TUYỂN CHỌN VÀ NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG VỚI NẤM *Phytophthora* GÂY BỆNH TRÊN MỘT SỐ LOẠI CÂY ĂN QUẢ

Phạm Hồng Hiển[1], Đào Ngô Tú Quỳnh[2], Nguyễn Thị Diệu Hương[2], Nguyễn Thị Chúc Quỳnh[3], Phùng Quang Tùng[2,3], Bạch Thị Điệp[3], Nguyễn Xuân Cảnh[2]

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn, xác định đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Phytophthora* gây bệnh trên một số loại cây cây ăn quả. Từ 60 chủng xạ khuẩn có nguồn gốc khác nhau, bằng phương pháp đồng nuôi cấy trên đĩa thạch đã sàng lọc và xác định được chủng xạ khuẩn số 24 có khả năng đối kháng với nấm *Phytophthora* chủng RD2. Chủng 24 thể hiện hoạt tính kháng nấm rất mạnh, có khả năng ức chế 50% sự phát triển của hệ sợi nấm khi so với mẫu đối chứng sau 03 ngày nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu một số đặc điểm sinh học cho thấy chủng 24 có khả năng tạo chuỗi bào tử dạng thẳng sau 03 ngày nuôi cấy, sinh sắc tố melanin rất mạnh trên môi trường ISP-6, sinh trưởng tốt ở ngưỡng nhiệt độ 30°C - 40°C, pH trung tính đến kiềm và chịu được nồng độ muối thấp dưới 1%. Chủng 24 có khả năng sử dụng một số nguồn các bon và ni tơ khác nhau bao gồm sucrose, fructose, cellulose, raffinose, cao thịt bò, pepton và KNO_3. Căn cứ vào các đặc điểm hình thái và nuôi cấy có thể xác định chủng xạ khuẩn 24 thuộc vào chi *Streptomyces*.

Từ khóa: Xạ khuẩn (*Streptomyces* sp.), *Phytophthora,* tuyển chọn, cây ăn quả

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây ăn quả là nhóm cây trồng cho giá trị về kinh tế cao, tuy nhiên trong quá trình canh tác có rất nhiều tác nhân gây hại ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng sản phẩm. Nấm bệnh là một trong những nhóm tác nhân quan trọng nhất, một số loại nấm gây bệnh trên cây ăn quả điển hình có thể kể ra như nấm gây thối rễ, thán thư, đốm lá, cháy lá, đốm vòng. Trong số này bệnh do một số loài thuộc chi nấm *Phytophthora* gây nên được xem là nguy hiểm hơn cả (Mai Văn Trị và *ctv.*, 2016). Khi cây phát bệnh có những triệu chứng như héo rũ, úa vàng, lá và quả bị rụng, ở phần tiếp giáp của gốc thân cây với mặt đất có hiện tượng bị úng thành mảng và lan dần ra khắp chu vi thân, vết bệnh đổi sang màu nâu hoặc đen rồi bị thối đi. Bệnh có thể nhanh chóng lây lan ra các cây bên cạnh do chủng nấm dễ dàng phát tán khi gặp nước (Everett *et al.*, 2012). Ở cây con hay cây đang được ươm khó phát hiện bị nhiễm bệnh tuy nhiên nấm ẩn sâu trong đất khi gặp điều kiện thuận lợi sẽ phát bệnh làm giảm năng suất cây cũng như chất lượng của cây (Dunstan *et al.*, 2016).

Bệnh do *Phytophthora* khá phổ biến ở vùng nhiệt đới ẩm và gây nhiều nguy hiểm làm mất mùa ở nhiều loại cây ăn quả quan trọng ở những vùng này như bệnh thối rễ, thối cổ rễ, loét thân, tàn lụi lá và thối trái. Nấm *Phytophthora* đã gây rất nhiều bệnh trên nhiều loại cây trồng khác nhau: đen vỏ cacao, thối thân và trái đu đủ, thối rễ và tàn lụi trên cam quýt, thối chồi trên bơ, sọc đen trên cao su, thối rễ, loét thân sầu riêng, chết nhanh trên tiêu (Dương Minh và *ctv.,* 2006; Lê Quang Luân và *ctv.,* 2014; Mai Văn Trị và *ctv.*, 2016). Trên cây tiêu, dòng nấm *Phytophthora* gây hại được xác định là nấm *Phytophthora capsici* gây hại chủ yếu trong mùa mưa, nhất là vào cuối mùa mưa khi có khí hậu ấm và ẩm. Nấm *Phytophthora* sp. có thể tấn công riêng lẻ nhưng đa số có sự kết hợp với các nấm khác như *Fusarium, Pythium* và *Rhizoctonia* (Everett *et al.*, 2012; Kroon *et al.*, 2012). Mặc dù đã có nhiều biện pháp khắc phục tình trạng bệnh gây hại tuy nhiên các biện pháp này còn chưa hiệu quả triệt để. Vậy nên cần có một nghiên cứu cụ thể và chính xác hơn để tạo ra một biện pháp hữu hiệu hơn để có thể khống chế được nguồn bệnh này (Lê Quang Luân và *ctv.,* 2014). Đấu tranh sinh học được xác định là nền tảng của chương trình quản lý dịch hại tổng hợp với chiến lược sử dụng các tác nhân sinh học để hạn chế sự phát triển của các quần thể vi sinh vật gây bệnh. Trong số các tác nhân sinh học thường được sử dụng để ức chế vi sinh vật gây bệnh, xạ khuẩn là nhóm có nhiều tiềm năng nhất, nhiều chủng xạ khuẩn có khả năng sinh chất có hoạt tính kháng nấm mạnh. Vì vậy, việc tìm kiếm các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh chất kháng nấm bệnh cây có thể góp phần vào công tác bảo vệ cây trồng và xây dựng nền nông nghiệp an toàn và bền vững.

[1] Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam
[2] Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam; [3] Viện Bảo vệ thực vật

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng nấm *Phytophthora* RD2 phân lập từ đất vùng rễ cây đu đủ bị bệnh và đã được xác định là có khả năng gây bệnh trên một số loại cây gồm đu đủ, cam, chanh, sầu riêng. Các chủng xạ khuẩn phân lập từ nhiều nguồn khác nhau được lưu trữ tại phòng thí nghiệm Bộ môn Công nghệ Vi sinh, Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng nấm Phytophthora

Việc sàng lọc và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn được thực hiện bằng phương pháp đồng nuôi cấy trên đĩa môi trường (Nguyễn Xuân Cảnh và *ctv.*, 2018). Xạ khuẩn và nấm cùng được cấy trên đĩa petri chứa môi trường Gause-1 và PGA, nuôi ở 30°C. Sau 03 ngày nuôi cấy, kiểm tra sự phát triển của tản nấm và đánh giá khả năng ức chế của xạ khuẩn.

2.2.2. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn

Các nghiên cứu nhằm xác định một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn tiếp tục được thực hiện bao gồm: Xác định hình thái, kích thước khuẩn lạc; Xác định hình thái chuỗi sinh bào tử và bề mặt bào tử; Kiểm tra khả năng sinh sắc tố melanin; Kiểm tra khả năng đồng hóa các nguồn các bon và ni tơ; Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, nồng độ NaCl tới sinh trưởng và phát triển. Các nghiên cứu này được thực hiện theo các phương pháp đã mô tả chi tiết trong các công bố trước đây (Nguyễn Xuân Cảnh và *ctv.*, 2018).

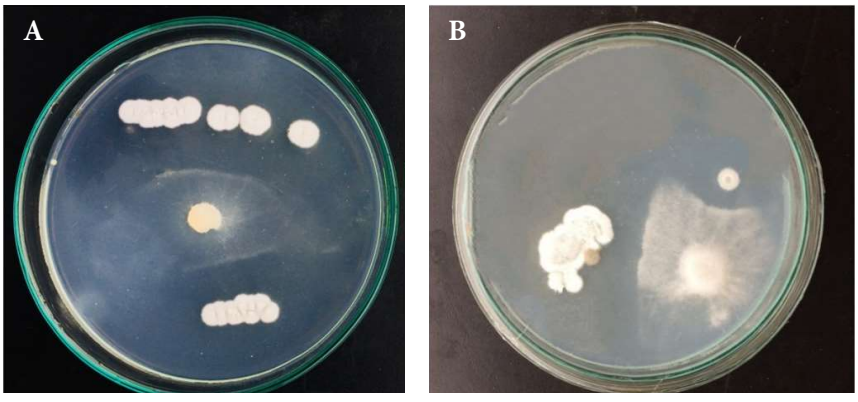
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam từ tháng 6/2018 - tháng 6/2019.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Phytophthora*

Để xác định hoạt tính kháng nấm *Phytophthora* chủng RD2, phương pháp đồng nuôi cấy trên đĩa môi trường thạch đã được thực hiện. Các chủng xạ khuẩn thử nghiệm và chủng nấm RD2 cùng được cấy trên hai loại môi trường khác nhau; môi trường Gause-1 thích hợp cho xạ khuẩn và môi trường PGA thích hợp cho vi nấm phát triển. Các đĩa môi trường được nuôi trong tủ ấm ở 30°C, khả năng ức chế sinh trưởng nấm của các chủng xạ khuẩn được đánh giá sau 03 ngày. Từ hơn 60 chủng xạ khuẩn, đã xác định được 02 chủng có hoạt tính kháng nấm *Phytophthora* chủng RD2, trong đó chủng số 24 có hoạt tính mạnh hơn. Kết quả đo bán kính tản nấm tại phía tiếp giáp với khuẩn lạc xạ khuẩn so với bán kính tản nấm ở phía không có xạ khuẩn xác định được chủng xạ khuẩn 24 có khả năng ức chế trên 50% sự sinh trưởng của nấm *Phytophthora* sau 03 ngày nuôi cấy. Chủng 24 thể hiện khả năng ức chế sinh trưởng của nấm trên cả hai loại môi trường thử nghiệm (Hình 1).



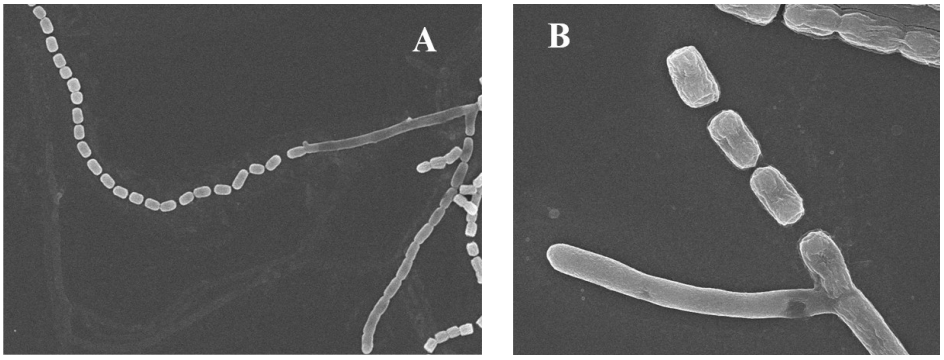
Hình 1. Hoạt tính kháng nấm *Phytophthora* của chủng xạ khuẩn 24 khi đồng nuôi cấy trên môi trường Gause-1 (A) và môi trường PGA (B)

3.2. Đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn số 24

3.2.1. Đặc điểm hình thái

Trên môi trường Gause-1 khi nuôi ở 30°C sau 03 ngày khuẩn lạc chủng 24 có dạng tròn, màu trắng, bề mặt thô ráp và hơi xốp, đường kính khá lớn khoảng 3 - 5 mm (Hình 1A). Nghiên cứu xác định hình dạng cuống sinh bào tử, chuỗi bào tử và bề mặt bào tử của chủng 24 cho thấy sau 36 h nuôi cấy chủng xạ khuẩn này bắt đầu hình thành bào tử.

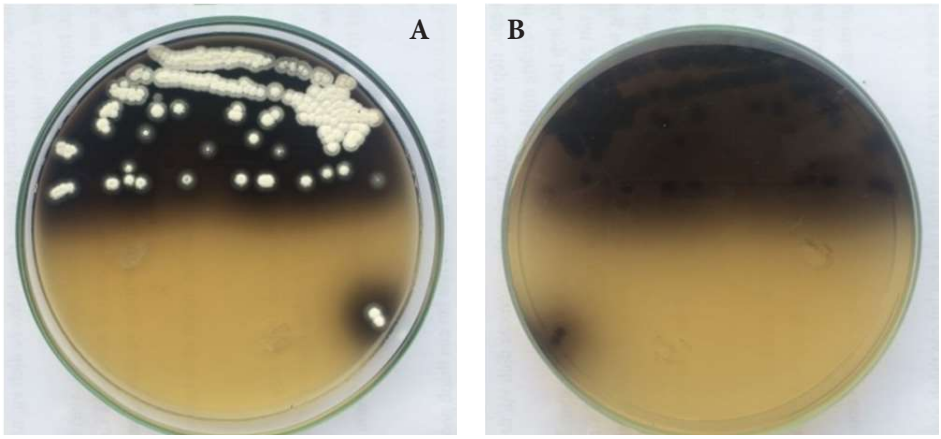
Các bào tử được sắp xếp thành từng chuỗi thẳng và dài, trên mỗi chuỗi chính các nhánh ngắn. Sau 60 h nuôi cấy bào tử bắt đầu phân cắt tách rời khỏi chuỗi và phát tán vào môi trường. Ở độ phóng đại 4000 lần dưới kính hiện vi điện tử quét (SEM) có thể dễ dàng quan sát thấy chuỗi bào tử dạng thẳng, trên mỗi chuỗi chính có khoảng 25 - 40 bào tử, ở một số chuỗi chính xuất hiện sự phân nhánh, các nhánh này cũng có dạng thẳng mỗi nhánh có khoảng 08 - 15 bào tử (Hình 2A). Bào tử chủng 24 có dạng hình bầu dục, bề mặt nhăn, kích thước dao động từ 1,4 - 1,8 × 7,0 - 8,0 µm (Hình 2B).



Hình 2. Hình thái chuỗi sinh bào tử và bề mặt bào tử của chủng 24 dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) ở độ phóng đại 4.000 lần (A) và 12.000 lần (B)

3.2.2. Khả năng hình thành sắc tố Melanin

Chủng 24 được nuôi cấy trên môi trường ISP-6 ở 30°C và quan sát sự thay đổi màu sắc môi trường nuôi cấy. Kết quả cho thấy sau 24 giờ nuôi cấy, trên môi trường tại vị trí có chủng xạ khuẩn đã xuất hiện sự thay đổi màu sắc từ vàng sang đen. Sang ngày nuôi cấy thứ 3 màu của môi trường đã có sự biến đổi rõ rệt, điều này cho thấy chủng xạ khuẩn 24 có khả năng sinh sắc tố melanin rất mạnh. Đây là một đặc điểm rất quan trọng khi thực hiện các nghiên cứu định danh xạ khuẩn (Shirling and Gottlieb, 1966).



Hình 3. Sự hình thành sắc tố melanin của chủng 24 khi nuôi cấy trong môi trường ISP-6 ở 30^0C sau 03 ngày, ảnh chụp mặt trước (A) và mặt sau (B) của đĩa nuôi cấy

3.2.3. Khả năng sử dụng các nguồn đường và ni tơ của chủng 24

Chủng 24 được nuôi cấy trên môi trường ISP-9 có bổ sung các nguồn đường khác nhau sau đó kiểm tra khả năng phát triển của chủng này. Kết quả cho thấy chủng này có khả năng đồng hóa tốt các nguồn đường như sucrose, fructose nhưng không đồng hóa các nguồn đường D-xylose, L-arabinose và inositol (Bảng 1). Nghiên cứu xác định khả năng sử dụng các nguồn ni tơ khác nhau của chủng 24 được thực hiện bằng các nuôi chủng này trên môi trường Starch Nitrate với nguồn $NaNO_3$ được thay thế bằng các nguồn ni tơ khác nhau. Kết quả cho thấy chủng chủng 24 có khả năng sử dụng nguồn ni tơ từ các nguồn khác nhau như cao thịt bò, pepton, KNO_3 (Bảng 1).

Bảng 1. Khả năng sử dụng các nguồn cacbon và ni tơ khác nhau của chủng 24

Nguồn cacbon	Khả năng phát triển của chủng 24 sau 03 ngày nuôi cấy	Nguồn ni tơ	Khả năng phát triển của chủng 24 sau 03 ngày nuôi cấy
Sucrose	+++	$NaNO_3$	+++
R-Hannose	±	KNO_3	+++
Cellulose	++	Cao thịt bò	++
Fructose	+++	NH_4Cl	+
L-arabinose	-	Pepton	++
Raffinose	+	$(NH_4)_2SO_4$	+
D-xylose	-	NH_4NO_3	±
Inositol	-		
D-manitol	±		

Ghi chú: (++) Chủng 24 có khả năng sử dụng tốt nguồn các bon hoặc ni tơ; (+) chủng 24 có khả năng sử dụng nguồn các bon hoặc ni tơ; (±) không xác định được khả năng sử dụng nguồn các bon hoặc ni tơ cho chủng 24; (-) chủng 24 không có khả năng sử dụng nguồn các bon hoặc ni tơ.

3.2.4. Khả năng thích nghi với một số điều kiện môi trường của chủng 24

Nhằm mục đích cung cấp thông tin về điều kiện nuôi cấy của chủng 24 các nghiên cứu khảo sát các yếu tố môi trường đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng xạ khuẩn này đã được thực hiện. Chủng xạ khuẩn 24 được nuôi trên trên môi trường Gause-1 ở các điều kiện nhiệt độ, pH và các nồng độ muối khác nhau. Khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng này sau 05 ngày nuôi cấy đã được kiểm tra, kết quả được tổng hợp trong bảng 2. Kết quả cho thấy chủng xạ khuẩn 24 có khả năng năng thích nghi với các điều kiện nuôi cấy khá khắc nhiệt như có thể chịu được nhiệt độ lên tới 45°C, pH12 hay nồng độ muối tới 4%. Tuy nhiên phát triển tốt trong điều kiện nhiệt độ từ 30°C - 40°C, thích hợp với môi trường trung tính và kiềm với khoảng pH từ 7 - 10 và nồng độ NaCl dưới 1%.

Bảng 2. Ảnh hưởng của một số điều kiện môi trường đến sự phát triển của chủng xạ khuẩn 24

Yếu tố	Khoảng tối ưu	Khoảng chịu đựng
Nhiệt độ (°C)	30 - 40	25 - 45
NaCl (%)	0 - 1	0 - 4
pH	7 - 10	6 - 12

IV. KẾT LUẬN

Đã xác định được chủng xạ khuẩn số 24 trong số 60 chủng xạ khuẩn khác nhau có khả năng đối kháng cao với chủng nấm gây bệnh *Phytophthora* RD2. Đã thực hiện các nghiên cứu xác định đặc điểm sinh học bao gồm hình thái khuẩn lạc, cuống sinh bào tử, bào tử, khả năng tổng hợp melanin của chủng xạ khuẩn 24, căn cứ vào các đặc điểm này có thể xếp chủng 24 thuộc chi *Streptomyces*.

Nghiên cứu cũng đã xác định các điều kiện thích hợp cho nuôi cấy chủng xạ khuẩn 24 bao gồm khả năng đồng hóa nguồn cacbon và ni tơ, các điều kiện nhiệt độ, pH và nồng độ muối phù hợp cho nuôi cấy.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí của đề tài "*Nghiên cứu công nghệ sản xuất và ứng dụng chế phẩm sinh học tổng hợp kiểm soát bệnh vàng lá, thối rễ và chảy gôm trên một số loại cây ăn quả*", thuộc chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học nông nghiệp phát triển nông thôn đến năm 2020. Nhóm tác giả xin chân thành cám ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Xuân Cảnh, Lê Thị Chinh, Phạm Hồng Hiển, Trịnh Thị Vân, 2018. Tuyển chọn và nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng nấm *Aspergillus flavus* gây bệnh trên cam quýt. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 18 (6): 52-55.

Dương Minh, Võ Thị Gương, Lê Phước Thạnh, Hồ Văn Thiệt, 2006. Tác động của các chủng nấm đối kháng Trichoderma nội địa trong việc phòng trị bệnh Phytophthora palmivora gây hại sầu riêng tại Cần Thơ và Bến Tre. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*, 6: 154-161.

Lê Quang Luân, Nguyễn Huỳnh Phương Uyên, Phan Hồ Giang, 2014. Nghiên cứu hiệu ứng kháng nấm

Phytophthora capsici gây bệnh chết nhanh ở cây hồ tiêu của chế phẩm nano bạc-chitosan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ. *Tạp chí sinh học*, 36 (1se): 152-157.

Mai Văn Trị, Nguyễn Lộc Hiền, Nguyễn Thị Nguyên Vân, Huỳnh Kỳ, 2016. *Phytophthora cinnamomi* Rands gây thối rễ và loét thân cây bơ ở miền Đông Nam Bộ. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*, 45b: 64-69.

Dunstan, W. A., Howard, K., StJ Hardy, G. E., & Burgess, T. I., 2016. An overview of Australia's Phytophthora species assemblage in natural ecosystems recovered from a survey in Victoria. *IMA fungus*, 7 (1): 47-58.

Everett, M.H., Paul, W.R., and Wendy S., 2012. Phytophthora beyond Agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 50: 359-378.

Kroon, L.P., Brouwer. H., de Cock, A.W., Govers, F., 2012. The genus Phytophthora anno 2012. *Phytopathology,* 102 (4): 348-364.

Shirling, E.B. & Gottlieb D., 1966. Methods for characterization of Streptomyces species. *International Journal of Systematic Bacteriology,* 16: 313 - 340.

Screening and characterization of actinomyces strain with bioactivity against *Phytophthora* fungi causing diseases on fruit trees

Pham Hong Hien, Dao Ngo Tu Quynh, Nguyen Thi Dieu Huong, Nguyen Thi Chuc Quynh, Phung Quang Tung, Bach Thi Diep, Nguyen Xuan Canh

Abstract

The study aimed to screen and identify the actinomyces trains that are capable of antagonism to *Phytophthora* causing diseases on fruit trees. Actinomyces strain number 24 was identified to be capable of antagonism to *Phytophthora* RD2 from 60 diffrent actinomyces strains by using the co-culture method on agar medium plate. The strain number 24 had strong activity with 50% inhibition of fungus growth after 03 days. The 24 strain was capable to produce the straight spore chains after 03 days of culture, strongly induced the soluble pigments on ISP-6 medium, grew well at temperatures between 30 - 40°C and neutral to base pH, and adapted to low salt concentration medium. The 24 strain could use some carbon and nitrogen sources including sucrose, fructose, cellulose, raffinose, meat extract, peptone and KNO_3. Based on morphology, culture, physiological, biochemical characteristics, the strain 24 was identified to belong to *Streptomyces* genus.

Keywords: Actinomyces (*Streptomyces* sp.), *Phytophthora*, screening, fruit tree

Ngày nhận bài: 26/7/2019
Ngày phản biện: 19/8/2019
Người phản biện: TS. Phạm Tuấn Anh
Ngày duyệt đăng: 9/9/2019

HIỆU LỰC CỦA MỘT SỐ THUỐC TRỪ SÂU NGUỒN GỐC SINH HỌC VÀ HÓA HỌC ĐỐI VỚI BỌ XÍT MUỖI HẠI CHÈ TẠI LÂM ĐỒNG

Nguyễn Thị Thanh Mai[1], Nguyễn Văn Toàn[2]

TÓM TẮT

Nghiên cứu về hiệu lực của một số thuốc trừ sâu trên chè tại Lâm Đồng, xác định: Hiệu lực thuốc có nguồn gốc sinh học trừ bọ xít muỗi tốt nhất trong các loại thuốc nghiên cứu là hoạt chất *Emamectin Benzoate 5%*. Sau 14 ngày trên giống chè Kim Tuyên hiệu lực đạt 74,59%, giống chè TB14 hiệu lực đạt 78,97. Khi sử dụng thuốc trên, không để lại dư lượng trên sản phẩm. Hiệu lực của thuốc hóa học tốt nhất trong các loại thuốc nghiên cứu là hoạt chất *Dinotefuran.* Sau 14 ngày trên giống chè Kim Tuyên hiệu lực đạt 85,87%, giống chè TB14 đạt 90,03%. Khi sử dụng thuốc trên, không để lại dư lượng trên sản phẩm.

Từ khóa: Hiệu lực, thuốc trừ sâu sinh học, thuốc hóa học, bọ xít muỗi hại chè

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây chè ở Lâm Đồng có vị trí quan trọng trong phát triển kinh tế xã hội của địa phương (UBND tỉnh Lâm Đồng, 2008). Để nâng cao giá trị gia tăng và phát triển bền vững cây chè, đẩy mạnh xuất khẩu, việc sản xuất chè đảm bảo chất lượng và vệ sinh an toàn thực phẩm được đặt lên hàng đầu. Trong đó, sản xuất nguyên liệu theo thực hành nông nghiệp

[1] Trường Cao đẳng Công nghệ và Kinh tế Bảo Lộc; [2] Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp miền núi phía Bắc