu có một giống}}{\text{Tổng số mẫu đã thu}} \times 100$$

$$RF (\%) = \frac{\text{Tần suất tuyệt đối của một giống (AF)}}{\text{Tổng tần suất xuất hiện của tất cả các giống}} \times 100$$

$$PV = \text{Mật số} \times \sqrt{\text{Tần suất}}$$

PV là một chỉ số giúp đánh giá mức độ quan trọng của một loài/giống tuyến trùng.

Tất cả số liệu liên quan đến mật số, các chỉ số sinh thái học của quần xã tuyến trùng ký sinh, hình thái định lượng được xử lý nhờ vào phần mềm MS. Excel.

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Đặc điểm phân bố của tuyến trùng trên cây sầu riêng

#### 3.1.1. Phân bố về giống/loài tuyến trùng trong đất

Quan phân tích các mẫu đất tại các vườn sầu riêng, giống tuyến trùng *Pratylenchus* có giá trị PV cao nhất (855,96), do hiện diện phổ biến với RF cao (25,99%) và RD cao (52,75%). Ở Thái Lan, mật số cao trong đất và rễ của loài *P. coffeae* đi cùng với triệu chứng rễ cây sầu riêng con bị gây hại nghiêm trọng [8]. Giống *Basiria* có PV cao (PV = 260,31), với RD đạt 16,04%, mật số trung bình đạt 130,16 con/100 g đất. Giống *Helicotylenchus* có chỉ số giá trị ưu thế khá cao (134,40) trong nghiên cứu này cũng được ghi nhận trong nghiên cứu Orwa và cs (2009) [3], Brown (1997) [9], nhưng không có thông tin về khả năng gây hại. Giống *Tylenchus* tuy có PV khá cao (161,83), nhưng do ngoài chủ yếu lấy dinh dưỡng từ ngoại biểu bì và rễ lông hút của rễ cây, còn có thể lấy dinh dưỡng từ nấm, tảo, thường được đánh giá là không có tiềm năng gây hại quan trọng [10, 11]. Giống *Tylenchorhynchus* có PV là 79,10, với RD trong đất là 7,91 con/100 g đất. Các giống còn lại có PV thấp ( $\leq 34,40$ ), bao gồm giống *Meloidogyne* (PV = 16,94).

**Bảng 1. Một số đặc điểm sinh thái học quần thể của tuyến trùng ký sinh hiện diện trong đất vườn sầu riêng tại thành phố Cần Thơ, tỉnh Tiền Giang và tỉnh Đồng Tháp**

| STT | Tên giống              | Mật số trung bình $\pm$ SE (con/100 g đất) | RD (%) | AF (%) | RF (%) | PV     |
|-----|------------------------|--------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| 1   | <i>Basiria</i>         | 26,03 $\pm$ 0,6                            | 16,04  | 20,00  | 7,05   | 260,31 |
| 2   | <i>Criconemella</i>    | 1,48 $\pm$ 1,5                             | 0,91   | 13,75  | 4,85   | 14,77  |
| 3   | <i>Gracilacus</i>      | 2,81 $\pm$ 0,1                             | 1,73   | 6,25   | 2,20   | 28,13  |
| 4   | <i>Helicotylenchus</i> | 13,44 $\pm$ 1,0                            | 8,28   | 38,75  | 13,66  | 134,40 |
| 5   | <i>Hoplolaimus</i>     | 0,13 $\pm$ 24,6                            | 0,08   | 1,25   | 0,44   | 1,25   |
| 6   | <i>Meloidogyne</i>     | 1,69 $\pm$ 17,6                            | 1,04   | 13,75  | 4,85   | 16,94  |

|    |                         |             |       |       |       |        |
|----|-------------------------|-------------|-------|-------|-------|--------|
| 7  | <i>Pratylenchus</i>     | 85,60 ± 2,4 | 52,75 | 73,75 | 25,99 | 855,96 |
| 8  | <i>Radopholus</i>       | 0,61 ± 1,4  | 0,37  | 1,25  | 0,44  | 6,06   |
| 9  | <i>Rotylenchulus</i>    | 2,96 ± 11,5 | 1,82  | 13,75 | 4,85  | 29,60  |
| 10 | <i>Tylenchorhynchus</i> | 7,91 ± 2,4  | 4,87  | 26,25 | 9,25  | 79,10  |
| 11 | <i>Tylenchus</i>        | 16,18 ± 1,2 | 9,97  | 61,25 | 21,59 | 161,83 |
| 12 | <i>Xiphinema</i>        | 3,44 ± 0,6  | 2,12  | 13,75 | 4,85  | 34,40  |

Ghi chú: SE (Standard Error): Sai số chuẩn.

### 3.1.2. Phân bố về giống/loài tuyến trùng trong rễ

Qua khảo sát ghi nhận sự hiện diện trong rễ của 3 loài tuyến trùng là *P. coffeae*, *H. crenacauda* và *R. duriophilus* (Bảng 2), cả ba loài này cũng hiện diện trong đất (Bảng 1) cho phép nhận định chúng đều thuộc nhóm nội ký sinh di động [12, 13] và có mối quan hệ ký sinh với cây sầu riêng. *P. coffeae* thuộc nhóm nội ký sinh rễ có vòng đời trung bình khoảng 27 ngày ở nhiệt độ 25 - 30°C [12], với PV đạt 613,57, mật số trung bình 76,85 con/5 g rễ) và RD 36,67% nên mật số có thể tăng nhanh trong điều kiện của

ĐBSCL. Bên cạnh đó, giống *Helicotylenchus* với khả năng nội ký sinh nên cũng có tiềm năng gây hại cho cây sầu riêng. Giống *Meloidogyne* là nội ký sinh cố định trong rễ cũng được ghi nhận nhưng với mật số rất thấp (12,56 con/5 g rễ, PV = 42,11) và cũng không phát hiện có sự hiện diện con cái trong các mẫu rễ khảo sát, ngay cả những rễ có biểu hiện triệu chứng tương tự như bấu rễ, mặt khác chưa có kết quả nghiên cứu nào ghi nhận sự gây hại của tuyến trùng này trên cây sầu riêng nên có thể không là ký sinh quan trọng trên cây sầu riêng ở vùng khảo sát.

**Bảng 2. Một số đặc điểm sinh thái học quần thể của tuyến trùng ký sinh hiện diện trong rễ cây sầu riêng tại thành phố Cần Thơ, tỉnh Tiền Giang và tỉnh Đồng Tháp**

| STT | Tên giống              | Mật số trung bình ± SE (con /5 g rễ) | RD (%) | AF (%) | RF (%) | PV     |
|-----|------------------------|--------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| 1   | <i>Helicotylenchus</i> | 0,66 ± 14,3                          | 1,10   | 3,75   | 4,69   | 6,63   |
| 2   | <i>Meloidogyne</i>     | 1,41 ± 16,4                          | 2,35   | 11,25  | 14,06  | 14,13  |
| 3   | <i>Pratylenchus</i>    | 56,80 ± 1,3                          | 94,42  | 63,75  | 79,69  | 527,50 |
| 4   | <i>Radopholus</i>      | 1,28 ± 0,4                           | 2,13   | 1,25   | 1,56   | 12,81  |

Ghi chú: SE (Standard Error): Sai số chuẩn.

Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên được phát hiện loài *Radopholus* sp., mà qua định danh dựa trên hình thái có thể là *R. duriophilus*, trên cây sầu riêng ở ĐBSCL, tuy với RD tần suất tương đối rất thấp (1,25%) (ứng với 1 vườn ở huyện Cai Lậy, tỉnh Tiền Giang/80 vườn khảo sát), nhưng có RD (%) khá cao (48,91%). *R. duriophilus* là loài tuyến trùng ký sinh được ghi nhận gây hại nặng trên cây sầu riêng tại vùng đất Tây Nguyên, nơi đây tuyến trùng này có thể làm chết cây con và làm cây suy tàn đối với những vườn mà cây bị nhiễm bởi loài này [14], nên cần được đặc biệt quan tâm.

Do các giống tuyến trùng có thể khác nhau về các đặc điểm sinh học, sinh thái, nên quần thể tuyến trùng ký sinh ghi nhận được từ các mẫu được khảo sát điều kiện sinh thái khác nhau của các vùng canh tác, độ tuổi cây, kỹ thuật canh tác,... có thể có những đặc điểm riêng.

### 3.2. Phân bố về giống/loài tuyến trùng theo tuổi cây

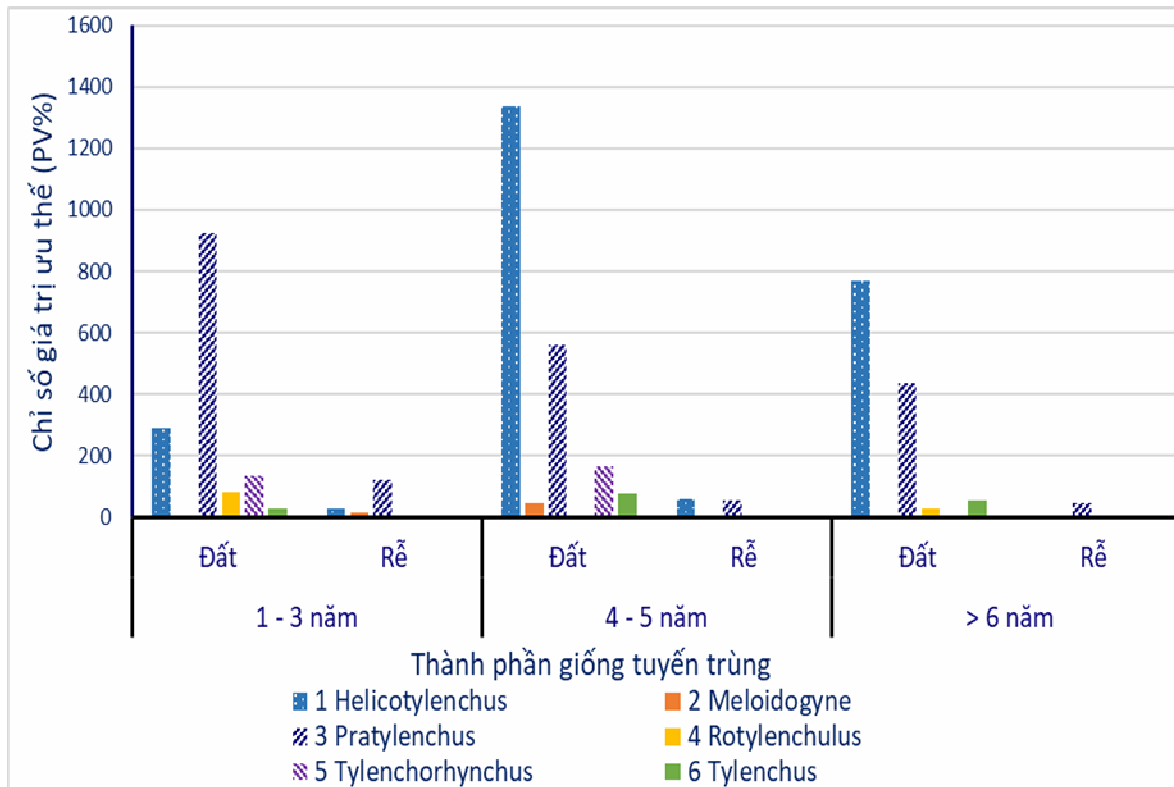
\* Trong đất: Kết quả khảo sát tại huyện Thới Lai (thành phố Cần Thơ) ghi nhận thành phần tuyến trùng ký sinh thực vật hiện diện ở các độ tuổi của cây không khác biệt rõ. Trong đó, ba giống tuyến trùng *Pratylenchus*, *Helicotylenchus* và *Tylenchus* đều xuất hiện ở tất cả các nhóm độ tuổi của cây, tuy nhiên với PV khá khác nhau tùy theo nhóm tuổi cây.

Đối với nhóm cây có độ tuổi từ 1 - 3 năm tuổi, giống *Pratylenchus* có chỉ số giá trị ưu thế cao nhất (992,61) so với các giống còn lại, giống tuyến trùng này cũng có mật số trung bình cao (48,18 con/100 g đất) với tần suất cao nhất (91,67%); theo sau đó là giống tuyến trùng *Helicotylenchus* với PV là 291,09, mật số 20 con/100 g đất, tần suất là 50%.

Đối với nhóm cây có độ tuổi từ 4 - 5 năm, *Helicotylenchus* có PV cao (1335,25), mật số trung bình cao (95 con/100 g đất); giống *Pratylenchus* có

PV là 559,73 và mật số trung bình khá cao là 73,29 con/200 g đất. Duy nhất ở nhóm cây độ tuổi này có

sự xuất hiện của giống *Meloidogyne*, tuy nhiên mật số và tần suất rất thấp.



Hình 1. Phân bố về mức độ ưu thế của giống/loài tuyến trùng ký sinh theo tuổi cây

Đối với nhóm cây có độ tuổi từ 6 năm trở lên, *Helicotylenchus* có PV là 770,75 và mật số cao (55 con/100 g đất), tần suất (50%); giống *Pratylenchus* với mật số trung bình là 27 con/100 g đất và PV đứng thứ hai là 436,83. Những giống còn lại là *Rotylenchulus* và *Tylenchus*. Giống *Tylenchorhynchus* không có sự hiện diện ở nhóm cây này.

Nhìn chung, *Helicotylenchus* có PV tương đối đều ở tất cả các nhóm tuổi, nhưng cao hơn ở nhóm cây có độ tuổi 4 - 5 năm; giống *Pratylenchus* có PV cao hơn ở nhóm cây có độ tuổi từ 1 - 3 năm; giống *Tylenchorhynchus* xuất hiện ở cả nhóm cây từ 1 - 5 năm tuổi nhưng không quá cao (PV = 136 - 163).

\* Trong rễ: Theo kết quả trình bày ở hình 1, ba giống được ghi nhận hiện diện trong rễ là *Helicotylenchus*, *Meloidogyne* và *Pratylenchus*. *Pratylenchus* xuất hiện phổ biến ở các độ tuổi cây, với PV có xu hướng giảm dần theo độ tuổi của cây là 120,71; 55,99; 43,89. Giống *Helicotylenchus* xuất hiện ở 2 nhóm cây, ở nhóm cây có độ tuổi 1 - 3 năm có tần suất 6,67%, với mật số trung bình (10 con/5 g rễ), nhóm cây có độ tuổi 4 - 5 năm có tần suất 3,33%, giảm so với nhóm độ tuổi 1 - 3 năm với mật số trung bình

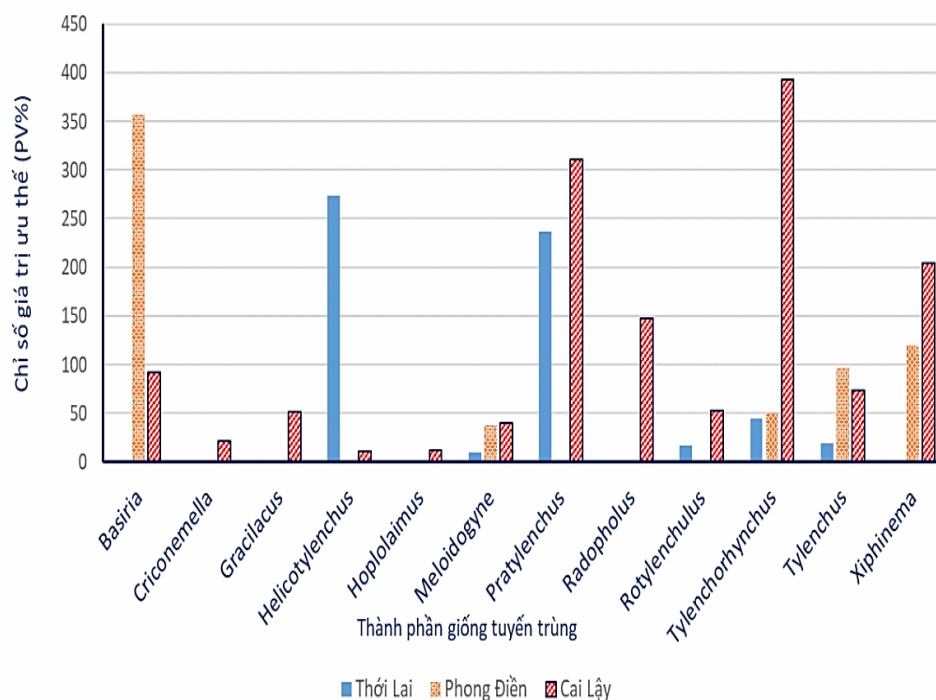
(33 con/5 g rễ), không có sự hiện diện của giống này ở nhóm cây trên 6 năm tuổi. Giống *Meloidogyne* chỉ xuất hiện ở độ tuổi 1 - 3 năm với tần suất (3,33%) mật số trung bình (7 con/5 g rễ) rất thấp, không đáng kể.

### 3.3. Phân bố về giống/loài tuyến trùng theo vùng canh tác

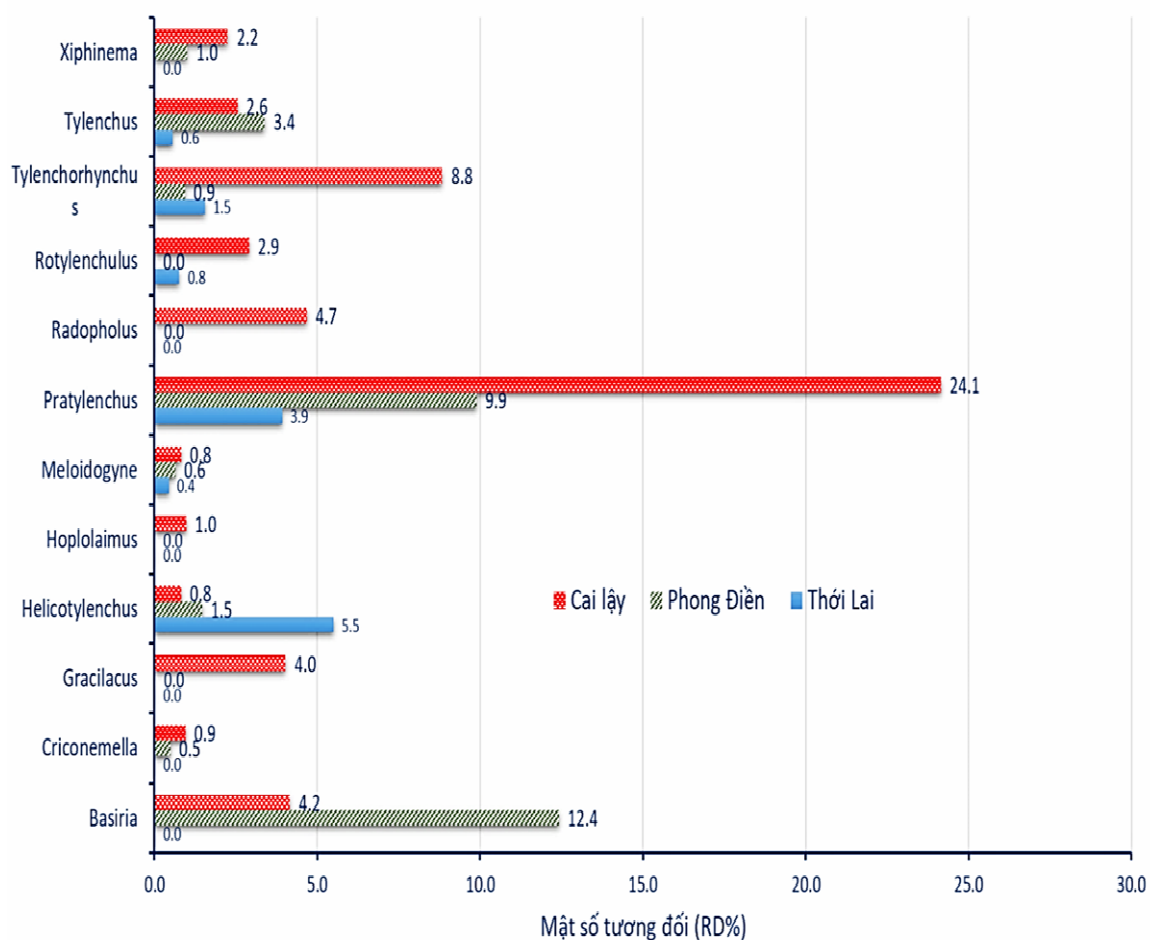
Từ nhiều nguồn thông tin và qua điều tra nông dân, có thể nhận định chung về 3 vùng điều tra khảo sát như sau: Huyện Thới Lai là vùng mới phát triển trồng sầu riêng trong những năm gần đây, huyện Phong Điền có tuổi vườn lâu hơn và huyện Cai Lậy (tỉnh Tiền Giang) là vùng có tập quán canh tác sầu riêng lâu năm. Đặc điểm của quần xã tuyến trùng ký sinh (chỉ số giá trị ưu thế, tần suất tương đối (%) và mật số tương đối (%)) tại 3 vùng khảo sát được trình bày qua hình 2 và 3.

Từ hình 2 có thể thấy, thành phần tuyến trùng và mức độ ưu thế ở huyện Cai Lậy có khuynh hướng cao hơn so với huyện Phong Điền và thấp nhất là ở huyện Thới Lai. Như vậy, có thể có sự tích tụ tuyến trùng ký sinh theo thời gian khi có sự hiện diện của cây trồng ký chủ [15]. Đây là vấn đề cần quan tâm, do sầu riêng là loại cây trồng lâu năm.





Hình 2. Phân bố về giá trị ưu thế của giống/ loài tuyến trùng ký sinh theo vùng canh tác



Hình 3. Phân bố về mật số tương đối của giống tuyến trùng ký sinh theo vùng canh tác

Hình 3 cũng cho thấy, mật số tương đối của loài tuyến trùng có tiềm năng gây hại cao, như *Pratylenchus*, đặc biệt là loài *Radopholus* sp., mà qua định danh dựa trên hình thái có thể là *R. duriophilus*, đây là vấn đề cần được quan tâm để có biện pháp quản lý hiệu quả đối tượng gây hại này.

### 3.4. Thảo luận

Tuyến trùng ký sinh thực vật đã được chứng minh là tác nhân gây hại quan trọng trong sản xuất, nhưng tác hại này thường được đánh giá thấp [2, 16]. Sầu riêng là một loại cây trồng lâu năm, bộ rễ rất phát triển, tuy nhiên rễ sầu riêng không có rễ lông hút. Các bệnh được đánh giá là quan trọng nhất trên sầu riêng dẫn đến thối rễ, thân và quả là do nấm *Phytophthora palmivora*, có mặt khắp nơi trong đất, mô ký chủ luôn hiện diện trong đất và có nhiều tác nhân hại rễ khác bao gồm tuyến trùng ký sinh mở đường cho sự xâm nhiễm của mầm bệnh [15].

Cho đến nay, vẫn chưa có nhiều công bố chi tiết về tuyến trùng ký sinh gây hại trên cây sầu riêng. Tiềm năng gây hại của tuyến trùng ký sinh còn phụ thuộc vào loài tuyến trùng ký sinh, mật số hiện diện, tình trạng sức khỏe và giai đoạn phát triển của cây và các điều kiện môi trường [17]. Kết quả nghiên cứu này khẳng định loài *Pratylenchus* sp. là nội ký sinh di động [12], mặt khác, theo Hunt và cs (2018) [18], ở một số giống tuyến trùng, bao gồm *Helicotylenchus*, tùy thuộc vào cây chủ, có thể thích ứng với kiểu ký sinh khác nhau và trong trường hợp này loài *Helicotylenchus* sp., được ghi nhận hiện diện cả trong đất và rễ, cho phép nhận định chúng cũng là nội ký sinh di động trên sầu riêng, chúng có tiềm năng gây hại cao cho cây sầu riêng trong vùng khảo sát.

Trong quản lý thiệt hại do tuyến trùng ký sinh, quyết định sẽ áp dụng biện pháp kiểm soát cần dựa vào ngưỡng thiệt hại kinh tế (ETL: economic threshold level), tuy nhiên đến nay vẫn chưa có công bố nào về ETL cho cây sầu riêng. Theo Ravichandra (2014) [19], ETL đối với hầu hết các loại cây trồng của *Pratylenchus* là 500 – 1.000 con/100 ml đất và đối với *Helicotylenchus* là 300 - 500 con/100 ml đất. Trong khảo sát này, trừ 4 vườn ở huyện Cai Lậy, mật

số các giống tuyến trùng ghi nhận trong khảo sát này có vẻ chưa đạt tới ngưỡng ETL. Tuy nhiên, mật độ tuyến trùng ban đầu (Pi), nhiệt độ và thời gian quyết định tốc độ gia tăng mật số do tích lũy và ảnh hưởng gây hại tích lũy của tuyến trùng trong suốt vòng đời sản xuất của cây lâu năm làm cây trồng bị suy yếu dần [17]. Mặt khác, do hầu hết thiệt hại trên cây trồng lâu năm đều liên quan đến giai đoạn cây con [20], nên cần đặc biệt lưu ý quản lý tuyến trùng ở giai đoạn vườn ươm hoặc vườn mới trồng. *P. coffeae* có khả năng sinh sản cao nhất ở nhiệt độ đất khoảng 26 - 30°C, với vòng đời chưa đầy một tháng và có thể đạt mật số rất cao tới 10.000 con tuyến trùng/1 g rễ [21, 22]. Điều kiện thời tiết và khí hậu của ĐBSCL, nhìn chung, không phải là yếu tố giới hạn đối với cây sầu riêng, là cây trồng lâu năm, là nguồn thức ăn cần cho sự sinh trưởng và phát triển nhân mật số của tuyến trùng ký sinh, bao gồm các giống/loài được ghi nhận từ nghiên cứu này; đáng quan tâm hơn nữa là khi có tương tác xảy ra giữa tuyến trùng mở đường cho sự xâm nhiễm và gây bệnh của các mầm bệnh có nguồn gốc từ đất cho cây sầu riêng [15].

### 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Qua khảo sát các mẫu đất và mẫu rễ được thu thập ở các vườn canh tác cây sầu riêng tại thành phố Cần Thơ và tỉnh Tiền Giang, xác định được sự hiện diện của 12 giống tuyến trùng có liên quan đến cây sầu riêng, trong đó 4 giống có ưu thế cao được xác định là *Pratylenchus*, *Helicotylenchus*, *Tylenchorhynchus* và *Radopholus*.

Giống *Helicotylenchus* và *Pratylenchus* xuất hiện ở tất cả các nhóm độ tuổi của cây sầu riêng, riêng *Pratylenchus* xuất hiện với mật số cao ở nhóm cây có độ tuổi từ 1 - 3 năm.

Có sự tích tụ mật số và thành phần tuyến trùng theo thời gian, nên có thêm các nghiên cứu về ngưỡng thiệt hại của một số giống/loài tuyến trùng ký sinh quan trọng trên cây sầu riêng, nhất là ở giai đoạn cây còn nhỏ để có biện pháp quản lý phù hợp.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Thu Hiền (2025). Sầu riêng - ngôi sao nông sản trên con đường xuất khẩu tỷ đô. *Tạp chí Con số & Sự kiện (Tạp chí Kinh tế - Tài chính)*, Bộ Tài

chính). <https://consosukien.vn/sau-rieng-ngoi-sao-nong-san-tren-con-duong-xuat-khau-ty-do.htm>, truy cập 12/5/2025.

2. Sikora R. A., Coyne D., Hallmann J., Timper P. (2018). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. CABI.

3. Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R, Simons A. (2009). *Durio zibetinus*. Agroforestry Database: A tree reference and selection guide version 4.0. World Agroforestry Centre, Kenya. <https://www.worldagroforestry.org/output/agroforestry-database> accessed on 16/5/2025.

4. Hallmann J. and Subbotin A. A. (2018). Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes. In: Sikora R. A., Coyne D., Hallmann J., Timper P. (Eds.). Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CAB International, 87 - 119.

5. Mai, W. F., Mullin P.G., Lyon H. H., Loeffler K. (1996). Plant-parasitic nematodes: A pictorial key to genera (5th edition). Cornell University Press. 288 pages.

6. Siddiqi, M. R. (2000). Tylenchida: Parasites of plants and insects (2nd edition). CABI

7. Norton, D. C. (1978). Ecology of Plant Parasitic Nematodes. Wiley, New York.

8. Chanthanao A. (1964). Nematode hypocotyl brown rot of durian. *Kasetsart Journal* 4(1 - 2): 56 - 60.

9. Brown, M. J. (1997). Durio - A Bibliographic Review. In: Arora R. K., Rao V. R. and Rao A. N., (Eds.). International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) office for South Asia, New Delhi.

10. Yeates, G. W., Bongers, T., De Goede, R. G. M., Freckman, D. W. and Georgieva, S. S. (1993). Feeding habits in soil nematode families and genera – an outline for soil ecologists. *Journal of Nematology*, 25(3): 315 - 331.

11. Nguyễn Ngọc Châu và Nguyễn Vũ Thanh (2000). *Động vật chí Việt Nam: Tuyển trùng ký sinh thực vật*, tập 4. Nxb Khoa học và Kỹ thuật. 401 trang.

12. Castillo, P. and Vovlas, N. (2007). *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae): Diagnosis, biology, pathogenicity and management. Brill Leiden–Boston. 37 - 280.

13. Pulavarty A, Egan A, Karpinska A, Horgan K, Kakouli-Duarte T. (2021). Plant parasitic nematodes: A Review on their behaviour, host interaction, management approaches and their occurrence in two sites in the Republic of Ireland. *Plants* (Basel), 10(11): 2352.

14. Chau N. N., Sergei A. S., Mehrdad M., Phap Q. T. and Maurice M. (2003). *Radopholus duriophilus* sp. n. (Nematoda: Pratylenchidae) from Western Highland of Vietnam. *Nematology*, 5: 549 - 558.

15. Drenth, A. and Guest, D. I. (eds.) (2004). Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia. ACIAR Monograph 114, 238p.

16. Jones J T, Haegeman A, Danchin E G, Gaur H S, Helder J, Jones M G, Kikuchi T, Manzanilla-López R, Palomares-Rius J E, Wesemael W M, Perry R N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, 14(9), 946 - 961.

17. Noling J W, Ferris H. (1987). Nematode-degree days, a density-time model for relating epidemiology and crop losses in perennials. *J. Nematol.* 19(1), 108 - 118.

18. Hunt, D. J., Palomares-Rius J. E. and Manzanilla-López, R. H. (2018). Identification, morphology and biology of plant parasitic nematodes. In: Sikora R.A., Coyne D., Hallmann J., Timper P. (Eds.). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. CABI, 20 -61.

19. Ravichandra, N. G. (2014). Horticultural Nematology. Springer India.

20. Sasanelli, N., Konrat, A., Migunova, V., Toderas, I., Iurcu-Straistaru, E., Rusu, S., Bivol, A., Andoni, C. & Veronico, P. (2021). Review on control methods against plant parasitic nematodes applied in Southern Member States (C Zone) of the European Union. *Agriculture*, 11(7), 602.

21. O'Bannon, J. H. and Tomerlin, A. T. (1969). Population studies on two species of *Pratylenchus* on citrus. *Journal of Nematology*, 1, 299 - 300.
22. Radewald J D, O'Bannon J H, Tomerlin A T. (1971). Temperature effects on reproduction and pathogenicity of *Pratylenchus coffeae* and *P. brachyurus* and survival of *P. coffeae* in roots of Citrus jambhiri. *J Nematol*, 3(4), 390 - 394.

## **STUDY ON PLANT-PARASITIC NEMATODE COMMUNITIES ASSOCIATED WITH DURIAN IN SOME MAJOR CULTIVATION AREAS OF THE MEKONG DELTA**

**Tran Vu Phen<sup>1</sup>, Dang Quoc Huy<sup>2</sup>, Nguyen Truong Vu<sup>2</sup>, Huynh Van Sau<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Department of Plant Protection, Can Tho University,

<sup>2</sup> Plant Protection Alumni, Can Tho University

<sup>3</sup> Postgraduate Students of Plant Protection, Can Tho University

### **Abstract**

The research was conducted during 2022 - 2024, in Phong Dien and Thoi Lai districts (Can Tho city) and Cai Lay district (Tien Giang province) and some other areas, with over 80 samples surveyed. Nematodes were extracted from rhizospheric soil and root samples using the improved Bearmann (dish) method; determining the presence and composition of plant parasitic nematodes based on morphological characteristics and morphological measurements. Characteristics of parasitic nematode communities are also determined based on ecological indicators. The results recorded the presence of 12 nematode genera, with *Pratylenchus* exhibiting a high prominence value (PV) (855.96), followed by *Basiria* (260.31) and *Helicotylenchus* (134.40). Based on their parasitic habits on durian, *Pratylenchus* and *Helicotylenchus* are considered to have damage potential; with their average density in soil (individuals/100 g soil) reaching 85.60 and 13.44; and in roots (individuals/5 g root) reaching 56.80 and 0.66, respectively. While these densities have not yet reached economic thresholds, further research on their damage potential is necessary, especially during the seedling stage. *Helicotylenchus* and *Pratylenchus* species were present in all age groups of durian trees, with *Pratylenchus* occurring at high densities in trees aged 1 - 3 years. Additionally, *Radopholus* sp. was also recorded in soil and roots of durian in Cai Lay district, Tien Giang province although only at low relative density (RD) (0.37%), this species possesses high damage potential as a migratory endoparasite. Due to the accumulation of nematode populations over time, appropriate recommendations for preventing their spread and controlling them are needed. This will help guide the management of these pests in durian cultivation towards safe and sustainable way.

**Keywords:** *Durian, Cai Lay, nematode communities, Phong Dien, Thoi Lai.*

**Ngày nhận bài:** 15/4/2025

**Ngày gửi phản biện:** 12/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 30/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 23/6/2025

# KHẢO SÁT THÀNH PHẦN TUYẾN TRÙNG KÝ SINH THỰC VẬT TRÊN CÂY ỔI TẠI HUYỆN CHÂU THÀNH, TỈNH ĐỒNG THÁP

Phạm Văn Lực<sup>1</sup>, Nguyễn Kim Cương<sup>1</sup>,

Nguyễn Thị Thu Nga<sup>1</sup>, Đoàn Thị Kiều Tiên<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

\*Email: dttkien@ctu.edu.vn

## TÓM TẮT

Ổi (*Psidium guajava* L.) là loại cây ăn quả phổ biến được trồng nhiều nơi trên thế giới. Nghiên cứu nhằm khảo sát thành phần tuyến trùng trên 30 vườn trồng ổi tại 8 xã bao gồm: An Khánh, Phú Hữu, Hòa Tân, An Phú Thuận, Phú Long, Tân Nhuận Đông, An Nhơn, An Hiệp của huyện Châu Thành, tỉnh Đồng Tháp. Kết quả điều tra đã ghi nhận thành phần tuyến trùng có 5 loài, 5 giống và 4 họ đều thuộc về bộ Tylenchida. Các loài tuyến trùng trên ổi là *Meloidogyne enterolobii*, *Helicotylenchus dihystra*, *Tylenchorhynchus* sp., *Rotylenchulus reniformis* và *Mesocriconema* sp.. Dựa trên triệu chứng gây hại, mật số và tần suất bắt gặp cho thấy loài tuyến trùng gây hại quan trọng trên cây ổi là loài tuyến trùng *Meloidogyne enterolobii*.

**Từ khóa:** Cây ổi, *Meloidogyne enterolobii*, tuyến trùng.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ổi (*Psidium guajava* L.) là một loại cây trồng giàu dinh dưỡng với hàm lượng vitamin C cao, đồng thời sở hữu các đặc tính như sinh trưởng nhanh, dễ thích ứng với điều kiện môi trường [1]. Vì vậy, ổi được trồng phổ biến nhiều nơi trên thế giới và trở thành một trong những loài cây ăn quả rất được ưa chuộng.

Trong canh tác ổi hiện nay, xuất hiện hiện tượng chết cây, cây sinh trưởng kém và đặc biệt là hiện tượng u bướu dưới rễ chưa tìm được nguyên nhân. Các nghiên cứu trên thế giới ghi nhận, hiện tượng bướu rễ trên cây ổi được cho là do tuyến trùng *Meloidogyne* spp. [2, 3], hoặc sự tương tác của chúng với các mầm bệnh trong đất gây triệu chứng chết trên cây ổi [4]. Bên cạnh đó, vấn đề nghiên cứu tuyến trùng trên ổi tại Việt Nam rất ít được quan tâm. Kết quả nghiên cứu của Lê Thị Mai Linh (2019) [5], đã ghi nhận sự xuất hiện *M. enterolobii* trên cây ổi ở vùng Tây Nguyên và tuyến trùng này cũng được ghi nhận ở tỉnh Hải Dương [6]. Tại đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), trong thời gian qua đã ghi nhận các hiện tượng chết cây hàng loạt và bướu rễ trên ổi. Hiện tượng này xuất hiện và gây hại nghiêm trọng đối với các vùng trồng ổi trọng điểm ở các tỉnh Vĩnh Long, Sóc Trăng, Bến Tre... Tại tỉnh Vĩnh Long, diện tích trồng ổi chiếm 939 ha, nhưng trong đó có 185 ha (chiếm 20%) ổi xuất hiện triệu chứng vàng lá và chết

cây [7]. Tỉnh Đồng Tháp cũng ghi nhận các hiện tượng tương tự tại hai vùng trồng ổi lớn là huyện Cao Lãnh và Châu Thành [8]. Trên cơ sở đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm bước đầu xác định thành phần tuyến trùng ký sinh trên cây ổi ở huyện Châu Thành, tỉnh Đồng Tháp, từ đó xác định các nhóm tuyến trùng gây hại chính. Kết quả nghiên cứu là cơ sở cho phân tích và làm rõ nguyên nhân của hiện tượng chết cây ổi hiện nay.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Thu thập mẫu: Tổng số 30 vườn ổi khác nhau, có diện tích tối thiểu 1.000 m<sup>2</sup> được thu thập mẫu đất và rễ cho nghiên cứu. Tại mỗi vườn, thu tại 5 điểm theo đường chéo gốc và mỗi điểm thu 3 - 5 gốc ổi (tùy thuộc vào mật độ cây trên vườn). Lấy lượng mẫu khoảng 200 g đất lẫn rễ ở mỗi điểm sao cho khi tổ hợp lại được khoảng 1 kg đất. Lượng đất và rễ ở độ sâu không quá 30 cm và nằm trong vòng tròn khoan xung quanh tán (ghi nhãn ký hiệu cho từng mẫu). Mẫu sau đó được chuyển về phòng thí nghiệm và tiến hành ly trích trong ngày hoặc sau thời điểm thu mẫu 1 ngày.

- Ly trích tuyến trùng: Tách lọc tuyến trùng từ đất theo phương pháp lắng lọc và cho qua rây với các kích thước lỗ rây tương ứng 1; 0,5; 25 µm theo mô tả của Barker (1985) [9] có cải tiến. Mẫu rễ trộn đều và định lượng khối lượng 5 g và đặt trên khay lọc tinh theo phương pháp của Nguyễn Ngọc Châu (2003)

[10]. Những phần rễ có nốt sần được tiến hành phân tách ngay trên kính hiển vi soi nổi để quan sát hình dạng tuyến trùng bươu rễ.

- Định lượng tuyến trùng: Tuyến trùng sau khi được tách lọc từ 500 g đất và 5 g rễ được đếm, định lượng đến giống dưới kính hiển vi soi nổi.

- Phân loại tuyến trùng: Đối với giống tuyến trùng bươu rễ *Meloidogyne*, được phân loại đến mức độ loài dựa trên phân tích đặc điểm hình thái mẫu cutin vùng chậu con cái, đặc điểm của tuyến trùng đực và ấu trùng. Các chi tuyến trùng khác được phân loại dựa trên đặc điểm về hình thái theo các tài liệu phân loại của Nguyễn Ngọc Châu và Nguyễn Vũ Thanh (2000) [11].

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả thành phần tuyến trùng ký sinh trên cây ổi

**Bảng 1. Thành phần loài tuyến trùng ký sinh gây hại trên cây ổi ở huyện Châu Thành, tỉnh Đồng Tháp (năm 2024)**

| STT | Hệ thống phân loại tuyến trùng ký sinh                | Bộ phận |    |
|-----|-------------------------------------------------------|---------|----|
|     | Bộ Tylenchida Thorne, 1949                            | Đất     | Rễ |
|     | Họ Belonolailidae Whitehead, 1960                     |         |    |
|     | Giống <i>Tylenchorhynchus</i> Cobb, 1913              |         |    |
| 1   | <i>Tylenchorhynchus</i> sp.                           | +       |    |
|     | Họ Hoplolaimidae Filipjev, 1934                       |         |    |
|     | Giống <i>Rotylenchulus</i> Linford & Oliveira, 1940   |         |    |
| 2   | <i>R. reniformis</i> Linford & Oliveira, 1940         | +       |    |
|     | Giống <i>Helicotylenchus</i> Steiner, 1945            |         |    |
| 3   | <i>H. dihytera</i> (Cobb, 1893) Sher, 1961            | +       |    |
|     | Họ Criconematidae Thorne, 1949                        |         |    |
|     | Giống <i>Mesocriconema</i> Andrassy, 1965             |         |    |
| 4   | <i>Mesocriconema</i> sp.                              | +       |    |
|     | Họ Meloidogynidae Filipjev, 1934                      |         |    |
|     | Giống <i>Meloidogyne</i> Goeldi, 1892                 |         |    |
| 5   | <i>Meloidogyne enterolobii</i> Yang & Eisenback, 1983 | +       | +  |

Ghi chú: +: Ghi nhận sự hiện diện của tuyến trùng.

Nhóm tuyến trùng ngoại sinh: Tuyến trùng *Helicotylenchus dihytera*, với hình dạng con cái (con đực không tìm thấy) hình xoắn ốc, với chiều dài cơ thể từ 562,5 – 795 µm, chiều dài kim từ 23,8 – 26,3

µm, chiều dài kim hút từ 23,8 - 26,3 µm, DGO từ 10 - 17,5 µm, chiều dài đuôi từ 10 - 18,75 µm, V từ 58 - 75,56% (66,9%) (Hình 1). Tại Việt Nam, tuyến trùng này được Trịnh Quang Pháp và cs (2022) [12] mô tả



đặc điểm hình thái và ghi nhận xuất hiện tại ĐBSCL, tuy nhiên vẫn chưa được ghi nhận hiện diện trên cây ổi. Trong khi đó, kết quả nghiên cứu của Grech (2015) [13] đã ghi nhận sự liên quan của chúng đối với bệnh chết héo trên cây ổi ở Nam Phi hoặc ở Ấn Độ với tần số xuất hiện 90,48% [14].



Hình 1. Hình thái tuyến trùng *Helicotylenchus dihystra*

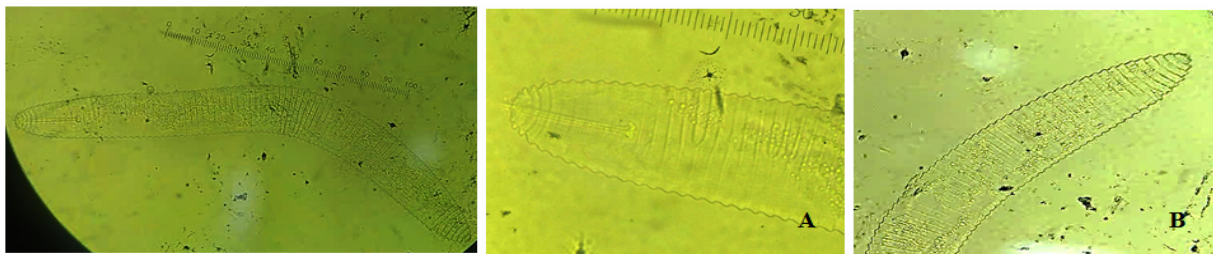
Tuyến trùng ngoại sinh *Tylenchorhynchus* sp. trong mẫu phân tích phù hợp với các đặc điểm đặc trưng cho chi tuyến trùng này theo mô tả của Nguyễn Ngọc Châu và Nguyễn Vũ Thanh (2000) [11], với cơ thể dạng chỉ kim hút mảnh, phần đầu hẹp và hơi lõm xuống, điều giữa tròn đến oval, đuôi hình chóp cụt hoặc chóp tù với nút đuôi nhẵn, tròn phân đốt hoặc không phân đốt, đuôi con cái có nhiều dạng như hình dùi trống, chóp cụt, chóp trụ (Hình 2).



Hình 2. Hình thái tuyến trùng *Tylenchorhynchus* sp.

(A: Phần đầu, B: Phần đuôi)

Đối với tuyến trùng *Mesocriconema* sp. có cơ thể tương đối lớn, cơ thể hình lạp sườn ngắn đến hình trụ, vỏ cutin dày, phân đốt cutin rất thô, kim rất phát triển, to và khỏe, gốc kim dạng mỏ neo, vùng môi hóa kitin rất mạnh (Hình 3). Kết quả nghiên cứu của Kaushal và cs (2024) [14] tại Ấn Độ, đã ghi nhận sự xuất hiện của *Mesocriconema xenoplax* trong vùng rễ cây ổi.



Hình 3. Hình thái tuyến trùng *Mesocriconema* sp.

(A: Phần đầu, B: Phần đuôi)



Hình 4. Hình thái tuyến trùng *Rotylechulus reniformis*

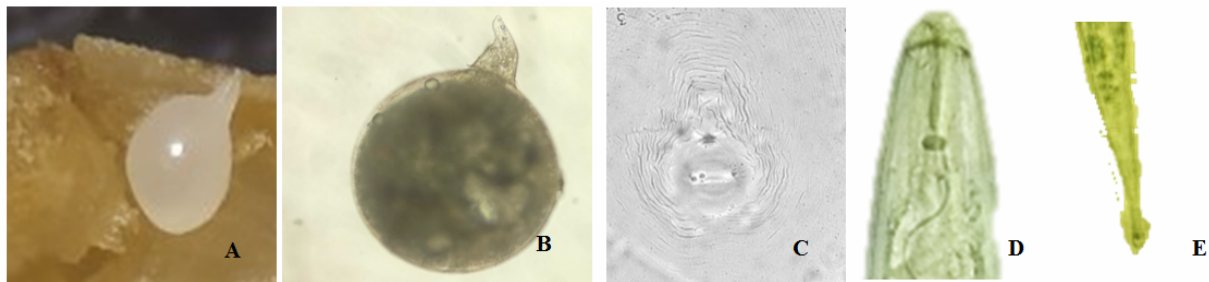
(A: Vùng đầu, B: Vùng đuôi)

Tuyến trùng bán nội ký sinh *Rotylechulus reniformis* có cơ thể hình chữ C mở, kim (stylet) có kích thước trung bình nhưng khỏe, chiều dài đuôi bằng 2 - 3 lần chiều rộng cơ thể tại vùng hậu môn,

thực quản tuyến rất dài, bao phủ phần đầu ruột và thường chủ yếu về phía bụng. Tại Việt Nam chỉ ghi nhận duy nhất loài tuyến trùng này và chúng được biết đến là loài tuyến trùng ký sinh đa thực gây hại trên nhiều loài cây trồng (Hình 4).

Tuyến trùng nội ký sinh không di chuyển *Meloidogyne enterolobii*, hình thái con cái trưởng thành có cơ thể dạng tròn hoặc quả lê, với phần cổ từ ngắn đến hơi dài, với tỷ lệ chiều dài cơ thể trên chiều dài cổ từ 2,1 - 3,8  $\mu\text{m}$  (Hình 5A-B). Đặc điểm tấm cắt cutin có dạng oval, với các vân thô và nhẵn; vòm lưng thường từ trung bình đến cao, thường xuyên có dạng

vuông, một số hơi tròn, đường bên hơi mờ (Hình 5C). Tuyến trùng đực trưởng thành với các đặc điểm đặc trưng như phần đầu cao, tách biệt so với cơ thể. Môi giữa và đĩa môi tạo thành hình quả tạ, đĩa môi ngang so với môi giữa (Hình 5D). Ấu trùng phần đuôi vuốt nhọn, hình chóp đều, phần hyaline dài, rõ ràng, mút đuôi mờ, phasmid to rõ, nằm gần cuối đuôi ở vị trí khoảng 1/4 hyaline tính từ cuối đuôi lên (Hình 5E). Các đặc điểm trên cũng phù hợp với các đặc điểm về loài tuyến trùng này trên cây ổi theo mô tả của Lê Thị Mai Linh (2019) [5], Nguyễn Văn Chung và cs (2022) [6], Yang và Eisenback (1983) [15].



Hình 5. Hình thái tuyến trùng *Meloidogyne enterolobii*

Ghi chú: A - B: Tuyến trùng cái, C: Cấu trúc tấm cutin vùng chầu, D: Vùng đầu tuyến trùng đực, E: Vùng đuôi ấu trùng.

### 3.2. Kết quả mật số tuyến trùng ký sinh trên cây ổi

Mật số tuyến trùng ký sinh trên cây ổi được ghi nhận ở bảng 2. Về mật số tuyến trùng trong đất, tuyến trùng *Meloidogyne enterolobii* hiện diện cao nhất, với có mật số trung bình 315 con/500 g đất, biến động 0 - 1.560 con, tần suất xuất hiện 56,6% (19 vườn trong tổng số 30 vườn). Xếp sau là tuyến trùng *Helicotylenchulus dihystra*, có mật số trung bình trong đất là 199 con, biến động 0 - 810 con, tần số xuất hiện 30%. Các nhóm tuyến trùng còn lại là: *Tylenchorhynchus* sp., *Rotylenchulus reniformis*, *Mesocriconema* sp. có mật số trung bình trong 500 g đất lần lượt là 16 con, 60 con, 7 con, biến động từ 0 - 20 con, 0 - 60 con, 0 - 7 con, tần suất xuất hiện lần lượt là 13,3%, 3,3%, 3,3%. Mật số tuyến trùng trong rễ chỉ xuất hiện chỉ tuyến trùng *Meloidogyne*, với mật số trung bình 2.433 con/5 g rễ, biến động từ 0 - 12.613 con/5 g rễ và có tần suất xuất hiện là 63,3%. Kết quả phân tích ghi nhận sự hiện diện đa số của tuyến trùng *Meloidogyne enterolobii*, đây là loài tuyến trùng đa thực và được ghi nhận là tuyến trùng ký sinh quan trọng trên cây ổi. *M. enterolobii* là loài có mức độ nguy hại cao hơn nhiều so với các loài khác trong giống *Meloidogyne* vì: Đây là loài có phổ ký chủ rộng; loài *M. enterolobii* hiện

nay được ghi nhận đã vượt qua nhiều gen kháng tuyến trùng đang được thương mại hóa rộng rãi như: Mi-1, Mh, Mir1, N gen trên nhiều loại cây trồng [16], [17]; thậm chí các cây họ cà chứa hơn một gen kháng cũng đã bị loài này vượt qua [18].

Sau khi xâm nhập vào trong rễ, tuyến trùng di chuyển đến vùng kéo dài của rễ, rồi cư trú tại vùng mô phân sinh của rễ và bắt đầu quá trình dinh dưỡng. Khi lấy dinh dưỡng, tuyến trùng cắn phần đầu vào các tế bào mô mạch của rễ, tiết enzyme tiêu hóa, làm cho quá trình sinh lý, sinh hóa của mô rễ thay đổi và hình thành các điểm dinh dưỡng cho tuyến trùng [19]. Do rễ bị tổn thương nên cây thường bị còi cọc, vàng lá, héo cây và thậm chí gây chết cây con (Hình 6). Mặt khác, tuyến trùng *Meloidogyne* spp. thường tấn công vào đỉnh sinh trưởng của chóp rễ chính, làm phân hóa tế bào đỉnh sinh trưởng [19]. Vì vậy, rễ cây ổi khi bị nhiễm tuyến trùng *Meloidogyne* spp. thường sần sùi, u sưng và thậm chí là hoại tử mô rễ (Hình 6C). Trong khi đó, tuyến trùng *Helicotylenchulus dihystra* lại dễ dàng được tìm thấy ở vùng rễ cây ổi bị tổn thương, biểu hiện triệu chứng héo úa và thậm chí chết cây (Hình 6D). Chưa có ghi nhận về sự ảnh hưởng đơn của tuyến trùng này liên quan đến triệu chứng chết cây trên ổi, tuy

nhiên mối tương tác của nó với các mầm bệnh được cho là nguyên nhân chết cây đã được chứng minh trong kết quả nghiên cứu của Grech (2015) [13].

Các nhóm tuyến trùng còn lại gồm: *Tylenchorhynchus* sp., *Rotylenchulus reniformis* và *Mesocriconema* sp. hiện diện trong mẫu với mật số thấp và không liên tục. Các nghiên cứu cho thấy, các nhóm tuyến trùng này vẫn được ghi nhận là tuyến trùng liên quan đến cây ổi. Tuy nhiên, rất khó để

chứng minh khả năng gây hại và mức độ ảnh hưởng đến các thông số sinh trưởng của cây ổi khi chúng hiện diện với mật số thấp. Mặt khác, tuyến trùng *Tylenchorhynchus* sp. và *Rotylenchulus reniformis* là tuyến trùng đa ký chủ và được ghi nhận phổ biến trên nhiều loại cây trồng khác nhau [20]. Trong khi đó, tuyến trùng *Mesocriconema* là loài tuyến trùng thường phân bố không liên tục, phổ biến ở đất cát pha và ít tạo quần thể lớn [10].



Hình 6. Một số triệu chứng gây hại của tuyến trùng trên cây ổi

(A: Triệu chứng lá còi cọc, vàng lá; B: Tím rìa lá, C: Bướu rễ, D: Chết cây)

Bảng 2. Mật số tuyến trùng ký sinh trong đất và rễ cây ổi tại huyện Châu Thành, tỉnh đồng Tháp (năm 2024)

| Chi tuyến trùng             | Đất (500 g đất) |            |          | Rễ (5 g rễ) |            |            |
|-----------------------------|-----------------|------------|----------|-------------|------------|------------|
|                             | TSXH (%)        | MSTB (con) | BĐ (con) | TSXH (%)    | MSTB (con) | BĐ (con)   |
| <i>M. enterolobii</i>       | 56,6            | 315        | 0 - 1560 | 63,3        | 2433       | 0 - 12.613 |
| <i>H. dihystra</i>          | 30              | 199        | 0 - 810  |             |            |            |
| <i>Tylenchorhynchus</i> sp. | 13,3            | 16         | 0 - 20   |             |            |            |
| <i>R. reniformis</i>        | 3,3             | 60         | 0 - 60   |             |            |            |
| <i>Mesocriconema</i> sp.    | 3,3             | 7          | 0 - 7    |             |            |            |

Ghi chú: TSXH: Tần suất xuất hiện, MSTB: Mật số trung bình, BĐ: Biến động.

Từ những đặc điểm về triệu chứng gây hại, thành phần, mật số và tần số xuất hiện, có thể kết luận, tuyến trùng gây hại quan trọng trên cây ổi tại huyện Châu Thành, tỉnh Đồng Tháp thuộc về loài tuyến trùng *Meloidogyne enterolobii*.

#### 4. KẾT LUẬN

Qua khảo sát 30 vườn ổi ở các xã khác nhau của huyện Châu Thành, tỉnh Đồng Tháp, đã xác định được 5 loài tuyến trùng có liên quan đến cây ổi bao gồm: *Meloidogyne enterolobii*, *Helicotylenchus dihystra*, *Tylenchorhynchus* sp., *Rotylenchulus reniformis*, *Mesocriconema* sp. Thành phần tuyến

trùng ký sinh thực vật trong đất (con/500 g đất) ghi nhận tất cả 5 loài, tương ứng với mật số và tần suất xuất hiện: *M. enterolobii* (315; 56,5%), *H. dihystra* (199; 30%), *R. reniformis* (60; 13,3%), *Tylenchorhynchus* sp. (16; 3,3%) và *Mesocriconema* sp. (7; 3,3%). Trong rễ chỉ ghi nhận duy nhất loài tuyến trùng *M. enterolobii*, với mật số 2.433 con/5 g rễ, tần suất 63,3%.

Dựa trên triệu chứng gây hại, mật số và tần suất bắt gặp trong đất và rễ đều trên 50%, cho thấy loài tuyến trùng gây hại quan trọng trên cây ổi tại huyện



Châu Thành, tỉnh Đồng Tháp là loài *Meloidogyne enterolobii*.

### LỜI CẢM ƠN

*Đề tài này được tài trợ bởi Trường Đại học Cần Thơ, mã số: T2024-115.*

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hundal, H. S., Singh, D. & Singh, K. (2007). Monitoring nutrient status of guava fruit trees in Punjab, Northwest India through the diagnostic and recommendation integrated system approach. *Communications in soil science and plant analysis*, 38(15 - 16), 2117 - 2130.
2. Carneiro, R. M. D. G., De Freitas, V. M., Mattos, J. K., Castro, J. M. C., Gomes, C. B. & Carneiro, R. G. (2012). Major guava nematodes and control prospects using resistance on *Psidium* spp. and non-host crops. *In: III International Symposium on Guava and other Myrtaceae*, 959, 41 - 49.
3. Khan, M. R., Poornima, K., Somvanshi, V. S. & Walia, R. K. (2022). *Meloidogyne enterolobii*: A threat to guava (*Psidium guajava*) cultivation. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 55(17), 1961 - 1997.
4. Gomes, V. M., R. M., Mussi-Dias, V., Silveira, S. F. D. & Dolinski, C. (2011). Guava decline: A complex disease involving *Meloidogyne mayaguensis* and *Fusarium solani*. *Journal of Phytopathology*, 159(1): 45 - 50.
5. Lê Thị Mai Linh (2019). Nghiên cứu sự đa dạng tuyến trùng ký sinh gây sần rễ *Meloidogyne* spp. ở Tây Nguyên. Luận án Tiến sĩ Sinh học. Học viện Khoa học và Công nghệ, 186 trang.
6. Nguyễn Văn Chung, Nguyễn Mạnh Hùng, Nguyễn Hồng Tuyên, Nguyễn Thúy Hạnh, Nguyễn Thị Thúy và Tạ Hoàng Anh (2022). Tuyến trùng nốt sần *Meloidogyne* sp. ký sinh rễ cây ổi (*Psidium guajava*) và một số biện pháp phòng trừ hiệu quả. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 6, 41 - 47.
7. Nguyễn Khang (2023). Thực trạng phát triển và bệnh vàng lá trên cây ổi. <https://baovinhlong.com.vn/kinh-te/nong-nghiep/202303/thuc-trang-phat-trien-va-benh-vang-la-chet-cay-oi-3159813>, truy cập ngày 4/5/2024.
8. Truyền hình Đồng Tháp (2022). Bệnh tuyến trùng gây hại trên ổi. <https://www.youtube.com/watch?v=4veuVyMzbFA>, truy cập ngày 8/9/2023.
9. Barker, K. R. (1985). Nematode extraction and bioassays. *In: An advanced treatise on Meloidogyne*, volume II – Methodology (Barker, K. R., Carter, C. C. and Sasser, J. N., editors). *A Cooperative Publication of the Department of Plant Pathology, North Carolina State University and the U. S. Agency for International Development, USA*. Pages: 19 - 32.
10. Nguyễn Ngọc Châu (2003). *Tuyến trùng thực vật và cơ sở phòng trừ*. Nxb Khoa học Kỹ thuật Hà Nội. 302 trang.
11. Nguyễn Ngọc Châu và Nguyễn Vũ Thanh (2000). *Tuyến trùng ký sinh thực vật ở Việt Nam. Động vật chí Việt Nam 4*. Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội. 400 trang.
12. Trịnh Quang Pháp, Nguyễn Thị Duyên, Lê Thị Mai Linh và Nguyễn Hữu Tiên (2022). *Nhóm tuyến trùng quan trọng trong nông nghiệp ở Việt Nam*. Nxb Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. 349 trang.
13. Grech, N. M. (2015). *Studies on Guava Wilt Disease*. Doctoral dissertation, University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg. 440 pages.
14. Kaushal, A., Vashisth, S. & Chandel, V. (2024). Diversity of plant parasitic nematode associated with guava and mango nurseries in Himachal Pradesh. *Proceedings of International Conference on Enabling Sustainable Food Systems through Natural Farming (ESFS-NF)*, September 13 - 14, 2024, Solan (Nauni), Himachal Pradesh, India.
15. Yang, B. & Eisenback, J. D. (1983). *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (*Meloidogynidae*), a root-knot nematode parasitizing pacara earpod tree in China. *Journal of Nematology*, 15(3): 381 - 391.
16. Castagnone-Sereno, P. (2012). *Meloidogyne enterolobii* (*M. mayaguensis*): Profile of an emerging, highly pathogenic, root-knot nematode species. *Nematology*, 14(2), 133 - 138.

17. Quenouille, J., Montarry, J., Palloix, A. & Moury, B. (2013). Farther, slower, stronger: How the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown. *Molecular Plant Pathology*, 14(2), 109 – 118.
18. Philbrick, A. N., Adhikari, T. B., Louws, F. J. & Gorny, A. M. (2020). *Meloidogyne enterolobii*, a major threat to tomato production: current status and future prospects for its management. *Frontiers in Plant Science*, 11: 606395.
19. Luc, M., Sikora, R. & Bridge, J. (2005). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. *C.A.B International Institute of Parasitology*. 629 pages.
20. Nguyễn Vũ Thanh (2002). *Tuyển trùng ký sinh cây ăn quả và biện pháp phòng trừ*. Nxb Nông nghiệp Hà Nội.

**SURVEY ON THE COMPOSITION OF PLANT PARASITIC NEMATODES ON GUAVA  
IN CHAU THANH DISTRICT, DONG THAP PROVINCE**

**Pham Van Luc<sup>1</sup>, Nguyen Kim Cuong,  
Nguyen Thi Thu Nga<sup>1</sup>, Doan Thi Kieu Tien<sup>1</sup>**  
*<sup>1</sup>College of Agriculture, Can Tho University*

**Abstract**

Guava (*Psidium guajava* L.) is a popular fruit tree cultivated in many regions around the world. This study aimed to investigate the composition of nematode species in 30 guava orchards across eight communes: An Khanh, Phu Huu, Hoa Tan, An Phu Thuan, Phu Long, Tan Nhuan Dong, An Nhon and An Hiep, located in Chau Thanh district, Dong Thap province. The survey recorded five nematode species belonging to five genera and four families, all within the order Tylenchida. The identified nematode species associated with guava include *Meloidogyne enterolobii*, *Helicotylenchus dihystra*, *Tylenchorhynchus* sp., *Rotylenchulus reniformis* and *Mesocriconema* sp. Based on observed damage symptoms, population density and frequency of occurrence, *Meloidogyne enterolobii* was determined to be the most significant nematode species affecting guava trees.

**Keywords:** *Guava, Meloidogyne enterolobii, nematodes.*

**Ngày nhận bài:** 15/5/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 20/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 24/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 25/6/2025

# ẢNH HƯỞNG CỦA TUYẾN TRÙNG *Meloidogyne* spp. ĐẾN SINH TRƯỞNG CỦA CÂY HỒ TIÊU TRONG ĐIỀU KIỆN VƯỜN ƯƠM

Nguyễn Thị Thanh Phụng<sup>1,\*</sup>, Dương Thị Oanh<sup>1</sup>, Trần Thị Diệu Hiền<sup>1</sup>,  
Nguyễn Tố Cát Triệu<sup>1</sup>, Nguyễn Đô<sup>1</sup>, Nguyễn Quang Ngọc<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Long<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Cây hồ tiêu

\*Email: nguyenthanhphung11303096@gmail.com

## TÓM TẮT

Tuyến trùng nốt sùng rễ (*Meloidogyne* spp.) đã được xác định là một trong những loài gây hại chính đối với cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.). Loài tuyến trùng này có khả năng xâm nhập và gây hại cho cây tiêu ngay từ giai đoạn cây con trong vườn ươm cho đến khi trưởng thành ngoài đồng ruộng. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá mức độ xâm nhiễm và ảnh hưởng của tuyến trùng *Meloidogyne* spp. đến giống hồ tiêu Vĩnh Linh trong điều kiện nhà màng. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên đầy đủ (RCBD) với 3 lần lặp lại, sử dụng các mức lây nhiễm tuyến trùng khác nhau gồm: 0, 50, 100, 150, 200, 300, 400 và 500 con/100 g đất. Kết quả cho thấy, tuyến trùng có khả năng xâm nhiễm và sinh sản mạnh, thể hiện qua sự gia tăng mật số trong đất và rễ theo thời gian so với mức độ lây nhiễm ban đầu. Ảnh hưởng của tuyến trùng đến sinh trưởng của cây hồ tiêu thể hiện rõ qua sự suy giảm các chỉ tiêu sinh trưởng đặc biệt là chiều dài thân chính và mức độ tổn thương hệ rễ. Từ mật số lây nhiễm 100 con/100 g đất trở lên, các chỉ tiêu sinh trưởng và sinh lý bắt đầu giảm có ý nghĩa thống kê so với đối chứng sau 150 ngày lây nhiễm. Tỷ lệ rễ bị nốt sùng tăng đáng kể, chiếm 88,67% ở mức lây nhiễm 500 con/100 g đất. Kết quả nghiên cứu xác định ngưỡng gây hại của *Meloidogyne* spp. trên giống hồ tiêu Vĩnh Linh trong điều kiện nhà màng là từ 150 con/100 g đất trở lên. Từ mật số 100 con/100 g đất được xác định là ngưỡng cảnh báo của tuyến trùng đối với cây hồ tiêu. Đây là cơ sở quan trọng phục vụ công tác đánh giá tính kháng của giống, sàng lọc vật liệu chọn tạo và xây dựng biện pháp quản lý tuyến trùng hiệu quả trong sản xuất hồ tiêu.

**Từ khóa:** Hồ tiêu, giống Vĩnh Linh, mức độ lây nhiễm, ngưỡng gây hại, tuyến trùng *Meloidogyne* spp.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tuyến trùng nốt sùng rễ (*Meloidogyne* spp.) là một trong những loài gây hại nghiêm trọng đối với cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.), có khả năng xâm nhập và gây hại cho cây ngay từ giai đoạn cây con trong vườn ươm cho đến khi trưởng thành ngoài đồng ruộng. Loài tuyến trùng này đã được ghi nhận là gây hại phổ biến và rộng rãi ở hầu hết các vùng trồng tiêu trên thế giới [1 - 3], Tại Việt Nam, tình hình tuyến trùng gây hại ngày càng nghiêm trọng và phức tạp. Theo báo cáo của Cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật (2025) [4], hiện có hơn 1.500 ha hồ tiêu bị nhiễm tuyến trùng, tập trung chủ yếu tại các vùng trồng trọng điểm như ở các tỉnh: Quảng Trị, Gia Lai, Đồng Nai, Bình Phước [4]. Tuyến trùng *Meloidogyne incognita* đã được Trinh Thị Thu Thủy và cs (2012) [5] xác định là loài tuyến trùng chiếm ưu thế trên cây hồ tiêu ở Việt Nam. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của Lê Đức Khánh và cs (2013) [6] cho thấy, đây là loài gây hại chính cho cây hồ tiêu tại Tây Nguyên với mật độ và

tần suất xuất hiện cao nhất. Tuyến trùng xâm nhập vào rễ tạo ra các nốt sùng làm giảm khả năng hấp thu nước và chất dinh dưỡng dẫn đến cây còi cọc, vàng lá và có các triệu chứng thiếu dinh dưỡng nghiêm trọng. Ngoài ra, tuyến trùng còn là tác nhân gây ra các vết thương trên rễ tạo điều kiện cho một số loài nấm như: *Fusarium* sp., *Pythium* sp. xâm nhập gây thối rễ làm cho cây sinh trưởng kém, vàng lá, tháo đốt và chết [7 - 9]. Trong sản xuất hồ tiêu tại Việt Nam hiện nay, các giống tiêu đều miễn cảm với tuyến trùng [1, 10, 11]. Một số nghiên cứu chọn tạo giống hồ tiêu có khả năng kháng tuyến trùng đã được triển khai, song kết quả đạt được vẫn còn hạn chế và chưa đáp ứng được yêu cầu thực tiễn sản xuất [5, 10 - 14]. Bên cạnh đó, việc kiểm soát tuyến trùng *Meloidogyne* spp. gặp nhiều khó khăn do chúng có khả năng tồn tại lâu dài trong đất dưới dạng trứng và có thể tái hoạt động khi gặp điều kiện thích hợp như độ ẩm cao hoặc nhiệt độ phù hợp [15, 16]. Do vậy, biện pháp hóa học vẫn đang được sử dụng rộng rãi như một giải pháp kiểm soát tuyến trùng. Tuy nhiên,



hiệu quả không ổn định của các phương pháp này, cùng với nguy cơ tồn dư hóa chất trong sản phẩm [17] đã đặt ra những thách thức lớn đối với mục tiêu sản xuất nông nghiệp bền vững.

Trong bối cảnh đó, việc xác định chính xác ngưỡng mật số gây hại và thời điểm cần phòng trừ có ý nghĩa đặc biệt quan trọng nhằm kiểm soát hiệu quả tuyến trùng hiệu quả. Trên cơ sở đó, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Cây hồ tiêu thực hiện nghiên cứu này nhằm đánh giá mức độ xâm nhiễm và ảnh hưởng của tuyến trùng *Meloidogyne* spp. đến giống hồ tiêu Vĩnh Linh trong điều kiện nhà màng. Kết quả nghiên cứu sẽ là cơ sở khoa học quan trọng phục vụ công tác đánh giá tính kháng của giống, sàng lọc vật liệu chọn tạo và xây dựng biện pháp quản lý tuyến trùng hiệu quả trong sản xuất hồ tiêu.

## 2. PHƯƠNG PHƯƠNG NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu, thời gian và địa điểm nghiên cứu

Cây hồ tiêu 4 tháng tuổi, ương từ hom lươn 2 mắt giống Vĩnh Linh. Cây sinh trưởng tốt, chiều cao đạt từ 40 - 50 cm, có 7 - 8 lá, bộ rễ khỏe không bị nhiễm sâu, bệnh hại.

Tuyến trùng *Meloidogyne* spp. được phân lập từ rễ cây hồ tiêu có nốt sưng thu thập tại các vườn tiêu bị bệnh vàng lá ở tỉnh Gia Lai.

Địa điểm nghiên cứu: Nhà màng Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Cây hồ tiêu, thành phố Pleiku, tỉnh Gia Lai.

Thời gian thực hiện: 07/2024 - 01/2025.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

+ **Nhân nuôi tuyến trùng:** Thu rễ hồ tiêu có nhiều nốt sưng điển hình từ các vườn bị bệnh vàng lá. Rửa sạch, nghiền nát rễ và lọc qua rây để thu huyền phù chứa trứng. Huyền phù chứa trứng được đặt trong đĩa petri có nước sạch, ủ ở nhiệt độ 25 - 28°C trong 2 - 3 ngày để trứng nở thành ấu trùng tuổi 2. Xác định đặc điểm hình thái của tuyến trùng theo TCVN 12194-2-4:2020 [18]. Tuyến trùng được nhân nuôi trên cà chua trong chậu giá thể đã xử lý. Sau 50 - 60 ngày tiến hành thu hoạch tuyến trùng J2 phục vụ thí nghiệm.

+ **Chuẩn bị vật liệu:** Đất, phân chuồng, xơ dừa, trấu hun (6: 2: 1: 1), ủ hoai mục được hấp xử lý ở nhiệt độ 121°C, 1 atm trong 60 phút để loại bỏ các tác nhân gây hại khác trước khi lây nhiễm. Giá thể bổ sung thêm phân lân, vôi và phân hữu cơ sinh học để đảm bảo dinh dưỡng cho cây sinh trưởng tốt.

Cây giống: Hom lươn 2 mắt giống hồ tiêu Vĩnh Linh được xử lý nấm bệnh bằng thuốc Ridomil Gold 68WG 0,3% trong 15 phút, sau đó cắm vào chậu nhựa (14 x 24 cm), chứa 2 kg giá thể đã xử lý. Các chậu được để trên giàn cao cách mặt đất 50 cm, dưới đáy chậu có lót đĩa nhựa để hứng nước và hạn chế tuyến trùng di chuyển ra ngoài sau khi lây nhiễm. Chăm sóc cây trong nhà màng. Sau 4 tháng, cây phát triển khỏe, đạt chiều cao 40 - 50 cm, có 7 - 8 lá, bộ rễ khỏe thì tiến hành lây nhiễm tuyến trùng.

+ **Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên (RCBD) trong nhà màng đảm bảo môi trường tối ưu để tạo điều kiện cho tuyến trùng phát triển và gây hại rõ ràng trên cây hồ tiêu. Thí nghiệm gồm 3 lần lặp lại và 8 mức lây nhiễm ở các mật độ tuyến trùng khác nhau để đánh giá áp lực gây hại của tuyến trùng đối với cây hồ tiêu giai đoạn vườn ươm. Các mức lây nhiễm như sau:

| Công thức (CT) | Mức lây nhiễm tuyến trùng (con/100 g đất) | Số lượng tuyến trùng/chậu (2 kg đất) |
|----------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|
| CT1            | 0                                         | 0                                    |
| CT2            | 50                                        | 1.000                                |
| CT3            | 100                                       | 2.000                                |
| CT4            | 150                                       | 3.000                                |
| CT5            | 200                                       | 4.000                                |
| CT6            | 300                                       | 6.000                                |
| CT7            | 400                                       | 8.000                                |
| CT8            | 500                                       | 10.000                               |

Quy mô thí nghiệm: Mỗi ô cơ sở 15 chậu x 3 lần lặp lại x 8 mức lây nhiễm = 360 chậu.

+ **Phương pháp lây nhiễm tuyến trùng:** Tuyến trùng được lây nhiễm bằng cách tạo 3 lỗ sâu từ 8 - 10 cm quanh gốc cây và tưới 50 ml huyền phù chứa J2 với các mật số tương ứng. Các chậu được lót đĩa nhựa để ngăn tuyến trùng phát tán và duy trì độ ẩm đất.

Chăm sóc cây hồ tiêu sau lây nhiễm tuyến trùng: Kiểm tra và tưới nước hàng ngày, đảm bảo đất luôn trong trạng thái đủ ẩm để cây sinh trưởng bình thường và thuận lợi cho sự phát triển của tuyến trùng. Nhiệt độ không khí trong thời gian thực hiện thí nghiệm từ 24 - 26°C.

+ **Chỉ tiêu và phương pháp theo dõi:** Sinh trưởng (sau 90, 120, 150 ngày lây nhiễm): đường kính thân (mm), chiều dài thân (cm), số lá, chỉ số diệp lục (SPAD).

Mật số tuyến trùng trong đất (con/100 g đất) và trong rễ (con/5 g rễ): được xác định tại thời điểm 150 ngày sau lây nhiễm. Mỗi ô cơ sở lấy mẫu từ 3 chậu để phân tích. Việc xác định mật số tuyến trùng tuổi 2 được thực hiện dưới kính hiển vi soi nổi (phóng đại 40 lần). Tuyến trùng trong rễ: Được tách lọc từ mẫu 5 g rễ theo phương pháp Paul and Dirk (1997) [19]. Tuyến trùng trong đất: Được tách lọc từ mẫu 100 g đất theo phương pháp Baermann cải tiến [20]. Hệ số sinh sản của tuyến trùng (Rf) được xác định theo công thức  $Rf = Pf/Pi$ , trong đó: Pf là mật số tuyến trùng cuối cùng; Pi là mật số tuyến trùng ban đầu.

Các chỉ tiêu về rễ: Tỷ lệ rễ bị nốt sùng (%): Đếm số rễ chính có nốt sùng trên tổng số rễ chính mọc từ thân chính; chỉ số nốt sùng rễ; khối lượng rễ tươi (g/cây); khối lượng rễ khô (g/cây). Quan sát 3 cây/ô cơ sở, tại thời điểm 150 ngày.

+ *Phương pháp xử lý số liệu*: Sử dụng phần mềm SAS 9.1 để xử lý thống kê. Số liệu được chuyển đổi sang log (xi + 1) và arcsin√x trước khi xử lý thống kê.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Mật số tuyến trùng trong đất và rễ cây hồ tiêu sau 150 ngày lây nhiễm

**Bảng 1. Mật số tuyến trùng trong đất và trong rễ cây hồ tiêu sau 150 ngày lây nhiễm**

| Mức lây nhiễm (con/100 g đất) | Mật số tuyến trùng trong đất (con/100 g) | Mật số tuyến trùng trong rễ (con/5 g) | Tổng mật số tuyến trùng | Hệ số sinh sản    |
|-------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------|
| 0                             | 0 <sup>d</sup>                           | 0 <sup>d</sup>                        | 0 <sup>e</sup>          | 0,00 <sup>g</sup> |
| 50                            | 1.491 <sup>c</sup>                       | 1.229 <sup>c</sup>                    | 45.493 <sup>d</sup>     | 45,5 <sup>a</sup> |
| 100                           | 1.797 <sup>bc</sup>                      | 1.896 <sup>bc</sup>                   | 50.820 <sup>c</sup>     | 25,4 <sup>b</sup> |
| 150                           | 2.060 <sup>abc</sup>                     | 2.294 <sup>ab</sup>                   | 61.302 <sup>bc</sup>    | 20,4 <sup>c</sup> |
| 200                           | 2.123 <sup>abc</sup>                     | 2.242 <sup>ab</sup>                   | 64.031 <sup>bc</sup>    | 16,0 <sup>d</sup> |
| 300                           | 2.200 <sup>ab</sup>                      | 2.670 <sup>ab</sup>                   | 68.073 <sup>ab</sup>    | 11,4 <sup>e</sup> |
| 400                           | 2.300 <sup>ab</sup>                      | 3.087 <sup>ab</sup>                   | 70.232 <sup>ab</sup>    | 8,8 <sup>f</sup>  |
| 500                           | 2.757 <sup>a</sup>                       | 3.216 <sup>a</sup>                    | 85.865 <sup>a</sup>     | 8,6 <sup>f</sup>  |
| CV%                           | 2,79                                     | 4,34                                  | 1,33                    | 4,71              |

*Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có cùng ký tự không có sự khác biệt có ý nghĩa  $p < 0,01$  theo phân hạng Duncan.*

Như vậy, kết quả thí nghiệm cho thấy, lây nhiễm tuyến trùng thành công trong điều kiện nhà màng và mật số tuyến trùng ban đầu có ảnh hưởng rõ rệt đến mật số tích lũy sau này trong đất và rễ. Kết quả có ý

Kết quả theo dõi cho thấy, tuyến trùng *Meloidogyne* spp. có khả năng xâm nhiễm và sinh sản mạnh trong điều kiện thí nghiệm nhà màng. Mật số tuyến trùng trong đất và rễ tăng tỷ lệ thuận với mức lây nhiễm ban đầu và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,01$ ). Mật số tuyến trùng trong đất tăng từ 1.491 - 2.757 con/100 g đất tương ứng với mức lây nhiễm từ 50 - 500 con/100 g đất, đồng thời, mật số tuyến trùng trong rễ cũng tăng từ 1.229 - 3.216 con/5 g rễ. Tổng mật số tuyến trùng cũng tăng đáng kể theo mật số lây nhiễm ban đầu, đặc biệt từ mức lây nhiễm 150 con/100 g đất trở lên. Điều này cho thấy rễ cây hồ tiêu là môi trường thuận lợi cho tuyến trùng *Meloidogyne* spp. phát triển và sinh sản. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Trần Văn Hai (2015) [21] và John Bridge và James (2007) [22], khẳng định *Meloidogyne* spp. sinh sản nhanh trong điều kiện thuận lợi (25 - 30°C và cây ký chủ mẫn cảm). Khi mật số lây nhiễm tăng cao, mặc dù tổng mật số tuyến trùng tiếp tục tăng, nhưng hệ số sinh sản lại giảm. Cụ thể, hệ số sinh sản giảm từ 45,5 ở mức lây nhiễm 50 con/100 g đất xuống còn 8,6 ở mức lây nhiễm 500 con/100 g đất. Điều này có thể là do sự cạnh tranh về thức ăn cũng như không gian sống nên khả năng nhân lên của tuyến trùng *Meloidogyne* spp. ở các mật số lây nhiễm cao thường ít hơn so với các mật số lây nhiễm tuyến trùng thấp.

nghĩa quan trọng trong việc đánh giá mức độ gây hại của tuyến trùng đối với cây hồ tiêu. Đây là cơ sở khoa học để xây dựng ngưỡng gây hại và các biện pháp phòng trừ tuyến trùng trên cây hồ tiêu.

### 3.2. Ảnh hưởng của tuyến trùng *Meloidogyne* spp. đến cây hồ tiêu trong nhà màng

#### 3.2.1. Ảnh hưởng của tuyến trùng *Meloidogyne* spp. đến sinh trưởng cây hồ tiêu

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tuyến trùng có tác động tiêu cực đến sự phát triển của cây hồ tiêu với mức độ ảnh hưởng tăng dần theo thời gian và mật số lây nhiễm. Thời điểm 90 ngày đầu sau lây nhiễm, tuyến trùng chưa gây ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của cây, các chỉ tiêu sinh trưởng vẫn duy trì ổn định và không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ). Tại thời điểm 120 ngày sau lây nhiễm, tăng trưởng chiều dài thân chính bắt đầu có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở

mức lây nhiễm từ 150 con/100 g đất với giá trị dao động từ 15,2 - 17,1 cm/tháng, trong khi đó số lá và đường kính thân không có sự khác biệt. Đến thời điểm 150 ngày sau lây nhiễm, sự ảnh hưởng đã trở nên rõ rệt hơn khi chiều dài thân chính của công thức không lây nhiễm vẫn duy trì ở mức tăng trưởng cao (17,8 cm/tháng), trong khi các công thức lây nhiễm đều cho thấy, sự suy giảm đáng kể. Ngoài ra, tăng trưởng số lá cũng bắt đầu có sự khác biệt ở các mức lây nhiễm cao từ 400 - 500 con/100 g đất. Ở mức 500 con/100 g đất, chiều dài thân chính chỉ còn 10,2 cm/tháng, giảm gần 42,69% so với đối chứng, số lá giảm còn 2,27 lá/tháng sau 150 ngày lây nhiễm.

**Bảng 2. Đặc điểm tăng trưởng của cây hồ tiêu sau lây nhiễm tuyến trùng**

| Mức lây nhiễm<br>(con/100 g đất) | Chiều dài thân chính<br>(cm/tháng) |                    |                    | Số lá (lá/tháng) |          |                    | Đường kính thân<br>(mm/tháng) |          |          |
|----------------------------------|------------------------------------|--------------------|--------------------|------------------|----------|--------------------|-------------------------------|----------|----------|
|                                  | 90 ngày                            | 120 ngày           | 150 ngày           | 90 ngày          | 120 ngày | 150 ngày           | 90 ngày                       | 120 ngày | 150 ngày |
| 0                                | 24,5                               | 21,9 <sup>a</sup>  | 17,8 <sup>a</sup>  | 3,42             | 3,55     | 3,18 <sup>a</sup>  | 0,18                          | 0,27     | 0,30     |
| 50                               | 22,9                               | 19,1 <sup>ab</sup> | 14,4 <sup>ab</sup> | 3,30             | 3,42     | 3,21 <sup>a</sup>  | 0,15                          | 0,18     | 0,20     |
| 100                              | 24,3                               | 18,4 <sup>ab</sup> | 12,8 <sup>b</sup>  | 3,52             | 3,18     | 3,00 <sup>ab</sup> | 0,15                          | 0,17     | 0,19     |
| 150                              | 23,3                               | 17,1 <sup>b</sup>  | 12,7 <sup>b</sup>  | 3,21             | 3,52     | 3,12 <sup>a</sup>  | 0,16                          | 0,22     | 0,18     |
| 200                              | 23,4                               | 15,2 <sup>b</sup>  | 11,9 <sup>b</sup>  | 3,39             | 3,24     | 3,15 <sup>a</sup>  | 0,16                          | 0,18     | 0,20     |
| 300                              | 23,4                               | 17,2 <sup>b</sup>  | 11,8 <sup>b</sup>  | 3,27             | 3,06     | 2,52 <sup>ab</sup> | 0,15                          | 0,15     | 0,19     |
| 400                              | 23,2                               | 16,6 <sup>b</sup>  | 11,9 <sup>b</sup>  | 3,21             | 3,48     | 2,30 <sup>b</sup>  | 0,14                          | 0,18     | 0,20     |
| 500                              | 23,5                               | 15,7 <sup>b</sup>  | 10,2 <sup>b</sup>  | 3,33             | 3,27     | 2,27 <sup>b</sup>  | 0,16                          | 0,18     | 0,20     |
| CV%                              | 9,68                               | 12,73              | 18,20              | 5,89             | 15,55    | 13,93              | 24,28                         | 21,48    | 25,97    |

*Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có cùng ký tự không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê theo phân hạng Duncan  $P < 0,05$ .*

Những kết quả này cho thấy, chiều dài thân chính là chỉ tiêu nhạy cảm nhất đối với sự xâm nhiễm của tuyến trùng trong giai đoạn đầu. Đường kính thân phản ứng kém nhạy hơn trước sự tác động của tuyến trùng khi không có sự khác biệt đáng kể nào được ghi nhận trong suốt quá trình thí nghiệm mặc dù có xu hướng giảm nhẹ.

Dù không thể hiện mối quan hệ tuyến tính rõ ràng giữa mật số tuyến trùng lây nhiễm và hiệu quả

kinh tế, nhưng kết quả này khẳng định rằng sự hiện diện của tuyến trùng *Meloidogyne* spp. ngay cả ở mật số thấp (50 - 100 con/100 g đất), đã gây ảnh hưởng đến sự phát triển bình thường của cây hồ tiêu, đặc biệt là khả năng phát triển chiều dài thân chính, số lá và có ý nghĩa quan trọng về năng suất và chất lượng. Kết quả cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây về tác hại của *Meloidogyne* spp. trên hồ tiêu [9], [12], [22].

3.2.2. Ảnh hưởng của tuyến trùng *Meloidogyne* spp. đến chỉ số SPAD trong lá hồ tiêu

Kết quả đo chỉ số SPAD trong lá hồ tiêu tại các thời điểm sau khi lây nhiễm tuyến trùng *Meloidogyne* spp. cho thấy, có xu hướng giảm dần theo thời gian và mật số tuyến trùng tăng, đặc biệt là sau 150 ngày. Chỉ số SPAD dao động từ 51,57 - 54,89 tại thời điểm 90 ngày và sau đó giảm xuống còn 42,38 - 48,06 tại thời

điểm 150 ngày. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p > 0,05$ ). Điều này cho thấy, trong điều kiện thí nghiệm sự lây nhiễm tuyến trùng ở mật số từ 50 - 500 con/100 g đất trong thời gian 150 ngày vẫn chưa đủ để gây ra tác động nghiêm trọng đến diệp lục trong lá cây hồ tiêu, do đó có thể cần thời gian theo dõi dài hơn để đánh giá sự ảnh hưởng của tuyến trùng đến của chỉ số SPAD.

**Bảng 3. Chỉ số SPAD trong lá hồ tiêu sau lây nhiễm tuyến trùng**

| Mức lây nhiễm (con/100 g đất) | 90 ngày | 120 ngày | 150 ngày | Tỷ lệ giảm so với đối chứng (%) |
|-------------------------------|---------|----------|----------|---------------------------------|
| 0                             | 54,29   | 49,27    | 48,06    | -                               |
| 50                            | 52,39   | 45,63    | 43,47    | 10,56                           |
| 100                           | 54,46   | 47,72    | 42,94    | 11,93                           |
| 150                           | 54,89   | 47,29    | 42,82    | 12,24                           |
| 200                           | 53,85   | 46,68    | 42,38    | 13,41                           |
| 300                           | 52,59   | 47,28    | 42,93    | 11,94                           |
| 400                           | 51,57   | 46,98    | 44,38    | 8,29                            |
| 500                           | 52,98   | 48,49    | 44,89    | 7,06                            |
| CV%                           | 5,39    | 4,52     | 6,60     |                                 |

3.2.3. Ảnh hưởng của tuyến trùng *Meloidogyne* spp. đến hệ thống rễ cây hồ tiêu

Kết quả bảng 4 cho thấy, tuyến trùng *Meloidogyne* spp. gây hại nghiêm trọng đến hệ rễ hồ tiêu, thể hiện qua tỷ lệ rễ bị nốt sùng và chỉ số nốt sùng tăng mạnh theo mức độ lây nhiễm. Tỷ lệ rễ bị nốt sùng đạt 88,67% ở mật số 500 con/100 g đất, trong khi tỷ lệ rễ bị nốt sùng vượt 70% ngay cả ở mật số thấp, cho thấy rễ hồ tiêu rất mẫn cảm với tuyến trùng. Ở mức lây nhiễm 50 - 100 con/100 g đất, chỉ

số nốt sùng biến động từ 4,2 - 4,4, tương ứng với mức gây hại nặng. Ở mức lây nhiễm 150 con/100 g đất trở lên, chỉ số nốt sùng biến động từ 4,8 - 5,0 tương ứng với mức gây hại rất nặng, phù hợp với hệ thống phân cấp hại của Paul và Dirk (1997) [19] và QCVN 01-172:2014/BNNT [23]. Những kết quả này thống nhất với các nghiên cứu trước đó như của Trần Thị Diệu Hiền và cs (2018) [12] và Trịnh Thị Thu Thủy (2010) [1].

**Bảng 4. Ảnh hưởng của tuyến trùng đến hệ thống rễ cây hồ tiêu 150 ngày sau lây nhiễm**

| Mức lây nhiễm (con/100 g đất) | Tỷ lệ rễ bị nốt sùng (%) | Chỉ số nốt sùng rễ | Khối lượng rễ tươi (g) | Khối lượng rễ khô (g) | Tỷ lệ rễ tươi/khô  |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------|------------------------|-----------------------|--------------------|
| 0                             | 0,00 <sup>c</sup>        | 0,0 <sup>d</sup>   | 22,43                  | 4,09                  | 5,50 <sup>a</sup>  |
| 50                            | 70,41 <sup>d</sup>       | 4,2 <sup>c</sup>   | 17,09                  | 3,23                  | 5,26 <sup>a</sup>  |
| 100                           | 71,39 <sup>cd</sup>      | 4,4 <sup>b</sup>   | 16,06                  | 3,04                  | 5,27 <sup>a</sup>  |
| 150                           | 78,01 <sup>bc</sup>      | 4,8 <sup>a</sup>   | 16,97                  | 3,23                  | 5,25 <sup>a</sup>  |
| 200                           | 82,44 <sup>ab</sup>      | 4,8 <sup>a</sup>   | 18,96                  | 3,61                  | 5,24 <sup>a</sup>  |
| 300                           | 83,80 <sup>ab</sup>      | 5,0 <sup>a</sup>   | 21,32                  | 4,30                  | 5,03 <sup>ab</sup> |
| 400                           | 87,81 <sup>a</sup>       | 5,0 <sup>a</sup>   | 18,73                  | 3,66                  | 5,05 <sup>ab</sup> |
| 500                           | 88,67 <sup>a</sup>       | 5,0 <sup>a</sup>   | 16,43                  | 3,56                  | 4,56 <sup>b</sup>  |
| CV%                           | 7,15                     | 1,48               | 20,84                  | 22,11                 | 5,58               |

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có cùng ký tự không có sự khác biệt có ý nghĩa  $p < 0,05$  theo phân hạng Duncan.

Khối lượng rễ tươi và khô không khác biệt có ý nghĩa thống kê, song tỷ lệ rễ tươi/khô giảm đáng kể ở mật độ 500 con/100 g đất cho thấy, rễ bị tổn thương chức năng hấp thu nước. Đây là dấu hiệu chẩn đoán điển hình của tuyến trùng gây hại rễ, đã được mô tả bởi Chitwood (1994) [24] và Ramakrishnan & Rajendran (2018) [25]. Như vậy, chỉ số nốt sùng và tỷ lệ rễ bị hại là các chỉ tiêu để đánh giá mức độ gây hại của tuyến trùng, hỗ trợ xác định ngưỡng và phân cấp phục vụ quản lý hiệu quả.

3.2.4. *Tương quan giữa mật số tuyến trùng lây nhiễm với các chỉ tiêu sinh trưởng và hệ thống rễ cây hồ tiêu sau 150 ngày lây nhiễm*

Phân tích tương quan ở bảng 5 cho thấy, mật số tuyến trùng *Meloidogyne* spp. đã có tác động đến sinh trưởng chiều dài thân và số lá của cây hồ tiêu sau 150 ngày lây nhiễm. Cụ thể, mật số tuyến trùng ban đầu tương quan nghịch với chiều dài thân ( $r = -0,599$ ) và số lá ( $r = -0,729$ ) ( $p < 0,01$ ). Điều này cho thấy, khi mật số tuyến trùng tăng, khả năng phát triển thân lá của cây có xu hướng giảm tăng trưởng. Trong khi chỉ số SPAD không có tương quan có ý nghĩa thống kê ( $r = -0,085$ ,  $p > 0,05$ ). Điều này cho thấy, trong giai đoạn đầu, tuyến trùng ảnh hưởng chủ yếu đến khả năng ra lá và sinh trưởng chiều cao, nhưng chưa tác động rõ rệt đến hàm lượng diệp lục.

**Bảng 5. Tương quan giữa mật số lây nhiễm tuyến trùng với các chỉ tiêu sinh trưởng và hệ thống rễ cây hồ tiêu sau 150 ngày lây nhiễm**

| Hệ số tương quan (r)                     | Mật số lây nhiễm (con/100 g đất) | Chiều dài thân (cm/tháng) | Số lá (lá/tháng) | Chỉ số SPAD | Khối lượng rễ tươi (g) | Khối lượng rễ khô (g) | Tỷ lệ rễ tươi/khô | Tỷ lệ rễ bị nốt sùng (%) | Mật số tuyến trùng trong đất (con/100 g) | Mật số tuyến trùng trong rễ (con/5 g) |
|------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------|------------------|-------------|------------------------|-----------------------|-------------------|--------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------|
| Mật số lây nhiễm (con/100 g đất)         | 1                                |                           |                  |             |                        |                       |                   |                          |                                          |                                       |
| Chiều dài thân (cm/tháng)                | -0,599**                         | 1                         |                  |             |                        |                       |                   |                          |                                          |                                       |
| Số lá (lá/tháng)                         | -0,729**                         | 0,528**                   | 1                |             |                        |                       |                   |                          |                                          |                                       |
| Chỉ số SPAD                              | -0,085                           | 0,274                     | 0,113            | 1           |                        |                       |                   |                          |                                          |                                       |
| Khối lượng rễ tươi (g)                   | -0,098                           | 0,303                     | 0,051            | 0,121       | 1                      |                       |                   |                          |                                          |                                       |
| Khối lượng rễ khô (g)                    | 0,102                            | 0,083                     | -0,101           | 0,193       | 0,924**                | 1                     |                   |                          |                                          |                                       |
| Tỷ lệ rễ tươi/khô                        | -0,549**                         | 0,545**                   | 0,372            | -0,201      | 0,482*                 | 0,122                 | 1                 |                          |                                          |                                       |
| Tỷ lệ rễ bị nốt sùng (%)                 | 0,677**                          | -0,653**                  | -0,380           | -0,445*     | -0,267                 | -0,135                | -0,362            | 1                        |                                          |                                       |
| Mật số tuyến trùng trong đất (con/100 g) | 0,541**                          | -0,646**                  | -0,290           | -0,534**    | -0,362                 | -0,247                | -0,345            | 0,965**                  | 1                                        | .                                     |
| Mật số tuyến trùng trong rễ (con/5 g)    | 0,577**                          | -0,663**                  | -0,334           | -0,502*     | -0,369                 | -0,248                | -0,361            | 0,967**                  | 0,992**                                  | 1                                     |

Ghi chú: (\*): Tương quan là có ý nghĩa ở mức 0,05. (\*\*): Tương quan là có ý nghĩa ở mức 0,01.

Mật số lây nhiễm không có tương quan có ý nghĩa với khối lượng rễ tươi ( $r = -0,098$ ) và khối lượng rễ khô ( $r = 0,102$ ), cho thấy, khối lượng tổng thể của rễ chưa bị ảnh hưởng đáng kể sau 150 ngày. Tuy nhiên, tỷ lệ rễ tươi/khô có tương quan nghịch ở mức trung bình ( $r = -0,549$ ,  $p < 0,01$ ), phản ánh khả năng hấp thụ nước của rễ bị suy giảm do tổn thương cấu trúc rễ.

Mật số lây nhiễm có tương quan thuận với tỷ lệ rễ bị nốt sùng ( $r = 0,677$ ,  $p < 0,01$ ), mật số tuyến trùng trong đất ( $r = 0,541$ ,  $p < 0,01$ ) và trong rễ ( $r = 0,577$ ,  $p < 0,01$ ).

Đồng thời, tỷ lệ rễ bị nốt sùng có tương quan thuận rất mạnh với mật số tuyến trùng trong đất ( $r = 0,965$ ,  $p < 0,01$ ) và trong rễ ( $r = 0,967$ ,  $p < 0,01$ ). Điều này chứng tỏ tỷ lệ rễ bị nốt sùng là chỉ tiêu đánh giá mức độ lây nhiễm tuyến trùng chính xác và tin cậy nhất.

Ngoài ra, kết quả này cũng khẳng định rằng tuyến trùng *Meloidogyne* spp. không chỉ tồn tại trong đất xung quanh rễ mà còn có khả năng xâm nhập và sinh sống bên trong mô rễ. Theo Maurice và cs (2009) [16], đây là đặc điểm sinh học quan trọng phân biệt

tuyến trùng gây nốt sùng rễ với các loại tuyến trùng ký sinh khác. Khả năng xâm nhập vào bên trong rễ giúp tuyến trùng tránh được các tác động bất lợi từ môi trường và tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình sinh sản.

### 3.3. Xác định ngưỡng và mức độ gây hại của *Meloidogyne* spp. đến cây hồ tiêu

#### 3.3.1. Ngưỡng gây hại

Kết quả cho thấy, cây hồ tiêu bắt đầu bị ảnh hưởng từ mức 150 con tuyến trùng/100 g đất trở lên tại thời điểm 120 ngày sau lây nhiễm. Tại ngưỡng này ở thời điểm 150 ngày sau lây nhiễm, sự ảnh hưởng của tuyến trùng đến sinh trưởng và sinh lý cây hồ tiêu trở nên rõ ràng hơn với mật số tuyến trùng trong rễ (2,294 con/5 g rễ) và đất (2,060 con/100 g đất) tăng đáng kể, sinh trưởng chiều dài thân chính giảm rõ rệt, tỷ lệ rễ bị nốt sùng đạt 71,39%. Vì vậy, ngưỡng gây hại của tuyến trùng *Meloidogyne* spp. đối với giống hồ tiêu Vĩnh Linh trong điều kiện thí nghiệm được xác định là 150 con/100 g đất. Đây là mức mật số mà các biểu hiện gây hại bắt đầu xuất hiện rõ rệt và ổn định trên cả sinh trưởng thân lá và hệ rễ.

#### 3.3.2. Mức độ gây hại

**Bảng 6. Phân cấp mức độ gây hại theo mật số tuyến trùng lây nhiễm (con/100 g đất)**

| Mật số tuyến trùng<br>(con/100 g đất) | Mức độ gây hại                 | Đặc điểm nhận diện chính                                                                                                      |
|---------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| < 50                                  | Không gây hại hoặc gây hại nhẹ | Cây sinh trưởng tốt, chưa xuất hiện các triệu chứng rõ rệt.                                                                   |
| 50 - 100                              | Gây hại trung bình             | Chiều dài thân chính bắt đầu giảm, và tỷ lệ rễ bị nốt sùng 70 - 71%; chỉ số nốt sùng rễ: 4,2 - 4,4.                           |
| 150 - 200                             | Gây hại nặng                   | Giảm rõ rệt chiều dài thân chính; tỷ lệ rễ bị nốt sùng 78 - 82%; chỉ số nốt sùng rễ: 4,8; có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê |
| 300 - 500                             | Gây hại rất nặng               | Tăng trưởng suy giảm nghiêm trọng (chiều dài thân và số lá); tỷ lệ rễ bị nốt sùng > 83%; chỉ số nốt sùng rễ: 5,0.             |

Dựa trên kết quả phân tích số liệu, trong điều kiện thí nghiệm, mức độ gây hại của tuyến trùng *Meloidogyne* spp. sau 150 ngày lây nhiễm được phân cấp ở bảng 6.

Kết quả ở bảng 6 cho thấy, mức độ gây hại của tuyến trùng trong điều kiện nhà màng sau 150 ngày lây nhiễm được phân thành bốn nhóm: Không gây hại

hoặc gây hại nhẹ (< 50 con/100 g đất), gây hại trung bình (50 - 100 con/100 g đất), nặng (150 - 200 con/100 g đất) và rất nặng (300 - 500 con/100 g đất). Nghiên cứu này cung cấp cơ sở khoa học cho việc xây dựng biện pháp quản lý tuyến trùng và định hướng chọn giống kháng phù hợp cho sản xuất hồ tiêu trong điều kiện nhà màng.



**4. KẾT LUẬN**

Tuyến trùng nốt sùng *Meloidogyne* spp. gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sinh trưởng và sinh lý cây hồ tiêu Vĩnh Linh trong điều kiện nhà màng, với mức độ tác động phụ thuộc rõ rệt vào mật số lây nhiễm ban đầu và thời gian sau lây nhiễm. Kết quả cho thấy, ngưỡng gây hại của tuyến trùng bắt đầu từ mức 150 con/100 g đất, tại đây các chỉ tiêu như chiều dài thân chính, tỷ lệ rễ bị nốt sùng và chỉ số nốt sùng đều ảnh hưởng rõ rệt và có ý nghĩa thống kê.

Mật số 100 con/100 g đất được xác định là ngưỡng cảnh báo về sự ảnh hưởng của tuyến trùng đối với cây hồ tiêu. Từ 120 ngày trở đi là thời điểm quan trọng cần theo dõi chặt chẽ vì đây là lúc tác động của tuyến trùng bắt đầu biểu hiện rõ ràng, đặc biệt đối với chỉ tiêu chiều dài thân. Thời điểm 150 ngày được xác định là mốc quan trọng khi tác động của tuyến trùng đạt mức nghiêm trọng nhất, với sự suy giảm đồng loạt của tất cả các chỉ tiêu sinh trưởng và sinh lý cây. Do đó, việc kiểm soát tuyến trùng trước khi đạt ngưỡng gây hại, đặc biệt trong giai đoạn từ 60 - 90 ngày là cần thiết nhằm duy trì sự sinh trưởng ổn định cho cây giống hồ tiêu và hạn chế sự gia tăng của mật số tuyến trùng. Trong đó, cần ưu tiên áp dụng các biện pháp quản lý sinh học nhằm tránh nguy cơ lạm dụng thuốc hóa học, góp phần nâng cao hiệu quả và đảm bảo tính bền vững trong sản xuất hồ tiêu.

Mặt khác, do kết quả được đánh giá trên cây hồ tiêu sinh trưởng trong điều kiện nhà màng, việc áp dụng ngưỡng gây hại này cho các giai đoạn sinh trưởng khác nhau của cây, đặc biệt là đối với cây hồ tiêu trồng ngoài đồng ruộng cần được nghiên cứu bổ sung nhằm đánh giá mức độ gây hại của tuyến trùng trong điều kiện sản xuất thực tế.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Trinh Thi Thu Thuy (2010). *Incidence and effect of Meloidogyne incognita (nematoda: Meloidogyninae) on black pepper plants in Vietnam*, Doctoral thesis, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium, 138 pp.

2. P. K. Koshy, Santhosh J. Eapen and Rakesh Pandey (2005). Nematode parasites of spices, condiments and medicinal plants. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. CABI Publishing, UK, 751 - 791.

3. Maddirala Surendra Babu (2016). *Investigations on yellowing of Black Pepper (Piper nigrum L.)*, Kerala Agricultural University, 191 pp.

4. Cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật (2025). *Báo cáo số 11/ BC7N-TT&BVTV về tình hình sinh vật gây hại cây trồng (Từ ngày 7 đến ngày 13 tháng 3 năm 2025)*.

5. Trinh Thi Thu Thuy, Tran Nhat Yen, Ngo Thi Anh Tuyet, Le Luong Te and D. De Waele (2012). Plant - parasitic nematodes and yellowing of leaves associated with black pepper plants in Vietnam. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45, 1 - 18.

6. Lê Đức Khánh, Lê Quang Khải, Đào Thị Hằng, Phùng Sinh Hoạt, Trần Thị Thúy Hằng, Trần Thanh Toàn, Nguyễn Đức Việt, Đặng Đình Thắng, Trịnh Quang Pháp, Nguyễn Văn Ván, Đào Thị Lan Hoa, Cù Thị Dân và Nguyễn Hồng Phong (2013). Diễn biến mật độ *Meloidogyne* spp. trong đất và rễ hồ tiêu tại Cư Kuin, Đắk Lắk và Chư Sê, Gia Lai năm 2013. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 01(55), 74 - 79.

7. Trần Danh Sửu, Đào Thị Lan Hoa và Phạm Thị Xuân (2017). *Sâu, bệnh hại hồ tiêu và biện pháp phòng trừ*. ISBN: 978-604-9803-12-3. Cục Xuất bản,

8. Phạm Ngọc Dung (2011). Nghiên cứu ứng dụng các giải pháp khoa học công nghệ quản lý tổng hợp bệnh hại chủ yếu trên cây hồ tiêu nhằm nâng cao hiệu quả sản xuất và thu nhập cho người dân nghèo tỉnh Quảng Trị. *Báo cáo tổng kết kết quả thực hiện đề tài thuộc dự án khoa học công nghệ nông nghiệp vốn vay ADB*.

9. Nguyễn Ngọc Châu và Nguyễn Vũ Thanh (1993). Tuyến trùng ký sinh ở cây hồ tiêu và các bệnh do chúng gây ra. *Tuyển tập các công trình*

ngiên cứu sinh thái và tài nguyên sinh vật (1990 - 1992). Nxb Khoa học và Kỹ thuật, 270 trang.

10. Nguyễn Thị Nguyên Vân, Nguyễn Thanh Phong, Lê Thanh Đạm, Võ Thị Thu Oanh và Nguyễn Vũ Phong (2021). *Phản ứng của năm giống hồ tiêu với tuyến trùng sùng rễ Meloidogyne incognita*. Hội thảo quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam lần thứ 20. Nxb Nông nghiệp Hà Nội, 304 - 312.

11. Ngô Đăng Duyên, Trần Thị Phượng và Trang Thị Nguyệt Quế (2023). Đánh giá khả năng nhiễm nấm bệnh và tuyến trùng của một số giống hồ tiêu trong điều kiện nhà lưới. *Tạp chí Khoa học Tây Nguyên*, 17(61), 50 - 57.

12. Trần Thị Diệu Hiền, Nguyễn Trần Quyên, Nguyễn Quang Ngọc và Dương Thị Oanh (2019). Khả năng kháng nấm *Phytophthora capsici* và tuyến trùng *Meloidogyne incognita* của một số vật liệu làm gốc ghép cho cây hồ tiêu tại Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 1(98), 99 - 104.

13. Nguyễn Quang Ngọc, Dương Thị Oanh, Phạm Thị Hoài, Trần Thị Diệu Hiền và Nguyễn Thị Tuyết (2021). Đánh giá một số tổ hợp ghép có khả năng kháng tuyến trùng trên cây hồ tiêu. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 6 (127), 29 - 36.

14. Hai Thi Hong Truong, Sonexay Rasphone, Bao Le Quy Nguyen, Han Ngoc Ho, Co Quang Nguyen, Tu Thi Tran, Thao Xuan Hoang and Thuy Thanh Duong (2023). Identification of Piper species that are resistant to *Phytophthora capsici*, *Meloidogyne incognita*, and waterlogging in Vietnam. *Plant Pathology*, 72(9), 1615 - 1625.

15. Nathaniel A. Mitkowski and George S. Abawi (2003). Root - knot nematode. The Plant Health instructor. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2003-0917-01>.

16. Maurice Moens, Roland N. Perry and James L. Star (2009). *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites. In: *Root - knot nematodes*. Roland N. Perry, Maurice Moens, &

James L. Star (Eds). Wallingford, UK: CABI Publishing, 1 - 17.

17. Dương Thị Oanh và Nguyễn Quang Ngọc (2019). Một số vấn đề về dư lượng thuốc bảo vệ thực vật trên hồ tiêu Việt Nam. Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên, <<https://wasi.org.vn/mot-so-van-de-ve-du-luong-thuoc-bao-ve-thuc-vat-tren-ho-tieu-viet-nam/>>.

18. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 12194-2-4:2020 về Quy trình giám định tuyến trùng gây bệnh thực vật - Phần 2-4: Meloidogyne.

19. Paul R Speijer and Dirk De Waele (1997). Screening of musa germplasm for resistance and tolerance to nematodes. *INIBAP Technical Guidelines 1 INIBAP, Montpellier, France*.

20. D. J Hooper, Johannes Hallmann and Sergei A Subbotin (2005). Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes. In: *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (Luc, M., Sikora, R.A. and Bridge, J., eds). CAB International, Wallingford, UK, 53 - 86.

21. Trần Văn Hai (2015). Tuyến trùng nốt sùng và khả năng gây hại trên cây hồ tiêu tại một số tỉnh Tây Nguyên. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 4, 20 - 25.

22. John Bridge and James Starr (2007). *Plant Nematodes of Agricultural Importance: A Colour Handbook*, CRC Press.

23. Quy chuẩn quốc gia QCVN 01-172:2014/BNNPTNT về Phương pháp điều tra phát hiện sinh vật chính hại cây hồ tiêu.

24. Chitwood B. G. (1994). Root - knot nematodes - Part I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 16(2), 90 - 104.

25. S. Ramakrishnan and G. Rajendran (2018). Integrated management of *Meloidogyne incognita* in black pepper using botanicals and biocontrol agents. *Journal of Plantation Crops*, 46(3), 156 - 162.

**EFFECTS OF ROOT-KNOT NEMATODES (*Meloidogyne* spp.)  
ON THE GROWTH OF BLACK PEPPER (*Piper nigrum* L.) UNDER NURSERY CONDITIONS**

**Nguyen Thi Thanh Phung<sup>1</sup>, Duong Thi Oanh<sup>1</sup>, Tran Thi Dieu Hien<sup>1</sup>,  
Nguyen To Cat Trieu<sup>1</sup>, Nguyen Do<sup>1</sup>, Nguyen Quang Ngoc<sup>1</sup>, Nguyen Van Long<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Pepper Research and Development Center*

**Abstract**

Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) have been identified as one of the major pests affecting black pepper (*Piper nigrum* L.). These nematodes are capable of infecting and damaging pepper plants from the seedling stage in nurseries to maturity in the field. This study was conducted to evaluate the infestation level and impact of *Meloidogyne* spp. on the Vinh Linh pepper variety under greenhouse conditions. The experiment was arranged in a randomized complete block design (RCBD) with three replications, using different nematode inoculation levels: 0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 juveniles per 100 g of soil. Results showed that *Meloidogyne* spp. were capable of infecting and reproducing rapidly, as indicated by the increase in nematode density in both soil and roots over time compared to the initial inoculation levels. The nematodes significantly affected plant growth, particularly in terms of reduced main stem length and the severity of root damage. From the inoculation level of 100 juveniles per 100 g soil and above, growth and physiological indicators began to decline significantly compared to control after 150 days of infection. The proportion of galled roots increased markedly, reaching 88,67% at the inoculation of 500 juveniles per 100 g of soil. The study determined that the damage threshold of *Meloidogyne* spp. for the Vinh Linh pepper variety under net house conditions is from 150 juveniles per 100 g of soil and above. From the density of 100 juveniles per 100 g of soil, it is determined as the warning threshold of nematodes for plants. These findings provide a critical basis for evaluating resistance, screening breeding materials, and developing effective nematode management strategies for black pepper production.

**Keywords:** *Black pepper, Vinh Linh pepper variety, infection level, damage threshold, Meloidogyne* spp. nematodes.

**Ngày nhận bài:** 13/5/2025

**Ngày chuyển phản biện:** 20/5/2025

**Ngày thông qua phản biện:** 24/5/2025

**Ngày duyệt đăng:** 27/6/2025

## THỂ LỆ VIẾT VÀ GỬI BÀI

1. Tạp chí Nông nghiệp và Môi trường đăng tải các bài báo khoa học công bố các công trình nghiên cứu khoa học có nội dung khoa học mới, các bài tổng quan về ngành nông nghiệp và môi trường chưa gửi đăng ở bất kỳ loại hình báo chí nào.

2. Bài báo có thể viết bằng tiếng Việt (đăng trên Tạp chí bằng ngôn ngữ tiếng Việt) hoặc tiếng Anh (đăng trên Tạp chí bằng ngôn ngữ tiếng Anh), soạn thảo trên máy vi tính, các dòng cách nhau bằng 1,2 (Paragraph/Line spacing Multiple at 1,2), sử dụng font chữ Times New Roman, cỡ chữ 12, có độ dài không quá 10 trang giấy khổ A4 bao gồm cả tài liệu tham khảo.

3. Từ khóa được trình bày theo thứ tự alphabet, từ 3 - 5 từ. Từ khóa bằng tiếng Việt và tiếng Anh phải cùng nội dung, ý nghĩa của từ. Phần tóm tắt có độ dài không quá 350 từ viết liền, không xuống dòng, cỡ chữ 10, bao gồm: Nêu ngắn gọn về mục đích, phương pháp nghiên cứu, kết quả nghiên cứu chính. Bài báo viết bằng tiếng Việt phải có tóm tắt bằng cả tiếng Anh, tiếng Việt và không khác biệt về nội dung, ý nghĩa.

4. Bài báo phải được trình bày theo thứ tự sau: Tên bài báo bằng tiếng Việt và tiếng Anh, (các) tác giả, tên cơ quan của (các) tác giả, tóm tắt, từ khóa, nội dung của bài báo, lời cảm ơn (nếu có), tài liệu tham khảo. Tác giả liên hệ phải được chỉ rõ cùng với địa chỉ cơ quan, Email, số điện thoại trên trang nhất của bản thảo. Tên riêng tiếng Việt phải có đủ dấu thanh kể cả các bài viết bằng tiếng Anh.

5. Tài liệu tham khảo được trình bày theo thứ tự trích dẫn và đánh số đặt trong ngoặc vuông theo thứ tự xuất hiện trong bài báo và trong danh mục tài liệu tham khảo.

*+ Đối với các tài liệu là bài báo trong Tạp chí ghi đầy đủ theo thứ tự:* Tên tác giả, năm xuất bản, tên bài báo, tên tạp chí, tập, số, trang.

*+ Đối với các tài liệu là sách ghi đầy đủ theo thứ tự:* Tên tác giả, năm xuất bản, tên sách, nhà xuất bản, nơi xuất bản.

Nếu bài viết bằng tiếng Anh, tài liệu tham khảo nào không phải bằng tiếng Anh thì phải dịch ra tiếng Anh và chú thích ngôn ngữ gốc trong ngoặc đơn.

6. Tạp chí Nông nghiệp và Môi trường thực hiện quy trình gửi bài, quy trình phản biện online trên hệ thống phần mềm của Tạp chí và sử dụng cơ sở dữ liệu các số Tạp chí đã xuất bản, đề nghị các cộng tác viên, phản biện bài báo và bạn đọc truy cập vào website: <http://www.tapchinongnghiep.vn> và thực hiện các thủ tục theo hướng dẫn.

7. Chi tiết xin liên hệ: Tạp chí Nông nghiệp và Môi trường; Số 10 Nguyễn Công Hoan, Ba Đình, Hà Nội; Điện thoại: 024.37711070; 024.38345457; 024.37716634. Email: [bbtnongnghiep@gmail.com](mailto:bbtnongnghiep@gmail.com).

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729

730

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805

806

807

808

809

810

811

812

813

814

815

816

817

818

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828

829

830

831

832

833

834

835

836

837

838

839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859

860

861

862

863

864

865

866

867

868

869

870

871

872

873

874

875

876

877

878

879

880

881

882

883

884

885

886

887

888

889

890

891

892

893

894

895

896

897

898

899

900

901

902

903

904

905

906

907

908

909

910

911

912

913

914

915

916

917

918

919

920

921

922

923

924

925

926

927

928

929

930

931

932

933

934

935

936

937

938

939

940

941

942

943

944

945

946

947

948

949

950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

964

965

966

967

968

969

970

971

972

973

974

975

976

977

978

979

980

981

982

983

984

985

986

987

988

989

990

991

992

993

994

995

996

997

998

999

1000