

## The synergistic effect of unsaturated fatty acid salts mixed with *Bacillus thuringiensis* against diamondback moth (*Plutella xylostella*)

Hoang Than Hoai Thu, Dao Van Hoang, Dinh Van Thanh

### Abstract

The activity of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* (Bt) has been found to be synergistically enhanced by the addition of unsaturated fatty acid salts, obtained from vegetable oils. The increased insecticidal activity of the Bt and synergist mixture was observed in the laboratory and field treatments of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). Bioassay indicated that using mixture products at the concentration of 2g/L the insects mortality increased 1.42 times more than single usage of Bt at 2.5 g/L respectively. The synergist factor was 1.42 and synergist ratio was 1/1.

**Key words:** Synergist, Bt, unsaturated fatty acid salt, diamondback moth (*Plutella xylostella*)

Ngày nhận bài: 16/5/2016

Ngày phản biện: 17/5/2016

Người phản biện: TS. Nguyễn Văn Liêm

Ngày duyệt đăng: 20/5/2016

## PHÁT HIỆN *Pythium helicoides* GÂY BỆNH THỐI GỐC RỄ CÂY HỒNG HOA TẠI HÀ NỘI

Hà Viết Cường<sup>1</sup>, Phạm Thị Thu Thủy<sup>2</sup>, Nguyễn Xuân Trường<sup>2</sup>, Cao Thị Hiền Chi<sup>3</sup>, Đinh Văn Lộc<sup>4</sup>

### TÓM TẮT

Cây Hồng hoa (*Carthamus tinctorius*) là loại cây dược liệu mới được trồng thử nghiệm gần đây tại Việt Nam. Điều tra đồng ruộng tại Trung tâm trồng và chế biến cây thuốc Hà Nội (Viện Dược liệu) đã xác định bệnh nghiêm trọng nhất trên cây này là bệnh thối gốc rễ. Bốn mẫu vi khuẩn, hai mẫu nấm *Fusarium* và một mẫu *Pythium* đã được phân lập từ cây bệnh. Kết quả lây nhiễm nhân tạo đã chứng tỏ chỉ mẫu *Pythium* gây bệnh cho cây. Phân tích đặc điểm hình thái và trình tự gen ITS đã xác định mẫu *Pythium* gây bệnh là loài *Pythium helicoides*.

**Từ khóa:** Hồng hoa, bệnh thối gốc rễ, nấm *Pythium helicoides*

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Hồng hoa (*Carthamus tinctorius*) là loại cây dược liệu họ cúc được trồng nhiều ở Ấn Độ, Trung Quốc, Nhật Bản và ở nhiều nước khác trên thế giới. Cây được trồng do có nhiều công dụng như để lấy dầu, chất tạo màu thực phẩm, làm dược liệu (Ekin, 2005; Emongor, 2010; Knowles, 1980; Norris *et al.*, 2009).

Do có giá trị kinh tế cao, gần đây, cây Hồng hoa đã được Trung tâm Nghiên cứu trồng và chế biến cây thuốc Hà Nội trực thuộc Viện Dược Liệu trồng thử nghiệm tại Trung tâm và một số địa điểm miền Bắc như Bắc Giang, Quảng Ninh, Phú Thọ.

Hồng hoa, cũng như nhiều cây trồng khác, bị nhiễm nhiều bệnh hại. Ít nhất 1 bệnh vi khuẩn, 15 bệnh nấm và 4 bệnh virus đã được công bố gây hại cây Hồng hoa (Klisiewicz, 1993). Trong số các bệnh trên, bệnh truyền qua đất do nấm và vi sinh vật giống

nấm là nhóm bệnh gây hại nặng nhất trên Hồng hoa và khó phòng chống (Pawar *et al.*, 2013).

Do Hồng hoa mới được trồng thử nghiệm tại Việt Nam nên thông tin về bệnh chưa sẵn có. Trên các ruộng Hồng hoa trồng thí nghiệm, nhiều cây đã bị nhiễm bệnh nhưng nguyên nhân chưa được xác định.

Mục tiêu chính của nghiên cứu này là xác định được nguyên nhân chính gây bệnh hại trên Hồng hoa trồng tại các ruộng trồng thử nghiệm tại Hà Nội.

### II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu bệnh được thu thập từ Trung tâm Nghiên cứu trồng và chế biến cây thuốc Hà Nội, trực thuộc Viện Dược liệu.

<sup>1</sup> Học viện Nông nghiệp Việt Nam; <sup>2</sup> Viện Dược liệu

<sup>3</sup> Viện Môi trường Nông nghiệp; <sup>4</sup> Công ty TNHH Thương mại và Dược phẩm Đông Á

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Điều tra đồng ruộng và nguồn cây bệnh

Điều tra đồng ruộng và thu thập mẫu cây bệnh được thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu trồng và chế biến cây thuốc Hà Nội trực thuộc Viện Dược Liệu năm 2012, 2013.

### 2.2.2. Phân lập và lây nhiễm vi khuẩn

**Phân lập:** Để phân lập vi khuẩn từ mẫu cây bệnh, các đoạn thân sát gốc và rễ (mô bệnh vẫn còn mới) của cây Hồng hoa được rửa sạch đất cát, khử trùng bề mặt bằng cồn sau đó đốt nhanh. Mô khử trùng bề mặt được cắt nhỏ, cho vào các ống Eppendorf chứa 100  $\mu$ l nước cất vô trùng. Sau 15 phút, dịch tiết ra từ cây Hồng hoa trong ống Eppendorf được cấy rìa 3 chiều trên môi trường King's B (15 mL/L glycerin, 20 g/L peptone, 1,5 g/L  $K_2HPO_4$ , 1,5 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 20 g/L agar, pH7) theo Lelliott et al. (1987). Các khuẩn lạc đơn sau đó được cấy truyền trên môi trường King's B.

**Lây nhiễm nhân tạo:** Vi khuẩn thuần sau cấy 24 giờ được hòa trong nước vô trùng và điều chỉnh nồng độ trong khoảng  $1,5 - 1,7 \times 10^{10}$  tế bào vi khuẩn/mL (tương đương CFU/mL) bằng cách đo OD ở bước sóng 600nm bằng máy spectrophotometer, với 1 đơn vị OD tương đương  $8 \times 10^8$  tế bào/mL. Mỗi cây lây nhiễm được tưới 2 mL dịch vi khuẩn vào gốc với 2 công thức sát thương rễ (dùng kim nhọn vô trùng chậm nhẹ 6-7 nốt trên rễ và gốc rễ, sau đó nhúng trong dịch khuẩn) và không sát thương (tưới trực tiếp dịch khuẩn vào gốc cây). Sự phát triển của bệnh được theo dõi thường xuyên và ghi kết quả sau 7, 14 và 21 ngày sau lây nhiễm.

### 2.2.3. Phân lập và lây nhiễm nấm *Fusarium*

**Phân lập:** Các đoạn thân sát gốc và rễ (mô bệnh vẫn còn mới) của cây Hồng hoa được rửa sạch đất cát, khử trùng bề mặt bằng cồn. Mẫu khử trùng bề mặt được rửa lại bằng nước vô trùng và thấm khô. Mỗi mẫu thân cây bệnh và 1-4 mẫu rễ (trên cùng cây) được đặt trên cùng 1 đĩa môi trường chọn lọc *Fusarium* (15 g/L Peptone, 1 g/L  $KH_2PO_4$ , 0,5 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 g/L Terachlor (chứa 75% Pentachloronitrobenzene), 1g/L Streptomycin sulfate, 0,12 g/L Neomycin sulfate, 20 g/L agar). Nấm thuần phân lập trên môi trường chọn lọc được cấy trên môi trường PDA (200 g/L khoai tây, 20 g/L đường Dextrose (D-glucose) và 20 g/L agar).

**Lây nhiễm nhân tạo:** Thí nghiệm lây nhiễm được thực hiện trong điều kiện chậu vại. Cây lây nhiễm được trồng trên đất khử trùng. Nhằm mục

đích tăng số lượng nguồn bào tử lây nhiễm và đảm bảo độ tính của nấm, nấm *Fusarium* thuần được cấy trên môi trường CLA (agar - lá cẩm chướng). Sau 6-7 ngày dùng que cấy nấm cạo toàn bộ nấm bám trên lá cẩm chướng và môi trường cho vào nước vô trùng. Nồng độ bào tử nấm được xác định bằng buồng đếm hồng cầu và điều chỉnh ở  $10^7$  bào tử/mL. Thông thường nấm *Fusarium* tấn công rễ cây trồng thông qua lỗ mở tự nhiên trên rễ hoặc vết thương. Vì vậy, để tăng khả năng xâm nhập và gây bệnh của nấm, phần gốc và rễ cây Hồng hoa được trực tiếp vào dịch bào tử nấm trước khi trồng trên đất. Cây lây nhiễm được theo dõi thường xuyên và ghi kết quả sau 7, 14, 21 và 28 ngày lây nhiễm.

### 2.2.4. Phân lập và lây nhiễm nấm trứng (*oomycetes*) từ đất và cây bệnh

**Phân lập:** Các vi sinh vật giống nấm gồm *Phytophthora* và *Pythium* từ đất và vết bệnh được phân lập trên môi trường chọn lọc là PDA1/2 (lượng đường và khoai tây giảm 50% so với môi trường PDA) chứa 10 ppm Pimaricin (ức chế các nấm truyền qua đất), 50 ppm Rifampicin (ức chế vi khuẩn Gram (+) và Gram (-)). *Phytophthora* và *Pythium* cũng được phân lập bằng phương pháp bẫy dùng quả táo và bầu (Erwin & Ribeiro, 1996). *Phytophthora* và *Pythium* thuần được nuôi cấy trên môi trường PDA.

**Lây nhiễm nhân tạo:** Thí nghiệm lây nhiễm được thực hiện trong điều kiện chậu vại. Cây lây nhiễm được trồng trên đất khử trùng. Ba viên môi trường PDA chứa nấm thuần (5-7 ngày sau cấy), kích thước  $\sim 1cm^2$ , được đặt đối xứng sát gốc cây. Cây lây nhiễm được tưới nước giữ ẩm để kích thích nấm sinh động bào tử. Cây lây nhiễm được theo dõi thường xuyên và ghi kết quả sau 1, 3, 5, 7, 14, 21 và 28 ngày lây nhiễm.

### 2.2.5. Xác định loài nấm gây bệnh bằng giải trình tự

**Tinh chiết DNA:** DNA tổng số được chiết từ mẫu nấm nuôi cấy trên môi trường PDA theo phương pháp CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) của Doyle & Doyle (1987). DNA được hòa trong 50  $\mu$ l đệm TE và bảo quản ở  $-20^\circ C$ .

**Phản ứng PCR và giải trình tự:** Hai mỗi ITS4 và ITS5 (White *et al.*, 1990) được sử dụng để nhân toàn bộ vùng ITS (Internal Transcribed Spacer) của gen mã hóa RNA ribosome của nấm. Phản ứng PCR được thực hiện với DreamTaq polymerase (hãng Fermentas) với nhiệt độ gắn mỗi ở  $50^\circ C$ . Sản phẩm PCR được tinh chiết từ gel agarose dùng kit tinh chiết AccuPrep Gel Purification Kit (Bioneer) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ DNA được

ước lượng bằng điện di agarose. Sản phẩm PCR tinh chiết được giải trình tự cả 2 chiều dùng môi PCR và gửi đọc tại hãng Macrogen (Hàn Quốc).

**Phân tích trình tự:** Trình tự mẫu được xác định danh tính khi so sánh với các chuỗi đã công bố từ trước nhờ phần mềm tìm kiếm BLAST tại NCBI (the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)).

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Triệu chứng gây hại

Theo dõi trên các ruộng trồng Hồng hoa tại Trung tâm Nghiên cứu trồng và chế biến cây thuốc (Viện Dược liệu) cho thấy dịch hại nguy hiểm nhất trên cây dược liệu này là bệnh bệnh thối gốc rễ. Bệnh nghiêm trọng cả về mức độ gây hại và phổ biến.



Các quan sát triệu chứng trên đồng ruộng cho thấy tác nhân gây bệnh thuộc nhóm truyền qua đất (soil-borne diseases) nên việc xác định chính xác tác nhân gây bệnh cũng như phòng chống hiệu quả rất phức tạp.

Triệu chứng bệnh khá đa dạng, bắt đầu xuất hiện ở giai đoạn cây con (tháng 2-3). Triệu chứng điển hình là phần gốc, rễ bị thối hỏng. Ngoài ra, trên cây con có các vết thâm nâu tại phần thân tiếp xúc với mặt đất (đoạn thân không phát triển theo chiều thẳng đứng mà hơi cong lại tiếp xúc với mặt đất). Lúc đầu vết bệnh có màu thâm đen 1 bên thân sau đó lan xung quanh thân tại điểm có vết bệnh. Theo thời gian sinh trưởng của cây, vết bệnh tiếp tục lan dần đến ngọn cây tạo thành những vết bệnh lớn liên kết mầu vàng nâu hoặc nâu đậm. Vết bệnh lan ra cả cuống và gân chính lá. Khi bệnh nặng, thân cây mục rỗng, quắt lại chỉ còn vỏ. Toàn bộ bộ lá, kể cả lá ngọn bị khô héo, cây có thể chết (Hình 1).



Hình 1. Triệu chứng bệnh thối gốc rễ Hồng hoa tại Trung tâm trồng và chế biến cây thuốc (Viện Dược liệu)

#### 3.2. Phân lập vi khuẩn, nấm và vi sinh vật giống nấm

Bệnh thối gốc rễ trên các cây dược liệu nói riêng và cây trồng cạn nói chung do nhiều nguyên nhân gây ra như nấm, vi khuẩn, tuyến trùng. Dựa vào triệu chứng điển hình của cây bị bệnh, 2 nhóm tác nhân gây bệnh là nấm, vi sinh vật giống nấm và vi khuẩn được nghi ngờ là tác nhân gây bệnh.

Từ 2 mẫu cây bệnh bệnh điển hình, 4 mẫu vi khuẩn khác nhau về đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên môi trường King's B (kích thước, độ nhày, màu sắc, độ lồi, rìa) đã được phân lập. Các mẫu vi khuẩn được ký hiệu là V1C, V2C, V3C, V4C (Bảng 1).

Từ 7 cây bệnh điển hình và 2 mẫu đất vùng rễ cây bệnh, 2 mẫu *Fusarium* (ký hiệu là FuI và FuII) và 1 mẫu *Pythium* (ký hiệu là Py1) đã được phân lập (Bảng 1).

Bảng 1. Kết quả phân lập vi sinh vật từ cây Hồng hoa bị bệnh thối gốc rễ tại Trung tâm trồng và chế biến cây thuốc Hà Nội (Viện Dược liệu)

Nhóm vi sinh vật	Số mẫu phân lập		Số loại vi sinh vật phân lập được
	Cây	Đất	
Vi khuẩn	2	0	4 (V1C, V2C, V3C và V4C)
Nấm <i>Fusarium</i>	7	2	2 (FuI và FuII)
<i>Phytophthora</i>			0
<i>Pythium</i>			1 (Py1)

### 3.3. Lây nhiễm nhân tạo

Tất cả 4 mẫu vi khuẩn, 2 mẫu nấm *Fusarium* và 1 mẫu *Pythium* được lây nhiễm trên cây Hồng hoa để xác định nguyên nhân gây bệnh.

Kết quả lây nhiễm 4 mẫu vi khuẩn, V1C, V2C, V3C và V4C, cho thấy ở cả 2 công thức, gây tổn thương và không gây tổn thương, các cây lây nhiễm đều phát triển bình thường giống như các cây đối chứng không lây nhiễm.

Lây nhiễm với 2 mẫu nấm *Fusarium*, FuI và FuII, cũng cho kết quả tương tự. Tất cả các cây lây nhiễm đều không biểu hiện triệu chứng nhiễm bệnh. Để chắc chắn nấm *Fusarium* không phải là nguyên nhân gây bệnh, các cây thí nghiệm (sau lây nhiễm 28 ngày) được rửa sạch nhằm kiểm tra rễ và mạch dẫn. Quan sát cho thấy gốc, rễ và mạch dẫn phần gốc thân của cây lây nhiễm tương tự như của cây đối chứng.

Dựa trên kết quả lây nhiễm nhân tạo, chúng tôi kết luận 4 mẫu vi khuẩn và 2 mẫu *Fusarium* phân

lập được không phải là nguyên nhân gây bệnh chết héo – thối thân Hồng hoa tại Trung tâm cây thuốc Hà Nội.

Lây nhiễm nhân tạo mẫu *Pythium*, Py1, trên cây Hồng hoa cho thấy sau khi lây nhiễm 1 ngày, trên cây Hồng hoa giai đoạn 7 ngày tuổi đã bắt đầu có triệu chứng bệnh tại vị trí đặt tản nấm. Trên cây 21 ngày tuổi thì triệu chứng xuất hiện ở ngày thứ 3 sau lây nhiễm (Bảng 2).

Nhằm khẳng định tác nhân gây bệnh do *Pythium* gây ra, chúng tôi tiếp tục tiến hành tái phân lập theo qui trình Koch. *Pythium* được tái phân lập từ cả 2 nguồn cây đối chứng và cây lây nhân tạo. Kết quả tái phân lập cho thấy *Pythium* chỉ phân lập được từ cây lây nhiễm nhân tạo mà không từ cây đối chứng.

Dựa trên kết quả thí nghiệm lây nhiễm và tái phân lập, chúng tôi kết luận *Pythium* là nguyên nhân gây bệnh chết héo - thối gốc rễ Hồng hoa tại Trung tâm cây thuốc Hà Nội.

**Bảng 2.** Kết quả lây nhiễm vi khuẩn và nấm trên cây Hồng hoa

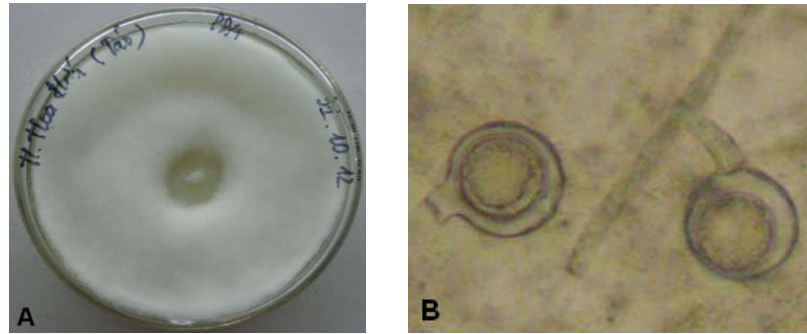
Nguồn vi sinh vật	Mẫu lây	Số cây thí nghiệm	Tuổi cây thí nghiệm (ngày)	Số cây biểu hiện triệu chứng tại ngày sau lây						
				1	3	5	7	14	21	28
Vi khuẩn	V1C	5	7	0	0	0	0	0	0	0
	V2C	5	7	0	0	0	0	0	0	0
	V3C	5	7	0	0	0	0	0	0	0
	V4C	5	7	0	0	0	0	0	0	0
	Đ/C	5	7	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusarium</i>	FuI	25	7	0	0	0	0	0	0	0
	FuII	10	7	0	0	0	0	0	0	0
	Đ/C	5	7	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pythium</i>	Py1	5	7	1	2	2	3	5	5	5
	Đ/C	5	7	0	0	0	0	0	0	0
	Py1	5	21	0	1	1	2	5	5	5
	Đ/C	5	21	0	0	0	0	0	0	0

### 3.4. Định danh *Pythium* gây bệnh trên cây Hồng hoa

#### 3.4.1. Đặc điểm hình thái *Pythium*

*Pythium* gây hại trên cây Hồng hoa là vi sinh vật giống nấm. Tản nấm nuôi cấy trên môi trường PDA có màu trắng, xốp, sinh trưởng rất nhanh, sau 3 ngày nuôi cấy có thể mọc kín đĩa môi trường PDA (đường kính 90 mm) ở nhiệt độ 30 ± 2 °C (Hình 2 A).

Bọc động bào tử (sporangium) gần hình cầu hoặc trứng ngược, có núm nhỏ, kích thước trung bình 35 x 28 µm, mọc ở đỉnh cành bọc hoặc mọc lỏng từ bên trong bọc động bào tử cũ. Bao trứng (oogonium) nhẵn, hình cầu, kích thước trung bình 34 µm. Bào tử trứng cũng hình cầu, kích thước trung bình 29 µm, tách biệt hẳn với vách bao trứng (aplerotic) (Hình 2 B).



**Hình 2.** Tảo (A) và bào tử với bào tử trứng bên trong (B) của *Pythium* sp. phân lập được trên cây Hồng hoa

**3.4.2. Giải trình tự vùng ITS của mẫu *Pythium* (Py1)**

DNA tinh chiết của mẫu *Pythium* (Py1) phân lập từ Hồng hoa được dùng để nhân vùng gen ITS dùng cặp mồi ITS4 và ITS5. Sản phẩm PCR có kích thước 0,8 kb giống như của các nấm trứng Oomycetes. Sản

phẩm PCR được tinh chiết từ kit thôi gel và được giải trình tự 1 chiều bằng mồi PCR (ITS4). Sản phẩm giải trình tự có kích thước ~ 800 nucleotide. Tuy nhiên chỉ 1 đoạn với kích thước 389 nucleotide có chất lượng tốt. Trình tự của đoạn đọc được này như sau:

AATTTGTGGCAGATGTGAGGTGTCTTGTGTTTGTCTGTGTCTTTGTTGATGCGGCGGGCAAGTC-CCTTGAAAGTCGGACGCGTATCTTTGCGTGCGTTGGGTGCCGGTGGGCTGTGGGACGCGTCT-GTTGACGAGTCTGGCGACCTTTGGCGCGTGCATGCTTGGGCACTGTGTATTGGCGGTATGTTAG-GCTGCGTTCGCGCGGCTTTGACAATGCAGCTGATGCGTGTGTTGGGCTGTGGTGTCTGTATGG-GTGAACCGGATGGTCGATGGGTTTATATGCGTTTCTCGTGTCTGTTTTATCCGGTGTCTCTG-TATCGTGCCTGGAGTGTGTCATCATTTGGGAATTTGTACGTCTTTTGTGTTTGGGGCGTATCT-CATTTGACCTGA.

Xác định trình tự tương đồng đã được thực hiện bằng phần mềm tìm kiếm trực tuyến (BLAST) dùng trình tự đọc được của mẫu *Pythium* (Py1) làm chuỗi hỏi (query). Kết quả tìm kiếm đã cho thấy tất cả các mẫu trên Ngân hàng gen gần gũi nhất với mẫu Py1 là

loài *Pythium helicoides*. Mức đồng nhất trình tự của đoạn so sánh từ 98-99% (Bảng 3).

Dựa trên kết quả tìm kiếm trên Ngân hàng Gen, chúng tôi kết luận mẫu *Pythium* (Py1) gây bệnh thối gốc rễ cây Hồng hoa là loài *Pythium helicoides*.

**Bảng 3.** Kết quả tìm kiếm trên Ngân hàng gen (GenBank) dựa trên trình tự ITS của mẫu Py1

STT	Loài	Mã truy cập	Phần trăm đoạn so sánh (%)	Mức đồng nhất trình tự (%)
1	<i>Pythium helicoides</i>	AB108029.1	97	99
2	<i>Pythium helicoides</i>	JX271802.1	100	98
3	<i>Pythium helicoides</i>	HQ643383.1	100	98
4	<i>Pythium helicoides</i>	AY598665.1	100	98
5	<i>Pythium helicoides</i>	AB108038.1	97	99

Ghi chú: Chỉ trình bày 5 mẫu GeneBank gần gũi nhất

*P. helicoides* là một tác nhân gây bệnh cây truyền qua đất điển hình, thích ứng với điều kiện nhiệt độ cao và có phổ ký chủ khá rộng (Watanabe *et al.*, 2005). Trên thế giới, tác nhân này đã gây được công bố gây bệnh thối gốc rễ trên nhiều loại cây như bệnh thối rễ và cổ rễ cây dâu tây ở Nhật Bản (Ishiguro *et*

*al.*, 2014), bệnh thối rễ cây *Tibouchina semidecandra* ở Đài Loan (Huang, 2009), bệnh thối rễ cây hoa hồng tỷ muội ở Nhật Bản (Kageyama *et al.*, 2002), cây rau răm ở Mỹ (Roskopf *et al.*, 2005).

Tại Việt Nam, loài nấm này cũng mới được phát hiện và ghi nhận là tác nhân gây bệnh thối rễ trên

cây vú sữa ở đồng bằng Sông Cửu Long (Nguyễn Văn Hòa *et al.*, 2013) và bệnh thối nõn cây mạch môn ở tỉnh Phú Thọ (Nguyễn Thế Hình, 2014).

#### IV. KẾT LUẬN

- Điều tra đồng ruộng cho thấy bệnh thối gốc rễ là bệnh nghiêm trọng nhất trên Hồng hoa.

- Đã phân lập được 4 mẫu vi khuẩn, 2 mẫu nấm *Fusarium* và 1 mẫu *Pythium* từ cây Hồng hoa bị bệnh. Các thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo cho thấy chỉ *Pythium* gây bệnh trên hồng hoa.

- Định danh phân tử đã xác định mẫu *Pythium* (Py1) là loài *Pythium helicoides*.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Thế Hình, 2014. Nghiên cứu sâu, bệnh, cỏ dại trong hệ thống trồng xen cây mạch môn (*Ophiopogon japonicus* Wall.) với cây trồng khác tại tỉnh Phú Thọ. *Luận án Tiến sĩ*.

Nguyễn Văn Hòa, Nguyễn Thành Hiếu, Đặng Thị Kim Uyên, Nguyễn Ngọc Anh Thư, Nguyễn Huy Cường và Đặng Thùy Linh, 2013. Nghiên cứu giải pháp phòng trừ bệnh thối rễ trên một số cây ăn quả đặc sản (cây có múi, vú sữa, sầu riêng và ổi) ở Đồng bằng Sông Cửu Long. *Hội thảo quốc gia về khoa học cây trồng lần thứ nhất*.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19, 11-15.

Ekin, Z., 2005. Resurgence of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) utilization: a global view. *Journal of Agronomy* 4, 83-87.

Emongor, V., 2010. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) the underutilized and neglected crop: A review. *Asian J Plant Sci* 9, 299-306.

Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K., 1996. *Phytophthora diseases worldwide: American Phytopathological Society* (APS Press).

Huang, J., 2009. First report of root rot of *Tibouchina semidecandra* caused by *Pythium helicoides* in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin* 18, 51-56.

Ishiguro, Y., Otsubo, K., Watanabe, H., Suzuki, M., Nakayama, K., Fukuda, T., Fujinaga, M., Suga, H. and Kageyama, K., 2014. Root and crown rot of strawberry caused by *Pythium helicoides* and its distribution in strawberry production areas of Japan. *Journal of general plant pathology* 80, 423-429.

Kageyama, K., Aoyagi, T., Sunouchi, R. and Fukui, H., 2002. Root rot of miniature roses caused by *Pythium helicoides*. *Journal of general plant pathology* 68, 15-20.

Roskopf, E., Yandoc, C., Stange, B., Lamb, E. and Mitchell, D., 2005. First report of *Pythium* root rot of rau ram (*Polygonum odoratum*). *Plant Disease* 89, 340-340.

Watanabe, H., Horinouchi, H., Tanahashi, I. and Kageyama, K., 2005. Occurrence of root rot of strawberry caused by *Pythium helicoides*, and pathogenicity to several crops (Abstract in Japanese). *Jpn J Phytopathol* 71, 209-210.

### Detecting pathogens *Pythium helicoides* root rot disease on safflower in Hanoi

Ha Viet Cuong, Pham Thi Thu Thuy, Nguyen Xuan Truong,  
Cao Thi Hien Chi, Dinh Van Loc

#### Abstract

Safflower (*Carthamus tinctorius*) is a medicinal plant that has recently been introduced and experimentally grown in Vietnam. Field surveys of trial safflower plants grown at the Research Centre of Medicinal Plants located in Hanoi (National Institute of Medicinal Materials) identified the crown and root rot disease is the most serious disease of this plant. Four bacterial isolates, two *Fusarium* isolates and one *Pythium* isolate were isolated from diseased plants. Inoculation experiments showed that only the *Pythium* isolate was pathogenic to safflower plants. Morphological and ITS (Internal Transcribed Spacer) analyses identified that the pathogenic *Pythium* isolate was *Pythium helicoides*.

**Key words:** Safflower, root rot disease, *Pythium helicoides*

Ngày nhận bài: 20/4/2016  
Người phản biện: TS. Nguyễn Thế Yên

Ngày phản biện: 22/4/2016  
Ngày duyệt đăng: 26/4/2016

# ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA CHẾ PHẨM VI SINH HX ĐỐI VỚI BỆNH HÉO XANH ỚT TẠI MÊ LINH, HÀ NỘI

Lê Thị Thanh Thủy<sup>1</sup>, Lê Như Kiều<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

Chế phẩm vi sinh HX sản xuất từ các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ĐKB1 và *Pseudomonas fluorescence* ĐKP1 đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum* và một số phụ gia khác. Mật độ tế bào mỗi chủng đạt  $10^8$  cfu/g sau 6 tháng bảo quản được sử dụng để phòng trị bệnh héo xanh cây ớt tại xã Tráng Việt, huyện Mê Linh, thành phố Hà Nội. Kết quả cho thấy, hiệu quả phòng bệnh héo xanh đạt 80,12 % và năng suất ớt tăng 19,74 %, lãi thuần tăng 57.300.000 đ/ha so với đối chứng. Điều này có thể minh chứng rằng, sử dụng chế phẩm vi sinh đối kháng HX phòng trừ bệnh héo xanh vi khuẩn trong sản xuất ớt đã đem lại hiệu quả kinh tế cao hơn so với không sử dụng chế phẩm. Bên cạnh đó còn có lợi ích từ việc giảm thiểu ô nhiễm môi trường do không sử dụng thuốc bảo vệ thực vật.

**Từ khóa:** *Ralstonia solanacearum*, bệnh héo vi khuẩn, vi khuẩn đối kháng, ớt

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây ớt thuộc họ cà (*Solanaceae*) có nguồn gốc từ Nam Mỹ, có hai nhóm phổ biến là ớt cay (*Capsicum annuum* L.) và ớt ngọt (*Capsicum annuum* var. *grossum*). Ở Việt Nam, ớt được sử dụng như một loại gia vị phổ biến và có vai trò quan trọng trong chế biến thực phẩm, đồng thời trong những năm gần đây ớt cũng là mặt hàng xuất khẩu có giá trị. Cây ớt được trồng quanh năm, nhưng vào mùa mưa ẩm ướt cây ớt hay bị bệnh, điển hình là các bệnh héo xanh vi khuẩn (HXVK) làm ảnh hưởng lớn tới năng suất và phẩm chất ớt. Cho đến nay chưa có biện pháp hữu hiệu nào có thể phòng trừ bệnh này. Sử dụng phân bón, thuốc hoá học bảo vệ thực vật (BVTV) đối với cây ớt làm giảm được sâu bệnh nhanh chóng nhưng gây tác động xấu đến môi trường và sức khoẻ cộng đồng. Biện pháp sinh học sử dụng vi sinh vật đối kháng trong phòng chống bệnh cây trồng đã được quan tâm và đầu tư rất lớn của nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới trong nhiều thập kỷ qua (Abdlwareth A. Almoneafy *et al.*, 2012; Sutanu Maji *et al.*, 2014; Yun Chen *et al.*, 2012).

Bài báo này trình bày kết quả sản xuất và đánh giá hiệu quả của chế phẩm vi sinh HX chứa các chủng vi sinh vật đối kháng vi khuẩn *R. solanacearum* trong sản xuất ớt tại xã Tráng Việt, huyện Mê Linh, thành phố Hà Nội.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn đối kháng *Bacillus subtilis* ĐKB1 và *Pseudomonas fluorescence* ĐKP1 được phân lập từ đất trồng cây họ đậu và họ cà tại huyện Mê Linh, Hà Nội; giống ớt ngọt Mỹ; các phụ gia sản xuất chế phẩm vi sinh, phân bón NPK.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Lựa chọn các chủng vi khuẩn đối kháng theo nguyên tắc có khả năng đối kháng cao với vi khuẩn *R. solanacearum*, không kìm hãm lẫn nhau, không gây độc cho người và môi trường, ổn định hoạt lực lâu.

- Sản xuất chế phẩm trên nền chất mang với nguyên liệu rẻ tiền (than bùn, gi đường, bột vỏ tôm cua) dễ sử dụng, dễ kiểm, thời gian bảo quản lâu, hoạt lực đối kháng ổn định hơn 6 tháng.

- Thử nghiệm đồng ruộng diện rộng để đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh héo xanh của chế phẩm vi sinh được thiết kế trên diện tích 2.000 m<sup>2</sup>, chia thành 2 lô thí nghiệm (Lô 1: Đối chứng - không xử lý chế phẩm vi sinh HX (chứa vi sinh vật đối kháng vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh); Lô 2 - bổ sung chế phẩm vi sinh HX. Nền phân bón theo khuyến cáo của khuyến nông địa phương cho 1 ha trồng ớt: 167,2 kg N, 62,37 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 110,4 kg K<sub>2</sub>O tương đương 368 kg urê, 368kg super lân, 184 kg kali clorua. Sử dụng chế phẩm HX với liều lượng 5 kg/1.000 m<sup>2</sup>. Trộn hạt với 1/5 lượng chế phẩm khi gieo cây con và số còn lại bón vào rãnh trước khi trồng.

Theo dõi hiệu quả của chế phẩm HX đến sinh trưởng, phát triển, khả năng phòng trừ bệnh héo xanh vi khuẩn, năng suất ớt và hiệu quả kinh tế. Đánh giá khả năng phòng trừ bệnh héo xanh vi khuẩn hại ớt (từ gieo đến thu hoạch): Điều tra năm điểm trên các lô đối chứng và thí nghiệm theo đường chéo, mỗi điểm điều tra dùng khung chụp 1 m<sup>2</sup> (tương đương 6 cây ớt được điều tra). Đếm tổng số cây bị bệnh từ khi trồng đến thu hoạch ở các lô thí nghiệm, tính tỉ lệ cây bệnh theo công thức.

<sup>1</sup> Viện Thổ nhưỡng Nông hóa